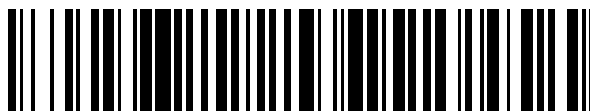


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 980**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/0797 (2010.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 35/30 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2013** **PCT/US2013/026286**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13123292**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013** **E 13749143 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2814947**

54 Título: **Perfil fenotípico de células progenitoras de retina humana**

30 Prioridad:

17.02.2012 US 201261600288 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2019

73 Titular/es:

SCHEPENS EYE RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
20 Staniford Street
Boston, MA 02114, US

72 Inventor/es:

YOUNG, MICHAEL, J. y
BARANOV, PETR, Y.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 700 980 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

Perfil fenotípico de células progenitoras de retina humana

Antecedentes de la invención

La degeneración de la retina humana, ya sea como resultado de un traumatismo, edad o enfermedad, puede provocar una pérdida visual permanente y afectar a millones de personas en todo el mundo. Las condiciones degenerativas incluyen, por ejemplo, retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética. Estas condiciones se caracterizan por la muerte progresiva de las células fotorreceptoras de detección de luz de la retina, y son las principales causas de ceguera incurable en el mundo occidental. Como la capacidad regenerativa intrínseca de la retina humana es extremadamente limitada, la única opción de tratamiento viable para personas que sufren pérdida de células fotorreceptoras es el reemplazo celular.

Se han sugerido varios tipos de células como herramientas de terapia celular para los trastornos degenerativos de la retina. Tales tipos de células incluyen células progenitoras retinales humana (hRPC), células epiteliales pigmentadas de la retina, células progenitoras gliales, células madre neurales, células derivadas de la médula ósea y de sangre de cordón umbilical. Las células madre multipotentes (también llamadas células progenitoras, células inmaduras, células precursoras, células indiferenciadas o células proliferativas) son un foco activo para el trasplante y la diferenciación.

Las células progenitoras retinales humana tienen un gran potencial para su uso en aplicaciones clínicas, tales como para el trasplante en huéspedes retinianos degenerativos o enfermos. Estas células se aíslan típicamente de la retina fetal en el tejido pre y postnatal mediante la eliminación de la zona marginal ciliar y el nervio óptico para eliminar la contaminación. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 7.514.259. Estas células se pueden expandir *in vitro* y son capaces de migrar y repoblar la retina, formando nuevos fotorreceptores funcionales.

El uso de células vivas como un producto farmacológico en aplicaciones clínicas tales como para trasplantes requiere la caracterización completa de la población celular durante la expansión de la población huésped y antes de la inyección de las células en un receptor humano. Dicha caracterización se logra típicamente mediante la identificación de marcadores específicos expresados en la superficie de la célula. La identificación de marcadores específicos, es decir, marcadores únicos para la línea celular particular, también es útil para el enriquecimiento o el agotamiento de la población huésped.

En el pasado, se han realizado varios intentos para identificar marcadores específicos únicos para diferentes tipos de células. Las poblaciones celulares que se han caracterizado e identificado con éxito de esta manera incluyen células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre neurales y células progenitoras gliales.

Carter et al., BMC Ophthalmology, 9: 1, 2009, describe el uso del marcador CD133 para purificar células adultas de la retina humana. Las suspensiones de células retinianas se derivaron de tejido humano postmortem adulto y se enriquecieron con la clasificación celular automatizada magnética. Se demostró una purificación celular de aproximadamente el 95%.

La patente de Estados Unidos N° 6.468.794 describe el enriquecimiento de las poblaciones de células madre neurales y de células progenitoras usando anticuerpos monoclonales que se unen a marcadores de superficie celular. La patente de Estados Unidos N° 7.015.037 describe células madre multipotentes aisladas que son negativas en la superficie para los marcadores CD44, CD45, HLA Clase I y HLA Clase II. Véase, también, las patentes de Estados Unidos Nos 6.908.763, 7.749.754 y 7.781.179.

Yuan et al., Plos One, 6 (3), e17540, marzo de 2011, describen procedimientos mejorados de diferenciación y enriquecimiento que generan poblaciones altamente puras de células madre neurales, glía y neuronas derivadas de células madre pluripotentes. Las firmas o marcadores de la superficie celular se identifican en las células para permitir el aislamiento de las células a partir de poblaciones de células heterogéneas diferenciadoras mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia. En particular, la referencia establece que una población de células madre neurales se ha aislado con éxito mediante el uso de la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y los siguientes marcadores: CD184+, CD271-, CD44- y CD24+.

Klassen et al., Journal of Neuroscience Research, 77 (3), agosto de 2004, describen el aislamiento de células progenitoras viables de la retina post mortem de bebés prematuros que muestran un perfil de expresión génica compatible con células neuroepiteliales inmaduras. Las células progenitoras retinales humanas (hRPC) se pueden distinguir de los cultivos de células progenitoras de cerebro humano (hBPC) por la expresión de genes de especificación retiniana y recoverina.

A pesar de varios intentos de caracterizar diferentes tipos de células madre utilizando marcadores específicos de células, no se han identificado marcadores de superficie específicos para células progenitoras de retina humana. La identificación exitosa de dichos marcadores avanzaría la tecnología al permitir el enriquecimiento de poblaciones celulares, la eliminación de células menos deseables del cultivo, como las células gliales, células neurales y células epiteliales de pigmento retiniano, y la selección final de células progenitoras retinianas que expresan altamente los marcadores de interés. Las poblaciones de células altamente purificadas se pueden cultivar luego utilizando técnicas

como las que se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 13/160.002, presentada el 14 de junio de 2011, y fabricadas en bancos de células con el fin de derivar células que podrían usarse en trasplantes humanos para el tratamiento de las enfermedades degenerativas de la retina. Los marcadores de la superficie celular pueden representar marcadores que permiten que la caracterización del producto celular se entregue al paciente, en cumplimiento parcial de los requisitos por parte de las agencias reguladoras gubernamentales para definir la calidad del producto celular.

En vista de lo anterior, así como la importancia de las células progenitoras retinales humana para la evaluación y el uso clínico, se apreciará fácilmente que existe una necesidad de mejorar la caracterización, identificación y purificación de las células progenitoras retinales humana para trasplante y tratamiento de la enfermedad. Estos y otros objetivos de la invención quedarán claros a partir de la siguiente descripción.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un método para identificar células progenitoras retinales fetales humanas en una población mixta de células derivadas de neurorretinas de ojos fetales humanos, que comprende seleccionar dicha población de células mixtas para células:

(i) que tengan los siguientes marcadores de superficie positivos: SSEA4, CD73, PTK7 y PSA-NCAM, recoverina, Sox2, Pax6 y opcionalmente nestina y Ki-67, y

(ii) que carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales: CD15 y CD133. Las composiciones que contienen las células y/o poblaciones se divulgan adicionalmente en el presente documento.

La invención proporciona además un método para aislar o purificar una población de células progenitoras retinales fetales humanas de una población mixta de células derivadas de neurorretinas de ojos fetales humanos, que comprende seleccionar dicha población de células mixtas para células:

(i) que tengan los siguientes marcadores de superficie positivos: SSEA4, CD73, PTK7 y PSA-NCAM, recoverina, Sox2, Pax6 y opcionalmente nestina y Ki-67, y

(ii) que carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales: CD15 y CD133; y

aislar o purificar las células progenitoras retinales fetales humanas de la población mixta para proporcionar la población aislada o purificada de células progenitoras retinales fetales humanas.

La invención proporciona además un método para preparar una población de células progenitoras de retina fetal humana purificada que comprende las etapas de:

clasificación de las células obtenidas de una muestra de células aisladas de neurorretinas de ojos fetales humanos que contienen células progenitoras retinales humana utilizando los siguientes marcadores de superficie identificables positivos: SSEA4, CD73, PTK7, PSA-NCAM, recoverina, Sox2, Pax6 y opcionalmente CD24, y opcionalmente nestina y Ki-67, en donde las células progenitoras retinales carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales CD15 y CD133, y

recoger dichas células progenitoras retinianas humanas separadas para preparar una población de células progenitoras retinianas humanas purificadas,

y opcionalmente comprende además eliminar las impurezas y contaminantes de la muestra de células aisladas antes de clasificar las células.

