

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 537**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2016** **PCT/US2016/050543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017** **WO17044483**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2016** **E 16766444 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023** **EP 3347456**

54 Título: **Método para la diferenciación reproducible de células epiteliales del pigmento retiniano de calidad clínica**

30 Prioridad:

08.09.2015 US 201562215579 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.05.2024

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)**

**National Institutes of Health, Office of
Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard,
Suite 325 MSC 7660
Bethesda, MD 20852-7660, US y
FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BHARTI, KAPIL;
CHASE, LUCAS;
FENG, XUEZHU y
JHA, BALENDU, SHEKHAR**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 970 537 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la diferenciación reproducible de células epiteliales del pigmento retiniano de calidad clínica

5 **Antecedentes**

1. Campo

10 Esta descripción se refiere de manera general al campo de la biología de las células madre. Más particularmente, se refiere a métodos de producción eficiente de poblaciones de células epiteliales del pigmento retiniano derivadas de células madre para su uso como terapia celular.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La retina es una capa sensible a la luz de tejido que reviste la superficie interna del ojo. Las células fotorreceptoras, ya sean bastones o conos, en la retina son directamente sensibles a la luz y transforman señales de luz químicas en acontecimientos eléctricos que desencadenan impulsos nerviosos. El epitelio pigmentario retiniano (RPE) es una capa de células pigmentadas que forma la barrera hematorretiniana. Las células RPE desempeñan papeles importantes en el mantenimiento de la función visual y el transporte de iones, agua y productos finales metabólicos desde el espacio subretiniano hasta la sangre (Strauss *y col.*, 2005). Además, las células RPE establecen el privilegio inmunitario del ojo mediante la secreción de factores inmunosupresores. Un trastorno o lesión de las células RPE puede dar como resultado la degeneración de la retina, pérdida de función visual y ceguera. Varios trastornos de la retina, incluyendo degeneración macular aguda y relacionada con la edad y enfermedad de Best, implican la degeneración del RPE; por lo tanto, la terapia de reemplazo celular es una posible opción terapéutica para la conservación de la visión (Buchholz *y col.*, 2009).

En general, las células madre son células indiferenciadas que pueden dar lugar a una sucesión de células funcionales maduras. Por ejemplo, una célula madre hematopoyética puede dar lugar a cualquiera de los diferentes tipos de células sanguíneas diferenciadas de manera terminal. Las células madre embrionarias (ES) se derivan del embrión y son pluripotentes, poseyendo así la capacidad de desarrollarse para dar cualquier tipo de órgano o tejido, incluyendo células RPE.

La producción de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de células somáticas de ratón adultas en 2006 proporcionó un importante avance para la investigación de células madre, el desarrollo de fármacos, los modelos de enfermedad y los agentes terapéuticos celulares (Takahashi *y col.*, 2006). Las iPSC humanas pueden diferenciarse para dar tipos de células especializadas y tienen el potencial de células inmunocompatibles específicas de paciente para medicina regenerativa (Yu *y col.*, 2007). El documento US 2013/224156 describe un método para producir una célula de pigmento retiniano a partir de una célula madre pluripotente humana. El documento US 2015/159134 describe un método de diferenciación de iPSC.

Se ha demostrado que las iPSC dan lugar a células oculares, incluyendo células RPE (Hirami *y col.*, 2009). Sin embargo, todas las técnicas conocidas hasta la fecha para la producción de células RPE derivadas de iPSC o de ESC dependen del uso de una población inicial de cuerpos embrioides. Existe una falta de métodos para la producción eficiente a gran escala de células RPE derivadas de iPSC o de ESC necesarias para agentes terapéuticos, ensayos de cribado, modelos de enfermedad retiniana e investigación de biología de RPE.

Resumen

Desafortunadamente, la producción rutinaria y reproducible de los RPE a partir de células pluripotentes, tales como iPSC o ESC, a partir de una población inicial de cuerpos embrioides resulta problemática, debido al hecho de que el propio proceso de producción de cuerpos embrioides no es reproducible, tiene una eficiencia variable y no puede ajustarse a escala, lo que es necesario para la producción a escala comercial de RPE. La invención se define en las reivindicaciones. Se describen métodos para obtener una población de células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) que evitan el requisito de usar cuerpos embrioides y, en cambio, emplean poblaciones de suspensión de células individuales de células madre pluripotentes, en lugar de usar cuerpos embrioides. La población celular inicial de células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para la diferenciación de células madre pluripotentes para dar células epiteliales del pigmento retiniano (RPE). Por ejemplo, las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En una realización, se proporciona un método para producir células RPE humanas, que comprende (a) obtener una población inicial que comprende células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas que se disocian para dar células esencialmente individuales; (b) cultivar las iPSC en un medio de inducción retiniano para iniciar la diferenciación de las células para dar células de linaje retiniano; (c) cultivar adicionalmente las células de linaje retiniano en un medio de diferenciación retiniano para diferenciar adicionalmente las células de linaje retiniano; (d) cultivar las células en medio retiniano para formar células RPE en diferenciación; y (e) cultivar las células RPE en un medio de maduración de RPE, produciendo de ese modo células RPE humanas.

En algunas realizaciones, el método no incluye la formación de cuerpos embrioides. En algunos aspectos, las células RPE se crioconservan después de la producción.

En ciertos aspectos, las iPSC se cultivan en una matriz. En algunas realizaciones, la matriz comprende al menos una proteína de adhesión celular recombinante tal como laminina, vitronectina o fibronectina. Particularmente, la al menos una proteína de adhesión celular es humana.

En ciertos aspectos, las iPSC se cultivan sin una capa alimentadora. En algunos aspectos, las iPSC se cultivan en un medio de cultivo completamente definido. En otros aspectos, las iPSC se cultivan en un medio de cultivo libre de componentes xenogénicos.

En aspectos adicionales, el medio de inducción retiniano comprende un inhibidor de la ruta de WNT, un inhibidor de la ruta de BMP, un inhibidor de la ruta de TGF β y un factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1). En algunos aspectos, el inhibidor de la ruta de WNT se selecciona del grupo que consiste en diclorhidrato de N-(2-aminoetil)-5-cloroisquinolina-8-sulfonamida (CKI-7), N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-4-oxo-3-feniltieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP2), N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-3-(2-metoxifenil)-4-oxotieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP4), [(5-metil-2-furanil)metileno]hidrazida del ácido 2-fenoxibenzoico (PNU 74654), 2,4-diamino-quinazolina, quercetina, 3,5,7,8-tetrahidro-2-[4-(trifluorometil)fenil]-4H-tiopirano[4,3-d]pirimidin-4-ona (XAV939), 2,5-dicloro-N-(2-metil-4-nitrofenil)bencenosulfonamida (FH 535), N-[4-[2-etil-4-(3-metilfenil)-5-tiazolil]-2-piridinil]benzamida (TAK 715), proteína relacionada con Dickkopf uno (DKK1), y proteína relacionada con frizzled secretada (SFRP1) 1. Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de WNT es CKI-7. En ciertos aspectos, el inhibidor de la ruta de BMP es clorhidrato de 4-(6-(4-(piperazin-1-il)fenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)quinolina (LDN193189), diclorhidrato de 6-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-3-(4-piridinil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (dorsomorfina), 4-[6-[4-(1-metiletoxi)fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina (DMH1), 4-[6-[4-[2-(4-morfolinil)etoxi]fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina (DMH-2) o 5-[6-(4-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina (ML 347). Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de BMP es LDN193189. En ciertos aspectos, el inhibidor de la ruta de TGF β es 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (SB431542), 6-[2-(1,1-metiletil)-5-(6-metil-2-piridinil)-1H-imidazol-4-il]quinoxalina (SB525334), hidrato de clorhidrato de 2-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124), hidrato de 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)-benzamida, hidrato de 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida, factor de determinación izquierda-derecha (Lefty), 3-(6-metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida (A 83-01), 4-[4-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (D 4476), 4-[4-[3-(2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]-2-piridinil]-N-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-benzamida (GW 788388), 4-[3-(2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]-quinolina (LY 364847), 4-[2-fluoro-5-[3-(6-metil-2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]fenil]-1H-pirazol-1-etanol (R 268712) o 2-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina (RepSox). Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de TGF β es SB431542.

En algunos aspectos, el medio de diferenciación retiniano comprende un inhibidor de la ruta de WNT, un inhibidor de la ruta de BMP, un inhibidor de la ruta de TGF β , un inhibidor de MEK e IGF1. En algunos aspectos, el inhibidor de la ruta de WNT se selecciona del grupo que consiste en diclorhidrato de N-(2-aminoetil)-5-cloroisquinolina-8-sulfonamida (CKI-7), N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-4-oxo-3-feniltieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP2), N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-3-(2-metoxifenil)-4-oxotieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP4), [(5-metil-2-furanil)metileno]hidrazida del ácido 2-fenoxibenzoico (PNU 74654), 2,4-diamino-quinazolina, quercetina, 3,5,7,8-tetrahidro-2-[4-(trifluorometil)fenil]-4H-tiopirano[4,3-d]pirimidin-4-ona (XAV939), 2,5-dicloro-N-(2-metil-4-nitrofenil)bencenosulfonamida (FH 535), N-[4-[2-etil-4-(3-metilfenil)-5-tiazolil]-2-piridinil]benzamida (TAK 715), proteína relacionada con Dickkopf uno (DKK1), y proteína relacionada con frizzled secretada (SFRP1) 1. Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de WNT es CKI-7. En ciertos aspectos, el inhibidor de la ruta de BMP es clorhidrato de 4-(6-(4-(piperazin-1-il)fenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)quinolina (LDN193189), diclorhidrato de 6-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-3-(4-piridinil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (dorsomorfina), 4-[6-[4-(1-metiletoxi)fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina (DMH1), 4-[6-[4-[2-(4-morfolinil)etoxi]fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina (DMH-2) o 5-[6-(4-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina (ML 347). Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de BMP es LDN193189. En ciertos aspectos, el inhibidor de la ruta de TGF β es 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (SB431542), 6-[2-(1,1-metiletil)-5-(6-metil-2-piridinil)-1H-imidazol-4-il]quinoxalina (SB525334), hidrato de clorhidrato de 2-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124), hidrato de 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)-benzamida, hidrato de 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida, factor de determinación izquierda-derecha (Lefty), 3-(6-metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida (A 83-01), 4-[4-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (D 4476), 4-[4-[3-(2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]-2-piridinil]-N-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-benzamida (GW 788388), 4-[3-(2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]-quinolina (LY 364847), 4-[2-fluoro-5-[3-(6-metil-2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]fenil]-1H-pirazol-1-etanol (R 268712) o 2-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina (RepSox). Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de TGF β es SB431542. En algunos aspectos, el inhibidor de MEK es N-[(2R)-2,3-dihidroxipropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-benzamida (PD0325901), N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodoanilino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxopirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida (GSK1120212), 6-(4-bromo-2-fluoroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida (MEK162), N-[3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodoanilino)-6-metoxifenil]-1-(2,3-dihidroxipropil)ciclopropano-1-sulfonamida (RDEA119) o 6-(4-bromo-2-cloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida

(AZD6244). Por ejemplo, el inhibidor de MEK es PD0325901. En ciertos aspectos, el medio de diferenciación retiniano comprende LDN193189, CKI-7, SB431542 y PD0325901.

En una realización adicional, las células RPE se disocian después del cultivo en el medio de maduración de RPE. En aspectos adicionales, las células RPE disociadas se siembran y cultivan en medio de maduración de RPE. En ciertos aspectos, el medio de maduración de RPE comprende un inhibidor de MEK. En algunos aspectos, el inhibidor de MEK es N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-benzamida (PD0325901), N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodoanilino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxopirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida (GSK1120212), 6-(4-bromo-2-fluoroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida (MEK162), N-[3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodoanilino)-6-metoxifenil]-1-(2,3-dihidroxiopropil)ciclopropano-1-sulfonamida (RDEA119) o 6-(4-bromo-2-cloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida (AZD6244). En algunos aspectos, el inhibidor de MEK es PD0325901.

En una realización más adicional, las células RPE se disocian después del cultivo en el medio RPE y se vuelven a sembrar en un armazón degradable en el medio de maduración de RPE produciendo de ese modo células RPE maduras. En ciertos aspectos, el medio de maduración de RPE puede comprender al menos un inductor de cilio primario. En algunos aspectos, el al menos un inductor de cilio primario es la prostaglandina E2 (PGE2) o afidicolina. En otros aspectos, el medio de maduración de RPE puede comprender N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-4-oxo-3-feniltieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP2) o 4-(1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isindol-2-il)-N-8-quinolinil-benzamida (endo- IWR1).

En aspectos adicionales, la población inicial de iPSC son células preconfluentes que se han disociado para dar células individuales. En otros aspectos, las iPSC se cultivan a una densidad celular inicial de aproximadamente 5.000 a 40.000 células/cm². En aspectos particulares, las iPSC se cultivan a una densidad celular inicial de 5.000, 10.000, 20.000, 30.000 o 40.000 células/cm².

En aspectos aún adicionales, la población inicial de iPSC coinciden con respecto al haplotipo de MHC con un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos, las iPSC son homocigóticas para al menos un alelo de HLA. Por ejemplo, las iPSC son homocigóticas en HLA-A, HLA-B o HLA-DR. En algunos aspectos, las iPSC son homocigóticas en HLA-A y HLA-B.

En otra realización, se proporciona un método para producir células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) humanas, que comprende (a) obtener una población inicial que comprende células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas que se disocian para dar células esencialmente individuales en un medio completamente definido; (b) cultivar las iPSC en laminina en un medio de inducción retiniano que comprende LDN193189, CKI-7 y SB431542 para iniciar la diferenciación de las células para dar células de linaje retiniano; (c) cultivar adicionalmente las células de linaje retiniano en un medio de diferenciación retiniano que comprende LDN193189, CKI-7, SB431542 y PD0325901 para diferenciar adicionalmente las células de linaje retiniano; (d) cultivar las células en medio retiniano que comprende nicotinamida y activina A para formar células RPE en diferenciación; y (e) cultivar las células RPE en un medio de maduración de RPE, produciendo de ese modo células RPE humanas. En ciertos aspectos, el método no incluye la formación de cuerpos embrioides.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se facilitan únicamente a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman porción de la presente descripción y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La descripción puede entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

Figuras 1A-1D: **A)** Imagen de iPSC preconfluentes. **B)** Imagen de ejemplo para el día 25 de la diferenciación de RPE. **C)** Imagen de ejemplo para el día 40 de la diferenciación de RPE. **D)** Imágenes de ejemplo en el día 60 después de una nueva siembra en placa en el día 40 con cultivo en RPE-MM con campo brillante de 100x.

Figuras 2A-2B: Análisis por citometría de flujo de marcadores relevantes que incluyen MAP2, NES, PAX6, MITF, PMEL17, TYRP1, CRALBP y BEST1 antes de la clasificación celular de la población de células RPE derivadas de iPSC.

Figuras 3A-3C: Análisis por citometría de flujo de marcadores relevantes incluyendo MAP2, NES, PAX6, MITF, PMEL17, TYRP1, CRALBP y BEST1 después de la clasificación celular de una población de células RPE derivadas de iPSC para retirar células positivas para CD24, células positivas para CD24 y positivas para CD56, células

positivas para CD24 y positivas para CD90, y células positivas para CD24, positivas para CD56 y positivas para CD90.

Figuras 4A-4D: **A)** Tinción con beta-catenina y F-actina de células iPSC-RPE no tratadas y células iPSC-RPE tratadas con PGE2. La tinción con beta-catenina se observa en el citoplasma de las células no tratadas y en la membrana en las células tratadas. **B)** Tinción con pERM (ezrina) y ZO1 de células iPSC-RPE no tratadas y células iPSC-RPE tratadas con PGE2. La tinción con ERM es baja en el citoplasma de las células no tratadas y alta en el citoplasma de las células tratadas, mientras que la tinción con ZO1 se observa en las uniones estrechas en la membrana plasmática de las células tanto no tratadas como tratadas. **C)** Tinción con RPE65 y ZO1 de células iPSC-RPE no tratadas y células iPSC-RPE tratadas con PGE2. La tinción con RPE65 es baja en el citoplasma de las células no tratadas y alta en el citoplasma de las células tratadas. **D)** Microfotografías electrónicas de transmisión de células iPSC-RPE no tratadas y células iPSC-RPE tratadas con PGE2. Las células tratadas con PGE2 tienen prolongaciones apicales más extensas.

Figuras 5A-5D: **A)** Tinción con beta-catenina de células tratadas con IWP2+endo-IWR1, IWP2 o LiCl. Las células tratadas con IWP2 o IWP2+endo-IWR1 tienen beta-catenina en la membrana celular. Las células tratadas con LiCl tienen beta-catenina en el núcleo y las células no tratadas tienen beta-catenina en el citoplasma. **B)** Tinción con p27 de células tratadas con IWP2+endo-IWR1, IWP2 o LiCl. Las células tratadas con IWP2 o IWP2+endo-IWR1 tienen una mayor expresión de p27 en el núcleo, lo que sugiere que las células han salido del ciclo celular. Las células tratadas con LiCl o las células no tratadas tienen una expresión débil de p27 en el núcleo. **C)** Uniones estrechas de RPE65 y ZO1 de células tratadas con IWP2+IWR1, IWP2 o LiCl. RPE65 es alto en el citoplasma de las células tratadas con IWP2+IWR1 y las células IWP2, bajo en las células no tratadas y no se observa tinción en las células tratadas con LiCl. **D)** Imágenes de microscopía electrónica de uniones estrechas funcionales de células tratadas con IWP2+IWR1, IWP2 o LiCl.

Figuras 6A-6D: **A)** Diferenciación de RPE de múltiples operarios. Los datos mostrados representan las diferenciaciones de RPE establecidas usando el protocolo optimizado a través de tres líneas con múltiples operarios medidas mediante citometría de flujo para el marcador de RPE de la proteína de unión a retinaldehído 1 (Cralbp). **B)** La reproducibilidad del protocolo de diferenciación del RPE se muestra entre diferentes poblaciones de líneas celulares iniciales incluyendo 3D1, AMD1B, BEST1L, BEST3A, BEST8A, donante 3D de AMD, donante 3C de AMD y la línea A de HLA. **C-D)** La reproducibilidad del protocolo de diferenciación de RPE se muestra entre diferentes poblaciones de líneas celulares iniciales. Los datos representan 109 diferenciaciones realizadas por cinco operarios en 28 líneas de iPSC derivadas de 13 donantes. El porcentaje de células positivas para Cralbp aumentó hasta entre el 90-100 % en comparación con la pureza variada de la población de células antes de la purificación.

Figuras 7A-7G: **A)** La funcionalidad de la función de barrera de las células RPE generadas usando el protocolo de diferenciación de RPE se muestra mediante la medición de potencial eléctrico transepitelial (TEP) del gradiente iónico a través de la monocapa. **B)** Funcionalidad de células RPE tratadas con IWP2 o IWP2+endo-IWR2. **C-E)** Resistencia eléctrica transepitelial (TER) y TEP (línea más clara) de células no tratadas, células tratadas con PGE2 y células tratadas con IWP2+endo-IWR1. **F)** Respuesta funcional (TER) de las células maduras con PGE2 50 μ M frente a 100 μ M en el medio RPE-MM + PGE2 desde el día 54 hasta el día 75 del protocolo de diferenciación derivado de iPSC. Hubo un aumento progresivo en la medida de la TER durante el curso de su diferenciación con 100 μ M en comparación con el RPE derivado de iPSC cultivado usando PGE2 50 μ M en medio RPE-MM + PGE2 desde el día 54 hasta el día 75 del protocolo de diferenciación. Esto demuestra que un aumento en la concentración de PGE2 promueve la madurez y eficiencia funcional de los cultivos de RPE derivados de iPSC. **G)** Pureza de RPE derivado de iPSC mediante expresión en porcentaje de marcadores de RPE maduros en el día 75 en cultivos con PEG2 50 μ M frente a 100 μ M comenzando en el día 54 hasta el día 75 de protocolo de diferenciación de RPE derivado de iPSC. Existe una expresión comparable de Pmel17, Tryp1 y Cralbp (marcadores específicos de RPE) en el RPE derivado de iPSC cultivado usando PGE2 50 μ M. Esto muestra que PGE2 promueve la diferenciación de RPE derivado de iPSC a lo largo de un intervalo de concentraciones. La expresión del marcador Best1 (marcador de RPE de madurez tardía) es mucho mayor en las células tratadas con PGE2 100 μ M en comparación con las células tratadas con PGE2 50 μ M, lo que muestra que el aumento de la concentración de PGE2 mejora la pureza y madurez del RPE derivado de iPSC.

Descripción de realizaciones ilustrativas

Aspectos particulares de la presente descripción superan varios problemas importantes con las tecnologías actuales al proporcionar métodos para producir una población de células RPE a partir de una suspensión celular inicial de células madre pluripotentes, preferiblemente una suspensión de células esencialmente individuales de células madre pluripotentes. Las células RPE pueden derivarse de células madre pluripotentes tales como células ES y células iPSC; sin embargo, los métodos actuales dependen de una población inicial de cuerpos embrioides. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método altamente eficiente y reproducible para diferenciar células madre pluripotentes (PSC) para dar células RPE funcionales y maduras sin el uso de cuerpos embrioides. A continuación se describen realizaciones y ventajas adicionales.

I. Definiciones

El término “purificado” no requiere pureza absoluta; en vez de eso, se pretende que sea un término relativo. Por lo tanto, una población purificada de células tiene una pureza de más de aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, o, lo más preferiblemente, está esencialmente libre de otros tipos de células.

Como se usa en la presente memoria, “esencialmente” o “esencialmente libre” en cuanto a un componente especificado, se usa en la presente memoria para querer decir que no se ha formulado de manera intencionada nada del componente especificado en una composición y/o sólo está presente como contaminante o en cantidades traza. Por tanto, la cantidad total del componente especificado resultante de cualquier contaminación involuntaria de una composición está muy por debajo del 0,05 %, preferiblemente por debajo del 0,01 %. Lo más preferido es una composición en la que no se puede detectar ninguna cantidad del componente especificado con métodos analíticos convencionales.

Como se usa en la presente memoria en la memoria descriptiva, “un” o “una” puede significar uno o más. Como se usa en la presente memoria en la(s) reivindicación/reivindicaciones, cuando se usan junto con la palabra “que comprende”, las palabras “un” o “una” pueden significar uno o más de uno.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalda una definición que se refiere solo a alternativas y “y/o”. Como se usa en la presente memoria, “otro” puede significar al menos un segundo o más.

A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método empleado para determinar el valor o la variación que existe entre objetos de estudio.

El término “célula” se usa en la presente memoria para referirse a una unidad estructural y funcional de un organismo que puede replicarse independientemente, está encerrada por una membrana y contiene biomoléculas y material genético. Las células utilizadas en la presente memoria pueden ser células de origen natural o células modificadas artificialmente (por ejemplo, células de fusión, células genéticamente modificadas, etc.).

El término “población celular” se usa en la presente memoria para referirse a un grupo de células, normalmente de un tipo común. La población celular puede derivarse de un progenitor común o puede comprender más de un tipo de célula. Una población celular “enriquecida” se refiere a una población celular derivada de una población celular inicial (por ejemplo, una población celular heterogénea no fraccionada) que contiene un mayor porcentaje de un tipo de célula específico que el porcentaje de ese tipo de célula en la población inicial. Las poblaciones celulares pueden enriquecerse para uno o más tipos de células y agotarse de uno o más tipos de células.

El término “célula madre” se refiere en la presente memoria a una célula que, en condiciones adecuadas, puede diferenciarse para dar una amplia gama de tipos de células especializados, mientras que, en otras condiciones adecuadas, puede autorrenovarse y permanecer en un estado pluripotente esencialmente indiferenciado. El término “célula madre” también abarca una célula pluripotente, célula multipotente, célula precursora y célula progenitora. Se pueden obtener células madre humanas a modo de ejemplo a partir de células madre hematopoyéticas o mesenquimatosas obtenidas de tejido de médula ósea, células madre embrionarias obtenidas de tejido embrionario o células germinales embrionarias obtenidas de tejido genital de un feto. Las células madre pluripotentes a modo de ejemplo también pueden producirse a partir de células somáticas reprogramándolas a un estado pluripotente mediante la expresión de ciertos factores de transcripción asociados con pluripotencia; estas células se denominan “células madre pluripotentes inducidas” o “iPSC”.

El término “pluripotente” se refiere a la propiedad de una célula para diferenciarse para dar todos los demás tipos de células en un organismo, con la excepción de células extraembrionarias o placentarias. Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse para dar tipos de células celulares de las tres capas germinales (por ejemplo, tipos de células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas) incluso después de un cultivo prolongado. Una célula madre pluripotente es una célula madre embrionaria derivada de la masa celular interna de un blastocisto. En otras realizaciones, la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida derivada mediante reprogramación de células somáticas.

El término “diferenciación” se refiere al proceso mediante el cual una célula no especializada se convierte en un tipo más especializado con cambios en las propiedades estructurales y/o funcionales. La célula madura tiene normalmente una estructura celular alterada y proteínas específicas de tejido. Más específicamente, en el contexto de los presentes métodos, indica el proceso de una célula madre humana que adquiere el tipo de célula de una célula epitelial de pigmento retiniano (RPE) con características indicativas de que dicha célula RPE es una célula madura diferenciada de manera terminal.

[0030] Como se usa en la presente memoria, “indiferenciado” se refiere a células que muestran marcadores característicos y características morfológicas de células indiferenciadas que las distinguen claramente de las células diferenciadas de manera terminal de origen embrionario o adulto.

5 Los “cuerpos embrioides (EB)” son agregados de células madre pluripotentes que pueden experimentar diferenciación para dar células de las capas germinales de endodermo, mesodermo y ectodermo. Las estructuras esferoides se forman cuando se agregan células madre pluripotentes y permiten el cultivo no adherente de EB en suspensión.

10 Una célula “aislada” se ha separado o purificado sustancialmente de otras células en un organismo o cultivo. Las células aisladas pueden tener, por ejemplo, una pureza de al menos el 99 %, una pureza de al menos el 98 %, una pureza de al menos el 95 % o una pureza de al menos el 90 %.

15 Un “embrión” se refiere a una masa celular obtenida por una o más divisiones de un cigoto o un ovocito activado con un núcleo reprogramado artificialmente.

Una “célula madre embrionaria (ES)” “ES una célula pluripotente indiferenciada que se obtiene de un embrión en una etapa temprana, tal como la masa celular interna en la etapa de blastocisto, o producida por medios artificiales (por ejemplo, transferencia nuclear) y puede dar lugar a cualquier tipo de célula diferenciada en un embrión o un adulto, incluyendo células germinales (por ejemplo, espermatozoides y óvulos).

20 Las “células madre pluripotentes inducidas (iPSC)” son células generadas mediante la reprogramación de una célula somática mediante la expresión o la inducción de la expresión de una combinación de factores (denominados en la presente memoria factores de reprogramación). Las iPSC pueden generarse mediante el uso de células somáticas fetales, posnatales, de recién nacido, juveniles o adultas. En ciertas realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar células somáticas para dar células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, Oct4 (algunas veces denominado Oct 3/4), Sox2, c-Myc, y Klf4, Nanog, y Lin28. En algunas realizaciones, las células somáticas se reprograman mediante la expresión de al menos dos factores de reprogramación, al menos tres factores de reprogramación o cuatro factores de reprogramación para reprogramar una célula somática para dar una célula madre pluripotente.

Un “alelo” se refiere a una de dos o más formas de un gen. Los organismos diploides tales como los seres humanos contienen dos copias de cada cromosoma y, por lo tanto, portan un alelo en cada uno.

35 El término “homocigótico” se define como que contiene dos de los mismos alelos en un locus particular. El término “heterocigótico” se refiere a que contiene dos alelos diferentes en un locus particular.

Un “haplotipo” se refiere a una combinación de alelos en múltiples loci a lo largo de un solo cromosoma. Un haplotipo puede basarse en un conjunto de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en un solo cromosoma y/o los alelos en el complejo mayor de histocompatibilidad.

40 Como se usa en la presente descripción, el término “coincidencia de haplotipo” se define como que la célula (por ejemplo, célula iPSC) y el sujeto que está tratándose comparten uno o más haplotipos de locus mayor de histocompatibilidad. El haplotipo del sujeto puede determinarse fácilmente mediante el uso de ensayos bien conocidos en la técnica. La célula iPSC de haplotipo coincidente puede ser autóloga o alogénica. Las células autólogas que se hacen crecer en cultivo tisular y diferenciadas para dar células RPE tienen inherentemente un haplotipo coincidente con el sujeto.

50 “Sustancialmente el mismo tipo de HLA” indica que el tipo de HLA de donante coincide con el de un paciente en la medida en que las células trasplantadas, que se han obtenido induciendo la diferenciación de iPSC derivadas de las células somáticas del donante, pueden injertarse cuando se trasplantan al paciente.