En un aspecto, las células progenitoras retinianas humanas de la divulgación se caracterizan además por carecer de los siguientes marcadores de superficie: CD15, CD133, A2B5 y CD38 (identificados también en la técnica como CD15-, CD133-, A2B5- y CD38-). CD15 y CD133 son marcadores de superficie de células madre neurales. A2B5 y CD38 son marcadores de superficie de células progenitoras gliales. En un aspecto adicional, las poblaciones celulares purificadas de la divulgación comprenden al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, de las células progenitoras retinianas humanas identificadas específicamente con los marcadores de superficie celular indicados. Las composiciones que contienen las células y/o poblaciones se describen adicionalmente en el presente documento.

El método de la invención incluye las etapas de obtener una muestra de células aisladas a partir de tejido humano e identificar y luego aislar o purificar la célula progenitora mediante el uso de los marcadores identificados anteriormente, utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. En un aspecto, el método comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún más consiste en eliminar las diversas impurezas y contaminantes normalmente presentes en la muestra de células, clasificando las células para separar y purificar las células progenitoras humanas que tienen los marcadores de superficie identificados anteriormente, y recolectar las células purificadas para uso clínico o experimental. Posteriormente, las células se pueden colocar en cultivo de tejidos y cultivar para permitir que se generen números sustanciales de células para la terapia, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 13/160.002, presentada el 14 de junio de 2011. Las técnicas de clasificación celular que se pueden usar

en la práctica de la invención son generalmente conocidas e incluyen, por ejemplo, citometría de flujo, y específicamente clasificación celular activada por fluorescencia usando anticuerpos y fragmentos de los mismos que reconocen y se unen a los marcadores de superficie celular.

5 El método de la divulgación permite la selección de células progenitoras retinianas a partir de una variedad de fuentes de tejido humano, tales como médula ósea, sangre del cordón umbilical, células madre embrionarias humanas o su progenie diferenciada, células madre pluripotentes inducidas humanas o su progenie diferenciada, aunque las fuentes de tejido preferidas son tejido de retina fetal o adulto humano.

10 Las células progenitoras retinianas humanas de la divulgación tienen diversos usos terapéuticos, tales como para el tratamiento de enfermedades retinianas tras el trasplante en un ojo enfermo, y las células pueden ser autólogas o alogénicas para el paciente o receptor huésped. Las células de la descripción también se pueden usar para el descubrimiento de fármacos *in vitro* y las pruebas de toxicidad, poniendo en contacto las células con agentes farmacéuticos en un formato de ensayo apropiado. Debido a que las células progenitoras retinales son capaces de diferenciarse en células fotorreceptoras, son útiles para reemplazar o reparar el tejido fotorreceptor en un paciente y, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades degenerativas del ojo como la retinitis pigmentosa, la degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética. Por lo tanto, la presente descripción también proporciona métodos para preparar un cultivo purificado de células fotorreceptoras mediante el cultivo de una célula o población de células identificadas anteriormente en condiciones apropiadas para inducir o apoyar la diferenciación de las células a células fotorreceptoras. Luego, varios agentes pueden ponerse en contacto con las células (en una o más veces durante la diferenciación de la célula o la población) para determinar el efecto, si lo hay, en la viabilidad, características o diferenciación de la célula.

Breve descripción de las figuras

Lo anterior y otras ventajas y características de la invención se harán evidentes al leer la siguiente descripción detallada con referencia a las figuras y dibujos acompañantes.

25 La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra la expresión de los marcadores de severidad/campo ocular indicados en base a un análisis de citometría de flujo de células progenitoras retinianas humanas.

La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra la expresión de los marcadores proliferativos/de ciclo celular indicados en base a un análisis de citometría de flujo de células progenitoras retinianas humanas.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra la expresión de los marcadores neurales/gliales indicados en base a un análisis de citometría de flujo de células progenitoras retinianas humanas.

30 La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra la expresión de los marcadores de severidad/campo ocular indicados en base a un análisis inmunocitoquímico de células progenitoras retinianas humanas.

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra la expresión de los marcadores proliferativos/de ciclo celular indicados en base a un análisis inmunocitoquímico de células progenitoras retinianas humanas.

35 La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra la expresión de los marcadores neurales/gliales indicados en base a un análisis inmunocitoquímico de células progenitoras retinianas humanas.

Descripción detallada de las realizaciones

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a ser anterior a dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

45 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo de tejidos, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, citometría de flujo y clasificación de células que están dentro de los conocimientos de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y Russell eds. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición; La serie Ausubel et al., eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology; la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5a edición; Gaited. (1984) Oligonucleotide Synthesis; patente de estadíos Unidos No. 4.683.195; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press,

London); y Herzenberg et al., eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology. Véase, también Yuan et al., Plos One, 6(3), e17540, marzo de 2011.

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluidos los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 1,0 o 0,1, según corresponda. Debe entenderse, aunque no siempre se establece explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se establece explícitamente, que los reactivos descritos en este documento son meramente ejemplos y que los equivalentes de los mismos se conocen en la técnica.

Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los propósitos, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos en el presente documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos. Se puede reconocer fácilmente que cualquier intervalo incluido en la lista describe y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como ejemplo no limitativo, cada intervalo descrito en este documento se puede desglosar fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también comprenderá un experto en la técnica todas las expresiones tales como "hasta", "al menos", "mayor que", "menos que" y el como incluir el número mencionado y referirse a intervalos que se pueden dividir posteriormente en subintervalos como se discutió anteriormente.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular "un", "uno, una" y "el, la" incluye referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un portador farmacéuticamente aceptable" incluye una pluralidad de portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos.

Como se usa en este documento, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen a otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación para el uso previsto. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen aquí no excluiría contaminantes en trazas a partir del Método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, como solución salina regulada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en" significa que excluye más que los elementos en trazas de otros ingredientes y las etapas sustanciales del método para administrar las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Un "huésped" o "paciente" de esta descripción es un animal tal como un mamífero, o un ser humano. Los animales no humanos sujetos a diagnóstico o tratamiento son aquellos que necesitan tratamiento, como por ejemplo, simios, murinos, tales como ratas, ratones, caninos, tales como perros, lepóridos, tales como conejos, ganado, animales de deporte y mascotas.

Los términos "purificado" o "aislado" significa separados de los constituyentes, celulares y de otro tipo, en los cuales la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos de los mismos, que normalmente están asociados en la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido aislado se separa de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que normalmente está asociado en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Una célula purificada o aislada se separa del tejido en el que normalmente se asocia en la naturaleza. Una célula aislada o purificada es una célula que está separada de tejidos o células de fenotipo o genotipo diferente. Como es evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos de los mismos no naturales, no requiere un "aislamiento" para distinguirlo de su contraparte natural.

Como se usa en el presente documento, "célula madre" define una célula con la capacidad de dividirse por períodos indefinidos en cultivo y dar lugar a células especializadas. En este momento y por conveniencia, las células madre se clasifican como somáticas (adultas) o embrionarias. Una célula madre somática es una célula indiferenciada que se encuentra en un tejido diferenciado que puede renovarse por si mismo (clonal) y (con ciertas limitaciones) diferenciarse para producir todos los tipos de células especializadas del tejido del cual se originó. Una célula madre embrionaria es una célula primitiva (no diferenciada) del embrión que tiene el potencial de convertirse en una amplia variedad de tipos de células especializadas (pluripotentes). Recientemente, las células somáticas, incluidas las células adultas totalmente diferenciadas, como los fibroblastos, pueden volverse pluripotentes como las células madre embrionarias, mediante la introducción de algunos o todos los siguientes factores: Oct-3/4, SOX2, c-Myc, Nanog y Klf4. Estas células se denominan células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Una célula madre embrionaria o pluripotente inducida es una que se ha cultivado en condiciones *in vitro* que permiten la proliferación sin diferenciación durante meses o años. Las células madre pluripotentes se pueden distinguir de otros tipos de células mediante el uso de marcadores apropiados, que incluyen, pero no se limitan a, Oct4: oct-4, fosfatasa alcalina, CD30, TDGF-1, GCTM-2, Génesis, factor nuclear de células germinales, SSEA1, SSEA3, y SSEA4.