[0041] Los “superdonantes” se denominan en la presente memoria individuos homocigóticos para ciertos genes de MHC de clase I y II. Estos individuos homocigóticos pueden servir como superdonantes y sus células, incluyendo tejidos y otros materiales que comprenden sus células, pueden trasplantarse en individuos que son homocigóticos o heterocigóticos para ese haplotipo. El superdonante puede ser homocigótico para los alelos de locus/loci de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ, respectivamente.

60 “Libre de alimentador” o “independiente de alimentador” se usa en la presente memoria para referirse a un cultivo complementado con citocinas y factores de crecimiento (por ejemplo, TGFβ, bFGF, LIF) como reemplazo de la capa de células alimentadoras. Por lo tanto, pueden usarse sistemas y medios de cultivo de “libres de alimentador” o independientes de alimentador para cultivar y mantener células pluripotentes en un estado indiferenciado y proliferativo. En algunos casos, los cultivos libres de alimentador utilizan una matriz basada en animales (por ejemplo, MATRIGEL™) o se hacen crecer sobre un sustrato tal como fibronectina, colágeno o vitronectina. Estos enfoques permiten que células madre humanas permanezcan en un estado esencialmente indiferenciado sin la necesidad de “capas alimentadoras” de fibroblastos de ratón.

Las “capas de alimentador” se definen en la presente memoria como una capa de recubrimiento de células tal como en el fondo de una placa de cultivo. Las células alimentadoras pueden liberar nutrientes en el medio de cultivo y proporcionar una superficie a la que se pueden unir otras células, tales como células madre pluripotentes.

El término “definido” o “completamente definido”, cuando se usa en relación con un medio, una matriz extracelular o una condición de cultivo, se refiere a un medio, una matriz extracelular o una condición de cultivo en la que se conocen la composición química y cantidades de aproximadamente todos los componentes. Por ejemplo, un medio definido no contiene factores no definidos tales como en suero bovino fetal, albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano. Generalmente, un medio definido comprende un medio basal (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), F12 o medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, que contiene aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, tampones, antioxidantes y fuentes de energía) que se complementa con albúmina recombinante, lípidos químicamente definidos e insulina recombinante. Un medio completamente definido a modo de ejemplo es el medio Essential 8™.

El término “libre de componentes xenogénicos (XF)” cuando se usa en relación con un medio, una matriz extracelular o una condición de cultivo, se refiere a un medio, una matriz extracelular o una condición de cultivo que está esencialmente libre de componentes heterogéneos derivados de animales. Para cultivar células humanas, cualquier proteína de un animal no humano, tal como ratón, será componentes xenogénicos. En ciertos aspectos, la matriz libre de componentes xenogénicos puede estar esencialmente libre de cualquier componente derivado de animal no humano, excluyendo por tanto las células alimentadoras de ratón o MATRIGEL™. MATRIGEL™ es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas de matriz extracelular para incluir laminina (un componente principal), colágeno IV, proteoglicanos de heparán sulfato y entactina/nidógeno.

“Reemplazo de suero KNOCKOUT™”, denominado en la presente memoria formulación libre de suero optimizada para hacer crecer y mantener células indiferenciadas, tales como células madre, en cultivo.

“Preconfluente” se refiere a un cultivo celular en el que la proporción de la superficie de cultivo que está cubierta por células es aproximadamente el 60-80 %. Habitualmente, preconfluente se refiere a un cultivo en el que aproximadamente el 70 % de la superficie de cultivo está cubierta por células.

La “retina” se refiere a una capa sensible a la luz de tejido que reviste la superficie interna del ojo.

“Epitelio pigmentario retiniano” se refiere a una monocapa de células pigmentadas entre el coroides, una capa llena de vasos sanguíneos y la retina.

Las “células de linaje retiniano” en la presente memoria se refieren a células que pueden dar lugar a, o diferenciarse para dar, células RPE.

“Medio de inducción retiniano (RIM)” se refiere en la presente memoria a un medio de crecimiento que comprende un inhibidor de la ruta de WNT y un inhibidor de la ruta de BMP y puede dar como resultado la diferenciación de PSC para dar células del linaje retiniano. El RIM también comprende un inhibidor de la ruta de TGFβ.

El “medio de diferenciación retiniano (RDM)” se define en la presente memoria como un medio que comprende un inhibidor de la ruta de WNT, un inhibidor de la ruta de BMP y un inhibidor de MEK y diferencia las células retinianas. El RDM también comprende un inhibidor de la ruta de TGFβ.

El “medio retiniano (RM)” se define como un medio de crecimiento para el cultivo de células retinianas que comprende activina A y nicotinamida.

El “medio de maduración de RPE (RPE-MM)” en la presente memoria se refiere a un medio para la maduración de células RPE que comprende taurina e hidrocortisona. El RPE-MM también comprende triyodotironina. El RPE-MM también puede comprender PD0325901 o PGE2.

Las células RPE “maduras” se denominan en la presente memoria células RPE que tienen una expresión regulada por disminución de marcadores de RPE inmaduros tales como Pax6 y una expresión regulada por aumento de marcadores de RPE maduros tales como RPE65.

La “maduración” de células RPE se refiere en la presente memoria al proceso mediante el cual se modulan rutas de desarrollo de RPE para generar células RPE maduras. Por ejemplo, la modulación de la función de cilios puede dar como resultado la maduración de RPE.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” usada en la presente memoria se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad o afección, es suficiente para realizar dicho tratamiento.

“Inductor” se define en la presente memoria como una molécula que regula la expresión génica tal como genes activadores dentro de una célula. Un inductor puede unirse a represores o activadores. Los inductores funcionan deshabilitando represores.

II Células madre pluripotentes

A. Células madre embrionarias

Las células ES se derivan de la masa celular interna de los blastocistos y tienen una alta capacidad de diferenciación *in vitro*. Las células ES pueden aislarse retirando la capa externa de trofoectodermo de un embrión en desarrollo, luego cultivando las células de masa interna en una capa alimentadora de células que no están en crecimiento. Las células vuelven a sembrar en placa pueden continuar proliferando y producir nuevas colonias de células ES que pueden retirarse, disociarse, volver a sembrarse en placa y dejarse crecer. Este procedimiento de “subcultivar” células ES indiferenciadas puede repetirse varias veces para producir líneas celulares que contienen células ES indiferenciadas (patentes estadounidenses n.º 5.843.80; 6.200.806; 7.029.913). Las células ES tienen el potencial de proliferar al tiempo que conservan su pluripotencia. Por ejemplo, las células ES son útiles en la investigación sobre células y sobre genes que controlan la diferenciación celular. La pluripotencia de las células ES en combinación con la manipulación genética y la selección se puede usar para estudios de análisis de genes *in vivo* mediante la generación de ratones transgénicos, quiméricos y con desactivación génica.

Los métodos para producir células ES de ratón son bien conocidos. En un método, un blastocisto antes de la implantación a partir de la cepa 129 de ratones se trata con antisuero de ratón para retirar el trofoectodermo, y se cultiva la masa celular interna en una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón químicamente inactivados en medio que contiene suero de ternera fetal. Las colonias de células ES indiferenciadas que se desarrollan se subcultivan en capas alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón en presencia de suero de ternera fetal para producir poblaciones de células ES. En algunos métodos, las células ES de ratón pueden hacerse crecer en ausencia de una capa alimentadora añadiendo el factor inhibidor de la leucemia de citocinas (LIF) al medio de cultivo que contiene suero (Smith, 2000). En otros métodos, las células ES de ratón se pueden hacer crecer en medio libre de suero en presencia de proteína morfogenética ósea y LIF (Ying y *col.*, 2003).

Las células ES también se pueden derivar de otros organismos incluyendo mono rhesus y tití mediante métodos previamente descritos (Thomson y Marshall, 1998; Thomson y *col.*, 1995; Thomson y Odorico, 2000), así como también de líneas celulares de ratón y humanas establecidas. Por ejemplo, las líneas de células ES humanas establecidas incluyen MAOI, MA09, ACT-4, HI, H7, H9, H13, H14 y ACT30. Como ejemplo adicional, las líneas de células ES de ratón que se han establecido incluyen la línea celular CGR8 establecida a partir de la masa celular interna de embriones de la raza de ratón 129, y pueden hacerse crecer cultivos de células CGR8 en presencia de LIF sin capas alimentadoras.

Las células madre ES pueden detectarse mediante marcadores de proteínas incluyendo el factor de transcripción Oct4, fosfatasa alcalina (AP), antígeno embrionario específico de estadio SSEA-1, antígeno embrionario específico de estadio SSEA-3, antígeno embrionario específico de estadio SSEA-4, factor de transcripción NANOG, antígeno de rechazo tumoral 1-60 (TRA-1-60), antígeno de rechazo tumoral 1-81 (TRA-1-81), SOX2 o REX1.

B. Células madre pluripotentes inducidas

La inducción de la pluripotencia se logró originalmente en 2006 usando células de ratón (Yamanaka y *col.* 2006) y en 2007 usando células humanas (Yu y *col.* 2007; Takahashi y *col.* 2007) mediante la reprogramación de células somáticas a través de la introducción de factores de transcripción que están asociados a la pluripotencia. Las células madre pluripotentes pueden mantenerse en un estado indiferenciado y pueden diferenciarse para dar casi cualquier tipo de célula. El uso de iPSC elude la mayoría de los problemas éticos y prácticos asociados con el uso clínico a gran escala de células ES, y los pacientes con trasplantes autólogos derivados de iPSC pueden no requerir tratamientos inmunosupresores a lo largo de toda la vida para prevenir el rechazo del injerto.

Con la excepción de las células germinales, puede usarse cualquier célula como punto de partida para las iPSC. Por ejemplo, los tipos de células pueden ser queratinocitos, fibroblastos, células hematopoyéticas, células mesenquimatosas, células hepáticas o células estomacales. También pueden usarse células T como fuente de células somáticas para la reprogramación (patente estadounidense n.º 8.741.648). No existe limitación en el grado de diferenciación celular o la edad de un animal a partir del cual se recogen las células; incluso las células progenitoras indiferenciadas (incluyendo las células madre somáticas) y células maduras diferenciadas finalmente pueden usarse como fuentes de células somáticas en los métodos descritos en la presente descripción. En una realización, la célula somática es en sí misma una célula RPE tal como una célula RPE humana. Las iPSC pueden ser una célula RPE de adulto o fetal. Las iPSC pueden hacerse crecer en condiciones que se sabe que diferencian células ES humanas para dar tipos de células específicos, y expresan marcadores de células ES humanas incluyendo: SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81.

Las células somáticas pueden reprogramarse para producir células madre pluripotentes inducidas (iPSC) mediante el uso de métodos conocidos por un experto en la técnica. Un experto en la técnica puede producir fácilmente células madre pluripotentes inducidas, véanse, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 20090246875, solicitud de patente estadounidense publicada n.º 2010/0210014; solicitud de patente estadounidense publicada n.º 20120276636; patente estadounidense n.º 8.058.065; patente estadounidense n.º 8.129.187; patente estadounidense n.º 8.278.620; publicación PCT n.º WO 2007/069666 A1, y patente estadounidense n.º 8.268.620. Generalmente, se usan factores de reprogramación nuclear para producir células madre pluripotentes a partir de una célula somática. En algunas realizaciones, se utilizan al menos tres, o al menos cuatro, de Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nanog y Lin28. En otras realizaciones, se utilizan Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4.

Las células se tratan con una sustancia de reprogramación nuclear, que generalmente es uno o más factores que pueden inducir una iPSC a partir de una célula somática o un ácido nucleico que codifica para estas sustancias (incluyendo formas integradas en un vector). Las sustancias de reprogramación nuclear incluyen generalmente al menos Oct3/4, Klf4 y Sox2 o ácidos nucleicos que codifican para estas moléculas. Un inhibidor funcional de p53, L-myc o un ácido nucleico que codifica para L-myc, y Lin28 o Lin28b o un ácido nucleico que codifica para Lin28 o Lin28b, puede utilizarse como sustancias de reprogramación nuclear adicionales. Nanog también puede utilizarse para la reprogramación nuclear. Como se describe en la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 20120196360, los factores de reprogramación a modo de ejemplo para la producción de iPSC incluyen (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc (Sox2 puede sustituirse por Sox1, Sox3, Sox15, Sox17 o Sox18; Klf4 puede sustituirse por Klf1, Klf2 o Klf5); (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, antígeno T grande de SV40 (SV40LT); (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, virus del papiloma humano (VPH) 16 E6; (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, VPH16 E7 (5) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, VPH16 E6, VPH16 E7; (6) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, Bmi1; (7) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28; (8) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, SV40LT; (9) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, TERT, SV40LT; (10) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, SV40LT; (11) Oct3/4, Esrrb, Sox2, L-Myc (Esrrb puede sustituirse por Esrrg); (12) Oct3/4, Klf4, Sox2; (13) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, SV40LT; (14) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, VPH16 E6; (15) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, VPH16 E7; (16) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, VPH16 E6, VPH16 E7; (17) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, Bmi1; (18) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28 (19) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, SV40LT; (20) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, TERT, SV40LT; (21) Oct3/4, Klf4, Sox2, SV40LT; o (22) Oct3/4, Esrrb, Sox2 (Esrrb puede sustituirse por Esrrg). En un ejemplo no limitativo, se utilizan Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc. En otras realizaciones, se utilizan Oct4, Nanog y Sox2, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.682.828. Estos factores incluyen, pero no se limitan a, Oct3/4, Klf4 y Sox2. En otros ejemplos, los factores incluyen, pero no se limitan a, Oct 3/4, Klf4 y Myc. En algunos ejemplos no limitativos, se utilizan Oct3/4, Klf4, c-Myc y Sox2. En otros ejemplos no limitativos, se utilizan Oct3/4, Klf4, Sox2 y Sal 4. Factores como Nanog, Lin28, Klf4 o c-Myc pueden aumentar la eficiencia de la reprogramación y pueden expresarse a partir de varios vectores de expresión diferentes. Por ejemplo, se puede usar un vector de integración tal como el sistema basado en elementos de VEB (patente estadounidense n.º 8.546.140). En un aspecto adicional, pueden introducirse proteínas de reprogramación directamente en células somáticas mediante transducción de proteínas. La reprogramación puede comprender además poner en contacto las células con uno o más receptores de señalización incluyendo el inhibidor de glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3), un inhibidor de la proteína cinasa activada por mitógeno (MEK), un inhibidor de señalización o inhibidor de receptor de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor inhibidor de la leucemia (LIF), un inhibidor de p53, un inhibidor de NF-kappa B o una combinación de los mismos. Esos reguladores pueden incluir moléculas pequeñas, nucleótidos inhibidores, casetes de expresión o factores de proteínas. Se prevé que puede usarse prácticamente cualquier célula o línea celular iPS.

Las secuencias de ADNc de ratón y humano de estas sustancias de reprogramación nuclear están disponibles con referencia a los números de registro del NCBI mencionados en el documento WO 2007/069666. En la técnica se conocen métodos para introducir una o más sustancias de reprogramación, o ácidos nucleicos que codifican para estas sustancias de reprogramación, y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 2012/0196360 y la patente estadounidense n.º 8.071.369.

Una vez derivadas, las iPSC pueden cultivarse en un medio suficiente para mantener la pluripotencia. Las iPSC pueden usarse con diversos medios y técnicas desarrollados para cultivar células madre pluripotentes, más específicamente, células madre embrionarias, como se describe en la patente estadounidense n.º 7.442.548 y la publicación de patente estadounidense n.º 2003/0211603. En el caso de células de ratón, el cultivo se lleva a cabo con la adición de factor inhibidor de leucemia (LIF) como factor de supresión de diferenciación a un medio habitual. En el caso de células humanas, es deseable que se añada factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en lugar de LIF. Pueden usarse otros métodos para el cultivo y el mantenimiento de las iPSC, como conocerá un experto en la técnica.

En ciertas realizaciones, se pueden usar condiciones indefinidas; por ejemplo, pueden cultivarse células pluripotentes en células alimentadoras de fibroblastos o un medio que se ha expuesto a células alimentadoras de fibroblastos para mantener las células madre en un estado indiferenciado. En algunas realizaciones, la célula se cultiva en la presencia conjunta de fibroblastos embrionarios de ratón tratados con radiación o un antibiótico para terminar la división celular, como células alimentadoras. Como alternativa, se pueden cultivar células pluripotentes y mantener en un estado esencialmente indiferenciado usando un sistema de cultivo independiente de alimentador definido, tal como un medio TESR™ (Ludwig y col., 2006a; Ludwig y col., 2006b) o medio E8™ (Chen y col., 2011).

En algunas realizaciones, la iPSC se puede modificar para expresar ácidos nucleicos exógenos, tal como para incluir un potenciador de tirosinasa unido operativamente a un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica para un primer marcador. El gen de tirosinasa se describe, por ejemplo, en el n.º de registro de GENBANK® 22173, disponible el 1 de enero de 2013. Esta secuencia se alinea con el cromosoma 7 de la ubicación 5286971-5291691 de la raza C57BL/6 de ratón (orientación inversa). Una secuencia de 4721 pares de bases es suficiente para la expresión en células RPE, véase Murier y col., Dev. Biol. 303: 838-847, 2007. Este constructo se expresa en células epiteliales del pigmento retiniano. Se pueden utilizar otros potenciadores. Otros potenciadores específicos de RPE incluyen D-MITF, DCT, TYRP1, RPE65, VMD2, MERTK, MYRIP y RAB27A. Los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a, cualquier promotor expresado en células epiteliales del pigmento retiniano incluyendo el promotor de tirosinasa. El constructo también puede incluir otros elementos, tales como un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción (secuencias de unión al ribosoma internas) y un terminador de la transcripción/traducción. Generalmente, es ventajoso transfectar células con el constructo. Los vectores adecuados para la transfección estable incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovirales, vectores lentivirales y virus Sendai.

Los plásmidos se han diseñado con una serie de objetivos en mente, tales como lograr un alto número de copias regulado y evitar posibles causas de inestabilidad del plásmido en bacterias y proporcionar medios para la selección del plásmido que son compatibles con el uso en células de mamífero, incluyendo células humanas. Se ha prestado especial atención a los dobles requisitos de plásmidos para su uso en células humanas. En primer lugar, son adecuados para el mantenimiento y la fermentación en *E. coli*, de modo que se pueden producir y purificar grandes cantidades de ADN. En segundo lugar, son seguros y adecuados para su uso en pacientes humanos y animales. El primer requisito requiere plásmidos de alto número de copias que pueden seleccionarse y mantenerse de manera estable con relativa facilidad durante la fermentación bacteriana. El segundo requisito requiere atención a elementos tales como marcadores seleccionables y otras secuencias codificantes. En algunas realizaciones, los plásmidos que codifican para un marcador están compuestos por: (1) un origen de replicación de alto número de copias, (2) un marcador seleccionable, tal como, pero sin limitarse a, el gen neo para la selección de antibióticos con kanamicina, (3) secuencias de terminación de la transcripción, incluyendo el potenciador de tirosinasa y (4) un sitio de clonación múltiple para la incorporación de diversos casetes de ácido nucleico; y (5) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un marcador unido operativamente al promotor de tirosinasa. Existen numerosos vectores de plásmidos que se conocen en la técnica para inducir un ácido nucleico que codifica para una proteína. Estos incluyen, pero no se limitan a, los vectores descritos en la patente estadounidense n.º 6.103.470; patente estadounidense n.º 7.598.364; patente estadounidense n.º 7.989.425. patente estadounidense n.º 6.416.998.

Un sistema de administración génica viral puede ser un vector viral basado en ARN o basado en ADN. Un sistema de administración génica episomal puede ser un plásmido, un vector episomal basado en el virus de Epstein-Barr (VEB), un vector basado en levadura, un vector basado en adenovirus, un vector episomal basado en virus de simio 40 (SV40), un vector basado en virus del papiloma bovino (BPV) o un vector lentiviral.

Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fluorescencia (por ejemplo, proteína verde fluorescente o proteína roja fluorescente), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina o luciferasa de luciérnaga/renilla o nanoluc) u otras proteínas. Un marcador puede ser una proteína (incluyendo proteínas secretadas, de superficie celular o internas; ya sea sintetizada o captada por la célula); un ácido nucleico (tal como un ARNm o una molécula de ácido nucleico enzimáticamente activa) o un polisacárido. Se incluyen determinantes de cualquiera de dichos componentes celulares que pueden detectarse mediante anticuerpo, lectina, sonda o reacción de amplificación de ácido nucleico que son específicos para el marcador del tipo de célula de interés. Los marcadores también pueden identificarse mediante un ensayo bioquímico o enzimático o una respuesta biológica que depende de la función del producto génico. Las secuencias de ácido nucleico que codifican estos marcadores pueden unirse operativamente al potenciador de tirosinasa. Además, pueden incluirse otros genes, tales como genes que pueden influir en la célula madre para la diferenciación de RPE, o función o fisiología o patología de RPE. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se incluye un ácido nucleico que codifica para uno o más de MITF, PAX6, TFEC, OTX2, LHX2, VMD2, CFTR, RPE65, MFRP, CTRP5, CFH, C3, C2B, APOE, APOB, mTOR, FOXO, AMPK, SIRT1-6, HTRP1, ABCA4, TIMP3, VEGFA, CFI, TLR3, TLR4, APP, CD46, BACE1, ELOLV4, ADAM 10, CD55, CD59 y ARMS2.

1. Coincidencia de haplotipo de MHC

El complejo mayor de histocompatibilidad es la principal causa del rechazo inmunitario de trasplantes de órganos alogénicos. Existen tres haplotipos principales de MHC de clase I (A, B y C) y tres haplotipos principales de MHC de clase II (DR, DP y DQ). Los loci de HLA son altamente polimórficos y se distribuyen a lo largo de 4 Mb en el cromosoma 6. La capacidad de haplotipo de los genes de HLA dentro de la región es clínicamente importante ya que esta región está asociada con enfermedades autoinmunitarias e infecciosas y la compatibilidad de haplotipos de HLA entre el donante y el receptor puede influir en los desenlaces clínicos del trasplante. Los HLA correspondientes a MHC clase I presentan péptidos desde el interior de las células y los HLA correspondientes a MHC de clase II presentan antígenos desde el exterior de la célula frente a los linfocitos T. La incompatibilidad de los haplotipos del MHC entre el injerto y el huésped desencadena una respuesta inmunitaria contra el injerto y conduce a su rechazo.

Por lo tanto, un paciente puede tratarse con un inmunosupresor para prevenir el rechazo. Las líneas de células madre que coinciden con respecto al HLA pueden superar el riesgo de rechazo inmunitario.

Debido a la importancia del HLA en el trasplante, los loci de HLA generalmente se tipifican mediante serología y PCR para identificar pares favorables de donante-receptor. La detección serológica de los antígenos de HLA de clase I y II puede lograrse mediante el uso de una prueba de linfocitotoxicidad mediada por complemento con linfocitos T o B purificados. Este procedimiento se usa predominantemente para hacer coincidir los loci de HLA-A y B. El tipado tisular de base molecular puede ser a menudo más preciso que las pruebas serológicas. Los métodos moleculares de baja resolución tales como los métodos de SSOP (sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia), en los que los productos de PCR se someten a prueba frente a una serie de sondas oligonucleotídicas, pueden usarse para identificar antígenos HLA, y actualmente estos métodos son los métodos más habituales utilizados para la tipificación de HLA de clase II. Las técnicas de alta resolución tales como los métodos de SSP (cebador específico de secuencia) que utilizan cebadores específicos de alelos para la amplificación por PCR pueden identificar alelos de MHC específicos.

La compatibilidad con MHC entre un donante y un receptor aumenta significativamente si las células de donante son homocigóticas, es decir contienen alelos idénticos para cada proteína presentadora de antígeno. La mayoría de los individuos son heterocigóticos para los genes de MHC de clase I y II, pero ciertos individuos son homocigóticos para estos genes. Estos individuos homocigóticos pueden servir como superdonantes y los injertos generados a partir de sus células pueden trasplantarse en todos los individuos que sean o bien homocigóticos o bien heterocigóticos para ese haplotipo. Además, si las células donantes homocigóticas tienen un haplotipo que se encuentra en alta frecuencia en una población, estas células pueden tener aplicación en terapias de trasplante para un gran número de individuos.

En consecuencia, pueden producirse iPSC a partir de células somáticas del sujeto que va a tratarse, u otro sujeto con el mismo o sustancialmente el mismo tipo de HLA que el del paciente. En un caso, los HLA principales (por ejemplo, los tres loci principales de HLA-A, HLA-B y HLA-DR) del donante son idénticos a los HLA principales del receptor. En algunos casos, el donante de células somáticas puede ser un superdonante; por tanto, pueden usarse iPSC derivadas de un superdonante homocigótico para MHC para generar células RPE. Por lo tanto, las iPSC derivadas de un superdonante pueden trasplantarse en sujetos que son o bien homocigóticos o bien heterocigóticos para ese haplotipo. Por ejemplo, las iPSC pueden ser homocigóticas en dos alelos de HLA tales como HLA-A y HLA-B. Como tales, las iPSC producidas a partir de superdonantes pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria, para producir células RPE que pueden "coincidir" potencialmente con un gran número de receptores potenciales.

2. Vectores episomales

En ciertos aspectos, se expresan factores de reprogramación a partir de casetes de expresión comprendidos en uno o más elementos genéticos episomales exógenos (véase la publicación de patente estadounidense 2010/0003757). Por lo tanto, las iPSC pueden estar esencialmente libres de elementos genéticos exógenos, tal como de elementos de vectores retrovirales o lentivirales. Estas iPSC se preparan mediante el uso de vectores de replicación extracromosómica (es decir, vectores episomales), que son vectores que pueden replicarse episómicamente para producir iPSC esencialmente libres de vector exógeno o elementos virales (véase la patente estadounidense n.º 8.546.140; Yu y col., 2009). Varios virus de ADN, tales como adenovirus, virus de vacuolización de simio 40 (SV40) o virus del papiloma bovino (BPV), o plásmidos que contienen ARS de levadura de gemación (secuencias de replicación autónoma) se replican de manera extracromosómica o episómica en células de mamífero. Estos plásmidos episomales están intrínsecamente libres de todas estas desventajas (Bode y col., 2001) asociadas con vectores de integración. Por ejemplo, un virus del herpes linfotrófico o virus de Epstein Barr (VEB) como se definió anteriormente puede replicarse de manera extracromosómica y ayudar a administrar genes de reprogramación a células somáticas. Los elementos de VEB útiles son OriP y EBNA-1, o sus variantes o equivalentes funcionales. Una ventaja adicional de los vectores episomales es que los elementos exógenos se perderán con el tiempo después de introducirse en las células, lo que conduce a iPSC autosostenidas esencialmente libres de estos elementos.

Otros vectores extracromosómicos incluyen otros vectores basados en virus del herpes linfotrófico. El virus del herpes linfotrófico es un virus del herpes que se replica en un linfoblasto (por ejemplo, un linfoblasto B humanos) y se convierte en un plásmido durante una parte de su ciclo de vida natural. El virus del herpes simple (VHS) no es un virus del herpes "linfotrófico". Los virus del herpes linfotróficos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a VEB, virus del herpes de sarcoma de Kaposi (VHSK); virus del herpes saímiri (HS) y virus de la enfermedad de Marek (NMV). También se contemplan otras fuentes de vectores basados en episoma, tales como ARS de levadura, adenovirus, SV40 o BPV.

C. Transferencia nuclear de células somáticas

Pueden prepararse células madre pluripotentes mediante el método de transferencia nuclear de células somáticas. La transferencia nuclear de células somáticas implica la transferencia de un núcleo donante en un ovocito libre de huso. En un método, los núcleos de fibroblastos donantes a partir de fibroblastos de la piel de un macaco rhesus se

introducen en el citoplasma de ovocitos de macaco rhesus maduros, libres del huso, en metafase II, por electrofusión (Byrne y col., 2007). Los ovocitos fusionados se activan por exposición a ionomicina, y luego se incuban hasta la etapa de blastocisto. Después se cultiva la masa celular interna de blastocistos seleccionados para producir líneas de células madre embrionarias. Las líneas de células madre embrionarias muestran la morfología normal de células ES, expresan varios marcadores de células ES y se diferencian para dar múltiples tipos de células tanto *in vitro* como *in vivo*.

III. Células epiteliales del pigmento retiniano

Se producen células RPE en los métodos descritos en la presente memoria. Las células en la retina que son directamente sensibles a la luz son las células fotorreceptoras. Los fotorreceptores son neuronas fotosensibles en la parte externa de la retina y pueden ser o bien bastones o bien conos. En el proceso de fototransducción, las células fotorreceptoras convierten la energía de luz incidente enfocada por el cristalino en señales eléctricas que luego se envían a través del nervio óptico al cerebro. Los vertebrados tienen dos tipos de células fotorreceptoras que incluyen conos y bastones. Los conos están adaptados para detectar visión central, a color y con detalles finos y funcionan bien con luz brillante. Los bastones son responsables de la visión periférica y con luz tenue. Las señales neuronales de los bastones y conos se someten a procesamiento por otras neuronas de la retina.

El epitelio pigmentario retiniano actúa como barrera entre el torrente sanguíneo y la retina e interacciona estrechamente con los fotorreceptores en el mantenimiento de la función visual. El epitelio pigmentario retiniano está compuesto por una sola capa de células hexagonales que están densamente empaquetadas con gránulos de melanina que absorben la energía de la luz que llega a la retina. Las principales funciones de las células RPE especializadas incluyen: transporte de nutrientes tales como glucosa, retinol y ácidos grasos desde la sangre hasta los fotorreceptores transporte de agua, productos finales metabólicos e iones desde el espacio subretiniano hasta la sangre; absorción de luz y protección contra fotooxidación; reisomerización de todo-trans-retinol para dar 11-cis-retinal; fagocitosis de las membranas de fotorreceptores desprendidas; y secreción de diversos factores esenciales para la integridad estructural de la retina.

El epitelio pigmentario retiniano expresa marcadores tales como proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), RPE65, gen de distrofia macular viteliforme de Best (VMD2) y factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF). La función errónea del epitelio pigmentario retiniano está asociada con varios estados que alteran la visión, tales como el desprendimiento de epitelio pigmentario retiniano, displasia, atrofia, retinopatía, retinosis pigmentaria, distrofia macular o degeneración.

Las células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) se pueden caracterizar basándose en su pigmentación, morfología epitelial y polaridad apical-basal. Las células RPE diferenciadas se pueden reconocer visualmente por su morfología de adoquín y la apariencia inicial del pigmento. Además, las células RPE diferenciadas tienen resistencia transepitelial/TER y potencial trans-epitelial/TEP a través de la monocapa (TER>100 ohmios-cm²; TEP>2 mV), transportan fluido y CO₂ desde el lado apical hasta el basal, y regulan una secreción polarizada de citocinas.

Las células RPE expresan varias proteínas que pueden servir como marcadores para la detección mediante el uso de metodologías, tales como inmunocitoquímica, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, citometría de flujo e inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Por ejemplo, los marcadores específicos de RPE pueden incluir: proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), proteína relacionada con tirosinasa 1 (TYRP-1), proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario retiniano (RPE65), proteína de premelanosoma (PMEL17), bestrofina 1 (BAS1) y tirosina cinasa de proto-oncogén c-mer (MERTK). Las células RPE no expresan (a ningún nivel detectable) los marcadores de células madre embrionarias Oct-4, nanog o Rex-2. Específicamente, la expresión de estos genes es aproximadamente 100-1000 veces menor en células RPE que en células ES o células iPSC, cuando se evalúa mediante RT-PCR cuantitativa.

Los marcadores de células RPE se pueden detectar a nivel de ARNm, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), análisis de transferencia tipo Northern o análisis de hibridación por transferencia puntual usando cebadores específicos de secuencia en métodos de amplificación convencionales usando datos de secuencia disponibles públicamente (GENBANK®). La expresión de marcadores específicos de tejido como se detecta a nivel de proteína o ARNm se considera positiva si el nivel es al menos o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 veces, y más particularmente más de 10, 20, 30, 40, 50 veces o más superior al de una célula de control, tal como una célula madre pluripotente indiferenciada u otro tipo de célula no relacionado.

La disfunción, lesión y pérdida de las células RPE son factores de muchas enfermedades y trastornos oculares incluyendo degeneración macular relacionada con la edad (AMD), degeneraciones maculares hereditarias incluyendo la enfermedad de Best y retinosis pigmentaria. Un posible tratamiento para tales enfermedades es el trasplante de células RPE en la retina de las personas que necesitan dicho tratamiento. Se especula que la reposición de células RPE mediante su trasplante puede retrasar, detener o revertir la degradación, mejorar la función de la retina y prevenir la ceguera derivada de tales estados. Sin embargo, la obtención de células RPE directamente de donantes humanos y embriones supone un desafío.

A. Derivación de células RPE a partir de cuerpos embrioides de PSC

Las iPSC reprogramadas mediante el uso de factores de reprogramación bien conocidos pueden dar lugar a células oculares del linaje neuronal, incluyendo células RPE (Hirami y *col.*, 2009). La publicación PCT n.º 2014/121077 describe métodos en donde se tratan cuerpos embrioides (EB) producidos a partir de iPSC con antagonistas de Wnt y Nodal en cultivo en suspensión para inducir la expresión de marcadores de células progenitoras retinianas. Esta publicación describe métodos en donde se derivan células RPE a partir de iPSC mediante un proceso de diferenciación de EB de las iPSC en cultivos altamente enriquecidos para células RPE. Por ejemplo, se producen cuerpos embrioides a partir de iPSC mediante la adición de un inhibidor de cinasa espiral asociada a rho (ROCK) y se cultivan en un primer medio que comprende dos inhibidores de la ruta de WNT y un inhibidor de la ruta de Nodal. Además, se siembran los EB en placas en un cultivo tisular recubierto con MATRIGEL™ en un segundo medio que no comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), comprende un inhibidor de la ruta de Nodal, comprende de aproximadamente 20 ng a aproximadamente 90 ng de nogina y comprende de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5 % de reemplazo de suero deficiente para formar células RPE en diferenciación. Las células RPE en diferenciación se cultivan en un tercer medio que comprende activina y WNT3a. Después se cultivan las células RPE en medio RPE que incluye aproximadamente el 5 % de suero fetal, un inhibidor de WNT canónico, un inhibidor de WNT no canónico e inhibidores de las rutas de Sonic Hedgehog y FGF para producir células RPE humanas.

Existen varias desventajas en el uso de EB para la producción de tipo de célula diferenciado. Por ejemplo, la producción de EB es un proceso no sistemático y no reproducible a medida que varía la eficiencia. El tamaño y la forma de los EB producidos a partir de iPSC o células ES no son homogéneos, y la producción de EBS también implica un tratamiento de centrifugación limitante de la tasa. La presente descripción proporciona métodos que permiten la producción a gran escala de células derivadas de iPSC o ES necesarias para aplicaciones clínicas, de investigación o terapéuticas que son independientes de los EB.

B. Derivación de células RPE a partir de PSC de células esencialmente individuales

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para producir células RPE a partir de una suspensión de células esencialmente individuales de células madre pluripotentes (PSC) tales como iPSC humanas. En algunas realizaciones, las PSC se cultivan hasta preconfluencia para evitar cualquier agregado celular. En ciertos aspectos, las PSC se disocian mediante incubación con una enzima de disociación celular, tal como se muestra a modo de ejemplo mediante TRIPSIN™ o TRYPLE™. Las PSC también se pueden disociar para dar una suspensión de células esencialmente individuales mediante pipeteo. Además, se puede añadir blebistatina (por ejemplo, aproximadamente 2,5 µM) al medio para aumentar la supervivencia de las PSC después de la disociación para dar células individuales mientras que las células no se adhieren a un recipiente de cultivo. Alternativamente puede usarse un inhibidor de ROCK en lugar de blebistatina para aumentar la supervivencia de PSC después de disociarse para dar células individuales.

Para diferenciar eficientemente las células RPE de las PSC de células individuales, un recuento preciso de la densidad de entrada puede aumentar la eficiencia de la diferenciación de RPE. Por lo tanto, generalmente se cuenta la suspensión de células individuales de las PSC antes de la siembra. Por ejemplo, la suspensión de células individuales de PSC se cuenta mediante un hemocitómetro o un contador de células automatizado, tal como VICELL® o TC20. Las células pueden diluirse hasta una densidad celular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 500.000 células/mL, de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 200.000 células/mL, o de aproximadamente 75.000 a aproximadamente 150.000 células/mL. En un ejemplo no limitativo, la suspensión de células individuales de PSC se diluye hasta una densidad de aproximadamente 100 000 células/mL en un medio de cultivo completamente definido tal como medio ESSENTIAL 8™ (E8™).

Una vez que se obtiene una suspensión de células individuales de PSC a una densidad celular conocida, generalmente se siembran las células en un recipiente de cultivo apropiado, tal como una placa de cultivo tisular, tal como un matraz, una placa de 6 pocillos, 24 pocillos o 96 pocillos. Un recipiente de cultivo usado para cultivar la(s) célula(s) puede incluir, pero no se limita particularmente a: matraz, matraz para cultivo tisular, placa, placa de petri, placa para cultivo tisular, plato múltiple, microplaca, placa de micropocillos, placa múltiple, placa de múltiples pocillos, microportaobjetos, portaobjetos de cámara, tubo, bandeja, CELLSTACK® Chambers, bolsa de cultivo y botella de rodillo, siempre que pueda cultivar las células madre en el mismo. Las células se pueden cultivar en un volumen de al menos o aproximadamente 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, 550 ml, 600 ml, 800 ml, 1000 ml, 1500 ml, o cualquier intervalo derivable en el mismo, dependiendo de las necesidades del cultivo. En una determinada realización, el recipiente de cultivo puede ser un biorreactor, que puede referirse a cualquier dispositivo o sistema *ex vivo* que soporta un entorno biológicamente activo de manera que las células pueden propagarse. El biorreactor puede tener un volumen de al menos o aproximadamente 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500 litros, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 metros cúbicos, o cualquier intervalo derivable en el mismo.

En ciertos aspectos, las PSC, tales como las iPSC, se siembran en placas a una densidad celular adecuada para una diferenciación eficiente. Generalmente, las células se siembran en placas a una densidad celular de

aproximadamente 1000 a aproximadamente 40.000 células/cm², tal como de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 40.000 células/cm². En una placa de 6 pocillos, las células pueden sembrarse a una densidad celular de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 400.000 células por pocillo. En métodos a modo de ejemplo, las células se siembran a una densidad celular de aproximadamente 100.000, aproximadamente 150.000, aproximadamente 200.000, aproximadamente 250.000, aproximadamente 300.000 o aproximadamente 350.000 células por pocillo, tal como aproximadamente 200.00 células por pocillo.

Las PSC, tales como las iPSC, se cultivan generalmente en placas de cultivo recubiertas por una o más proteínas de adhesión celular para promover la adhesión celular mientras se mantiene la viabilidad celular. Por ejemplo, las proteínas de adhesión celular preferidas incluyen proteínas de la matriz extracelular tales como vitronectina, laminina, colágeno y/o fibronectina que pueden usarse para recubrir una superficie de cultivo como un medio para proporcionar un soporte sólido para el crecimiento celular pluripotente. El término "matriz extracelular" se reconoce en la técnica. Sus componentes incluyen una o más de las siguientes proteínas: fibronectina, laminina, vitronectina, tenascina, entactina, trombospodina, elastina, gelatina, colágeno, fibrilina, merosina, ancorina, condronectina, proteína de enlace, sialoproteína ósea, osteocalcina, osteopontina, epinectina, hialuronectina, ondulina, epilagina y kalinina. En métodos a modo de ejemplo, las PSC se hacen crecer en placas de cultivo recubiertas con vitronectina o fibronectina. En algunas realizaciones, las proteínas de adhesión celular son proteínas humanas.

Las proteínas de la matriz extracelular (ECM) pueden ser de origen natural y purificarse a partir de tejidos humanos o animales o, alternativamente, las proteínas ECM pueden ser proteínas recombinantes modificadas por ingeniería genética o de naturaleza sintética. Las proteínas ECM pueden ser una proteína completa o estar en forma de fragmentos peptídicos, nativos o modificadas por ingeniería. Los ejemplos de proteína ECM que pueden ser útiles en la matriz para el cultivo celular incluyen laminina, colágeno I, colágeno IV, fibronectina y vitronectina. En algunas realizaciones, la composición de matriz incluye fragmentos peptídicos generados sintéticamente de fibronectina o fibronectina recombinante. En algunas realizaciones, la composición de matriz está libre de componentes xenogénicos. Por ejemplo, en la matriz libre de componentes xenogénicos para cultivar células humanas, se pueden usar componentes de matriz de origen humano, en donde se pueden excluir cualquier componente animal no humano.

En algunos aspectos, la concentración total de proteínas en la composición de matriz puede ser de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 1 mg/mL. En algunas realizaciones preferidas, la concentración total de proteínas en la composición de matriz es de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 300 µg/mL. En realizaciones más preferidas, la concentración total de proteínas en la composición de la matriz es de aproximadamente 5 µg/mL a aproximadamente 200 µg/mL.

Las células, tales como las células RPE o PSC, pueden cultivarse con nutrientes necesarios para soportar el crecimiento de cada población específica de células. Generalmente, las células se cultivan en medios de crecimiento que incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y un tampón para mantener el pH. El medio también puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (tales como aminoácidos no esenciales), vitamina(s), factores de crecimiento, citocinas, sustancias antioxidantes, ácido pirúvico, agentes tamponantes y sales inorgánicas. Un medio de crecimiento a modo de ejemplo contiene un medio esencial mínimo, tal como medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio ESSENTIAL 8™ (E8™), complementado con diversos nutrientes, tales como aminoácidos no esenciales y vitaminas, para mejorar el crecimiento de células madre. Los ejemplos de medios esenciales mínimos incluyen, pero no se limitan a, medio esencial mínimo de Eagle (MEM) alfa, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio RPMI-1640, medio 199 y medio F12. Además, los medios esenciales mínimos pueden complementarse con aditivos tales como suero fetal bovino, de ternera o de caballo. Alternativamente, el medio puede estar libre de suero. En otros casos, los medios de crecimiento pueden contener "reemplazo de suero Knockout", denominado en la presente memoria formulación libre de suero optimizada para hacer crecer y mantener células indiferenciadas, tales como células madre, en cultivo. El reemplazo de suero KNOCKOUT™ se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0076747. Preferiblemente, las PSC se cultivan en un medio completamente definido y sin alimentador.

Por consiguiente, las PSC de células individuales se cultivan generalmente en un medio de cultivo completamente definido después de la siembra en placas. En ciertos aspectos, aproximadamente 18-24 horas después de la siembra, se aspira el medio y se añade medio nuevo, tal como medio E8™, al cultivo. En ciertos aspectos, las PSC de células individuales se cultivan en el medio de cultivo completamente definido durante aproximadamente 1, 2 ó 3 días después de la siembra en placas. Preferiblemente, las PSC de células individuales se cultivan en el medio de cultivo completamente definido durante aproximadamente 2 días antes de continuar con el proceso de diferenciación.

En algunas realizaciones, el medio puede contener o no contener cualquier alternativa al suero. Las alternativas al suero pueden incluir materiales que contienen de manera adecuada albúmina (tal como albúmina rica en lípidos, sustitutos de albúmina tales como albúmina recombinante, almidón vegetal, dextranos e hidrolizados de proteínas), transferrina (u otros transportadores de hierro), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol, 3'-tioglicerol o equivalentes de los mismos. Las alternativas al suero se pueden preparar mediante el método descrito en la publicación internacional n.º WO 98/30679, por ejemplo. Alternativamente, puede usarse

cualquier material disponible comercialmente por mayor comodidad. Los materiales disponibles comercialmente incluyen reemplazo de suero KNOCKOUT™ (KSR), concentrado de lípidos definidos químicamente (Gibco) y GLUTAMAX™ (Gibco).

Otras condiciones de cultivo pueden definirse adecuadamente. Por ejemplo, la temperatura de cultivo puede ser de aproximadamente 30 a 40 °C, por ejemplo, al menos o aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 °C pero particularmente no se limita las mismas. En una realización, las células se cultivan a 37 °C. La concentración de CO₂ puede ser de aproximadamente el 1 al 10 %, por ejemplo, de aproximadamente el 2 al 5 %, o cualquier intervalo derivable en el mismo. La tensión de oxígeno puede ser de al menos, hasta o aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 %, o cualquier intervalo derivable en el mismo.

a. Medios de diferenciación

Medio de inducción retiniano

Después de que las PSC de células individuales se hayan adherido a la placa de cultivo, las células se cultivan preferiblemente en medio de inducción retiniano para iniciar el proceso de diferenciación para dar células de linaje retiniano. El medio de inducción retiniano (RIM) comprende un inhibidor de la ruta de WNT y puede dar como resultado la diferenciación de las PSC para dar células del linaje retiniano. El RIM comprende adicionalmente un inhibidor de la ruta de TGFβ y un inhibidor de la ruta de BMP. Un medio RIM a modo de ejemplo se muestra en la tabla 3.

El RIM puede incluir DMEM y F12 a una razón de aproximadamente 1:1. En métodos a modo de ejemplo, se incluye un inhibidor de la ruta de WNT en el RIM, tal como CKI-7, se incluye un inhibidor de la ruta de BMP, tal como LDN193189, y se incluye el inhibidor de la ruta de TGFβ, tal como SB431542. Por ejemplo, el RIM comprende de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 50 nM, tal como aproximadamente 10 nM, de LDN193189, de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 5 μM, tal como aproximadamente 0,5 μM, de CKI-7, y de aproximadamente 0,5 μM a aproximadamente 10 μM, tal como aproximadamente 1 μM, de SB431542. Además, el RIM puede incluir reemplazo de suero Knockout, tal como de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %, aminoácidos no esenciales (NEAA) de MEM, piruvato de sodio, suplemento N-2, suplemento B-27, ácido ascórbico y factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1). Preferiblemente, el IGF1 es IGF1 libre de animales (AF-IGF1) y está comprendido en el RIM a desde aproximadamente 0,1 ng/mL hasta aproximadamente 10 ng/mL, tal como aproximadamente 1 ng/mL. Los medios se aspiran cada día y se reemplazan con RIM nuevo. Las células se cultivan generalmente en el RIM durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 días, tal como aproximadamente 1, 2, 3, 4 ó 5 días, tal como durante aproximadamente 2 días para producir células de linaje retiniano.

Medio de diferenciación retiniano

Las células de linaje retiniano se pueden cultivar entonces en medio de diferenciación retiniano (RDM) para una diferenciación adicional. El RDM comprende un inhibidor de la ruta de WNT, un inhibidor de la ruta de BMP, un inhibidor de la ruta de TGFβ y un inhibidor de MEK. En una realización, el RDM comprende un inhibidor de la ruta de WNT, tal como CKI-7, un inhibidor de la ruta de BMP, tal como LDN193189, un inhibidor de la ruta de TGFβ, tal como SB431542, y un inhibidor de MEK, tal como PD0325901. Alternativamente, el RDM puede comprender un inhibidor de la ruta de WNT, un inhibidor de la ruta de BMP, un inhibidor de la ruta de TGFβ y un inhibidor de bFGF. Generalmente, las concentraciones del inhibidor de la ruta de Wnt, el inhibidor de la ruta de BMP y el inhibidor de la ruta de TGFβ son mayores en el RDM en comparación con el RIM, tal como de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 veces mayor, tal como aproximadamente 10 veces mayores. En métodos a modo de ejemplo, el RDM comprende de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 200 nM, tal como aproximadamente 100 nM de LDN193189, de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM, tal como aproximadamente 5 μM, de CKI-7, de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM, tal como aproximadamente 10 μM, de SB431542 y de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 10 μM, tal como aproximadamente 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM, 6 μM, 7 μM, 8 μM o 9 μM de PD0325901. Un medio RDM a modo de ejemplo se muestra en la tabla 3.

Generalmente, el RDM comprende DMEM y F12 a una razón de aproximadamente 1:1, reemplazo de suero Knockout (por ejemplo, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %, tal como aproximadamente el 1,5 %), NEAA de MEM, piruvato de sodio, suplemento N-2, suplemento B-27, ácido ascórbico e IGF1 (por ejemplo, de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 50 ng/mL, tal como aproximadamente 10 ng/mL). En métodos particulares, se proporciona las células RDM nuevo cada día después de la aspiración de los medios del día anterior. Generalmente, las células se cultivan en el RDM durante aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 días, tal como durante aproximadamente 7 días para derivar células retinianas diferenciadas.

Medio retiniano

A continuación, las células retinianas diferenciadas pueden diferenciarse aún adicionalmente cultivando las células en medio retiniano (RM). El medio retiniano comprende activina A y puede comprender adicionalmente nicotinamida. El RM puede comprender de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 ng/mL, tal como aproximadamente

100 ng/mL, de activina A, y de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, tal como aproximadamente 10 mM, de nicotinamida. Alternativamente, el RM puede comprender otros activadores de la ruta de TGF- β tales como GDF1 y/o activadores de la ruta de WNT tales como WAY-316606, IQ1, QS11, SB-216763, BIO (6-bromoindirubin-3'-oxima), o 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencil-amino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina. Alternativamente, el RM puede comprender adicionalmente WNT3a. Un medio RM a modo de ejemplo se muestra en la tabla 3.

El RM puede incluir DMEM y F12 a una razón de aproximadamente 1:1, reemplazo de suero Knockout a de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %, tal como aproximadamente el 1,5 %, aminoácidos no esenciales (NEAA) de MEM, piruvato de sodio, suplemento N-2, suplemento B-27 y ácido ascórbico. El medio se puede cambiar diariamente con RM a temperatura ambiente. Las células se cultivan generalmente en el RM durante aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 días, tal como durante aproximadamente 10 días para derivar células RPE en diferenciación.

Medio de maduración de RPE

Para una mayor diferenciación de las células RPE, las células se cultivan preferiblemente en medio de maduración de RPE (RPE-MM). Los medios de RPE-MM a modo de ejemplo se muestran en la tabla 3. El medio de maduración de RPE puede comprender de aproximadamente 100 μ g/mL a aproximadamente 300 μ g/mL, tal como aproximadamente 250 μ g/mL, de taurina, de aproximadamente 10 μ g/L a aproximadamente 30 μ g/L, tal como aproximadamente 20 μ g/L, de hidrocortisona y de aproximadamente 0,001 μ g/L a aproximadamente 0,1 μ g/L, tal como aproximadamente 0,013 μ g/L, de triyodotironina. Además, el RPE-MM puede comprender MEM alfa, suplemento N-2, aminoácidos no esenciales (NEAA) de MEM y piruvato de sodio, y suero bovino fetal (por ejemplo, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 %, tal como de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %). El medio se puede cambiar cada dos días con RPE-MM a temperatura ambiente. Las células se cultivan generalmente en RPE-MM durante de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, tal como aproximadamente 5 días. A continuación, las células pueden disociarse, tal como con una enzima de disociación celular, volver a sembrarse y cultivarse durante un periodo de tiempo adicional, tal como un de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 días adicionales, tal como de aproximadamente 15 a 20 días, para una diferenciación adicional para dar células RPE. En realizaciones adicionales, el RPE-MM no incluye un inhibidor de la ruta de WNT. Las células RPE pueden criopreservarse en esta etapa.

b. Maduración de células RPE

Entonces, las células RPE se pueden cultivar en el RPE-MM durante un periodo de tiempo continuado para la maduración. En algunas realizaciones, las células RPE se hacen crecer en pocillos, tal como una placa de 6 pocillos, 12 pocillos, 24 pocillos o 10 cm. Las células RPE pueden mantenerse en medio RPE durante de aproximadamente cuatro a aproximadamente diez semanas, tal como durante de aproximadamente seis a ocho semanas, tal como durante seis, siete u ocho semanas. En métodos a modo de ejemplo para la maduración continua de las células RPE, las células se pueden disociar en una enzima disociada celular tal como TRYPLE™ y vuelven a sembrarse en un ensamblaje de armazón degradable tal como en un diseño de SNAPWELL™ especializado durante de aproximadamente una a dos semanas en RPE-MM con un inhibidor de MEK tal como PD0325901. Alternativamente, el RPE-MM puede comprender un inhibidor de bFGF en lugar del inhibidor de MEK. Los métodos para cultivar células RPE en un armazón degradable se enseñan y describen en la publicación PCT n.º WO 2014/121077. En resumen, los componentes principales de este método son una placa CORNING® COSTAR® SNAPWELL™, una junta tórica bioinerte y un armazón biodegradable. Las placas SNAPWELL™ proporcionan la estructura y plataforma para los armazones biodegradables. La membrana microporosa que crea un lado apical y basal es ideal para proporcionar soporte al armazón, así como aislar los distintos lados de la capa polarizada de células. La capacidad del elemento de inserción SNAPWELL™ para desprender la membrana permite que el anillo de soporte del elemento de inserción se use como anclaje para el armazón. Las monocapas diferenciadas, polarizadas y confluentes resultantes de las células RPE funcionales pueden criopreservarse en esta etapa (por ejemplo, en medio libre de componentes xenogénicos CS10).

En algunas realizaciones, las células RPE maduras pueden desarrollarse adicionalmente para dar monocapas de células RPE funcionales que se comportan como tejido RPE intacto mediante cultivo continuado en el RPE-MM con productos químicos adicionales o moléculas pequeñas que promueven la maduración de RPE. Por ejemplo, estas moléculas pequeñas son inductores de cilios primarios tales como prostaglandina E2 (PGE2) o afidicolina. El PGE2 puede añadirse al medio a una concentración de aproximadamente 25 μ M a aproximadamente 250 μ M, tal como de aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 100 μ M. Alternativamente, el RPE-MM puede comprender inhibidores de la ruta de WNT canónicos. Inhibidores de la ruta de WNT canónicos a modo de ejemplo son N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-3-feniltieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP2) o 4-(1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isoindol-2-il)-N-8-quinolinil-benzamida (endo-IWR1). Las células se pueden cultivar en este medio durante un periodo de tiempo adicional, tal como de aproximadamente una semana a aproximadamente cinco semanas adicionales, tal como aproximadamente otras dos a cuatro semanas para obtener monocapas de células RPE maduras y funcionales. Por lo tanto, los métodos descritos actualmente proporcionan células RPE maduras a partir de suspensiones de células individuales de células pluripotentes que pueden reproducirse de manera sistemática a gran escala para aplicaciones clínicas.

c. Criopreservación de células RPE

Las células epiteliales del pigmento retiniano producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria pueden criopreservarse, véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º 2012/149484 A2. Las células pueden criopreservarse con o sin un sustrato. En varias realizaciones, la temperatura de almacenamiento oscila entre aproximadamente -50 °C y aproximadamente -60 °C, entre aproximadamente -60 °C y aproximadamente -70 °C, entre aproximadamente -70 °C y aproximadamente -80 °C, entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -90 °C, entre aproximadamente -90 °C y aproximadamente -100 °C, e intervalos superpuestos de los mismos. En algunas realizaciones, se usan temperaturas más bajas para el almacenamiento (por ejemplo, mantenimiento) de las células criopreservadas. En varias realizaciones, se usa nitrógeno líquido (u otro refrigerante líquido similar) para almacenar las células. En realizaciones adicionales, las células se almacenan durante más de aproximadamente 6 horas. En realizaciones adicionales, las células se almacenan durante aproximadamente 72 horas. En varias realizaciones, las células se almacenan durante de 48 horas a aproximadamente una semana. En otras realizaciones más, las células se almacenan durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. En realizaciones adicionales, las células se almacenan durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Las células también se pueden almacenar durante tiempos más largos. Las células se pueden criopreservar por separado o sobre un sustrato, tal como cualquiera de los sustratos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se pueden usar crioprotectores adicionales. Por ejemplo, las células pueden criopreservarse en una disolución de criopreservación que comprende uno o más crioprotectores, tales como DM80, albúmina sérica, tal como albúmina de suero humana o bovina. En ciertas realizaciones, la disolución comprende aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 2,5 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 % o aproximadamente el 10 % de DMSO. En otras realizaciones, la disolución comprende de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 4 %, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 6 %, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 7 %, de aproximadamente el 6 % a aproximadamente el 8 %, de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 9 %, o de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) o albúmina. En una realización específica, la disolución comprende DMSO al 2,5 %. En otra realización específica, la disolución comprende DMSO al 10 %.

Las células pueden enfriarse, por ejemplo, a aproximadamente 1 °C por minuto durante la criopreservación. En algunas realizaciones, la temperatura de criopreservación es aproximadamente -80 °C a aproximadamente -180 °C, o de aproximadamente -125 °C a aproximadamente -140 °C. En algunas realizaciones, las células se enfrían hasta 4 °C antes de enfriarse a aproximadamente 1 °C/minuto. Las células criopreservadas se pueden transferir a la fase de vapor de nitrógeno líquido antes de descongelarse para su uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las células han alcanzado aproximadamente -80 °C, se transfieren a una zona de almacenamiento de nitrógeno líquido. La criopreservación también se puede realizar utilizando un congelador de tasa controlada. Las células criopreservadas pueden descongelarse, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, y normalmente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

d. Inhibidores

Inhibidores de la ruta de WNT

WNT es una familia de moléculas de señalización secretadas altamente conservadas que regulan las interacciones entre células y están relacionadas con el gen de la polaridad del segmento *Drosophila*, sin alas. En seres humanos, la familia de genes de WNT codifica para glicoproteínas ricas en cisteína de 38 a 43 kDa. Las proteínas WNT tienen una secuencia señal hidrófoba, una secuencia consenso de oligosacáridos unidos a asparagina conservada (véase, por ejemplo, Shimizu y col. *Cell Growth Differ* 8: 1349-1358 (1997)) y 22 residuos de cisteína conservados. Debido a su capacidad para promover la estabilización de la beta-catenina citoplasmática, las proteínas WNT pueden actuar como activadores transcripcionales e inhibir la apoptosis. Se ha demostrado que la sobreexpresión de proteínas WNT particulares está asociada con ciertos cánceres.