El término "célula madre" también incluye células madre "desdiferenciadas", un ejemplo de las cuales es una célula somática que se convierte directamente en una célula madre, es decir, reprogramada. Un clon es una línea de células que es genéticamente idéntica a la célula originaria; en este caso, una célula madre.

El término "propagar" o "proliferar" significa crecer o alterar el fenotipo de una célula o población de células. El término "crecimiento" o "expansión" se refiere a la proliferación de células en presencia de medios de soporte, nutrientes, factores de crecimiento, células de soporte o cualquier compuesto químico o biológico necesario para obtener el número deseado de células o tipo de célula. En una realización, el crecimiento de las células da como resultado la regeneración de tejido. En otra realización más, el tejido está compuesto por cardiomiocitos.

El término "cultivo" se refiere a la propagación *in vitro* de células u organismos en o en medios de diversos tipos. Se entiende que los descendientes de una célula cultivada en cultivo pueden no ser completamente idénticos (es decir, morfológicamente, genéticamente o fenotípicamente) a la célula progenitora. Por "expandido" se entiende cualquier proliferación o división de células.

La "proliferación clonal" o "expansión clonal" se refiere al crecimiento de una población de células por la división continua de células individuales en dos células hijas idénticas y/o población de células idénticas.

Como se usa en el presente documento, el "linaje" de una célula define la herencia de la célula, es decir, sus antecesores y su progenie. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

La "diferenciación" describe el proceso mediante el cual una célula no especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula del corazón, hígado o músculo. "Diferenciación dirigida" se refiere a la manipulación de las condiciones de cultivo de células madre para inducir la diferenciación en un tipo de célula particular o fenotipo. "Desdiferenciada" define una célula que vuelve a una posición menos comprometida dentro del linaje de una célula. Como se usa en este documento, el término "diferencia o diferenciada" define una célula que toma una posición más comprometida ("diferenciada") dentro del linaje de una célula.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno o una sola cadena de los mismos. Por lo tanto, el término "anticuerpo" incluye cualquier molécula que contiene proteína o péptido que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina. Los ejemplos de tales incluyen, pero no se limitan a, una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de la misma de unión al ligando, una región variable de cadena pesada o de cadena ligera, una región constante de cadena pesada o de cadena ligera, una región marco (FR), o cualquier porción de la misma, o al menos una porción de una proteína de unión, cualquiera de las cuales puede incorporarse en un anticuerpo de la presente invención.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden aislarse de cualquier fuente biológica adecuada, por ejemplo, murino, rata, oveja y canino.

El término "anticuerpo" está destinado además a abarcar anticuerpos monoclonales, fragmentos de digestión, porciones específicas, derivados y variantes de los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpos o que comprenden porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento específico o parte de los mismos, incluidos los anticuerpos de cadena única y sus fragmentos. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH; un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH, un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, mediante métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv)). Bird et al., (1988) Science 242: 423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl Acad Sci. USA 85: 5879-5883. También se pretende que los anticuerpos de cadena única se incluyan dentro del término "fragmento de un anticuerpo". Cualquiera de los fragmentos de anticuerpo señalados anteriormente se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para determinar la especificidad de unión y la actividad de neutralización de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "epítipo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos generalmente consisten en grupos de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

"Células progenitoras retinales", o "células madre retinales derivadas de la neuroretina", o "células madre retinales", como se usan esos términos en el presente documento, son sinónimos y significan células madre viables aisladas que

pueden derivarse del tejido neuroretinal. El punto de origen de estas células es un factor que puede distinguirlas de las células retinales no neurales, como las células pigmentadas del epitelio pigmentario de la retina, el cuerpo ciliar o el iris. Las células de la divulgación se distinguen adicionalmente por una incapacidad para proliferar en ausencia de factores de crecimiento. Las células no expresan cantidades significativas de marcadores fotorreceptores en un cultivo de crecimiento normal, pero en ausencia de factores de crecimiento y, en particular, cuando se colocan en placas sobre cierto material de matriz (solicitud de patente PCL), las células se diferencian rápidamente en células positivas para marcadores fotorreceptores.

Las células de la divulgación se caracterizan aún más por el conjunto único de marcadores de superficie celular, como se describe más detalladamente en el presente documento. Las células de la divulgación de los datos derivan de fuentes prenatales o postnatales, y son multipotentes, lo que significa que son capaces de autorrenovación y diferenciación específica de la retina en fotorreceptores. Dichas células también se describen con más detalle en la patente de Estados Unidos N° 7.514.259.

Como se usa en este documento en relación con las células progenitoras retinales de la divulgación, el término "multipotencia" significa la capacidad de las células progenitoras retinales para proliferar y formar tipos de células retinales maduras, particularmente células fotorreceptoras.

La población celular "sustancialmente homogénea" describe una población de células en las que más de aproximadamente el 50%, o alternatively más de aproximadamente el 60%, o alternatively más del 70%, o alternatively más del 75%, o alternatively más del 80% , o alternatively más del 85%, o alternatively más del 90%, o alternatively, más del 95%, de las células son del mismo o similar fenotipo. El fenotipo está determinado por los marcadores de superficie celular descritos con más detalle en el presente documento.

Como se usa en este documento, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se usan en este documento para significar obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de un trastorno o signo o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o un efecto adverso atribuible al trastorno. Los ejemplos de "tratamiento" incluyen, entre otros, los siguientes: prevenir que ocurra un trastorno en un sujeto que pueda estar predispuesto a un trastorno, pero que aún no se haya diagnosticado que lo tenga; inhibir un trastorno, es decir, detener su desarrollo; y/o aliviar o mejorar los síntomas del trastorno, por ejemplo, la degeneración macular. Como entienden los expertos en la técnica, el "tratamiento" puede incluir la mejora sistémica de los síntomas asociados con la patología y/o un retraso en la aparición de síntomas tales como dolor en el pecho. La evidencia clínica y subclínica de "tratamiento" variará según la patología, el individuo y el tratamiento.

Una "composición" pretende significar una combinación de agente activo, célula o población de células y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo.

Se pretende que una "composición farmacéutica" incluya la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, tal como un soporte o matriz biocompatible [por favor proporcionar ejemplos de matrices], haciendo que la composición sea adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" (o medio), que puede usarse indistintamente con el término portador o medio biológicamente compatible, se refiere a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que no son solo compatibles con las células y otros agentes para ser administrados terapéuticamente, pero también son, dentro del alcance de un buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación proporcional con una razonable relación beneficio/riesgo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y materiales sólidos (por ejemplo, soportes y matrices celulares, láminas de tubos y otros materiales similares conocidos en la técnica y descritos con mayor detalle en el presente documento). Estos materiales semisólidos y sólidos pueden diseñarse para resistir la degradación dentro del cuerpo (no biodegradable) o pueden diseñarse para degradarse dentro del cuerpo (biodegradable, bioerosionable). Un material biodegradable puede ser además bioabsorbible, es decir, puede disolverse y absorberse en fluidos corporales (los implantes solubles en agua son un ejemplo), o degradarse y finalmente eliminarse del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o por descomposición y eliminación a través de vías naturales.

Una "cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones, aplicaciones o dosis.

Como se usa en el presente documento, el término "administrar" para fines *in vivo* y *ex vivo* significa proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de la composición, células o poblaciones efectivas para lograr el objeto deseado del método. Los métodos de administración de composiciones tales como los descritos en este documento son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a la administración parenteral, tópica, oral o local, así como por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. La administración puede efectuarse de forma continua o intermitente a lo largo del tratamiento. Los métodos para determinar los medios más eficaces y la dosis de administración son bien conocidos por los expertos en la técnica y variarán con la célula utilizada para la terapia, la composición utilizada para

la terapia, el propósito de la terapia y el sujeto que se está tratando. Las administraciones únicas o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosis y el patrón seleccionado por el médico tratante. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse antes o alternativamente a un sujeto que ya padece una enfermedad o afección para la cual está destinado el tratamiento.