Un inhibidor de WNT en la presente memoria se refiere a inhibidores de WNT en general. Por lo tanto, un inhibidor de WNT se refiere a cualquier inhibidor de un miembro de las proteínas de la familia de WNT incluyendo Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt4, Wnt5A, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt9A, Wnt10a, Wnt11 y Wnt16. Ciertas realizaciones de los presentes métodos se refieren a un inhibidor de WNT en el medio de diferenciación. Los ejemplos de inhibidores de WNT adecuados, ya conocidos en la técnica, incluyen diclorhidrato de N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolina-8-sulfonamida (CKI-7), N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-4-oxo-3-feniltieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP2), N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-3-(2-metoxifenil)-4-oxotieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP4), [(5-metil-2-furanil)metileno]hidrazida del ácido 2-fenoxibenzoico (PNU 74654), 2,4-diamino-quinazolina, quercetina, 3,5,7,8-tetrahidro-2-[4-(trifluorometil)fenil]-4H-tiopirano[4,3-d]pirimidin-4-ona (XAV939), 2,5-dicloro-N-(2-metil-4-nitrofenil)bencenosulfonamida (FH 535), N-[4-[2-

etil-4-(3-metilfenil)-5-tiazolil]-2-piridinil]benzamida (TAK 715), proteína relacionada con Dickkopf uno (DKK1), y proteína relacionada con frizzled secretada (SFRP1) 1. Además, los inhibidores de WNT pueden incluir anticuerpos frente a, variantes negativas dominantes de, y ARNip y ácidos nucleicos antisentido que suprimen la expresión de, WNT. La inhibición de WNT también se puede lograr usando interferencia mediada por ARN (iARN).

Inhibidores de la ruta de BMP

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta (TGFβ). Se considera que las BMP constituyen un grupo de señales morfogenéticas fundamental, que orquesta la arquitectura a través del cuerpo. El funcionamiento importante de las señales de BMP en la fisiología se enfatiza mediante la multitud de papeles para la señalización de BMP desregulada en procesos patológicos.

Los inhibidores de la ruta de BMP pueden incluir inhibidores de la señalización de BMP en general o inhibidores específicos para BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP10 o BMP15. Los inhibidores de BMP a modo de ejemplo incluyen clorhidrato de 4-(6-(4-(piperazin-1-il)fenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)quinolina (LDN193189), diclorhidrato de 6-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-3-(4-piridinil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (dorsomorfina), 4-[6-[4-(1-metiletoxi)fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina (DMH1), 4-[6-[4-[2-(4-morfolinil)etoxi]fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]quinolina (DMH-2) y 5-[6-(4-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]quinolina (ML 347).

Inhibidores de la ruta de TGFβ

El factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) es una proteína secretada que controla la proliferación, la diferenciación celular y otras funciones en la mayoría de las células. Es un tipo de citocina que desempeña un papel en la inmunidad, cáncer, asma bronquial, fibrosis pulmonar, enfermedad cardíaca, diabetes y esclerosis múltiple. TGF-β existe en al menos tres isoformas denominadas TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3. La familia de TGF-β es parte de una superfamilia de proteínas conocida como la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta, que incluye inhibinas, activina, hormona anti-mülleriana, proteína morfogenética ósea, decapentaplégico y Vg-1.

Los inhibidores de la ruta de TGFβ pueden incluir cualquier inhibidor de la señalización de TGFβ en general. Por ejemplo, el inhibidor de la ruta de TGFβ es 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (SB431542), 6-[2-(1,1-metiletil)-5-(6-metil-2-piridinil)-1H-imidazol-4-il]quinoxalina (SB525334), hidrato de clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124), hidrato de 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)-benzamida, hidrato de 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida, factor de determinación izquierda-derecha (Lefty), 3-(6-metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotoamida (A 83-01), 4-[4-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (D 4476), 4-[4-[3-(2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]-2-piridinil]-N-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-benzamida (GW 788388), 4-[3-(2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]-quinolina (LY 364847), 4-[2-fluoro-5-[3-(6-metil-2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]fenil]-1H-pirazol-1-etanol (R 268712) o 2-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina (RepSox).

Inhibidores de MEK

Un inhibidor de MEK es un producto químico o fármaco que inhibe las enzimas de proteína cinasa activadas por mitógeno MEK1 o MEK2. Se pueden usar para afectar a la ruta de MAPK/ERK. Por ejemplo, los inhibidores de MEK incluyen N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-benzamida (PD0325901), N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodoanilino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxopirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida (GSK1120212), 6-(4-bromo-2-fluoroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxi-etoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida (MEK162), N-[3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodoanilino)-6-metoxifenil]-1-(2,3-dihidroxiopropil)ciclopropano-1-sulfonamida (RDEA119) y 6-(4-bromo-2-cloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxi-etoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida (AZD6244).

Inhibidores de bFGF

El factor de crecimiento de fibroblastos básico (también conocido como bFGF, FGF2 o FGF-β) es un miembro de la familia de factor de crecimiento de fibroblastos. bFGF está presente en las membranas basales y en la matriz extracelular subendotelial de los vasos sanguíneos. Además, bFGF es un componente común del medio de cultivo ESC humano en el que es necesario que las células permanezcan en un estado indiferenciado.

Los inhibidores de bFGF en la presente memoria se refieren a inhibidores de bFGF en general. Por ejemplo, los inhibidores de bFGF incluyen, pero no se limitan a, N-[2-[4-(dietilamino)butil]amino-6-(3,5-dimetoxifenil)pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-N'-(1,1-dimetiletil) urea (PD173074), 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona (PD 98059), 1-terc-butil-3-[6-(2,6-diclorofenil)-2-[[4-(dietilamino)butil]amino]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]urea (PD161570), hidrato de clorhidrato de 6-(2,6-diclorofenil)-2-[[4-[2-(dietilamino)etoxi]fenil]amino]-8-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (PD166285), N-[2-amino-6-(3,5-dimetoxifenil)pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-N'-(1,1-dimetiletil)-urea (PD166866) y MK-2206.

IV. Uso de células epiteliales del pigmento retiniano

Ciertos aspectos proporcionan un método para producir una población de células RPE o enriquecidas en que se puede usar para una serie de importantes fines de investigación, desarrollo y comerciales.

En algunos aspectos, los métodos descritos en la presente memoria dan como resultado una población celular de al menos o aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 10^{10} células (o cualquier intervalo derivable en el mismo) que comprende al menos o aproximadamente el 90 % (por ejemplo, al menos o aproximadamente el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o cualquier intervalo derivable de los mismos) de células RPE.

En ciertos aspectos, las células de partida para los presentes métodos pueden comprender el uso de al menos o aproximadamente 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} células o cualquier intervalo derivable de los mismos. La población celular inicial puede tener una densidad de siembra de al menos o aproximadamente 10 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 células/ml, o cualquier intervalo derivable en el mismo.

Las células RPE producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse en cualquier método y aplicación actualmente conocido en la técnica para células RPE. Por ejemplo, puede proporcionarse un método para evaluar un compuesto, que comprende someter a ensayo una propiedad farmacológica o toxicológica del compuesto sobre la célula RPE. También se puede proporcionar un método para evaluar un compuesto para determinar un efecto sobre una célula RPE, que comprende: a) poner en contacto las células RPE proporcionadas en la presente memoria con el compuesto; y b) someter a ensayo el efecto del compuesto sobre las células RPE.

A. Selección de compuestos de prueba

Las células RPE pueden usarse comercialmente para examinar factores (tales como disolventes, fármacos de molécula pequeña, péptidos, oligonucleótidos) o condiciones ambientales (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan a las características de tales células y su diversa progenie. Por ejemplo, los compuestos de prueba pueden ser compuestos químicos, moléculas pequeñas, polipéptidos, factores de crecimiento, citocinas u otros agentes biológicos.

En una realización, un método incluye poner en contacto una célula RPE con un agente de prueba y determinar si el agente de prueba modula la actividad o función de las células RPE dentro de la población. En algunas aplicaciones, los ensayos de selección se usan para la identificación de agentes que modulan la proliferación de células RPE o alteran la diferenciación de células RPE. Se pueden realizar ensayos de selección *in vitro* o *in vivo*. Los métodos de selección e identificación de agentes oculares o agentes de RPE incluyen aquellos adecuados para la selección de alto rendimiento. Por ejemplo, las células RPE pueden posicionarse o colocarse en una placa de cultivo, matraz, botella de rodillo o placa (por ejemplo, una sola placa o plato de múltiples pocillos tal como placa o plato de 8, 16, 32, 64, 96, 384 y 1536 pocillos), opcionalmente en ubicaciones definidas, para la identificación de moléculas potencialmente terapéuticas. Las bibliotecas que pueden examinarse incluyen, por ejemplo, bibliotecas de moléculas pequeñas, bibliotecas de ARNip y bibliotecas de vectores de transfección adenovirales.

Otras aplicaciones de selección se refieren a las pruebas de compuestos farmacéuticos para determinar su efecto sobre el mantenimiento o reparación del tejido retiniano. La selección puede realizarse ya sea porque el compuesto está diseñado para tener un efecto farmacológico sobre las células, o porque un compuesto diseñado para tener efectos en otras partes puede tener efectos secundarios no deseados en las células de este tipo de tejido.

B. Terapia y trasplante

Otras realizaciones también pueden proporcionar el uso de células RPE para mejorar el mantenimiento y reparación del tejido ocular para cualquier afección que lo necesite, incluyendo degeneración retiniana o lesiones significativas.

Para determinar la idoneidad de las composiciones celulares para la administración terapéutica, las células se pueden someter a prueba en primer lugar en un modelo animal adecuado. En un aspecto, las células RPE se evalúan para determinar su capacidad para sobrevivir y mantener su fenotipo *in vivo*. Se administran composiciones celulares a animales inmunodeficientes (por ejemplo, ratones desnudos o animales que se vuelven inmunodeficientes de manera química o por irradiación). Se recogen los tejidos después de un periodo de crecimiento y se evalúan para determinar si todavía están presentes células derivadas de células madre pluripotentes.

Hay varios animales disponibles para someter a prueba la idoneidad de las composiciones de células RPE. Por ejemplo, la rata Royal College of Surgeon (RCS) es un modelo bien conocido de distrofia retiniana (Lund y col., 2006). Además, la idoneidad y la supervivencia de las células RPE se pueden determinar mediante trasplante (por ejemplo, subcutáneo o subretiniano) en matrigel en animales inmunodeficientes, tales como ratones NOG (Kanemura y col., 2014).

Las células RPE humanas descritas en la presente memoria, o una composición farmacéutica que incluye estas células, pueden usarse para la fabricación de un medicamento para tratar una afección en un paciente que lo necesita. Las células RPE se pueden crioconservar previamente. En ciertos aspectos, las células RPE descritas se derivan de iPSC y, por lo tanto, se pueden usar para proporcionar “medicina personalizada” para pacientes con enfermedades oculares. En algunas realizaciones, las células somáticas obtenidas de pacientes pueden modificarse por ingeniería genética para corregir la mutación que provoca la enfermedad, diferenciarse para dar RPE y modificarse por ingeniería para formar un tejido RPE. Este tejido RPE puede usarse para reemplazar el RPE degenerado endógeno del mismo paciente. Alternativamente, pueden usarse iPSC generadas a partir de un donante sano o de “superdonantes” homocigóticos para HLA. Las células RPE se pueden tratar *in vitro* con ciertos factores, tales como factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), factor de crecimiento transformante (TGF)-beta y/o ácido retinoico para generar un entorno antiinflamatorio e inmunosupresor *in vivo*.

Varias afecciones oculares pueden tratarse o prevenirse mediante la introducción de las células RPE obtenidas usando los métodos descritos en la presente memoria. Las afecciones incluyen enfermedades o trastornos retinianos asociados generalmente con disfunción o degradación retiniana, lesión retiniana y/o pérdida del epitelio pigmentario retiniano. Las afecciones que pueden tratarse incluyen, sin limitación, enfermedades degenerativas de la retina, tales como distrofia macular de Stargardt, retinosis pigmentaria, degeneración macular (tal como degeneración macular relacionada con la edad), glaucoma y retinopatía diabética. Las afecciones adicionales incluyen amaurosis congénita de Leber, degeneración macular hereditaria o adquirida, enfermedad de Best, desprendimiento de la retina, atrofia girata, coroideremia, distrofia de patrones, otras distrofias del RPE y daño de RPE y retiniano debido a daño provocado por uno cualquiera de lesiones luminosas, por láser, inflamatorias, infecciosas, por radiación, neovasculares o por traumatismo. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar o prevenir una afección caracterizada por degeneración retiniana, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende células RPE. Estos métodos pueden incluir seleccionar un sujeto con una o más de estas afecciones y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las células RPE suficiente para tratar la afección y/o mejorar los síntomas de la afección. Las células RPE pueden trasplantarse en diversos formatos. Por ejemplo, las células RPE pueden introducirse en el sitio diana en forma de suspensión celular, o adherirse a una matriz, matriz extracelular o sustrato tal como un polímero biodegradable, como monocapa, o una combinación. Las células RPE también pueden trasplantarse juntas (trasplante conjunto) con otras células retinianas, tales como con fotorreceptores. En algunas realizaciones, las células RPE se producen a partir de iPSC del sujeto que va a tratarse y, por lo tanto, son autólogas. En otras realizaciones, las células RPE se producen a partir de un donante de MHC coincidente.

En algunas realizaciones, las células RPE pueden usarse para injertos de RPE autólogos en aquellos sujetos adecuados para recibir medicina regenerativa. Las células RPE pueden trasplantarse en combinación con otras células retinianas, tal como con fotorreceptores. El trasplante de las células RPE producidas mediante los métodos descritos puede realizarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos para realizar trasplantes de RPE en la patente estadounidense n.º 5.962.027 y la patente estadounidense n.º 6.045.791. Según una realización, el trasplante se realiza a mediante cirugía de vitrectomía pars plana seguida por la administración de las células a través de una pequeña abertura retiniana en el espacio subretiniano o mediante inyección directa. Las células RPE pueden introducirse en el sitio diana en forma de suspensión celular, adherida a una matriz, tal como matriz extracelular, o proporcionarse sobre sustrato tal como un polímero biodegradable. Las células RPE también se pueden trasplantar juntas (trasplante conjunto) con otras células, tales como células retinianas con fotorreceptores. Por lo tanto, se proporciona una composición que comprende células RPE obtenidas mediante los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, estas células RPE incluyen un potenciador de tirosinasa unido operativamente a un promotor y un ácido nucleico que codifica para un marcador. En otras realizaciones, las células RPE también incluyen un segundo promotor constitutivo unido operativamente a un ácido nucleico que codifica para un segundo marcador.

Composiciones farmacéuticas de las células RPE producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria. Esta composición puede incluir al menos aproximadamente 1×10^3 células RPE, aproximadamente 1×10^4 células RPE, aproximadamente 1×10^5 células RPE, aproximadamente 1×10^6 células RPE, aproximadamente 1×10^7 células RPE, aproximadamente 1×10^8 células RPE o aproximadamente 1×10^9 células RPE. En determinadas realizaciones, las composiciones son preparaciones sustancialmente purificadas (con respecto a células distintas de RPE) que comprenden células RPE diferenciadas producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria. También se proporcionan composiciones que incluyen un armazón, tal como un portador polimérico y/o una matriz extracelular, y una cantidad eficaz de las células RPE producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, las células se proporcionan como una monocapa de células. Generalmente, el material de matriz si es fisiológicamente aceptable y adecuado para su uso en aplicaciones *in vivo*. Por ejemplo, los materiales fisiológicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, materiales de matriz sólida que son absorbibles y/o no absorbibles, tales como submucosa del intestino delgado (SIS), alginato reticulado o no reticulado, hidrocoloide, espumas, gel de colágeno, esponja de colágeno, malla de poli(ácido glicólico) (PGA), vellón y bioadhesivos.

Los portadores poliméricos adecuados también incluyen mallas porosas o esponjas formadas por polímeros sintéticos o naturales, así como disoluciones de polímeros. Por ejemplo, la matriz es una malla polimérica o esponja,

o un hidrogel polimérico. Los polímeros naturales que pueden usarse incluyen proteínas tales como colágeno, albúmina y fibrina; y polisacáridos tales como alginato y polímeros de ácido hialurónico. Los polímeros sintéticos incluyen polímeros tanto biodegradables como no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros biodegradables incluyen polímeros de hidroxiácidos tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PGLA), poliortoésteres, polianhídridos, polifosfacenos y combinaciones de los mismos. Los polímeros no biodegradables incluyen poliacrilatos, polimetacrilatos, etileno-acetato de vinilo y poli(alcoholes vinílicos).

Pueden usarse polímeros que pueden formar hidrogeles iónicos o covalentemente reticulados que son maleables. Un hidrogel es una sustancia formada cuando un polímero orgánico (natural o sintético) se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura de red abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los ejemplos de materiales que se pueden usar para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato, polifosfacinas y poliacrilatos, que son reticulados iónicamente, o copolímeros de bloque tales como PLURONICS™ o TETRONICS™, copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-polipropilenglicol que se reticulan por temperatura o H₂, respectivamente. Otros materiales incluyen proteínas tales como fibrina, polímeros tales como polivinilpirrolidona, ácido hialurónico y colágeno.

Las composiciones farmacéuticas pueden empaquetarse opcionalmente en un recipiente adecuado con instrucciones escritas para un propósito deseado, tal como la reconstitución de la función de las células RPE para mejorar una enfermedad o anomalía del tejido retiniano. En algunas realizaciones, las células RPE producidas mediante los métodos descritos pueden modificarse por ingeniería para formar RPE, que puede usarse para reemplazar RPE degenerado de un sujeto que lo necesita.

C. Distribución para fines comerciales, terapéuticos y de investigación

En algunas realizaciones, se proporciona un sistema de reactivos que incluye un conjunto o combinación de células que comprenden una población de células enriquecida en RPE que existe en cualquier momento durante la fabricación, distribución o uso. Los conjuntos de células comprenden cualquier combinación de la población celular descrita en la presente memoria en combinación con células madre pluripotentes indiferenciadas u otros tipos de células diferenciadas, que a menudo comparten el mismo genoma. Cada tipo de célula se pueden empaquetar juntos, o en recipientes separados en la misma instalación, o en diferentes ubicaciones, al mismo tiempo o en momentos diferentes, bajo el control de la misma entidad o diferentes entidades que comparten una relación comercial.

Las composiciones farmacéuticas pueden empaquetarse opcionalmente en un recipiente adecuado con instrucciones escritas para un propósito deseado, tal como la reconstitución de la función de las células RPE para mejorar una enfermedad o lesión del tejido ocular.

V. Kits

En algunas realizaciones, se proporciona un kit que puede incluir, por ejemplo, uno o más medios y componentes para la producción de células RPE. El sistema de reactivos puede empaquetarse o bien en medios acuosos o bien en forma liofilizada, cuando sea apropiado. Los medios de recipiente de los kits incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otros medios de recipiente, en los que se puede colocar un componente, y preferiblemente, del que se pueden tomar alícuotas de manera adecuada. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit contendrá generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que se pueden colocar los componentes adicionales por separado. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también pueda proporcionarse en otros medios de recipiente. Los kits también incluirán normalmente un medio para contener el/los componente(s) del kit en estrecho confinamiento para la venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se retienen los viales deseados. El kit también puede incluir instrucciones para su uso, tal como en formato impreso o electrónico, tal como formato digital.

VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, a la luz de la presente descripción, deberán apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y todavía obtener un resultado igual o similar sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1 - Preparación de población de células madre pluripotentes de partida

Una población de partida de células RPE puede derivarse a partir de células madre pluripotentes tales como células ES e iPSC. En métodos a modo de ejemplo, las células RPE se derivaron a partir de iPSC humanas reprogramadas a partir de células somáticas mediante métodos conocidos en la técnica, tales como la patente estadounidense n.º 8.546.140, la patente estadounidense n.º 8.741.648, la patente estadounidense n.º 8.691.574, la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 20090246875, la patente estadounidense publicada n.º 8.278.104, la patente estadounidense publicada n.º 9.005.967, la patente estadounidense n.º 8.058.065, la patente estadounidense n.º 8.129.187, la publicación PCT n.º WO 2007/069666 A1, la patente estadounidense n.º 8.183.038 y la patente estadounidense n.º 8.268.620. En un método a modo de ejemplo, se usaron factores de programación nuclear Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 para producir células madre pluripotentes a partir de una célula somática. En otro método a modo de ejemplo, se usaron factores de programación nuclear Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, L-Myc y el antígeno T grande de SV40 para producir células madre pluripotentes a partir de una célula somática.

Las iPSC se cultivaron sin capas alimentadoras de ratón o ser humano en medio de cultivo completamente definido, tal como medio ESSENTIAL 8™ (E8™), en una placa recubierta por vitronectina. La vitronectina se diluyó 1:200 en DPBS sin calcio o magnesio y las placas de cultivo se recubrieron con la vitronectina y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Las iPSC se dividieron cuando eran preconfluentes y no se dejaron crecer en exceso para evitar células no sanas y/o diferenciadas (Figura 1A).

Para derivar las células RPE, las iPSC se disociaron para dar una suspensión de células individuales para eliminar cualquier agregado o cuerpos embrioides. Para obtener la suspensión de células individuales, las células se lavaron con DPBS y se incubaron en una enzima de disociación celular tal como TRYPLE™ durante aproximadamente 10 min a 37 °C. Después, las células se desprendieron mediante pipeteo con una pipeta serológica y la suspensión celular se recogió en un tubo cónico. Si las células no se desprendieron con pipeteo suave, se dejó incubar los cultivos durante más tiempo, tal como 2-3 minutos adicionales. Para recoger todas las células, el recipiente de cultivo se lavó con medio E8™ a temperatura ambiente y luego se añadió el medio al tubo que contenía la suspensión celular. Además, se añadió blebistatina (por ejemplo, 2,5 µM) al medio E8™ para aumentar la supervivencia de las PSC después de la disociación para dar células individuales mientras que las células no se adhieren a un recipiente de cultivo. Para recoger las células, se centrifugaron a 400xg durante aproximadamente 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en un volumen apropiado de medio E8™.

Para diferenciar eficientemente las células RPE a partir de las iPSC de células individuales, la densidad de entrada de las iPSC de células individuales se contó con precisión mediante un contador celular automatizado tal como VICELL™ y se diluyó a una suspensión celular de aproximadamente 1×10^5 células/mL en medio E8™ a temperatura ambiente. Una vez que se obtuvo la suspensión de células individuales de iPSC a una densidad celular conocida, las células se sembraron en un recipiente de cultivo apropiado tal como una placa de 6 pocillos recubierta con vitronectina. Las células se sembraron a una densidad celular de aproximadamente 200.000 células por pocillo y se colocaron en una incubadora humidificada a 37 °C. Después de aproximadamente 18-24 horas, se aspiró el medio y se añadió medio E8™ nuevo al cultivo. Las células se cultivaron en el medio E8™ durante aproximadamente 2 días después de la siembra para obtener una adherencia adecuada a la placa.

Ejemplo 2 - Diferenciación de iPSC para dar células RPE

Una vez que las iPSC de células individuales sembradas a la densidad celular apropiadas se cultivaron durante aproximadamente 2 días como en el ejemplo 1, se cultivaron en diversos medios de diferenciación para derivar células RPE. El día 3, se aspiró el medio E8™ y se añadió medio de inducción retiniano (RIM) a temperatura ambiente (por ejemplo, tabla 3). En resumen, el RIM comprendía DMEM y F12 a una razón de aproximadamente 1:1, reemplazo de suero Knockout, aminoácidos no esenciales (NEAA) de MEM, piruvato de sodio, suplemento N-2, suplemento B-27 y ácido ascórbico. Además, el RIM comprendía un inhibidor de la ruta de WNT, un inhibidor de la ruta de BMP, un inhibidor de la ruta de TGFβ y un factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1). Cada día se aspiró el medio y se añadió RIM nuevo a las células. Las células se cultivaron en el RIM durante aproximadamente de dos a cuatro días.

Las células se cultivaron a continuación en medio de diferenciación retiniano (RDM) durante aproximadamente de siete a catorce días. En resumen, el RDM (tabla 2) comprendía DMEM y F12 a una razón de aproximadamente 1:1, reemplazo de suero Knockout, NEAA de MEM, piruvato de sodio, suplemento N-2, suplemento B-27 y ácido ascórbico. Además, el RDM comprendía un inhibidor de la ruta de WNT (por ejemplo, CKI-7), un inhibidor de la ruta de BMP (por ejemplo, LDN193189), un inhibidor de la ruta de TGFβ (por ejemplo, SB431542) y un inhibidor de MEK (por ejemplo, PD325901). La concentración del inhibidor de la ruta de Wnt, el inhibidor de la ruta de BMP y el inhibidor de la ruta de TGFβ era diez veces mayor en el RDM en comparación con el RIM. Cada día se aspiró el medio y se añadió RDM a temperatura ambiente a las células para producir células retinianas diferenciadas.

Para derivar las células RPE, las células se cultivaron entonces en medio retiniano (RM) durante de siete a diez días. El RM comprendía DMEM y F12 a una razón de aproximadamente 1:1, reemplazo de suero Knockout, NEAA de MEM, piruvato de sodio, suplemento N-2, suplemento B-27 y ácido ascórbico. Además, el RM comprendía

nicotinamida y activina A. El medio se cambió diariamente con RM a temperatura ambiente, lo que dio como resultado células RPE.

Para la maduración de las células RPE, las células se cultivaron en medio de maduración de RPE (RPE-MM) durante de cinco a diez días. El RPE-MM (tabla 2) comprendía MEM alfa, suero bovino fetal, suplemento N-2, NEAA de MEM y piruvato de sodio. Además, el RPE-MM contenía taurina, hidrocortisona y 3,3',5-triiodo-L-tironina (Figura 1C). El medio se cambió cada dos días con RPE-MM a temperatura ambiente. A continuación, las células se disociaron en una enzima de disociación celular y se volvieron a sembrar en placas recubiertas de vitronectina. En esta etapa, las células PRE derivadas se pueden crioconservar en medio libre de componentes xenogénicos CS10. Para continuar la maduración de RPE, las células sembradas en placa se cultivan durante aproximadamente otros quince días.

Ejemplo 3 - Maduración de las células RPE

Para la maduración continua de las células RPE producidas en el ejemplo 2, las células se disociaron en una enzima de disociación celular tal como TRYPLE™ y volvieron a sembrarse en un ensamblaje de armazón degradable en un diseño de SNAPWELL™ especializado durante 1-2 semanas en el RPE-MM con un inhibidor de MEK tal como PD325901. Esto dio como resultado monocapas diferenciadas, polarizadas y confluentes de células RPE funcionales (Figura 1D) que pueden crioconservarse en esta etapa en medio libre de componentes xenogénicos CS10.

Las células RPE maduras se desarrollaron adicionalmente para dar monocapas de células RPE funcionales que funcionan como un tejido RPE intacto mediante cultivo continuado en el RPE-MM con moléculas pequeñas adicionales tales como inductores de cilios primarios como PGE2 o afidicolina. Sin limitarse a la teoría, estos inductores de cilios primarios suprimen la ruta de WNT canónica, inducen la salida del ciclo celular en las células e inducen la polarización apical-basal en la monocapa de RPE. La madurez de RPE puede inducirse alternativamente por inhibidores canónicos de la ruta de WNT tales como IWP2 y endo-IWR1 que también inducen la salida del ciclo celular en células RPE para promover la maduración de RPE. Las células se cultivaron en este medio durante otras 2-3 semanas para obtener monocapas de células RPE maduras y funcionales. Por lo tanto, los métodos descritos actualmente proporcionan células RPE maduras a partir de células pluripotentes que pueden reproducirse de manera sistemática a gran escala para aplicaciones clínicas.

Ejemplo 4 - Crioconservación de células RPE

Para la crioconservación de las células RPE diferenciadas del ejemplo 2, se aspiró el medio y se lavaron las células dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS). A continuación, las células se incubaron con una enzima de disociación celular y la suspensión celular se pipeteó en un tubo cónico. Se centrifugaron las células, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en RPE-MM a temperatura ambiente. Después se filtró la suspensión celular a través de un filtro celular STERIFLIP® y se contaron las células. A continuación, se centrifugaron las células y se resuspendieron a una densidad adecuada (por ejemplo, 1×10^7 células/mL) en CryoStor® CS10 frío. La suspensión celular se dividió en alícuotas en crioviales marcados previamente que se colocaron en un recipiente de congelación frío y se transfirieron a un congelador a -80°C durante 12-24 horas. A continuación, los viales se transfirieron a nitrógeno líquido para su almacenamiento.

Ejemplo 5 - Agotamiento de MACS de células distintas de RPE contaminantes y enriquecimiento de la población inicial de células RPE mediante agotamiento de CD24, CD56 y/o CD90

La población de células RPE obtenidas en el ejemplo 2 ó 3 puede tener células distintas de RPE contaminantes residuales, así como células RPE inmaduras (denominadas colectivamente "células contaminantes"), ambas de las cuales pueden separarse y retirarse para producir una población de células enriquecida en RPE maduras. Las células contaminantes se pueden retirar del cultivo mediante diversas metodologías, tales como, por ejemplo, clasificación celular activada magnéticamente (MACS®), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o clasificación de células individuales. La metodología de MACS®, que se conoce en la técnica para separar diversas poblaciones de células dependiendo de sus antígenos de superficie, se usó para separar las células contaminantes de las células RPE más maduras deseadas.

Las células contaminantes de la población inicial de células RPE tienen marcadores de superficie celular específicos que pueden usarse para separar células contaminantes de las células RPE maduras deseadas. Por ejemplo, CD24, CD56 y/o CD90 son antígenos de superficie celular expresados en (pero sin limitarse a) células madre pluripotentes y otros tipos de células neuronales. CD24 es una glicoproteína expresada en la superficie de células madre pluripotentes, algunos linfocitos B y neuroblastos en diferenciación. CD56 o molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) es una glicoproteína expresada en la superficie de las neuronas y linfocitos citotóxicos naturales. CD90 o Thy-1 es un marcador expresado en la superficie de una variedad de células madre, así como neuronas. La expresión de CD24, CD56 y/o CD90 se pierde durante la diferenciación de células madre para dar muchos tipos de células maduras, incluyendo células RPE. Por lo tanto, la retirada de células positivas para CD24, CD56 y/o CD90 da como resultado el agotamiento de células contaminantes residuales.

Para llevar a cabo una técnica de separación, es deseable disociar la población inicial de células RPE para dar una suspensión de células individuales para realizar la clasificación (por ejemplo, MACS). Para las células que se criopreservaron previamente, las células deben descongelarse y volver a sembrarse. Para obtener una suspensión de células individuales a partir de células en cultivo adherente, las células se lavaron (por ejemplo, DPBS) y se añadió una enzima de disociación celular (por ejemplo, TRYPLE™). Después de que las células se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 5 min, se dieron golpes suaves al recipiente para desprender las agrupaciones neuronales. Las células se lavaron dos veces en DPBS y se añadió una enzima de disociación celular (por ejemplo, TRYPLE™). Después de que las células se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 30 min, la suspensión celular se recogió en medio de siembra en placas RPE-MM y se centrifugaron a 400 xg durante 5 min. El sedimento celular se resuspendió en medio de siembra en placas RPE-MM y la suspensión celular se filtró a través de un filtro celular (por ejemplo, filtro celular Steriflip 20 µm) para disociar cualquier agrupación de células restante. Se contó la suspensión celular (por ejemplo, usando un contador ViCell) para detectar células viables para obtener una concentración celular. La suspensión celular contada proporcionó una suspensión de células individuales que pudo usarse para la clasificación o el ensayo de pureza por citometría de flujo.

Para retirar las células contaminantes de la población inicial de células RPE, se usó MACS para agotar las células positivas para CD24, las células positivas para CD56 y/o las células positivas para CD90. Después de que las células de la población inicial de células RPE se disociaran para dar una suspensión de células individuales, las células se resuspendieron en tampón MACS tal como a 1×10^7 células/mL. Un ejemplo de tampón MACS se incluye en la tabla 3. A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD24, un anticuerpo anti-CD56 y/o un anticuerpo anti-CD90 (cada uno diluido 1:500) y se incubaron a 4 °C durante 20 min para permitir que el anticuerpo se uniera al antígeno en las células. Los anticuerpos utilizados deben etiquetarse con una etiqueta (por ejemplo, FITC) que se unirá al anticuerpo secundario. Después de la incubación, se añadieron 20 mL de tampón MACS y las células se centrifugaron a 400xg durante 5 min. El sedimento celular se resuspendió en 20 mL de tampón MACS, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 400xg durante 5 min para retirar cualquier anticuerpo no unido. El sedimento celular se resuspendió en tampón MACS (por ejemplo, a $1, 11 \times 10^8$ células/mL), se añadieron microperlas recubiertas con el anticuerpo secundario diluido (1:10) (por ejemplo, anticuerpo anti-FITC), y las células se incubaron a 4 °C durante 20 min. Después de la incubación, las células se lavaron con tampón MACS para retirar las microperlas no unidas y se resuspendieron hasta $1,25 \times 10^8$ células en 500 µL de tampón MACS. La suspensión celular se transfirió a una columna LD colocada en un campo magnético fuerte y las células que expresaban el antígeno CD24, CD56 y/o CD90 unidas a las microperlas permanecieron en la columna. La columna LD se lavó dos veces con tampón MACS. Las células no marcadas que no expresaban los antígenos CD24, CD56 y/o CD90 se dejaron fluir a través y se recogieron. Para una caracterización y cultivo adicionales, la suspensión de células no marcadas recogida se centrifugó (400xg durante 5 min) y se volvió a sembrar en medio de siembra en placa RPE-MM, y se usó una alícuota de la suspensión celular para el ensayo de pureza por citometría de flujo. Por lo tanto, la clasificación celular mediante MACS dio como resultado una población celular enriquecida en RPE agotada con respecto a células positivas para CD24, CD56 y/o CD90. Se observa que el uso de este método no se limita a la población inicial resultante del método detallado en el ejemplo 2 y puede emplearse para retirar células contaminantes de una población de RPE producida mediante otros métodos tales como, pero sin limitarse a, los métodos descritos en las solicitudes estadounidenses n.º 12/523.444 y 14/405.730.

Tabla 1: Resumen de clasificación celular mediante MACS

Marcador	Antes de la clasificación (%)	CD24 (%)	CD24/CD56 (%)	CD24/CD90 (%)	CD24/CD56/CD90 (%)
MITF ⁺	94,5	99,1	99,2	99,1	99,5
MAP2 ⁺ /NES ⁺	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2
PMEL17	95,5	99,5	99,7	99,5	99,8
TYRP1	95,9	99,4	99,8	99,6	99,8
CRALBP	89,3	98,2	99,4	98,8	99,8
BEST1	78,6	95,0	98,6	95,9	99,0

Los porcentajes antes de la clasificación de células positivas para los marcadores de RPE son aquellos presentes en la población inicial de células RPE del ejemplo 2. El agotamiento de la combinación de células positivas para CD24 y células positivas para CD56 dio como resultado un mayor enriquecimiento en células RPE que el agotamiento tan sólo de células positivas para CD24. El agotamiento de células positivas para CD24, células positivas para CD56 y células positivas para CD90 dio como resultado más del 99 % de células RPE en la población celular.

Ejemplo 6 - Ensayo de pureza por citometría de flujo para la caracterización de la población celular enriquecida en RPE

Antes y después de realizar la clasificación por MACS, se realizó la caracterización de las células RPE mediante un panel de marcadores relevantes incluyendo BEST1, CRALBP, TYRP1, PMEL17, MAP2, NES y MITF (por ejemplo, antes de la clasificación y después de la clasificación). El ensayo de pureza por citometría de flujo se realizó para obtener una medición de los porcentajes (tabla 1) de células positivas para cada marcador antes y después de la retirada de células positivas para CD24, células positivas para CD56 y/o células positivas para CD90 mediante MACS (Figuras 2 y 3).

El ensayo de pureza por citometría de flujo se realizó para determinar el porcentaje de células RPE obtenidas mediante un método de clasificación de la presente descripción. Una alícuota de la suspensión celular recogida del ensayo de MACS (2 x 10⁶ células en un tubo de FACS de 5 mL por muestra) se centrifugaron a 400xg durante 3 min. El sedimento celular se resuspendió en 1 mL de un tinte (por ejemplo, tinte de rojo Live-Dead) y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Después de la incubación, se añadieron 2 mL de tampón de lavado y las células se centrifugaron a 400xg durante 3 min para eliminar cualquier tinte no unido. El sedimento celular se resuspendió en tampón de fijación y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Después de la incubación, se añadieron 2 mL de tampón de lavado y las células se centrifugaron a 400xg durante 3 min y el sobrenadante se decantó. El sedimento celular se resuspendió en 2 mL de tampón de lavado para preparar una suspensión de 1 x 10⁶ células/mL y se transfirieron 200 µL de la suspensión celular a un tubo de FACS. A cada tubo se le añadieron 2 mL de tampón Perm y las células se centrifugaron a 400xg durante 3 min. Se diluyeron anticuerpos primarios para los marcadores específicos de RPE en tampón Perm y se añadieron 100 µL de disolución de anticuerpo diluido a cada tubo. Después de la incubación durante la noche a 4 °C en la oscuridad, las células se lavaron en 2 mL de tampón Perm dos veces. Se añadió disolución de anticuerpo secundario a cada uno de los tubos y las células se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1-2 horas. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con tampón Perm, se centrifugaron (400xg durante 3 min) y se resuspendieron en 100 µL de tampón de lavado para el análisis de citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como en la patente estadounidense n.º 8.682.810 y Herzenberg y *col.*, 2006, para obtener porcentajes de células positivas para cada uno de los marcadores sometidos a prueba (tabla 1). El ensayo de pureza por citometría de flujo mostró que la clasificación por MACS para agotar las células contaminantes positivas para CD24, CD56 y/o CD90 dio como resultado una población enriquecida en células RPE (95-99 %) en comparación con la población celular inicial (78,6 %) tal como se determina mediante el marcador BAS1.

Ejemplo 7 - Método alternativo para la diferenciación de células RPE

Con respecto a los métodos descritos en los ejemplos 2 y 3, la inclusión de PD0325901 a una concentración de 1 µM en medios durante ciertos intervalos de tiempo comenzando en el día 2 después de la siembra en placas de iPSC hasta el final del proceso de diferenciación, incluyendo cultivo tras MACS, puede mejorar tanto la pureza de la población de RPE (lo que significa una disminución en las células contaminantes) como la madurez de la población de RPE resultante. Se ha demostrado que la inclusión de PD 0325901 1 µM mejora tanto la pureza como la madurez de la población de RPE cuando se incluye en RDM, así como en RPE-MM (aproximadamente los días 42 a 50) del proceso de RPE descrito en la presente memoria.

Ejemplo 8 - Método alternativo para la diferenciación de células RPE

Con respecto a los métodos descritos en los ejemplos 2 y 3, una disminución en el porcentaje de suero bovino fetal desde el 5 por ciento hasta el 0,5-1 por ciento en RPE-MM y medio de siembra en placa RPE-MM puede mejorar tanto la pureza de la población de RPE (lo que significa una disminución en las células contaminantes) como la madurez de la población de RPE resultante.

Ejemplo 9 - Funcionalidad de células RPE maduras

Para el análisis de las células RPE maduras producidas a partir del tratamiento con PGE2, se realizó la inmunotinción de la monocapa de RPE para confirmar la arquitectura hexagonal (Figuras 4A-4C) de las uniones estrechas mediante tinción con ZO1, así como microscopía electrónica de transmisión de las células iPSC-RPE (Figura 4D). La tinción mostró que las células RPE tratadas con PGE2 han disminuido la beta-catenina y aumentaron el RPE65. Además, el tratamiento con IWP2+endo-IWR1 o IWP2 también da como resultado una disminución de la catenina beta (Figura 5A) y un aumento del RPE65 (Figura 5C). Se encontró que la combinación de IWP2+endo-IWR1 era más eficaz en comparación con IWP2 solo o endo-IWR1 solo. Por lo tanto, el tratamiento con PGE2, IWP2 o IWP2+endo-IWR1 produce células RPE maduras.

Para medir la función de barrera de las células RPE generadas por los presentes métodos, se midió el potencial eléctrico transepitelial (TEP), el gradiente de iones a través de la monocapa generado por bombas de iones impulsadas por energía que regulan el paso a través de las células, y la resistencia eléctrica transepitelial (TER)

mide la resistencia de las sustancias a través del espacio paracelular principalmente a través de la estructura fina de la estructura de unión estrecha (Figura 7A).

También se caracterizó la funcionalidad de las células RPE maduras tratadas con IWP2 o endo-IWR1. Las mediciones de TEP y TER de células RPE no tratadas frente a células RPE tratadas con PGE2 o IWP2+endo-IWR1 muestran una mayor funcionalidad de las células RPE maduras tratadas (Figuras 7C-7E).

A continuación, se sometió a prueba si un aumento en la concentración de PGE2 desde 50 μ M hasta 100 μ M en el medio RPE-MM+PGE2 mejoraría tanto la pureza de la población de RPE (es decir, una disminución en las células contaminantes) como la madurez de la población de RPE resultante. Para determinar la madurez y funcionalidad de los cultivos tratados con PGE2 50 μ M frente a 100 μ M, se midió la función de barrera en cuanto a resistencia eléctrica transepitelial (TER) (Figura 7F) para comparar la resistencia de sustancias a través del espacio paracelular como se explica en el ejemplo 9. Para determinar el porcentaje de células RPE puras obtenidas después del tratamiento de cultivos de RPE derivados de iPSC con 50 μ M o 100 μ M en el medio RPE-MM+PGE2, se realizó un ensayo de pureza por citometría de flujo para marcadores específicos de RPE (Figura 7G) como se describe en el ejemplo 6. Los resultados mostraron que una mayor concentración del inductor de cilio primario PGE2 promueve tanto la pureza como la madurez de la población de RPE en el proceso de diferenciación de RPE derivado de iPSC.

Ejemplo 10 - Reproducibilidad del método de diferenciación de RPE

Para someter a prueba la reproducibilidad del proceso de diferenciación de RPE, se diferenciaron tres líneas de iPSC para dar células RPE por múltiples operarios (Figura 6A). La pureza promedio de las células RPE resultantes se caracterizó mediante la medición del marcador de RPE proteína de unión a retinaldehído 1 (Cralbp) por citometría de flujo (tabla 2). Se encontró que el proceso de diferenciación de RPE era altamente reproducible entre diferentes poblaciones de celulares iniciales, así como diferentes operarios. Además, la reproducibilidad se confirmó mediante diferenciación de RPE a partir de diferentes líneas celulares de partida incluyendo 3D1, AMD1B, BEST1L, BEST3A, BEST8A, donante 3D de AMD y línea A de HLA (Figura 6B). La línea A de HLA (21525.102) es una línea de iPSC producida a partir de un donante homocigótico para HLA-A*01 y HLA-B*08 que podía proporcionar una coincidencia beneficiosa con respecto al 11,38 % de la población de los Estados Unidos. Además, el RPE también se ha producido satisfactoriamente mediante el uso de este proceso usando una línea de iPSC producida a partir de un donante homocigótico para HLA-A*03 y HLA-B*07 denominada línea C de HLA (21526.101) que podía proporcionar posiblemente una coincidencia beneficiosa con respecto al 7,63 % de la población de los Estados Unidos. La línea A de HLA (21525.102) y la línea C de HLA (21526.101) homocigóticas en HLA-A y HLA-B como se describió anteriormente son propiedad de Cellular Dynamics International, Inc. Además, la reproducibilidad se confirmó adicionalmente en 109 diferenciaciones de RPE realizadas en 28 líneas de iPSC derivadas de 13 donantes midiendo el porcentaje de células positivas para Cralbp antes y después de la purificación (Figura 6C-D). Aunque el porcentaje de células positivas para Cralbp después de la diferenciación de RPE varió, la purificación por MACS dio sistemáticamente como resultado más del 95 por ciento de pureza y en la mayoría de los casos cerca del 100 por ciento de pureza. Por lo tanto, el presente método de diferenciación de RPE tiene una clara ventaja con respecto a cualquier método que produzca células RPE a partir de cuerpos embrioides ya que proporciona resultados más sistemáticos y reproducibles a través de genotipos donantes y cuando se realiza por diferentes operarios.

Tabla 2: Diferenciación de RPE múltiples operarios

Operario	Línea de iPSC	Día de análisis	% de Cralbp	Prom.	Desv. est.
1	Línea 1	40	81,8	82,9	9,6
2	Línea 1	47	68,0		
3	Línea 1	40	86,2		
4	Línea 1	41	76,7		
5	Línea 1	40	91,6		
6	Línea 1	40	93,3		
1	Línea 2	42	71,8	74,6	5,5
2	Línea 2	46	72,2		
3	Línea 2	40	79,6		
4	Línea 2	40	68,2		
5	Línea 2	40	81,1		
1	Línea 3	42	72,5	72,3	7,0
2	Línea 3	46	75,3		

Operario	Línea de iPSC	Día de análisis	% de Cralbp	Prom.	Desv. est.
3	Línea 3	40	80,5		
4	Línea 3	40	67,2		
5	Línea 3	40	77,1		
6	Línea 3	40	61,3		

Ejemplo 11 - Materiales y métodos

Los materiales usados en los ejemplos 1-10 se muestran en la tabla 3.

5

Tabla 3: Componentes de medio a modo de ejemplo

Medio Essential 8			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
Medio basal Essential 8™	Life Technologies	A1517001	98 %
Suplemento Essential 8™	Life Technologies		2 %
Medio de siembra en placa Essential 8			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
Medio Essential 8™ completo	Life Technologies	Tal como se preparó anteriormente	100 %
Blebistatina	Sigma	B0560	2,5 µM
Medio de inducción retiniano (RIM)			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
LDN-193189	Stemgent	04-0074	10nM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	1.0 µM
Diclorhidrato de CKI-7	Sigma	C0742	0.5 µM
AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	1 ng/ml
Medio de diferenciación retiniano RDM			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Suplemento N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
LDN-193189	Stemgent	04-0074	100nM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	10 µM
Diclorhidrato de CKI-7	Sigma	C0742	5 µM

AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	10 ng/ml
PD0325901	Stemgent	04-0006	1 µM
Medio retiniano (RM) + nicotinamida y activina			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
Kit de CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
Nicotinamida	Sigma	N0636	10 mM
Activina A	R&D Systems	338-AC	100 ng/ml
Medio de maduración de RPE (RPE-MM)			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
RPE-MM + PD0325901			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
PD0325901	Stemgent	04-0006	1 µM
RPE-MM + PGE2			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
PGE2	R&D Systems	2296	50 µM
Medio de siembra en placa RPE-MM			

<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
Y-27632	R&D Systems	1254/10	10 µM
Tampón de MACS			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DPBS (sin calcio y magnesio)	Life Technologies	14190-144	98 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	2 %
Disolución de EDTA UltraPure™ Life	Technologies	15575-020	2 mM
Medio Essential 8			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
Medio basal Essential 8™	Life Technologies	A1517001	98 %
Suplemento Essential 8™	Life Technologies		2 %
Medio de siembra en placa Essential 8			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
Medio Essential 8™ completo	Life Technologies	Tal como se preparó anteriormente	100 %
Blebistatina	Sigma	B0560	2,5 µM
Medio de inducción retiniano (RIM)			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
LDN-193189	Stemgent	04-0074	10nM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	1.0 µM
Diclorhidrato de CKI-7	Sigma	C0742	0.5 µM
AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	1 ng/ml
Medio de diferenciación retiniano (RDM)			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM

Suplemento N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
LDN-193189	Stemgent	04-0074	100nM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	10 µM
Diclorhidrato de CKI-7	Sigma	C0742	5 µM
AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	10 ng/ml
PD0325901	Stemgent	04-0006	1 µM
Medio retiniano (RM) + nicotinamida y activina			
Componente	Proveedor	N.º de cat.	Conclusiones finales
DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
Kit de CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
Nicotinamida	Sigma	N0636	10 mM
Activina A	R&D Systems	338-AC	100 ng/ml
Medio de maduración de RPE (RPE-MM)			
Componente	Proveedor	N.º de cat.	Conclusiones finales
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
PRE-MM + PD0325901			
Componente	Proveedor	N.º de cat.	Conclusiones finales
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
PD0325901	Stemgent	04-0006	1 µM
RPE-MM + PGE2			
Componente	Proveedor	N.º de cat.	Conclusiones finales
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.

Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
PGE2	R&D Systems	2296	50 µM
Medio RPE-MM			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
Y-27632	R&D Systems	1254/10	10 µM
Tampón de MACS			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DPBS (sin calcio y magnesio)	Life Technologies	14190-144	98 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	2 %
Disolución de EDTA UltraPure™	Life Technologies	15575-020	2 mM
Medio Essential 8			
Medio basal Essential 8™	Life Technologies	A1517001	98 %
Suplemento Essential 8™	Life Technologies		2 %
Medio de siembra en placa Essential 8			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
Medio Essential 8™ completo	Life Technologies	Tal como se preparó anteriormente	100 %
Blebistatina	Sigma	B0560	2,5 µM
Medio de inducción retiniano (RIM)			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
LDN-193189	Stemgent	04-0074	10nM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	1.0 µM
Diclorhidrato de CKI-7	Sigma	C0742	0.5 µM
AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	1 ng/ml
Medio de diferenciación retiniano (RDM)			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>

DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Suplemento N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
LDN-193189	Stemgent	04-0074	100nM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	10 µM
Diclorhidrato de CKI-7	Sigma	C0742	5 µM
AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	10 ng/ml
PD0325901	Stemgent	04-0006	1 µM
Medio retiniano (RM) + nicotinamida y activina			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DMEM/F12	Life Technologies	11330-032	99 %
Kit de CTS™ KnockOut™ SR libre de componentes xenogénicos	Life Technologies	A1099201	1,50 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
Suplemento B-27® (+VitA)	Life Technologies	17504-044	2 %
Ácido ascórbico	Sigma	A4544	200 µM
Nicotinamida	Sigma	N0636	10 mM
Activina A	R&D Systems	338-AC	100 ng/ml
Medio de maduración de RPE (RPE-MM)			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
RPE-MM + PD0325901			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
PD0325901	Stemgent	04-0006	1 µM
RPE-MM + PGE2			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>

MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
PGE2	R&D Systems	2296	50 µM
Medio de siembra en placa RPE-MM			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
MEM alfa	Life Technologies	12571-063	99 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	5 %
Suplemento CTS™ N-2	Life Technologies	A13707-01	1 %
AA no esenciales de MEM	Life Technologies	11140	0,1 mm.
Piruvato de sodio	Life Technologies	11360-070	1 mM
Taurina	Sigma	T4571	250 µg/ml
Hidrocortisona	Sigma	H6909	20 µg/L
3,3',5-Triyodo-L-tironina	Sigma	T-5516	0,013 µg/L
Y-27632	R&D Systems	1254/10	10 µM
Tampón de MACS			
<u>Componente</u>	<u>Proveedor</u>	<u>N.º de cat.</u>	<u>Conclusiones finales</u>
DPBS (sin calcio y magnesio)	Life Technologies	14190-144	98 %
Suero bovino fetal	Hyclone	SH30071.03	2 %
Disolución de EDTA UltraPure™	Life Technologies	15575-020	2 mM

El tampón de lavado de citometría de flujo se preparó añadiendo 20 mL de FBS a 1000 mL de DPBS (es decir, sin calcio y magnesio). El tampón se esterilizó por filtración y se puede almacenar a 4 °C durante hasta 4 semanas.

- 5 El tampón Perm de citometría de flujo se preparó añadiendo 20 mL de FBS a 1000 mL de DPBS (es decir, sin calcio y magnesio). Se añadió un gramo de saponina y se mezcló bien. El tampón se esterilizó por filtración y se puede almacenar a 4 °C durante hasta 4 semanas.

- 10 El tinte rojo Live-Dead de citometría de flujo se preparó diluyendo tinte Live-Dead 1:1000 en DPBS (es decir, sin calcio y magnesio). Se preparó un mL del tinte por 1×10^6 células que se someten a ensayo. El tinte se preparó nuevo antes de usarse.

- 15 El tampón de fijación por citometría de flujo se preparó añadiendo 1 mL de formaldehído al 36,5 % a 8,1 mL de DPBS (es decir, sin calcio y magnesio). Se preparó un mL del tinte por 1×10^6 células que se someten a ensayo. El tampón se preparó nuevo antes de usarse.

- 20 Todos los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la vista de la presente descripción. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en la presente memoria sin apartarse del concepto y alcance de las reivindicaciones. Más específicamente, será evidente que determinados agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados pueden sustituir a los agentes descritos en la presente memoria, al tiempo que se lograrán resultados iguales o similares. Se considera que todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica están dentro del
- 25 alcance y concepto de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Bibliografía

- 30 Las siguientes referencias proporcionan detalles de procedimiento a modo de ejemplo u otros detalles complementarios a los expuestos en la presente memoria.

Amit y col., Dev. Bio., 227:271-278, 2000.

Buchholz y col., Stem Cells, 27: 2427-2434, 2009.

5 Byrne y col., Nature, 450(7169):497-502, 2007.

Hirami y col., Neurosci. Lett., 48: 126-131, 2009.

Kanemura y col., PLoS One, 9, 2014.

10 Ludwig y col., Nat. Biotechnol., 24:185-187, 2006b.

Ludwig y col., Nat. Methods, 3:637-646, 2006a.

15 Publicación PCT n.º WO 2007/069666 A1.

Publicación PCT n.º WO 2014/121077.

Smith, en: Origins and Properties of Mouse Embryonic Stem Cells, 2000.

20 Strauss y col., Physiological Reviews, 85:845-881, 2005.

Takahashi y col., Cell, 126, 663-676, 2006.

25 Takahashi y col., Cell, 131, 861-872, 2007.

Thomson and Marshall, Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165, 1998.

Thomson y Odorico, Trends Biotechnol., 18(2):53-57, 2000.

30 Thomson y col. Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 92:7844-7848, 1995.

Patente estadounidense n.º 8.546.140.

35 Solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0076747.

Solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0246875.

Solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0210014.

40 Solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0196360.

Solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0276636.

45 Patente estadounidense n.º 5.843.780.

Patente estadounidense n.º 6.103.470.

Patente estadounidense n.º 6.200.806.

50 Patente estadounidense n.º 6.416.998.

Patente estadounidense n.º 6.833.269.

55 Patente estadounidense n.º 7.029.913.

Patente estadounidense n.º 7.442.548.

Patente estadounidense n.º 7.598.364.

60 Patente estadounidense n.º 7.682.828.

Patente estadounidense n.º 7.989.425.

65 Patente estadounidense n.º 8.058.065.

Patente estadounidense n.º 8.071.369.

Patente estadounidense n.º 8.129.187.

5 Patente estadounidense n.º 8.268.620.

Patente estadounidense n.º 8.278.620.

Patente estadounidense n.º 8.546.140.

10 Patente estadounidense n.º 8.741.648.

Publicación de patente estadounidense n.º 2003/0211603.

15 Solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0003757.

Xu y col., Nat. Biotechnol., 19:971-974, 2001.

Ying y col., Cell, 115:281-292, 2003.

20 Yu y col., Science, 318: 1917-1920, 2007.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) humanas, que comprende:
 - 5 a) cultivar una población celular que comprende células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas que se disocian para dar células individuales en un medio de inducción retiniano para iniciar la diferenciación de las células para dar células de linaje retiniano, en donde las iPSC se cultivan a una densidad celular inicial de desde 1.000 hasta 40.000 células/cm²;
 - 10 b) cultivar adicionalmente las células de linaje retiniano en un medio de diferenciación retiniano para diferenciar adicionalmente las células de linaje retiniano;
 - c) cultivar las células en medio retiniano para formar células RPE en diferenciación; y
 - 15 d) cultivar las células RPE en un medio de maduración de RPE, produciendo de ese modo células RPE humanas;

en donde el método no comprende la formación de cuerpos embrioides.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde las iPSC en la etapa (b) se cultivan en una matriz, particularmente en donde la matriz comprende al menos una proteína de adhesión celular recombinante, particularmente en donde la al menos una proteína de adhesión celular es laminina, vitronectina o

25 fibronectina,

y/o en donde la al menos una proteína de adhesión celular es humana.
- 30 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el medio de inducción retiniano comprende un inhibidor de la ruta de WNT, un inhibidor de la ruta de TGF β , un inhibidor de la ruta de BMP y un factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1).
- 35 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el medio de diferenciación retiniano comprende un inhibidor de la ruta de WNT, un inhibidor de la ruta de TGF β , un inhibidor de la ruta de BMP, un inhibidor de MEK e IGF 1.
- 40 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la siguiente etapa (e) de disociar las células RPE, volver a sembrar las células RPE y cultivar las células RPE en el medio de maduración de RPE que comprende un inhibidor de MEK,

particularmente que comprende además disociar las células RPE y volver a sembrar las células RPE en un

almacén degradable en el medio de maduración de RPE.
- 45 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además cultivar las células RPE en el medio de maduración de RPE, en donde el medio de maduración de RPE comprende al menos un inductor de cilio primario produciendo de ese modo células RPE maduras,

particularmente en donde el al menos un inductor de cilio primario es prostaglandina E2 (PGE2) o

afidicolina.
- 50 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además cultivar las células RPE en el medio de maduración de RPE, en donde el medio de maduración de RPE comprende N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-4-oxo-3-feniltieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP2) y/o 4-(1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isoindol-2-il)-N-8-quinolinil-benzamida (endo-IWRI).
- 55 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además crioconservar las células RPE,

y/o en donde la población inicial de iPSC de la etapa (a) son células preconfluentes que se han disociado para dar células individuales,

y/o en donde las iPSC se cultivan sin una capa alimentadora,

y/o en donde las iPSC se cultivan en un medio de cultivo completamente definido,
- 60

65

y/o en donde las iPSC se cultivan en un medio de cultivo libre de componentes xenogénicos.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 8, en donde el inhibidor de la ruta de WNT es diclorhidrato de N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolina-8-sulfonamida (CKI-7), N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-4-oxo-3-feniltieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP2), N-(6-metil-2-benzotiazolil)-2-[(3,4,6,7-tetrahidro-3-(2-metoxifenil)-4-oxotieno[3,2-d]pirimidin-2-il)tio]-acetamida (IWP4), [(5-metil-2-furanil)metileno]hidrazida del ácido 2-fenoxibenzoico (PNU 74654), 2,4-diamino-quinazolina, quercetina, 3,5,7,8-tetrahidro-2-[4-(trifluorometil)fenil]-4H-tiopyrano[4,3-d]pirimidin-4-ona (XAV939), 2,5-dicloro-N-(2-metil-4-nitrofenil)bencenosulfonamida (FH 535), N-[4-[2-etil-4-(3-metilfenil)-5-tiazolil]-2-piridinil]benzamida (TAK 715), proteína relacionada con Dickkopf uno (DKK1), o proteína relacionada con frizzled secretada (SFRP1) 1,

y/o en donde el inhibidor de la ruta de TGFβ es 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (SB431542), 6-[2-(1,1-metiletil)-5-(6-metil-2-piridinil)-1H-imidazol-4-il]quinoxalina (SB525334), hidrato de clorhidrato de 2-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124), hidrato de 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)-benzamida, hidrato de 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida, factor de determinación izquierda-derecha (Lefty), 3-(6-metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida (A 83-01), 4-[4-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (D 4476), 4-[4-[3-(2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]-2-piridinil]-N-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-benzamida (GW 788388), 4-[3-(2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]-quinolina (LY 364847), 4-[2-fluoro-5-[3-(6-metil-2-piridinil)-1H-pirazol-4-il]fenil]-1H-pirazol-1-etanol (R 268712) o 2-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina (RepSox).