5 Marcadores de superficie de células progenitoras retinales.

La divulgación se refiere a una célula purificada o aislada y/o poblaciones sustancialmente homogéneas de células progenitoras retinales caracterizadas por la presencia de cada uno de los siguientes marcadores de superficie celular: SSEA4+, CD73+, PTK7+ y PSA-NCAM+.

10 Estos son marcadores de superficie positivos, lo que significa que cada marcador está presente en la superficie de la célula y su presencia puede ser detectada por un anticuerpo u otro ligando relevante que se une al marcador de superficie. Las células retinales de la divulgación también se caracterizan por marcadores celulares negativos, lo que significa que la presencia de los marcadores no se puede detectar (o se observa la ausencia de los marcadores) por un anticuerpo con el marcador. Los siguientes son los marcadores celulares negativos para las células progenitoras retinales de la divulgación: CD15- (células madre neurales), CD 133- (células madre neurales), A2B5- (células progenitoras gliales) y CD38- (células progenitoras gliales).

15 Las poblaciones celulares de la descripción tienen, típicamente, al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, de células progenitoras retinales humanas. Las fuentes humanas para las células progenitoras retinales incluyen tejido de diversos órganos o tejido, tal como el tejido retiniano prenatal, el tejido fetal, los órganos adultos y la médula ósea, y la neuroesfera retinal. El tejido retinal humano es la fuente preferida de estas células. Las células pueden ser de huéspedes viables vivos o cadáveres.

25 En resumen, las células progenitoras retinales humanas se aíslan a partir de diferentes donaciones de retina neural humana a las 16 semanas de edad gestacional, obtenidas éticamente de bancos de tejidos y compatibles con GTP, por ejemplo ABR Inc. de Alameda, California. Las células aisladas y disociadas se expanden en una superficie recubierta con fibronectina en medio Ultraculture^{MR} con suplementos (20 ng/mL de rhEGF, 10 ng/mL de bFGF) hasta diferentes pasadas, por ejemplo, P8 y P13, y luego se congelan para proporcionar reservas de lotes de sustancia farmacéutica (DS). Estos lotes de sustancias farmacéuticas se pueden fabricar bajo GMP para aplicaciones clínicas. Para la preparación de células, los lotes de DS se descongelaron y se sembraron en placas a una densidad de 20.000 células/cm². Dos días después, las células se recolectaron y prepararon de acuerdo con los procedimientos estándar para generar el producto farmacéutico (DP). Se registra la concentración celular (número real de células por mL) y la viabilidad celular (estabilidad) para cada lote preparado de células progenitoras retinales humanas.

30 Para la caracterización, las células progenitoras retinales humanas se preparan como una suspensión fresca de células retinales en un excipiente no tóxico, tal como HBSS-NAC, a una concentración de 50 millones de células por mL. Las células se expanden y se preparan de acuerdo con los procedimientos estándar para trasplante. Véase, en general, el método descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 13/160.002, presentada el 14 de junio de 2011.

Las células se pueden caracterizar usando análisis de citometría de flujo y análisis inmunocitoquímico como se describe a continuación en los ejemplos.

Usos terapéuticos

40 Esta descripción también proporciona métodos para reemplazar o proteger células fotorreceptoras en un paciente que necesita este tratamiento que comprende implantar las células progenitoras retinales humanas descritas anteriormente en un espacio subretinal de una retina humana enferma o degenerada. En un aspecto, las células pueden tratar o aliviar los síntomas de la retinitis pigmentosa en un paciente que necesita el tratamiento. En otro aspecto, las células pueden sembrarse en soportes biocompatibles apropiados, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos Número 13/356.073, presentada el 23 de enero de 2012, y el producto de combinación de soporte celular puede implantarse para tratar o aliviar los síntomas de la degeneración macular relacionada con la edad en un paciente que necesita este tratamiento. Para todos estos tratamientos, las células progenitoras retinales son alogénicas para el paciente. En un aspecto adicional, las células de la descripción pueden administrarse en combinación con otros tratamientos.

50 Ensayos de selección

La presente descripción proporciona métodos para seleccionar diversos agentes que modulan la diferenciación de una célula progenitora retinal. También podría usarse para descubrir agentes terapéuticos que apoyan y/o rescatan fotorreceptores maduros que se generan en el cultivo a partir de células progenitoras retinales. Para los fines de esta divulgación, se pretende que un "agente" incluya, entre otros, un compuesto biológico o químico tal como una molécula orgánica o inorgánica simple o compleja, un péptido, una proteína (por ejemplo, un anticuerpo), un polinucleótido (por ejemplo, antisentido) o una ribozima. Se puede sintetizar una amplia gama de compuestos, por ejemplo, polímeros, como polipéptidos y polinucleótidos, y compuestos orgánicos sintéticos basados en varias estructuras centrales, y

estos también se incluyen en el término "agente". Además, varias fuentes naturales pueden proporcionar compuestos para la selección, tal como extractos de plantas o animales, y similares. Debe entenderse, aunque no siempre se establece explícitamente, que el agente se usa solo o en combinación con otro agente, que tenga la misma actividad biológica o diferente a la de los agentes identificados mediante la selección.

- 5 Para practicar el método de selección *in vitro*, se puede obtener una población aislada de células como se describió anteriormente. Cuando el agente es una composición distinta de un ADN o ARN, como una molécula pequeña como se describió anteriormente, el agente puede agregarse directamente a las células o agregarse al medio de cultivo para su adición. Como es evidente para los expertos en la técnica, debe añadirse una cantidad "efectiva" que pueda determinarse empíricamente. Cuando el agente es un polinucleótido, se puede agregar directamente mediante el uso de una pistola de genes o electroporación.

Como alternativa, puede insertarse en la célula utilizando un vehículo de suministro de genes u otro método como se describió anteriormente. Se pueden analizar los controles positivos y negativos para confirmar la supuesta actividad del fármaco u otro agente.

Kits

- 15 Esta divulgación también proporciona un kit para uso en los métodos descritos en el presente documento que contienen una o más de la población, célula o composición de la divulgación e instrucciones de uso. Opcionalmente, el kit puede incluir reactivos para uso en los métodos.

- 20 En un aspecto alternativo, la descripción proporciona kits para uso en los métodos descritos en el presente documento que comprenden instrucciones para el aislamiento o purificación de las células o poblaciones e instrucciones para uso y, opcionalmente, reactivos para aislar o purificar una célula o población de células de un fuente de tejido adecuada como se describe en el presente documento.

Ejemplos

Morfología de la retina

- 25 La morfología de la retina neural que es el objeto de esta divulgación se describe con más detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente comúnmente asignada 13/160.002, presentada el 14 de junio de 2011.

Aislamiento celular

- 30 Se aislaron hRPC (células progenitoras retinales humanas) de retinas fetales como se describe, con pequeñas modificaciones, en las siguientes referencias: Klassen, H.J. et al., Multipotent Retinal Progenitors Express Developmental Markers, Differentiate into Retinal Neurons, and Preserve Light-Mediated Behavior, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2004, 45 (11), páginas 4167-4173; Klassen, H. et al., Isolation of Retinal Progenitor Cells from Post-Mortem Human Tissue and comparison with Autologous Brain Progenitors, J. Neuroscience Research, 2004, 77(3), páginas 334-343; Klassen, H. et al., Progenitor Cells from the Porcine Neural Retina Express Photoreceptor Markers after Transplantation to the Subretinal Space of Allogeneic Recipients; Stem Cells, 2007, 25(5); páginas 1222-1230.