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en donde el inhibidor de MEK es N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxil]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodoanilino)amino]-benzamida (PD0325901), N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodoanilino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxopirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida (GSK1120212), 6-(4-bromo-2-fluoroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida (MEK 162), N-[3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodoanilino)-6-metoxifenil]-1-(2,3-dihidroxiopropil)ciclopropano-1-sulfonamida (RDEA119) o 6-(4-bromo-2-cloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida (AZD6244).

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en donde el inhibidor de la ruta de BMP es clorhidrato de 4-(6-(4-(piperazin-1-il)fenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)quinolina (LDN193189), diclorhidrato de 6-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-3-(4-piridinil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (dorsomorfina), 4-[6-[4-(1-metiletoxi)fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina (DMH1), 4-[6-[4-[2-(4-morfolinil)etoxi]fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]quinolina (DMH-2) o 5-[6-(4-metoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]quinolina (ML 347),

y/o en donde el inhibidor de la ruta de BMP es LDN193189 en el medio de inducción retiniano.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en donde el inhibidor de la ruta de BMP es LDN193189 y el inhibidor de MEK es PD0325901 en el medio de diferenciación retiniano.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la población inicial de iPSC coinciden con respeto al haplotipo de MHC con un sujeto que lo necesita.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la población inicial de iPSC son homocigóticas para al menos un alelo de HLA,

particularmente en donde el al menos un alelo HLA es HLA-A, HLA-B o HLA-DR.

15. Un método para producir células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) humanas, que comprende:

- a) cultivar una población celular que comprende células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas que se disocian para dar células individuales en laminina en un medio de inducción retiniano que comprende LDN193189, CKI-7 y SB431542 para iniciar la diferenciación de las células para dar células de linaje retiniano, en donde las iPSC se cultivan a una densidad celular inicial de desde 1.000 hasta 40.000 células/cm²;

- b) cultivar adicionalmente las células de linaje retiniano en un medio de diferenciación retiniano que comprende LDN193189, CKI-7, SB431542 y PD0325901 para diferenciar adicionalmente las células de linaje retiniano;

- c) cultivar las células en medio retiniano que comprende nicotinamida y activina A para formar células RPE en diferenciación; y

- d) cultivar las células RPE en un medio de maduración de RPE, produciendo de ese modo células RPE humanas;
- 5 en donde el método no comprende la formación de cuerpos embrioides.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de disociar las iPSC para dar células individuales en un medio que comprende blebbistatina.
- 10 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las iPSC se cultivan a una densidad celular inicial de 1.000 a 30.000 células/cm²,
- particularmente de 1.000 a 20.000 células/cm²,
- particularmente de 1.000 a 10.000 células/cm².
- 15 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde las iPSC se cultivan a una densidad celular inicial de 5.000 a 40.000 células/cm².
- 20 19. El método de la reivindicación 18, en donde las iPSC se cultivan a una densidad celular inicial de 5.000 a 30.000 células/cm²,
- particularmente de 5.000 a 20.000 células/cm²,
- particularmente de 5.000 a 10.000 células/cm².

Figura 1A

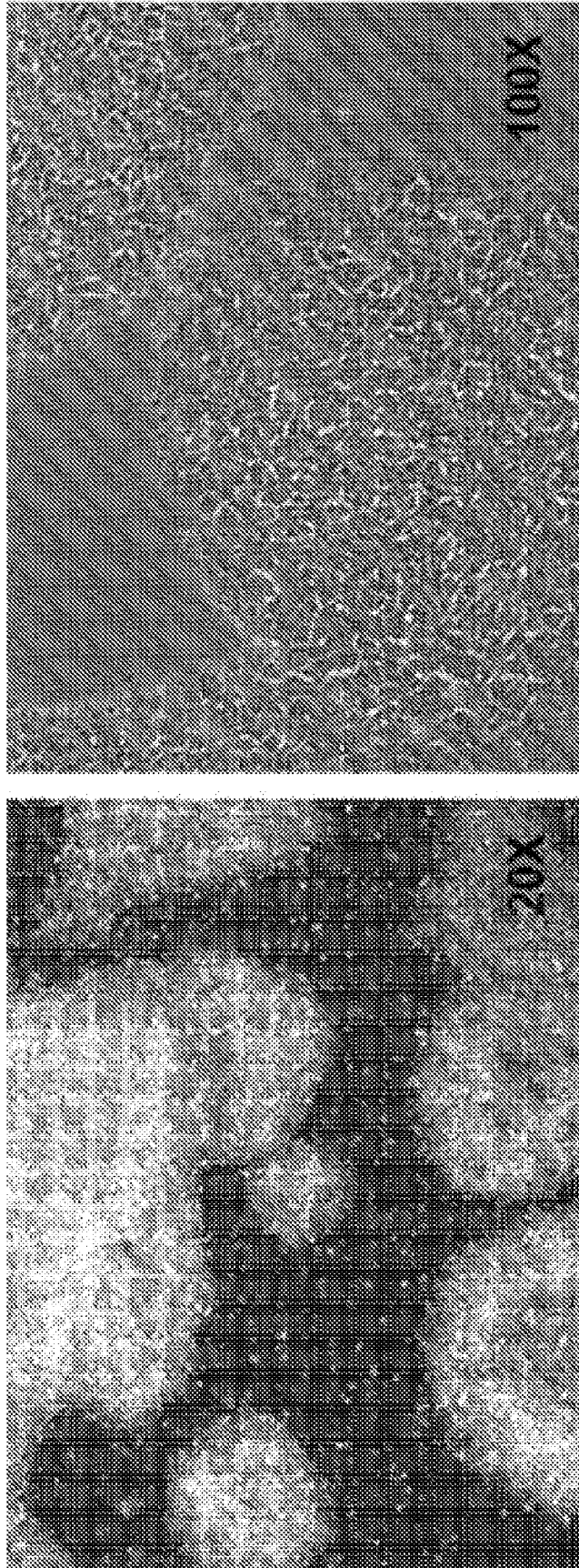


Figura 1B

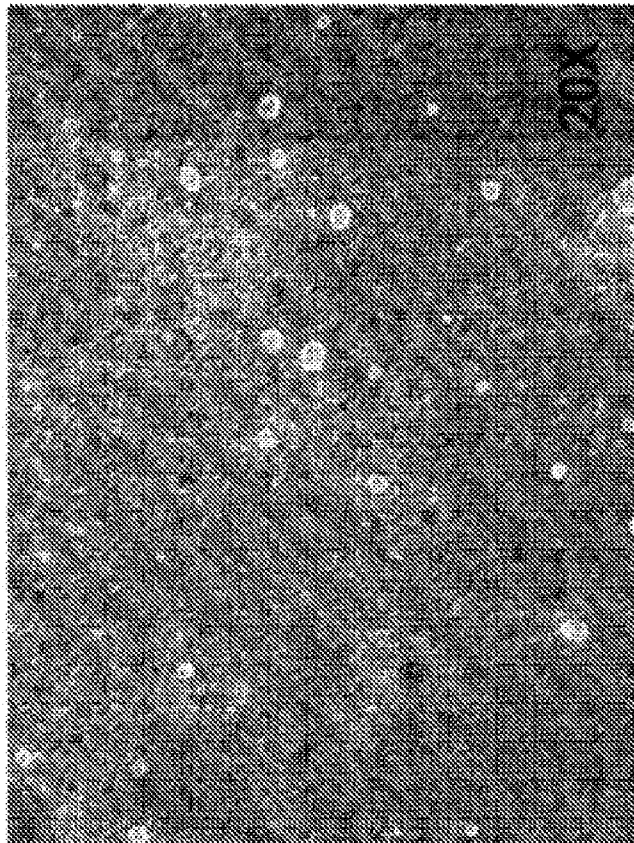
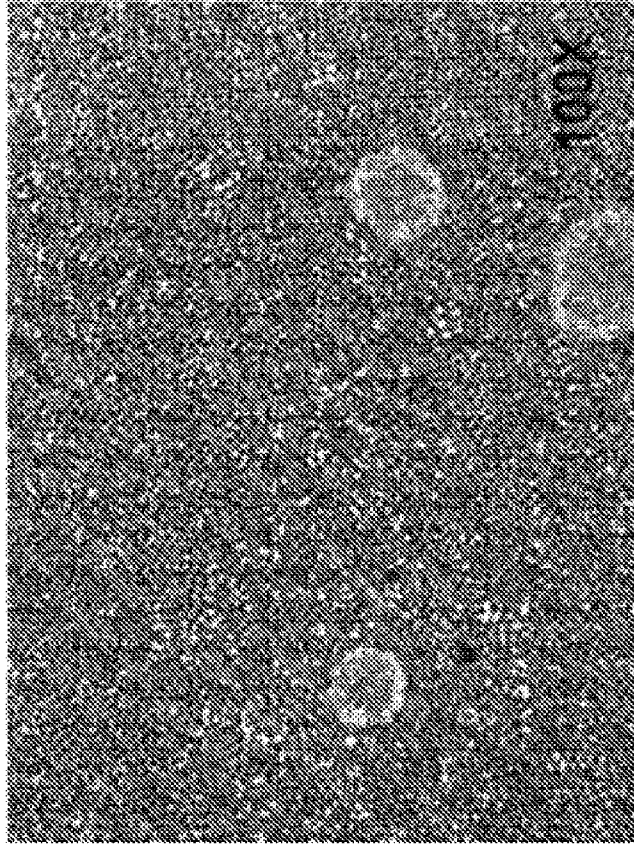


Figura 1C

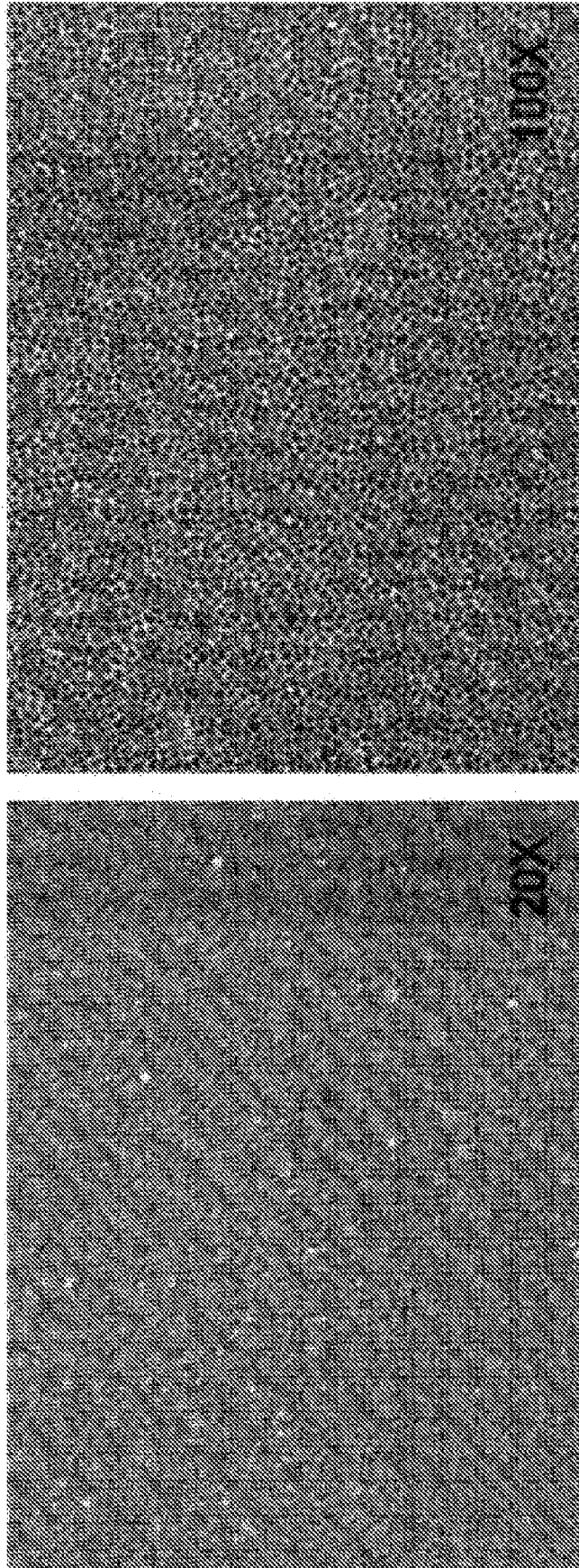


Figura 1D

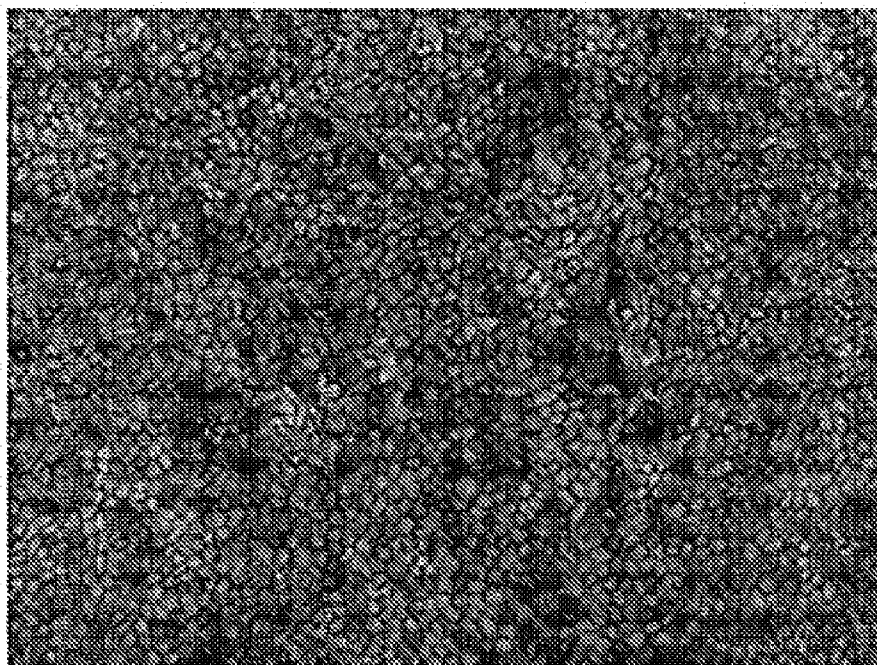


Figura 2B

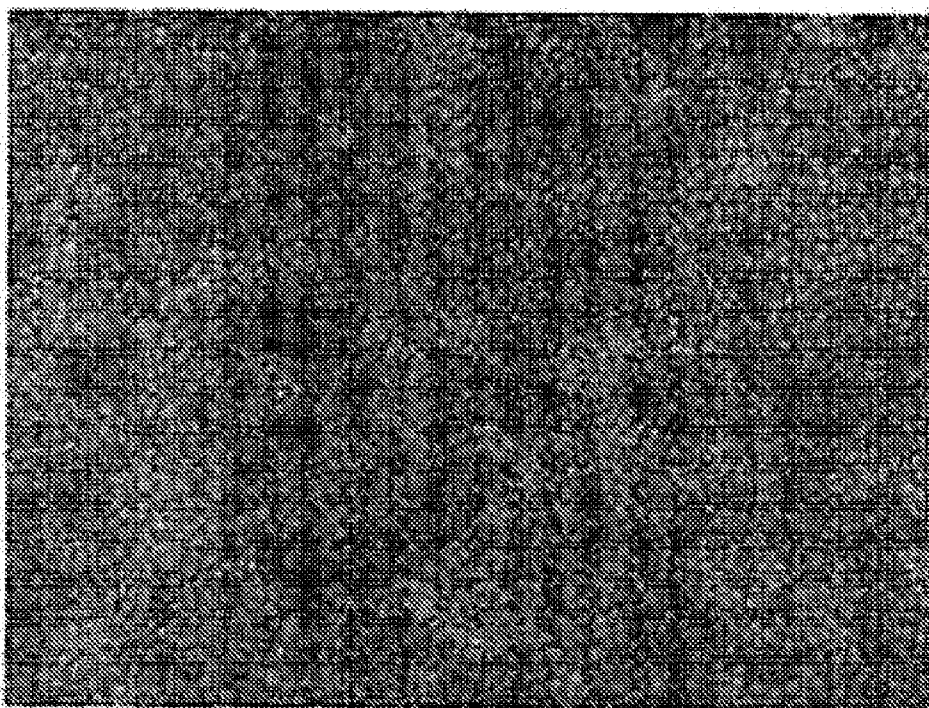


Figura 2A

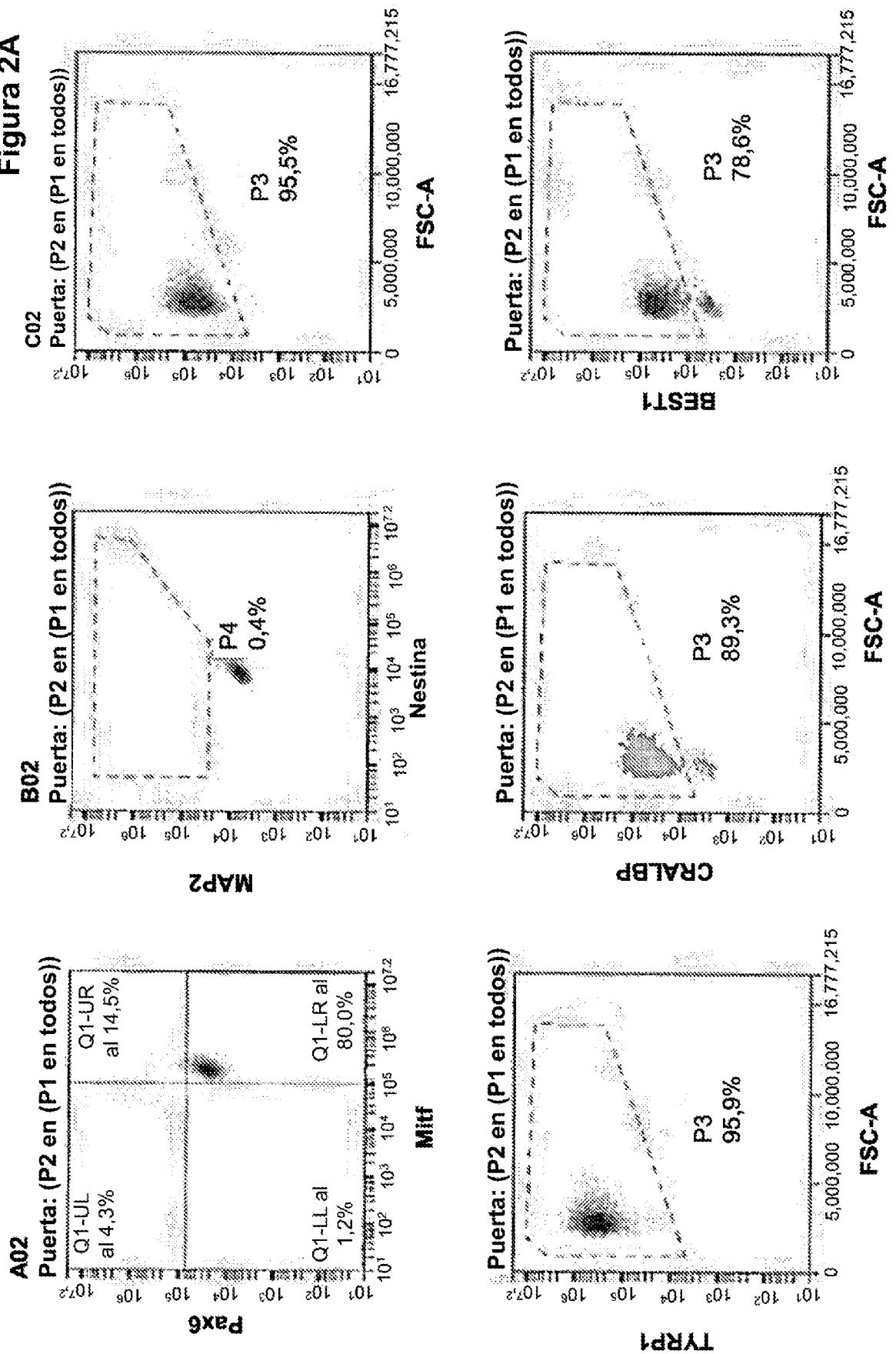


Figura 3A

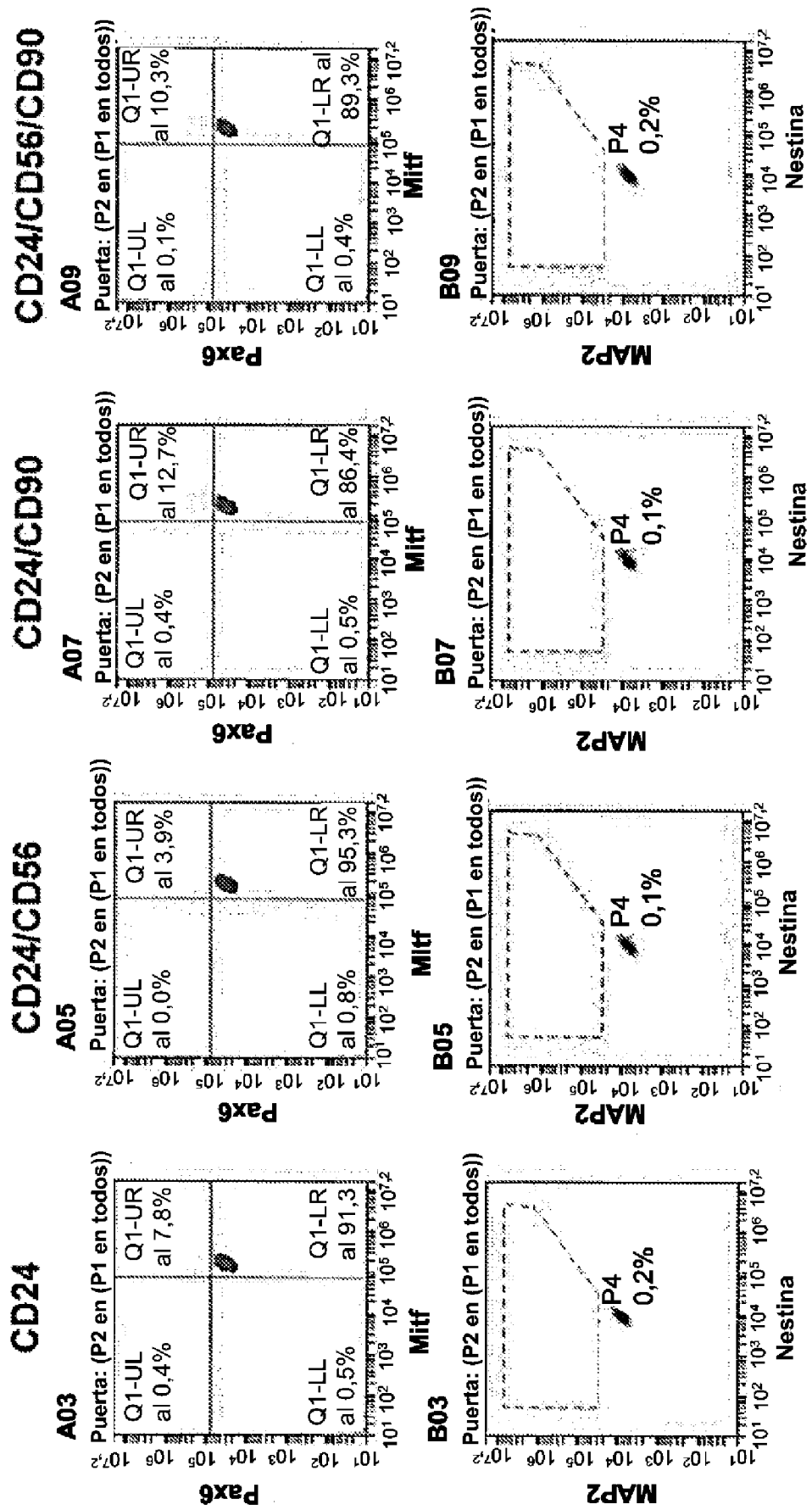


Figura 3B

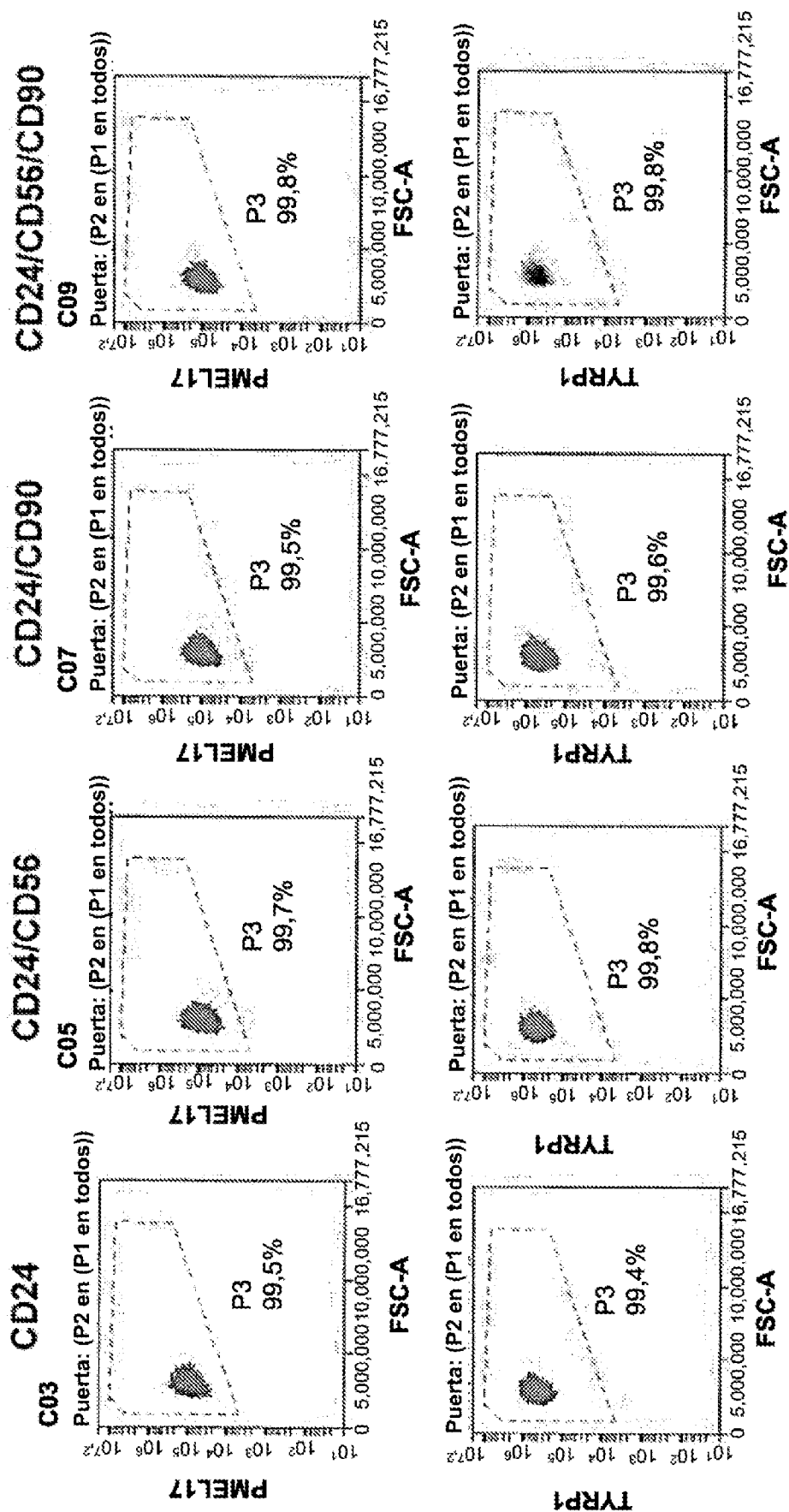


Figura 3C

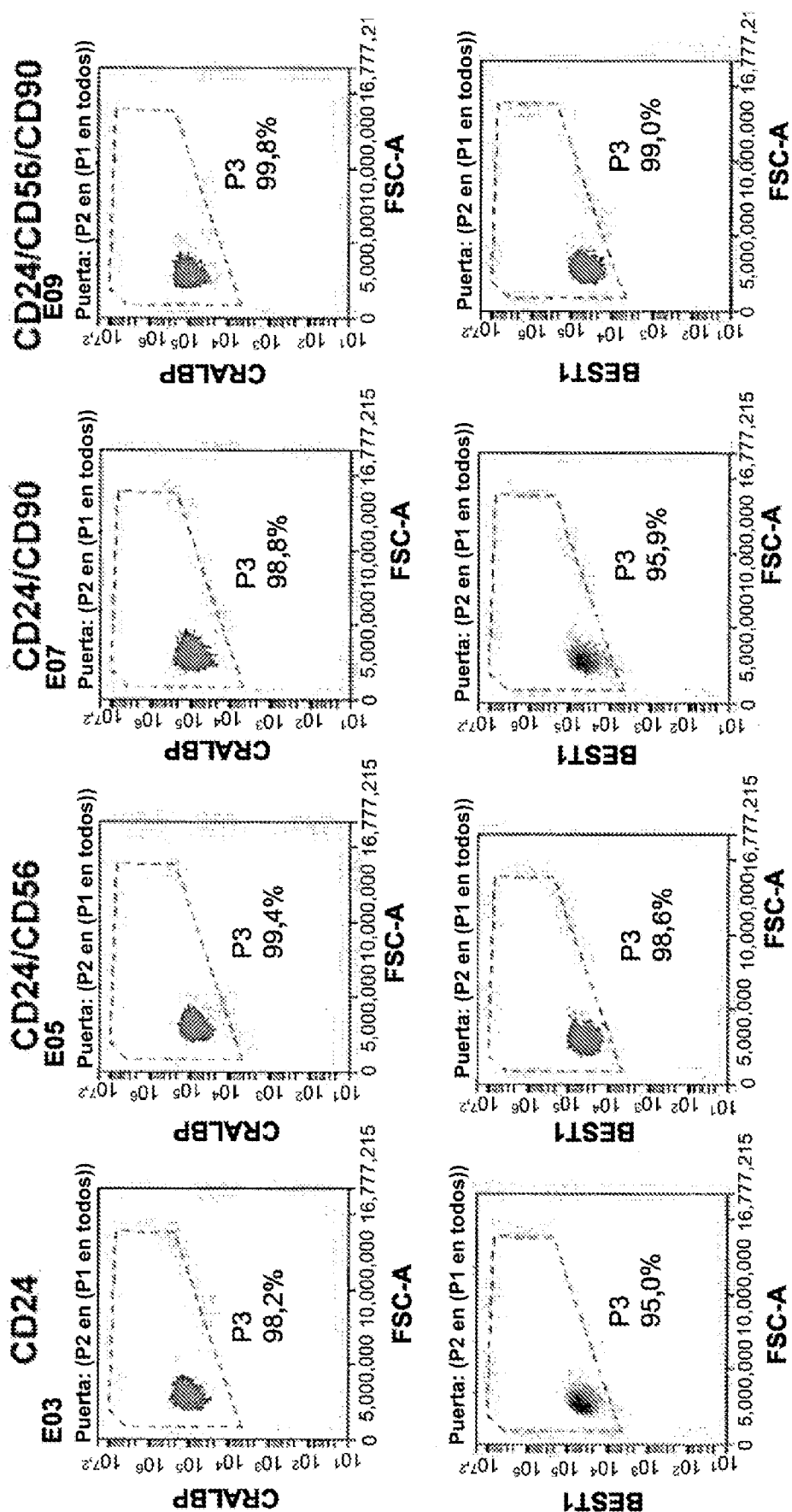
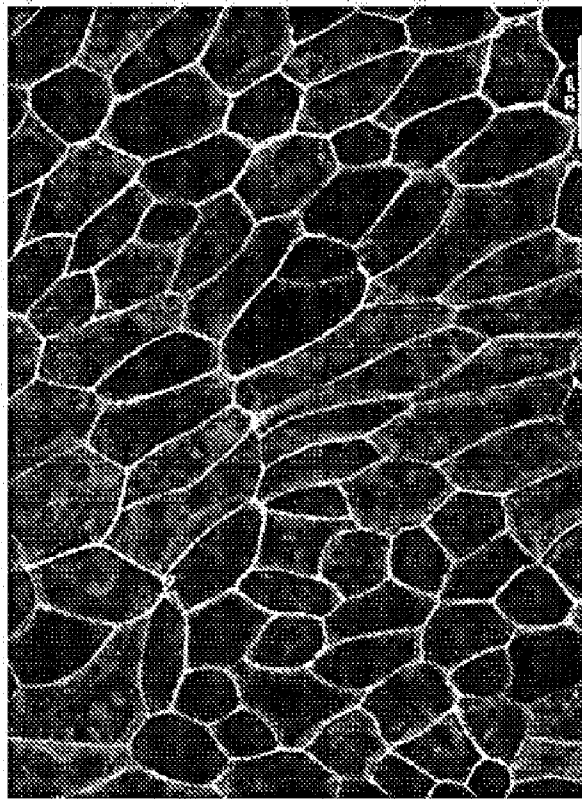
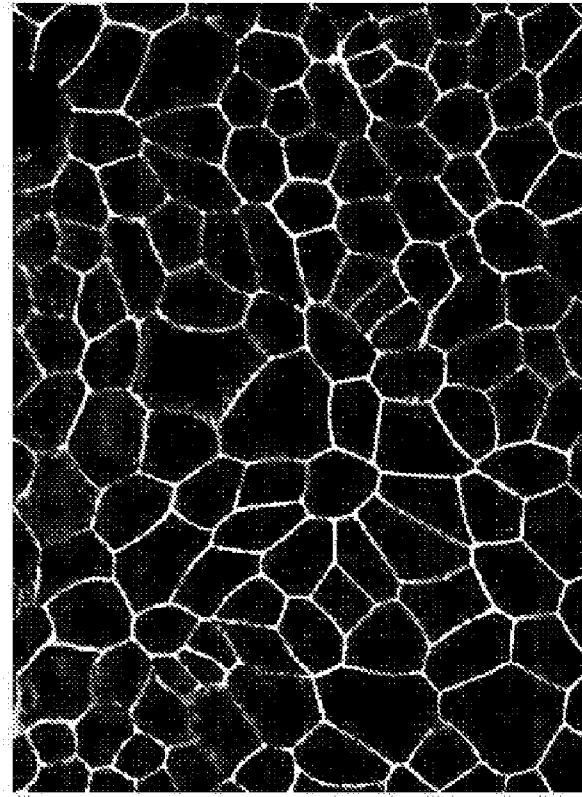


Figura 4A

iPSC-RPE no tratadas



iPSC-RPE tratadas con PGE2

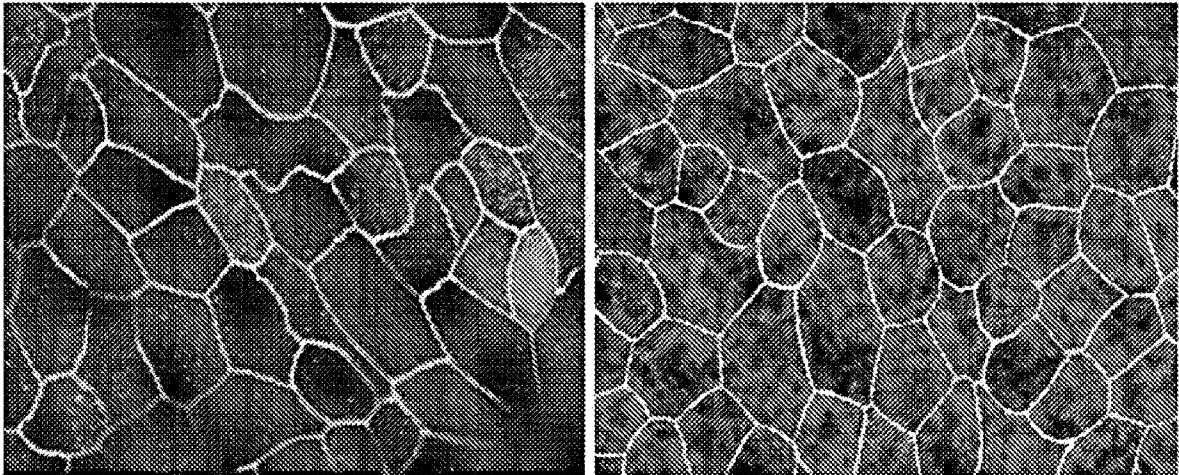


BETA-CATENINA/F-ACTINA

Figura 4B

iPSC-RPE no tratadas

iPSC-RPE tratadas con PGE2

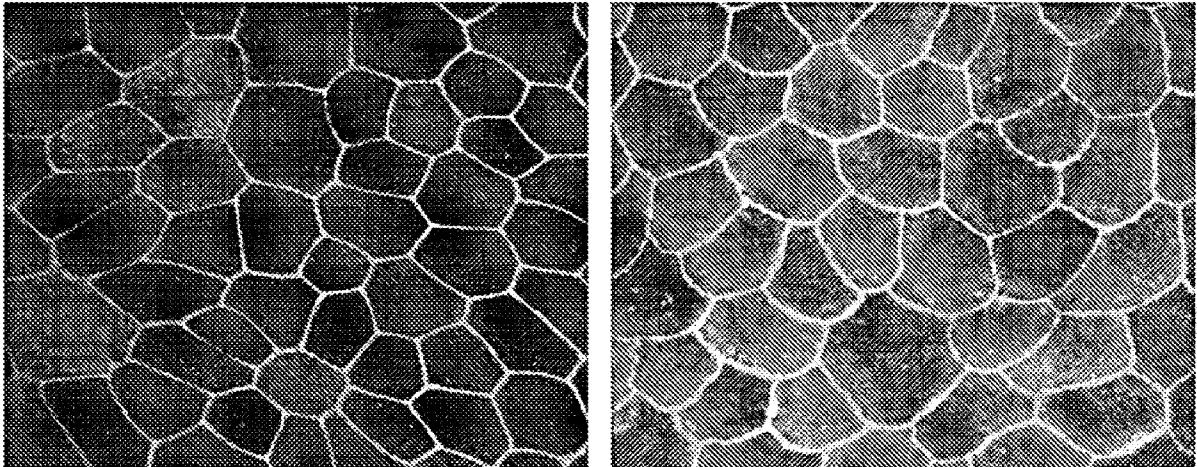


ERM/Z01

Figura 4C

iPSC-RPE no tratadas

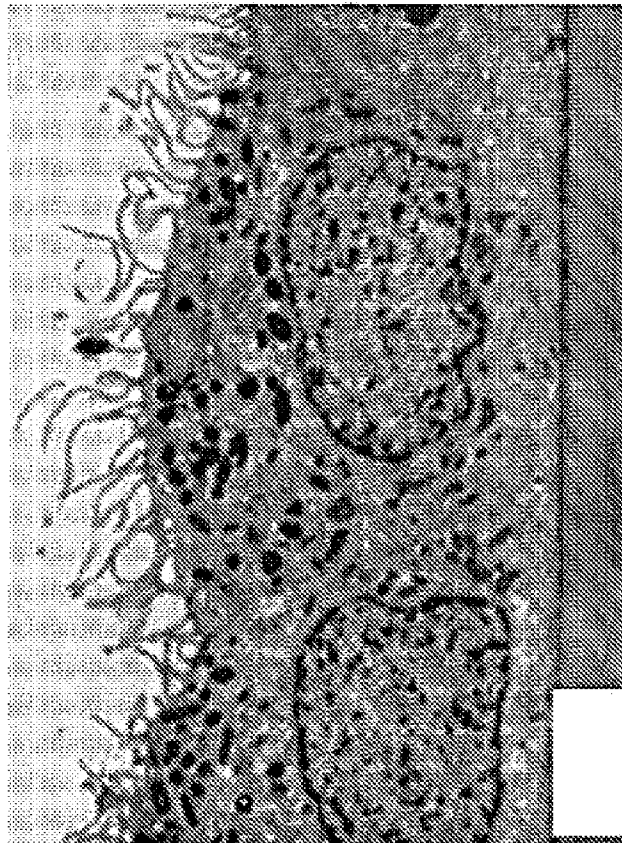
iPSC-RPE tratadas con PGE2



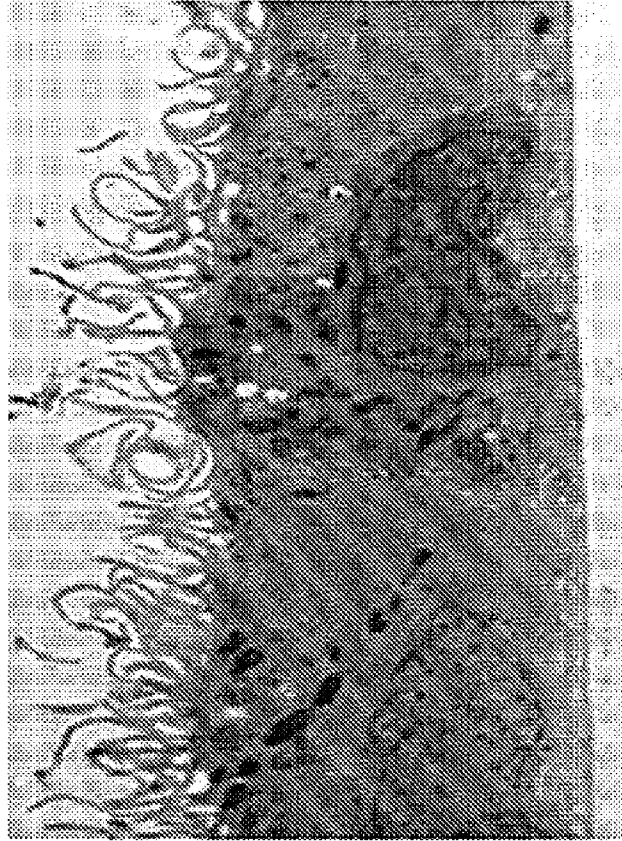
RPE65/Z01

Figura 4D

iPSC-RPE no tratadas



iPSC-RPE tratadas con PGE2



Microfotografías electrónicas de transmisión

Figura 5A

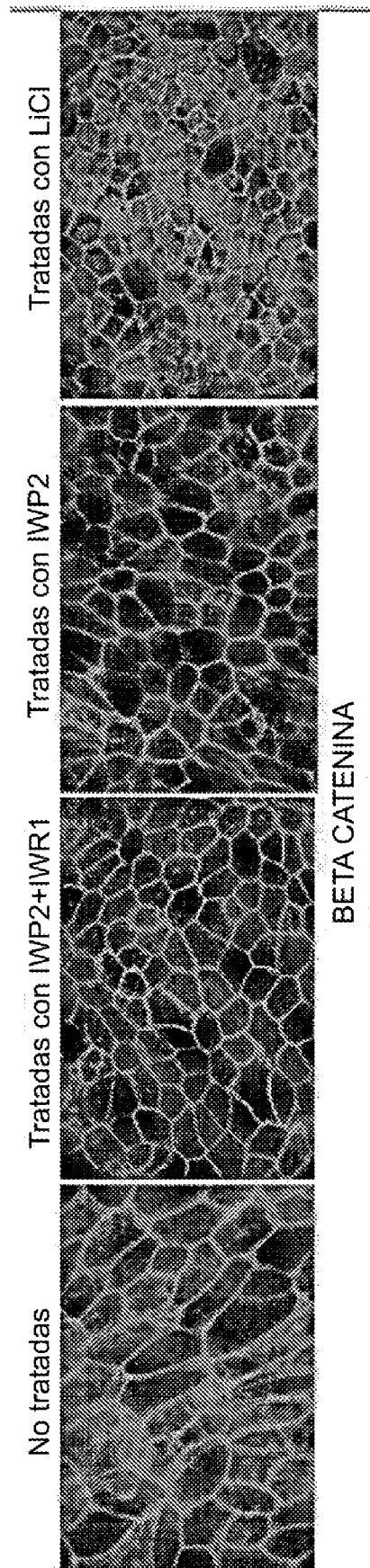


Figura 5B

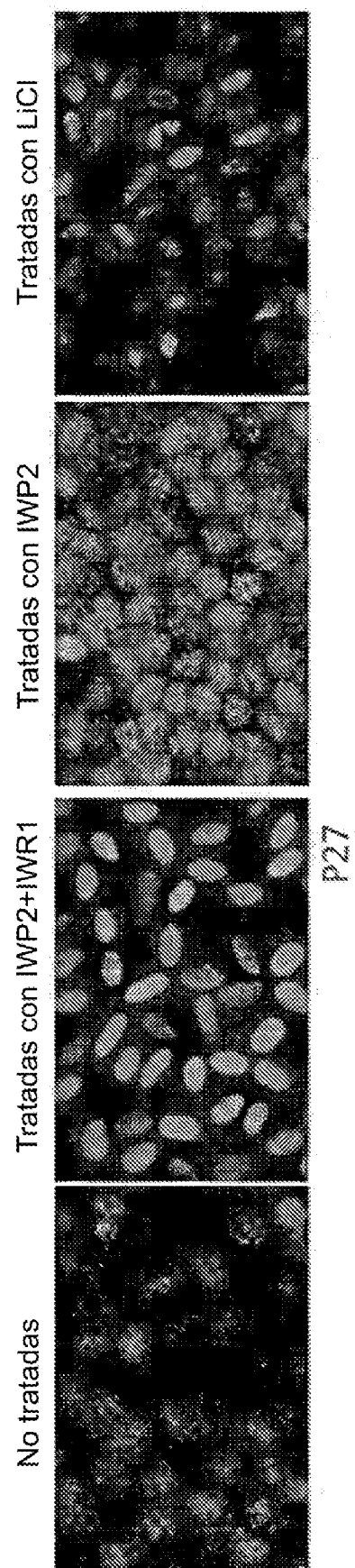


Figura 5C

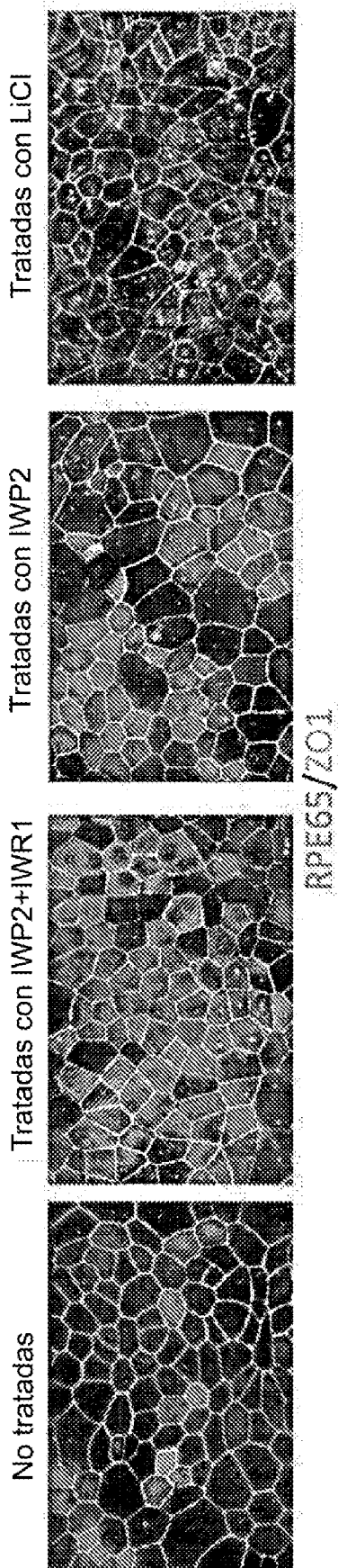
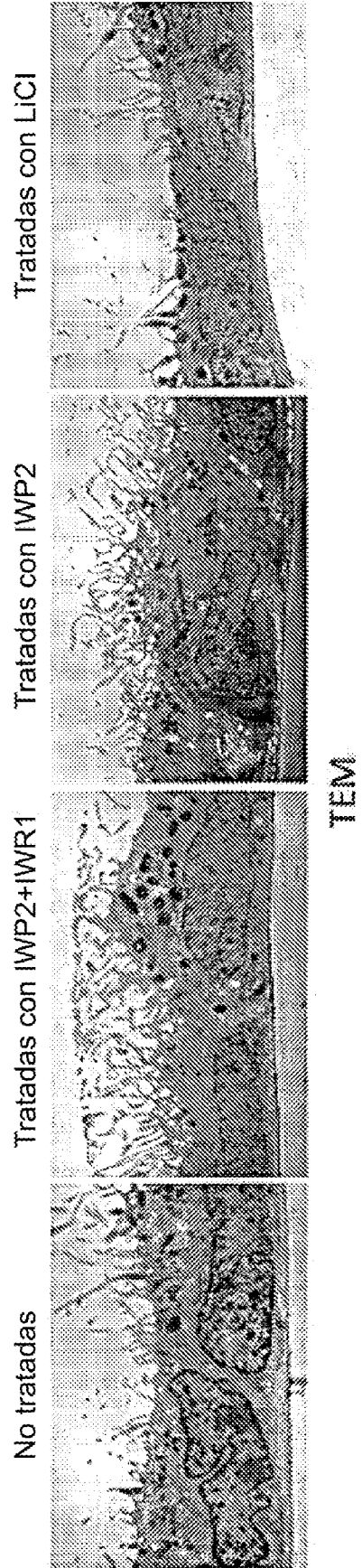