- 35 Brevemente, se diseccionaron neuroretinas enteras de ojos fetales humanos (14 a 18 semanas de edad gestacional), se disociaron en colagenasa I al 0,1% (Sigma) durante 4 ciclos (1,5 horas de fermentación en total) y se sembraron en medio de ultracultivo modificado (10 ng/mL de rhEGF, 20 ng/mL de rhbFGF, Pen/strep, Nistatina y L-glutamina) o se congelaron. La cantidad y la viabilidad de las células individuales y los grupos se estimaron utilizando azul de tripán y un hemocitómetro.

- 40 Análisis de citometría de flujo

Las células progenitoras retinales humanas se procesan de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Fijación: usar paraformaldehído fresco frío regulado al 4%, pH 7,4 para todos los antígenos (excepto el análisis del ciclo celular y PCNA) durante 30 minutos a 4°C. Usar etanol al 100% para el análisis del ciclo celular y PCNA durante 30 minutos a 4°C.

- 45 2. Lavado: Agregar PBS y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.

3. Permeabilización y bloqueo: resuspender el sedimento en regulador de bloqueo (Triton-X al 0,1%, solución de suero de cabra al 10%, preparada en BSA al 5% en PBS), incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Lavar

- 50 5. Resuspender el sedimento en X (número de anticuerpos a añadir) 100 µL de regulador de tinción (solución de suero de cabra al 10%, preparada en BSA al 5% en PBS). Tomar una alícuota por 100 µL en tubos de 5 mL.

ES 2 700 980 T3

6. Agregar los anticuerpos primarios de acuerdo con la Tabla 1 a continuación. Todas las soluciones de anticuerpos se prepararon en regulador de tinción. Incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente.

7. Lavar

5 8. Agregar 100 µL de anticuerpo secundario (en regulador de tinción) de acuerdo con la Tabla 1. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

9. Lavar

10. Resuspender en 500 µL de PBS.

11. Analizar dentro de las 4 horas (utilizando, por ejemplo, BD LSR II) al menos 10.000 eventos dentro del cuadrante.

Tinción con yoduro de propidio (para análisis de ciclo celular)

10 1. Suspender el sedimento celular en 1 mL PBS que contiene 20 µg/mL de PI y 100 µg/mL de RNasa A libre de DNasa.

2. Lavar

3. Resuspender en 500 µL de PBS y analizar.

Tinción con DAPI (para análisis de viabilidad)

1. Antes de la fijación, resuspender las células en 200 ng/mL de DAPI en PBS.

15 2. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

3. Lavar

4. Fijar en PFA frío al 4% durante 30 minutos.

5. Lavar

6. Resuspender en 500 µL de PBS y analizar.

20

Tabla 1

	Antígeno	Huésped	Compañía	Referencia	Dilución, 1:
Campo ocular	Nrl	ms	Santa Cruz	sc-166087	50
	SSEA4	ms	Chemicon	MAB4304	100
	Klf4	rbt	Santa Cruz	sc-20691	50
	Sox2	rbt	Santa Cruz	sc-20088	50
	Nestina	ms	BD Bio.	611658	100
	Pax6	ms	hybridoma bk		100
	Otx2	rbt	Chemicon	AB9566	100
Proliferación	CiclinaD1	rbt	Neomarkers	RB010P1abx	100
	PCNA	ms	Dako	M0879	100
	Ki67	rbt	Chemicon	AB9260	100
Fotorreceptores	Nr2e3(PNR)	rbt	Chemicon	AB9469	200

ES 2 700 980 T3

	Antígeno	Huésped	Compañía	Referencia	Dilución, 1:
Neuronas/Glía	Recoverina	rbt	Chemicon	AB5585	200
	Rodopsina	ms	Chemicon	MABN15	100
	Opsina Azul	rbt	Chemicon	AB5407	100
	Opsina Roja/Vr	rbt	Chemicon	AB5405	100
	S-opsina	rbt	Abeam	ab81017	100
	NF200	rbt	Chemicon	AB1982	100
	GFAP	ms	Chemicon	MAB360	100
Marcadores de superficie	B3tubulina	ms	Sigma	T8669	100
	CD15/SSEA1	ms	BD Bio.	5590945	100
	CD24	PE	MACS		100
	CD73	PE	MACS		50
	CD133	PE	MACS		50
	PSA-NCAM	PE	MACS		50
	CD38	PE	MACS		50
Controles de Isotipo	SSEA4	ms	Chemicon	MAB4304	100
	Iso IgG	rbt	Invitrogen		
	Iso IgG1	ms	Invitrogen		
	Iso IgG2	ms	Invitrogen		

Métodos estadísticos

5 La proporción de células positivas se determina basándose en el control de isotipo para anticuerpos. El experimento se repitió tres veces y se calcula un porcentaje promedio de células positivas con desviación estándar para cada marcador. Además, la proporción de células de alta expresión/baja expresión se calcula cuando corresponda.

Resultados

Citometría de flujo

10 Los resultados del análisis de citometría de flujo (3 procedimientos, 10.000 eventos cada vez) se presentan en la siguiente Tabla 2. Los números en la tabla muestran la proporción de células positivas (que expresan) dentro del producto farmacológico, con base en una comparación con el control de isotipo adecuado. Se eligió un nivel de expresión del 98% del isotipo como nivel de umbral.

Tabla 2

Klf4	Sox2	Recoverina	Otx2	Pax6	Crx	Nrl	SSEA4	CD24	CD73
------	------	------------	------	------	-----	-----	-------	------	------

51,4	97,7	97,1	94,3	50,1	48,0	31,0	91,2	38,8	98,1
12,7	99,2	97,2	94,9	46,7	77,9	43,6	89,4	35,0	98,7
27,6	97,3	97,0	82,3	44,3	19,1	18,2	49,3	27,1	97,1
CD38	Rodopsina	PhotNucLRc	Ki67	PCNA	CiclinaD1	Ciclo:	Ciclo:	Ciclo:	Beta3tubulina
2,3	1,30	0,8	82,8	96,7	34,4	70,6	3,2	25,1	92,9
5,2	4,10	3,4	80,3	86,9	28,1	70,7	17,0	12,3	99,4
0,9	2,00	1,6	75,2	91,8	22,5	70,1	5,6	23,9	99,3
NF200	Nestina		GFAP	PSA-	PTK7	SSEA1/CD		CD133	A2B5
97,7	95,1		14,8	62,1	97,8	0,7		5,8	2,15
97,9	98,9		40,9	49,4	98,6	0,8		2,8	4,20
90,1	99,4		11,6	97,8	99,7	2,3		1,4	3,30

Las Figuras 1, 2 y 3 son gráficos de barras que ilustran la media y la desviación estándar (M +/- SEM) de los resultados anteriores. Se ha encontrado que las células en un producto farmacológico expresan la mayoría de los marcadores de severidad investigados. Sin embargo, solo la mitad de la población de progenitores es positiva para Pax6, Crx y Nr1, lo que sugiere que esta población en realidad se compone de varias subpoblaciones. Los marcadores son estables a través del aumento de pasadas de 9 a 14, y a través de dos donaciones fetales separadas.

Análisis inmunocitoquímico

Las células progenitoras retinales humanas se procesan de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Siembra en placa: las células se siembran sobre portaobjetos Nunc de 16 pozos recubiertos con fibronectina fresca a una densidad de 4k células/cm² en medios de células progenitoras retinales humanas (200 µL/pozo).
2. Incubación: 6 horas a 37°C, 5% de CO₂, 3% de O₂, 100% de humedad.
3. Lavado: Aspirar el medio y agregar PBS.
4. Fijación: PFA al 4% regulado y frío durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar
6. Permeabilización y bloqueo: Incubar en regulador de bloqueo (Triton-X al 0,1%, solución de suero de cabra al 10%, preparado en BSA al 5% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavar
8. Agregar los anticuerpos primarios de acuerdo con la Tabla 3 (50 µL/pozo). Todas las soluciones de anticuerpos se preparan en regulador de tinción (solución de suero de cabra al 10%, preparada en BSA al 5% en PBS). Incubar durante la noche a 4°C en cámara humidificada.
9. Lavar 2 veces, 5 minutos cada vez.
10. Agregue 50 µL de anticuerpo secundario (en regulador de tinción) de acuerdo con la Tabla 3. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
11. Lavar 3 veces, 5 minutos cada vez.
12. Montar en el medio de montaje con DAPI.
13. Secar durante la noche.
14. Toma de Imágenes y análisis.