Figura 5D



TEM

Figura 6A

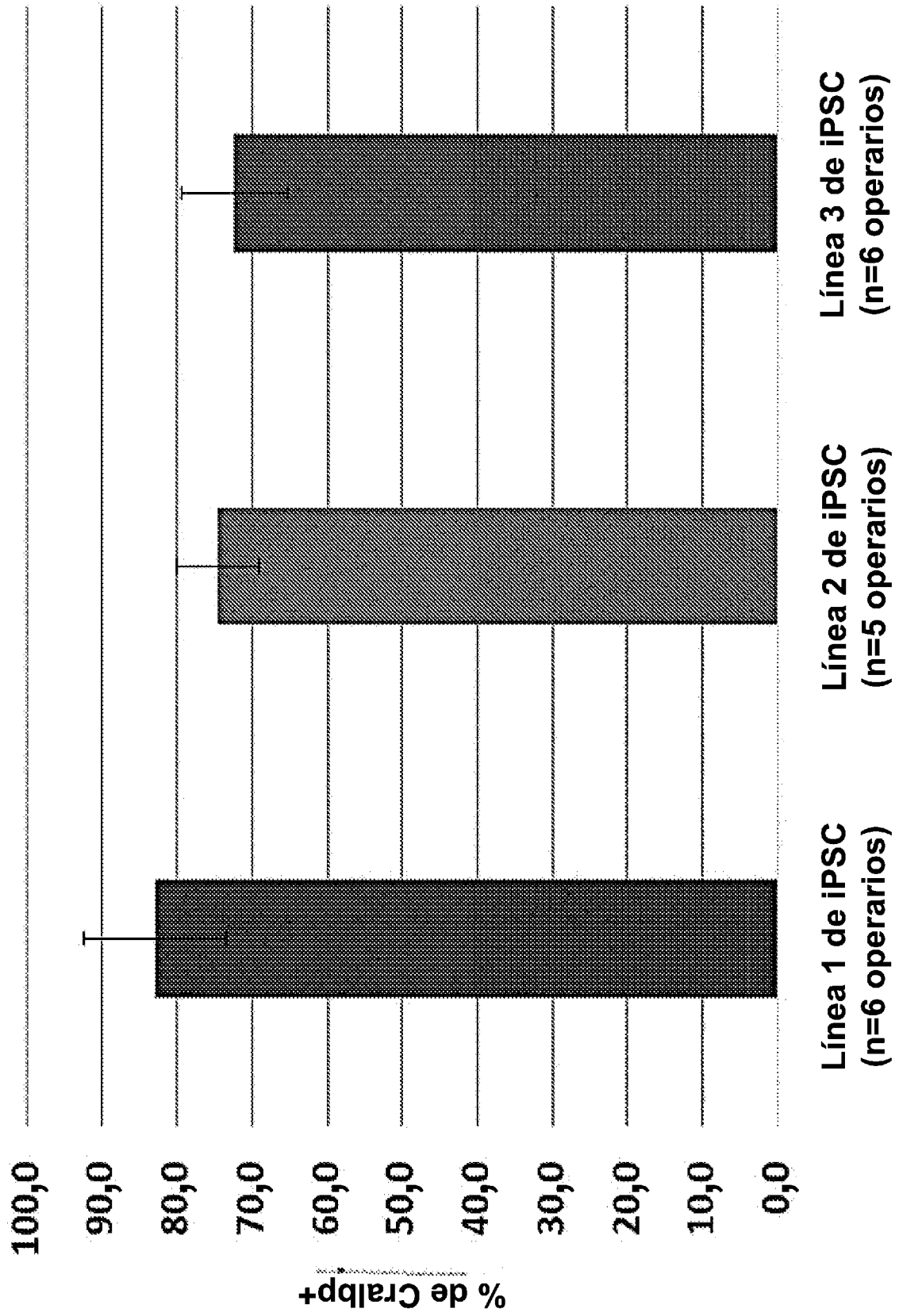


Figura 6B

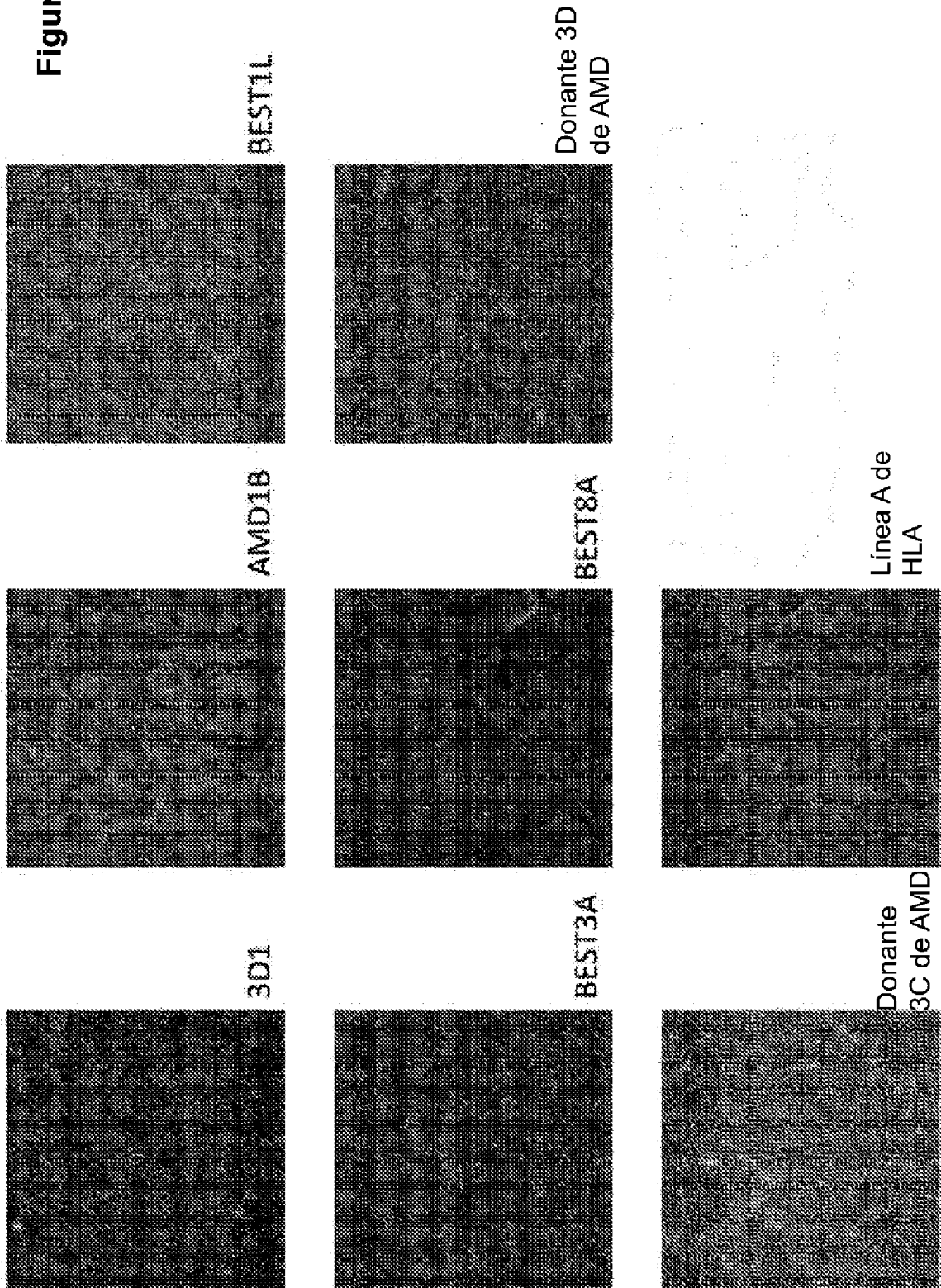


Figura 6C

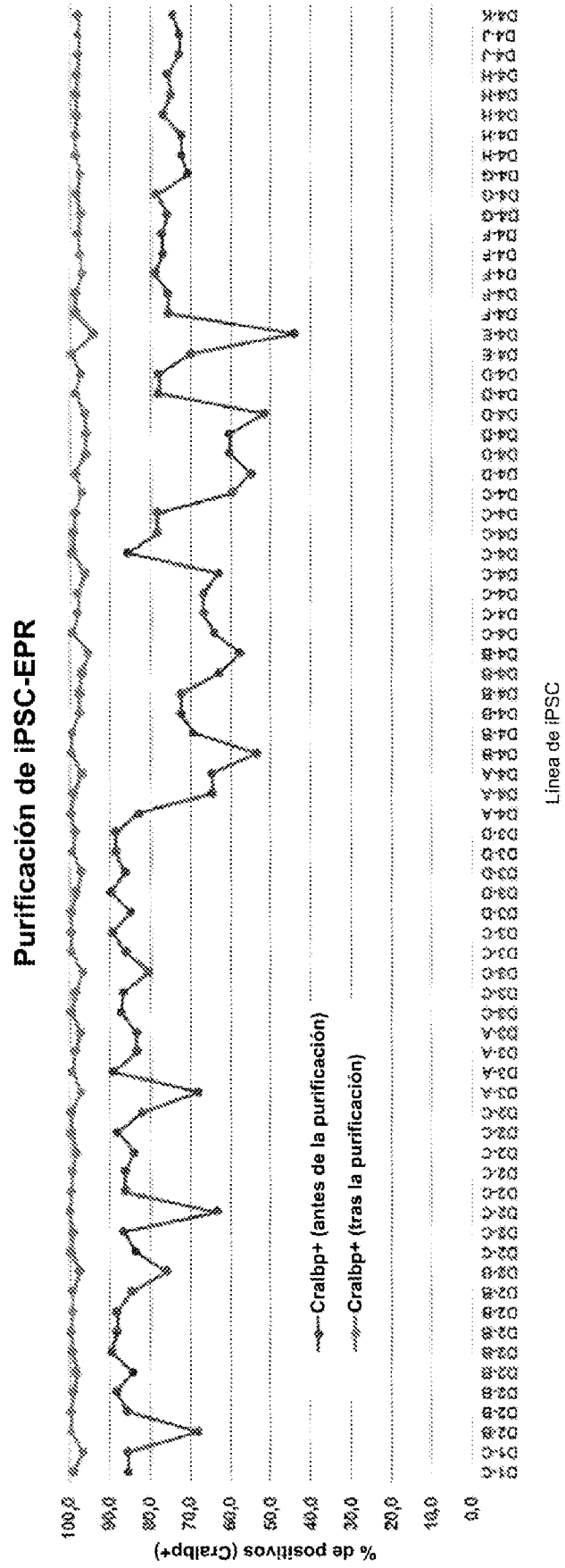


Figura 6D

Purificación de iPSC-EPR

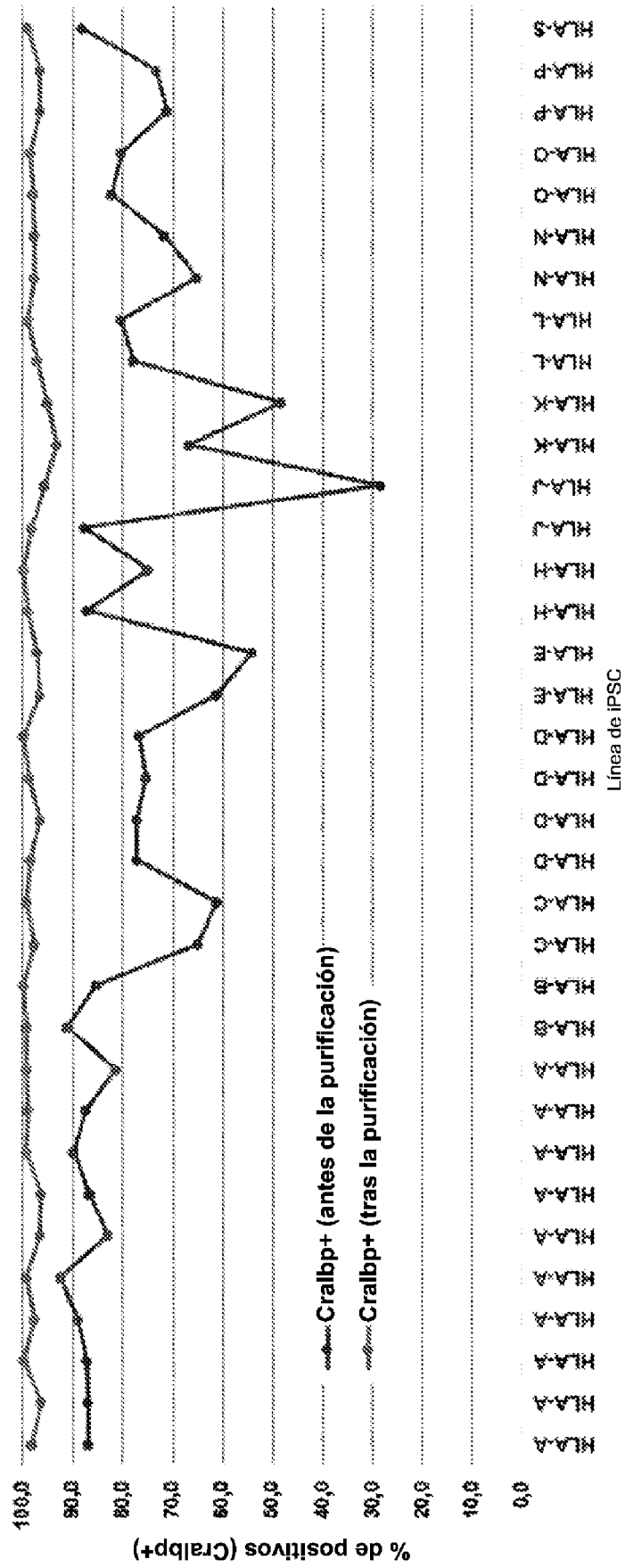
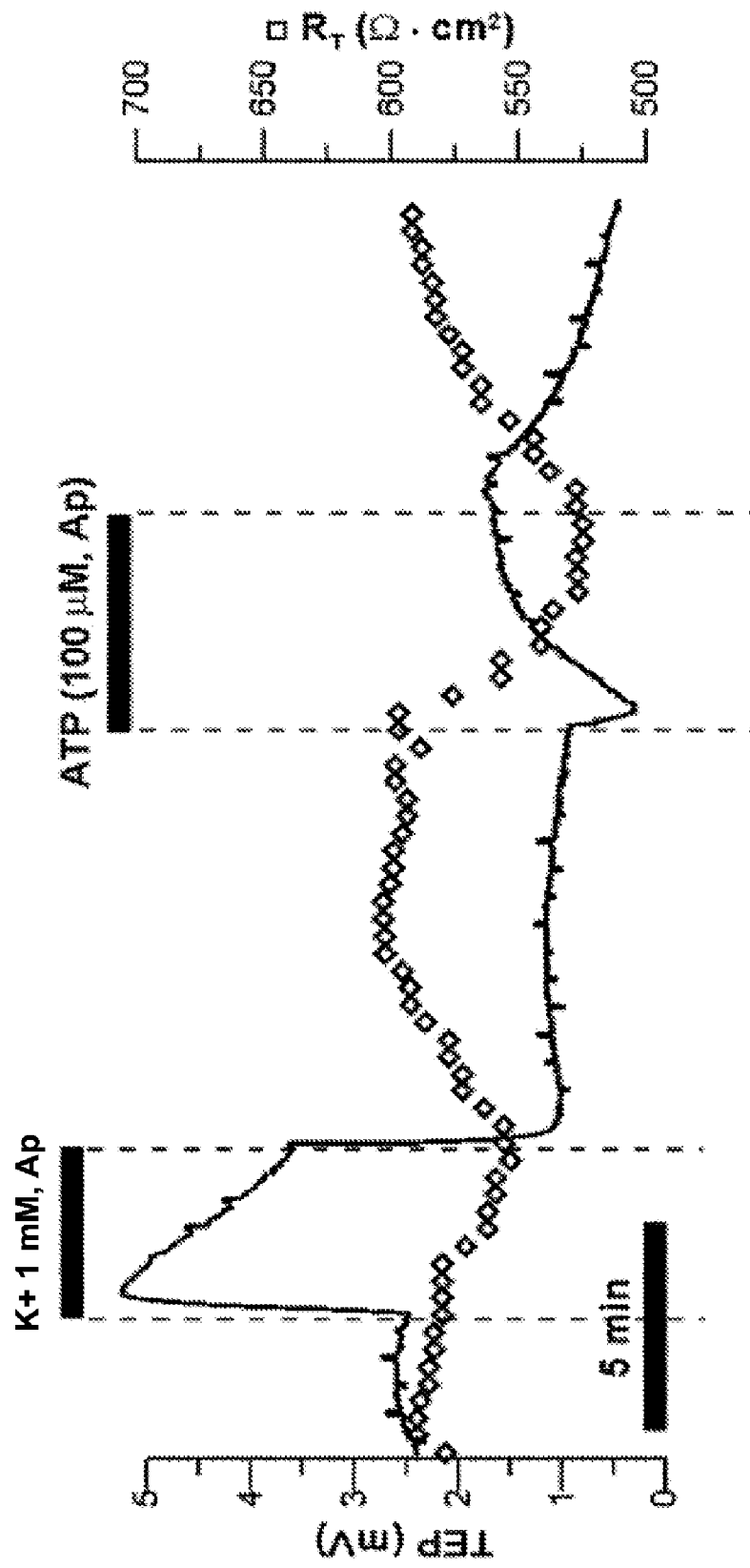


Figura 7A



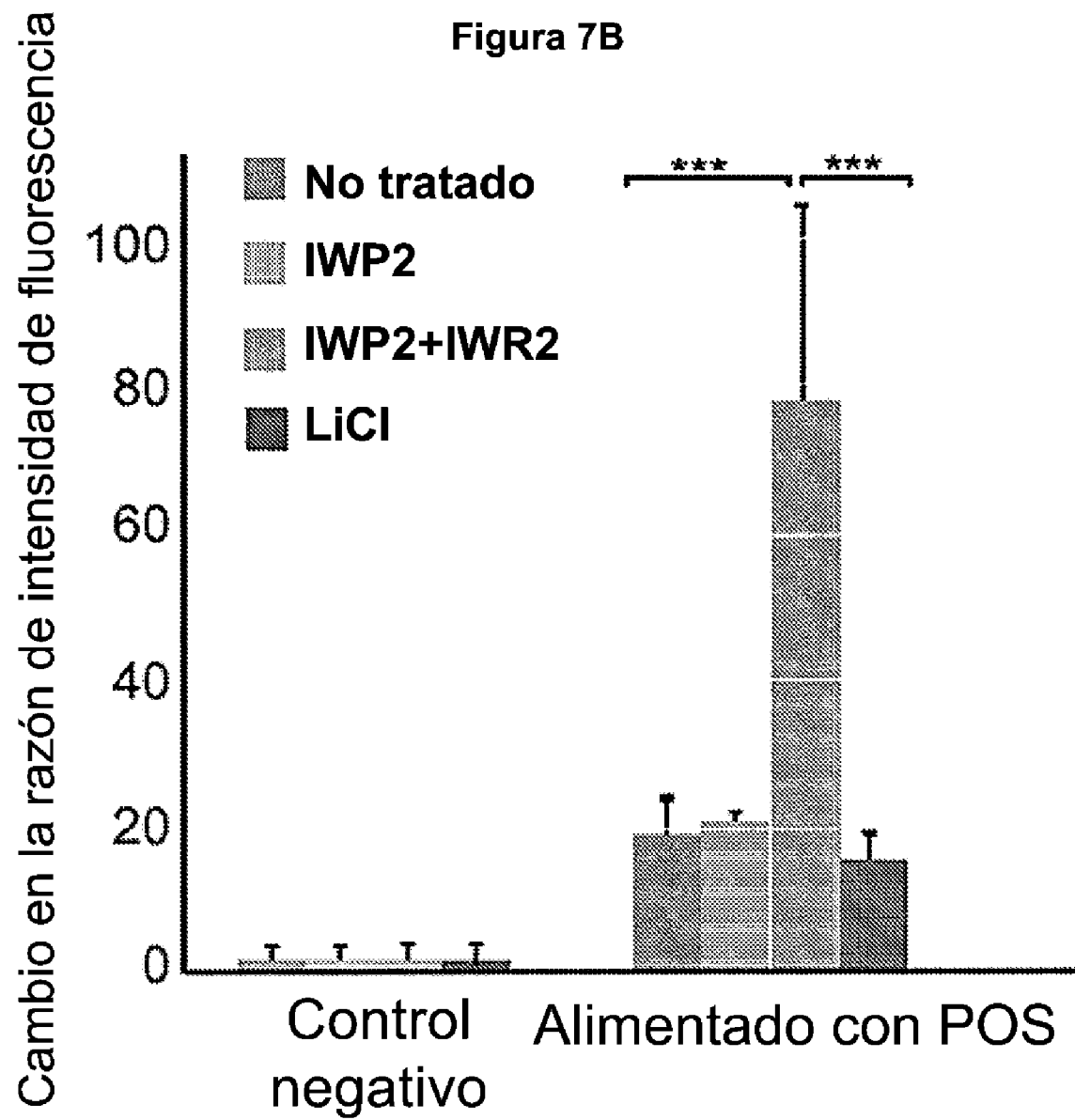


Figura 7C

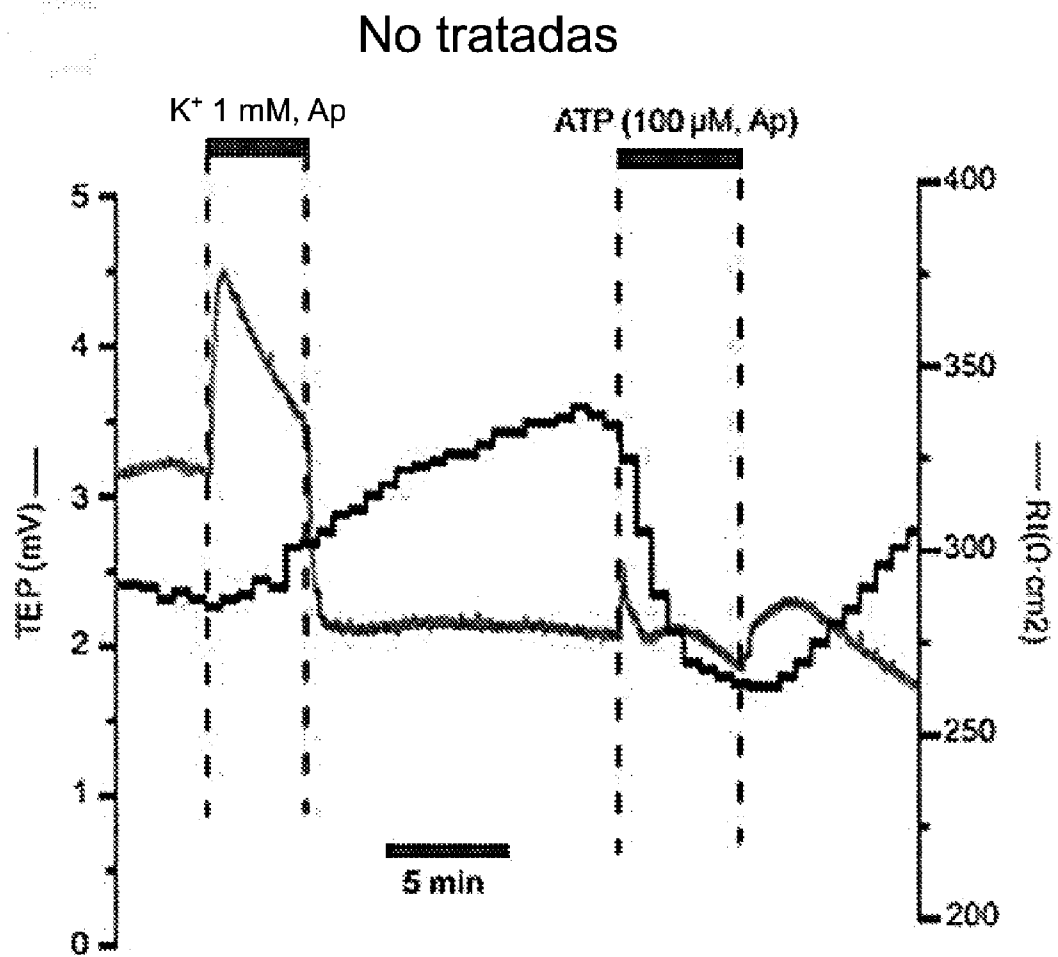


Figura 7D

PGE2

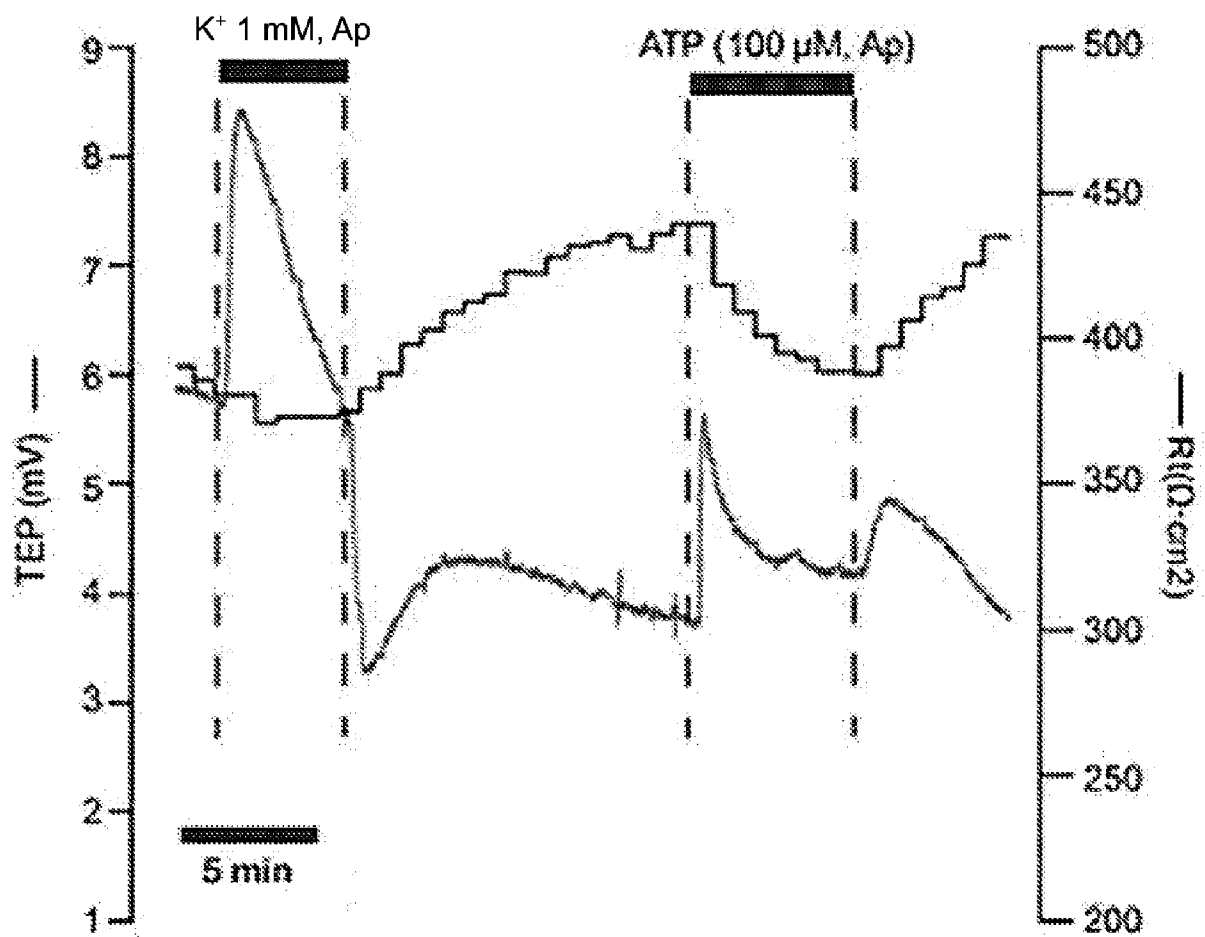


Figura 7E

IWP2+IWR1

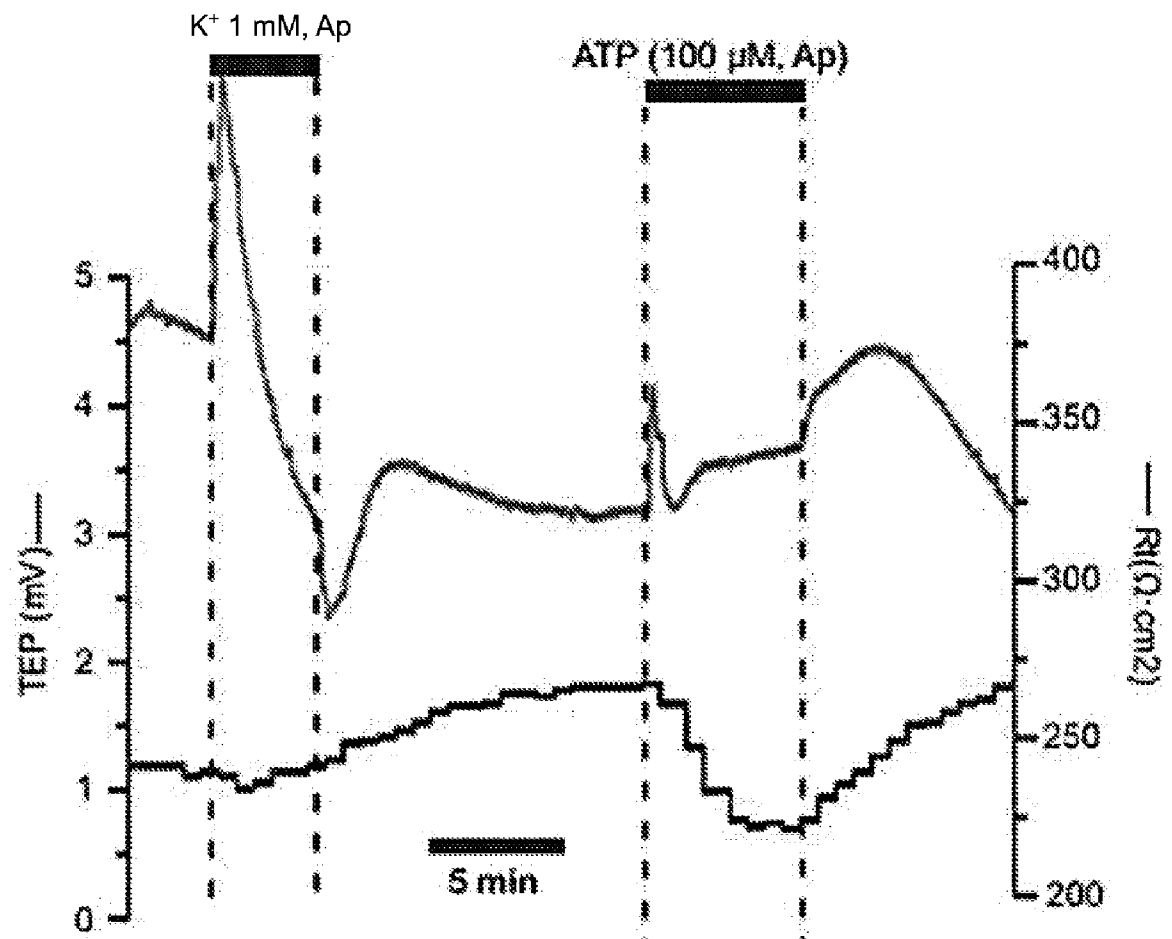


Figura 7F

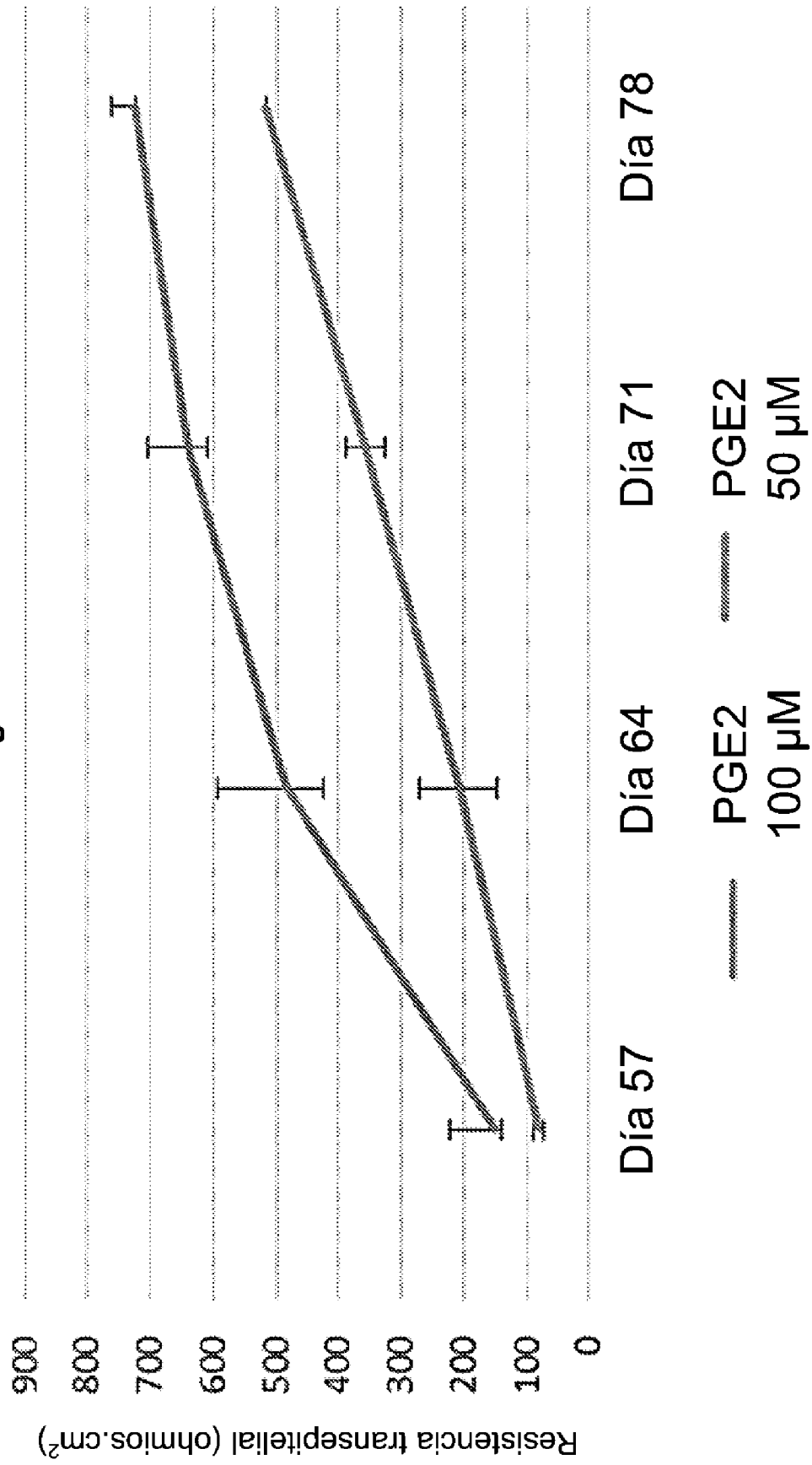


Figura 7G