ES 2 700 980 T3

Tabla 3

	Antígeno	Huésped	Compañía	Referencia	Dilución, 1 :
Campo ocular	Nrl	ms	Santa Cruz	sc-166087	50
	SSEA4	ms	Chemicon	MAB4304	200
	Klf4	rbt	Santa Cruz	sc-20691	50
	Sox2	rbt	Santa Cruz	sc-20088	50
	Nestina	ms	BD Bio.	611658	200
	Pax6	ms	hybridoma		200
	Otx2	rbt	Chemicon	AB9566	200
Proliferación	Chx10	Gt	Santa Cruz	sc-21692	200
	CD15/SSEA	ms	BD Bio.	559045	200
	CiclinaD1	rbt	Neomarkers	RB010P1ab	200
	PCNA	ms	Dako	M0879	200
	Ki67	rbt	Chemicon	AB9260	200
Fotorreceptores	Nr2e3(PNR)	rbt	Chemicon	AB9469	200
	Recoverina	rbt	Chemicon	AB5585	200
	Rodopsina	ms	Chemicon	MABN15	100
	Opsina Azul	rbt	Chemicon	AB5407	200
	Opsina	rbt	Chemicon	AB5405	200
	S-opsina	rbt	Abeam	ab81017	200
Neuronas/Glía	NF200	rbt	Chemicon	AB1982	200
	GFAP	ms	Chemicon	MAB360	200
	Vimentina	ms	Sigma	T8660	200
	B3tubulina	ms	Sigma	V22558	200
Controles de isotipo	Iso IgG	rbt	Invitrogen		
	Iso IgG1	ms	Invitrogen		

Antígeno	Huésped	Compañía	Referencia	Dilución, 1 :
Iso IgG2	ms	Invitrogen		

Resultados

Inmunocitoquímica

- 5 Los resultados del análisis inmunocitoquímico (5 procedimiento, > 100 eventos cada vez) se presentan en las Figuras 4, 5 y 6. Los ajustes de fluorescencia y exposición en el microscopio/cámara se ajustaron utilizando el control de isotipo adecuado. Las Figuras 4, 5 y 6 son gráficos de barras que ilustran la media y la desviación estándar (M +/- SEM) de los resultados anteriores. Los resultados del análisis inmunocitoquímico respaldan y soportan el perfil establecido mediante citometría de flujo.
- 10 Las células progenitoras retinales humanas de esta descripción se pueden usar para estudiar el desarrollo de la retina y el ojo, así como los factores que afectan dicho desarrollo, ya sea de manera beneficiosa o adversa. Estos hRPC también pueden usarse para ensayos clínicos mediante trasplante en una retina que sufre de disfunciones del ojo. Se pueden usar ventajosamente para repoblar o rescatar un tejido ocular distrófico y degenerado, en particular una retina disfuncional. La disfunción retinal abarca cualquier falta o pérdida de la función retinal normal, ya sea debido a una enfermedad, lesión mecánica o química, o un proceso degenerativo o patológico que involucre la retina del receptor.
- 15 Las hRPC pueden inyectarse o bien colocarse en un sitio de la retina, el espacio subretinal, la cavidad vítrea o el nervio óptico, de acuerdo con las técnicas conocidas en el arte.
- 20 Ventajosamente, las hRPC de la divulgación se pueden usar para compensar una falta o disminución de la función de las células fotorreceptoras. Los ejemplos de disfunción retinal que pueden tratarse con las poblaciones de células madre de la retina y los métodos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, degeneración de los fotorreceptores (como ocurre, por ejemplo, en la retinitis pigmentosa, las distrofias de conos, distrofia de cono-bastoncitos y/o distrofia bastoncitos-cono, y degeneración macular); desprendimiento de retina y traumatismo retinal; lesiones fóticas causadas por láser o luz solar; agujero macular; un edema macular; ceguera nocturna y ceguera al color; retinopatía isquémica como la causada por diabetes u oclusión vascular; retinopatía por premadurez/nacimiento prematuro; condiciones infecciosas, tales como, por ejemplo, retinitis por CMV y toxoplasmosis; condiciones inflamatorias, tales como la uveítis; tumores, como el retinoblastoma y el melanoma ocular; y para el reemplazo de neuronas de la retina interna, que se ven afectadas en las neuropatías oculares, tal como el glaucoma, la neuropatía óptica traumática, desprendimiento y neuropatía óptica de radiación y retinopatía.
- 25 Los tratamientos descritos en el presente documento se pueden usar como terapias independientes, o junto con otros tratamientos terapéuticos. Dichos tratamientos pueden incluir la administración de una sustancia que estimula la diferenciación de las células madre derivadas de neurorretina en células fotorreceptoras u otros tipos de células retinales (por ejemplo, células bipolares, células ganglionares, células horizontales, células amacrinas, células de Mueller).
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar células progenitoras de retinales fetales humanas en una población mixta de células derivadas de neurorretinas de ojos fetales humanos, que comprende la selección de dicha población de células mixtas para células:
 - 5 (i) que tengan los siguientes marcadores de superficie positivos: SSEA4, CD73, PTK7 y PSA-NCAM, recoverina, Sox2, Pax6 y opcionalmente nestina y Ki-67, y
 - (ii) que carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales: CD15 y CD133.
2. Un método para aislar o purificar una población de células progenitoras retinales fetales humanas de una población mixta de células derivadas de neurorretinas de ojos fetales humanos, que comprende seleccionar dicha población de células mixtas para células:
 - 10 (i) que tengan los siguientes marcadores de superficie positivos: SSEA4, CD73, PTK7 y PSA-NCAM, recoverina, Sox2, Pax6 y opcionalmente nestina y Ki-67, y
 - (ii) que carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales: CD15 y CD133; y aislar o purificar las células progenitoras retinales fetales humanas de la población mixta para proporcionar la población aislada o purificada de células progenitoras retinales fetales humanas.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la población aislada o purificada de células progenitoras retinales humanas es una población sustancialmente homogénea que comprende al menos 50% de células progenitoras retinales humanas que tienen los siguientes marcadores de superficie positivos: SSEA4, CD73, PTK7 y PSA-NCAM, recoverina, Sox2, Pax6 y opcionalmente nestina y Ki-67, y que carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales: CD15 y CD133.
4. El método de la reivindicación 2, en el que la población aislada o purificada de células progenitoras retinales humanas es una población sustancialmente homogénea que comprende al menos 80% de células progenitoras retinales humanas que tienen los siguientes marcadores de superficie positivos: SSEA4, CD73, PTK7 y PSA-NCAM, recoverina, Sox2, Pax6 y opcionalmente nestina y Ki-67, y que carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales: CD15 y CD133.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente seleccionar la población de células
 - (i) que carece de los siguientes marcadores de superficie del progenitor glial: A2B5 y CD38, y/o
 - (ii) para la presencia del marcador de superficie positivo: CD24.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la selección comprende:
 - (i) clasificación de células usando citometría de flujo, o
 - (ii) clasificación de células utilizando clasificación de células activada por fluorescencia y anticuerpos que reconocen y se unen a los marcadores de superficie de células positivas.
7. Un método para preparar una población purificada de células progenitoras retinales fetales humanas que comprende las etapas de:
 - clasificación de las células obtenidas de una muestra de células aisladas de neurorretinas de ojos fetales humanos que contienen células progenitoras retinales humana utilizando los siguientes marcadores de superficie identificables positivos: SSEA4, CD73, PTK7, PSA-NCAM, recoverina, Sox2, Pax6 y opcionalmente CD24, y opcionalmente nestina y Ki-67, en donde las células progenitoras retinales carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales CD15 y CD133, y
 - recoger dichas células progenitoras retinianas humanas separadas para preparar una población de células progenitoras retinales humanas purificadas,
 - y opcionalmente comprende además eliminar las impurezas y contaminantes de la muestra de células aisladas antes de clasificar las células.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la población de células progenitoras retinales humanas purificadas es una población sustancialmente homogénea que comprende al menos 50% de células progenitoras de retina humanas que tienen los siguientes marcadores de superficie positivos: SSEA4, CD73, PTK7, PSA-NCAM, recoverina, Sox2 , Pax6 y opcionalmente CD24, y opcionalmente nestina y Ki-67, y que carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales: CD15 y CD133.

9. El método de la reivindicación 7, en el que la población de células progenitoras retinales humanas purificadas es una población sustancialmente homogénea que comprende al menos 80% de células progenitoras retinales humanas que tienen los siguientes marcadores de superficie positivos: SSEA4, CD73, PTK7, PSA-NCAM, recoverina, Sox2 , Pax6 y opcionalmente CD24, y opcionalmente nestina y Ki-67, y que carecen de los siguientes marcadores de superficie de células madre neurales: CD15 y CD133.
- 5

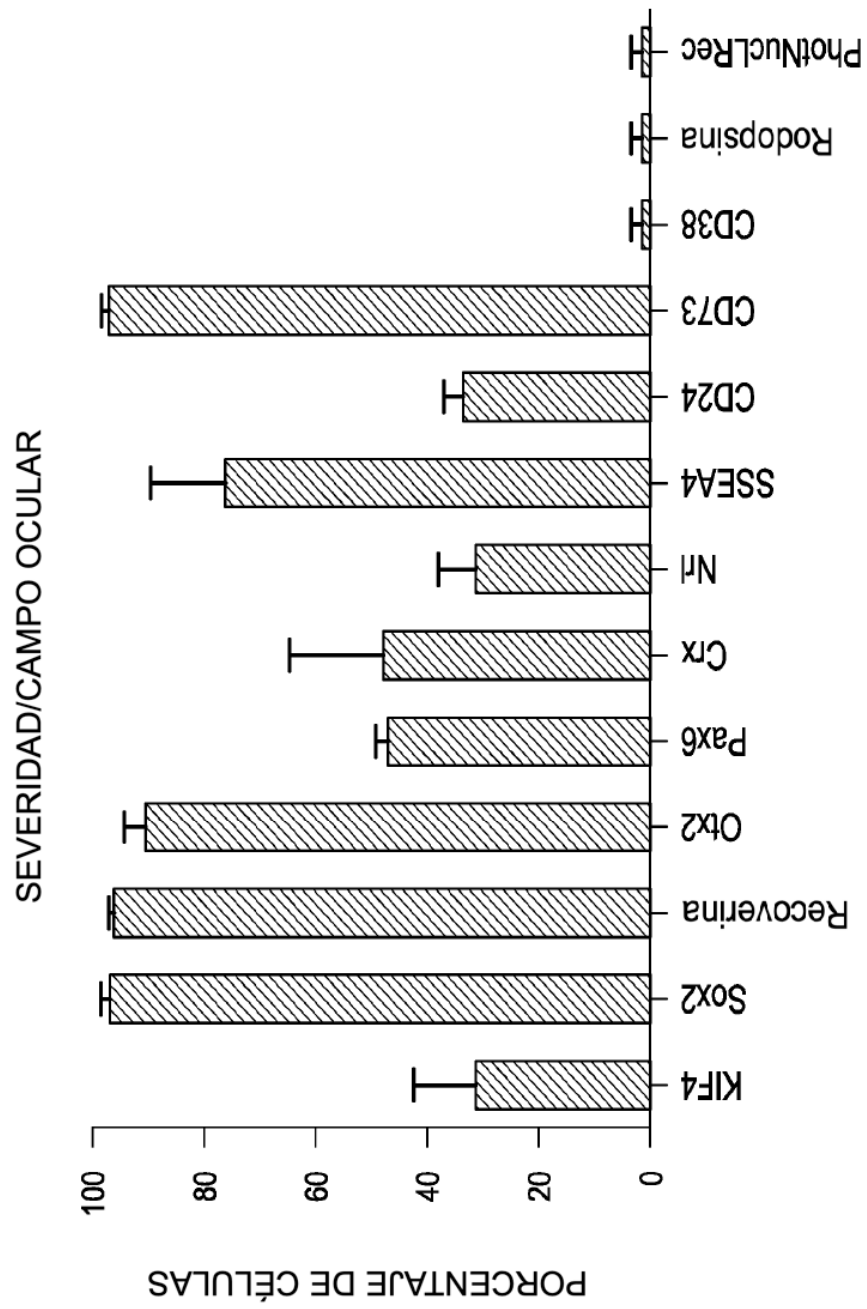


FIG. 1

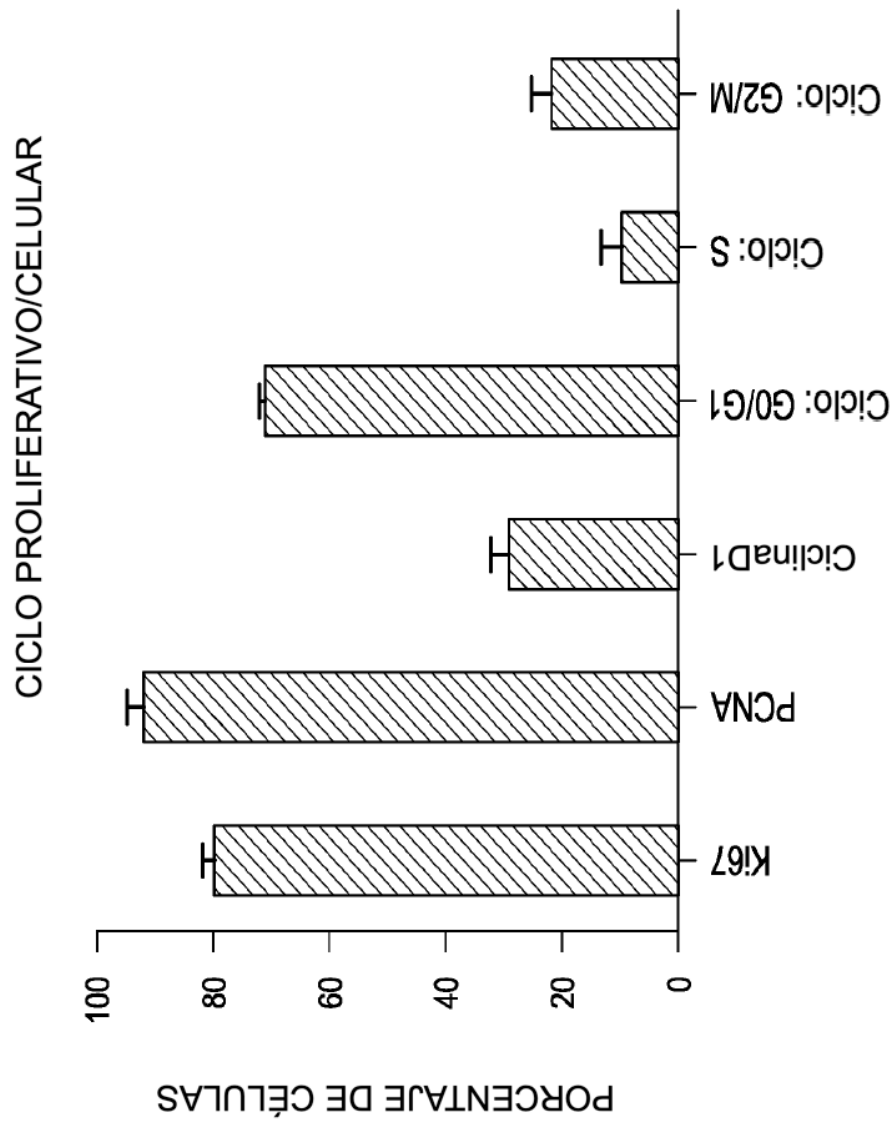


FIG. 2

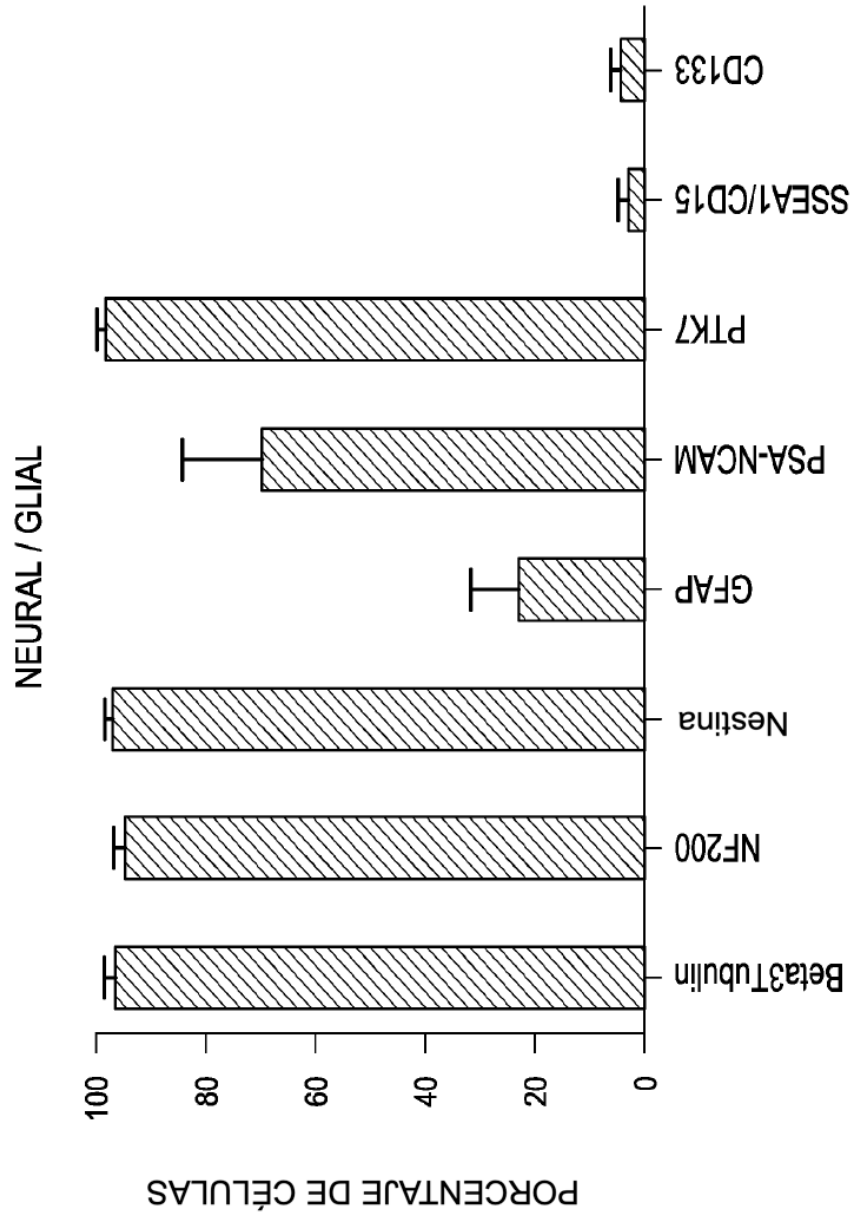


FIG. 3

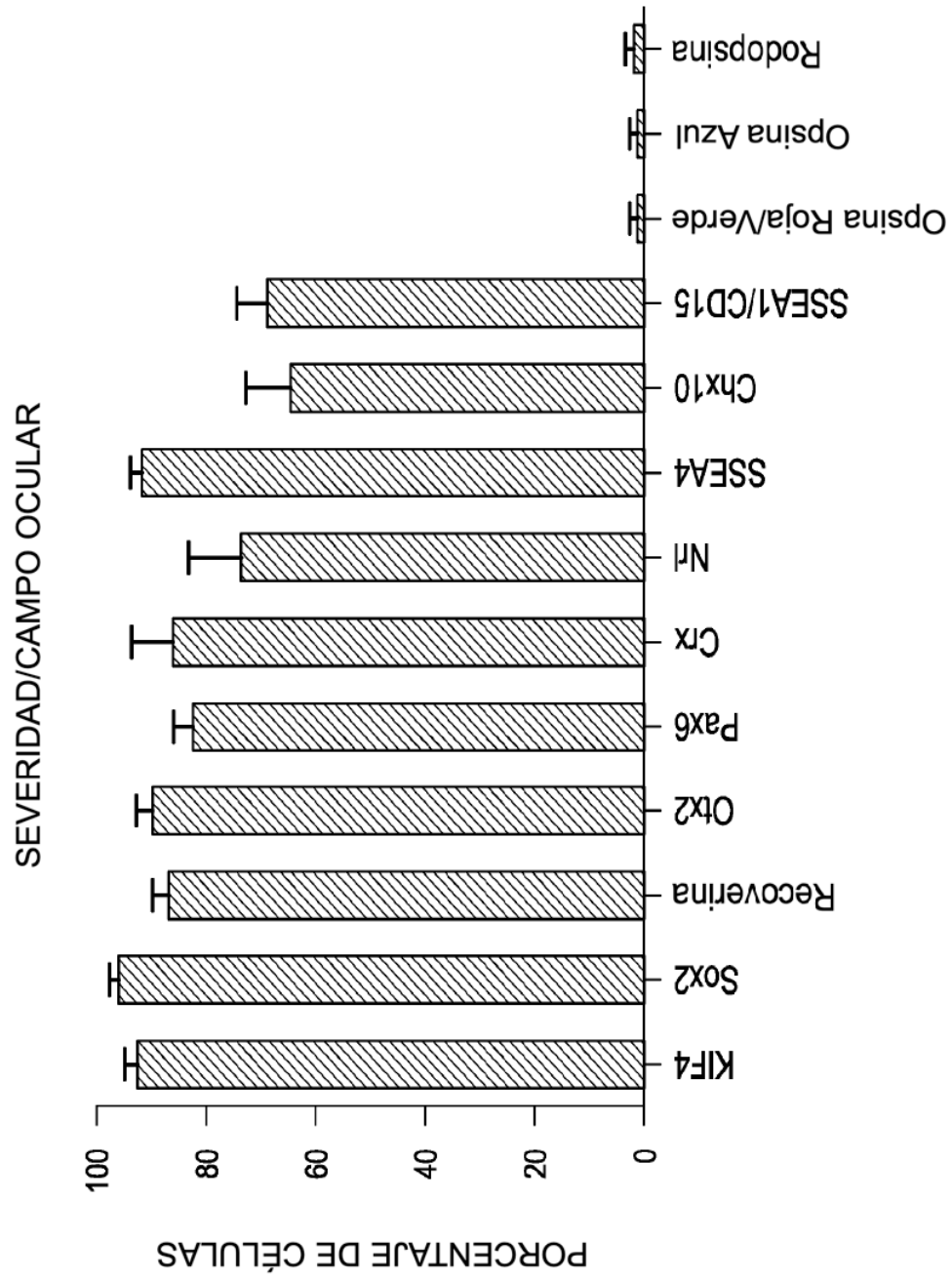


FIG. 4

Análisis inmunocitoquímico de hRPC

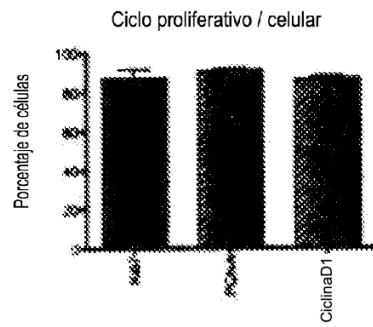


FIG. 5

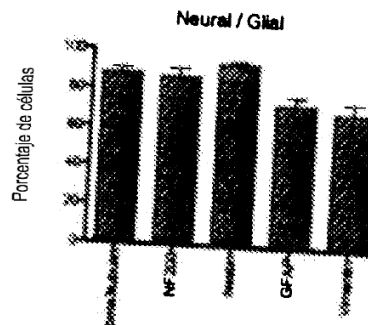


FIG. 6