

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 617**

51 Int. Cl.:

A61K 35/30 (2015.01)

A61F 2/14 (2006.01)

A61L 27/00 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2020 PCT/EP2020/072567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2021 WO21028456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2020 E 20761761 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024 EP 4013433**

54 Título: **Unidad tridimensional hueca de tejido retiniano y uso en el tratamiento de retinopatías**

30 Prioridad:

12.08.2019 FR 1909155

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

14.04.2025

73 Titular/es:

**TREEFROG THERAPEUTICS (100.00%)
30 Avenue Gustave Eiffel Bâtiment A
33600 Pessac, FR**

72 Inventor/es:

**FEYEUX, MAXIME y
ALESSANDRI, KEVIN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 3 013 617 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

Unidad tridimensional hueca de tejido retiniano y uso en el tratamiento de retinopatías

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al tratamiento de las enfermedades de la retina, en particular mediante el uso de unidades de tejido específicas que comprenden al menos un epitelio pigmentario retiniano. La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de estas unidades de tejido así como a kits de implantación en el ojo de estas unidades de tejido para realizar injertos de la totalidad o parte de la retina.

Técnica anterior

Las enfermedades de la retina, o retinopatías, constituyen una de las principales causas de debilidad visual a nivel mundial. La retina, que recubre el fondo del ojo, está constituida concretamente por células epiteliales pigmentarias y por células nerviosas que reciben la luz. Estas células nerviosas convierten la luz en señales eléctricas que transitan hacia el cerebro a través del nervio óptico. Cuando las células de la retina, en particular del epitelio pigmentario retiniano, se degeneran o ya no funcionan, aparecen zonas ciegas del campo de visión.

Las retinopatías pueden tener diversos orígenes: concretamente pueden estar asociadas al envejecimiento, tales como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), ser hereditarias, tales como la retinopatía pigmentaria o la distrofia retiniana, estar asociadas a un traumatismo tales como la retinopatía solar, o derivar de otra patología, tales como la retinopatía diabética o la retinopatía hipertensiva.

La DMAE representa la primera causa de debilidad visual en las personas ancianas. Esta patología se debe a la afección de la mácula, zona central de la retina, que transmite la parte esencial de la información visual al cerebro. Se traduce por la aparición de una mancha ciega en el centro del campo de visión. La DMAE puede presentarse en dos formas:

- una forme seca o atrófica: está caracterizada por la desaparición progresiva de las células de la mácula. Por tanto, evoluciona lentamente y constituye la forma más frecuente de DMAE;
- una forma húmeda o exudativa: está caracterizada por la formación de vasos sanguíneos anómalos bajo la retina que conducen concretamente a su desprendimiento.

Actualmente no existe ningún tratamiento contra la forma seca de DMAE. El único medio usado es retardarla tomando complementos alimentarios (vitaminas C, E y minerales antioxidantes). Desde hace algunos años, para la DMAE húmeda, si la enfermedad no está en un estadio demasiado avanzado, una inyección en el ojo de un medicamento que bloquea la proliferación de los vasos puede permitir una mejora de la enfermedad, pero este tratamiento necesita una inyección mensual y no permite obtener resultados completamente satisfactorios.

La retinopatía pigmentaria es una enfermedad genética que puede ser de origen hereditario. Está caracterizada por una degeneración de las células de la retina asociada a la mutación de uno o varios genes. La evolución de la enfermedad es lenta hasta provocar una ceguera y, por el momento, no existe ningún tratamiento.

La retinopatía diabética es una afección retiniana que se produce en el contexto de una diabetes. Está asociada a la concentración excesiva de azúcar a nivel de los pequeños vasos sanguíneos de la retina, lo cual conduce a su degradación. La falta de aporte de oxígeno induce la formación de nuevos vasos sanguíneos, más frágiles. Su ruptura y las microhemorragias que se producen pueden conducir a un desprendimiento de la retina. Como para la forma húmeda de la DMAE, es posible realizar inyecciones de medicamentos antiangiogénesis, pero este tratamiento no funciona bien. También puede realizarse un tratamiento por láser para quemar los vasos anómalos, pero la eficacia es limitada.

Recientemente se han descrito nuevos enfoques terapéuticos con el objetivo de tratamiento de las enfermedades de la retina.

Recientes ensayos terapéuticos han explorado la posibilidad de colocar un implante retiniano (retina artificial), pero la resolución de este implante sigue siendo baja.

También se han llevado a cabo ensayos de terapia celular con el objetivo de sustituir las células de la retina que se han degenerado por células madre que pueden diferenciarse para dar células epiteliales, neurales o vasculares de la retina (hRPC o "human retinal progenitor cells", células progenitoras retinianas humanas). No obstante, en la actualidad ningún ensayo ha resultado concluyente, en particular no se controla la diferenciación celular tras la implantación y la inyección intravítrea que es la vía de administración sometida a prueba no corresponde a un mecanismo fisiológico, lo cual ha conducido a efectos secundarios no deseados (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02320812>). Por otro lado, estas células progenitoras existen in vivo en

el ser humano sin que permitan una regeneración de la retina adulta (Tang y col. "Progress of stem/progenitor cell-based therapy for retinal degeneration" Journal of Translational Medicine, 10 de mayo de 2017).

Por otro lado, se han descrito membranas o láminas de células retinianas para su uso como implante. Es el caso de la solicitud US20160310637 o incluso de la solicitud EP2570139 que describen membranas o láminas de células de retina obtenidas a partir de células retinianas extraídas de ser humano y cultivadas, estando dichas membranas o láminas destinadas a implantarse en el ojo. No obstante, esta tecnología no ha sido satisfactoria ya que necesita producir un número muy importante de células con respecto al número de células injertadas (8 lotes producidos para permitir los controles de calidad y la mayoría de las células en cada lote no se posicionan en el implante), además, la implantación requiere realizar una cirugía larga y compleja que requiere una experiencia de injerto específica por parte del profesional y muy invasiva para el paciente.

La solicitud EP3211071 también describe tejidos retinianos en forma de agregados en suspensión obtenidos a partir de células madre pluripotentes. A continuación se inyecta la suspensión en el ojo. Esta solución tampoco es satisfactoria ya que la inyección no permite conservar una estructuración funcional (concretamente una polarización funcional): i) en el caso del epitelio pigmentario en el que la cara apical de las células debe presentarse frente a segmentos externos de los fotorreceptores del injerto, limitando la supervivencia y la funcionalidad del injerto ii) en el caso de los fotorreceptores el segmento externo debe estar posicionado hacia el exterior del ojo con respecto a células del epitelio pigmentario y la terminación sináptica debe estar orientada hacia el centro del ojo para conectarse con el resto de la retina neutra). Además, esta técnica requiere la inyección de un volumen importante de líquido en el ojo, y conduce, como con todas las demás soluciones de la técnica anterior, a un desprendimiento de la retina importante, en una zona más grande que la zona que debe tratarse, con el riesgo de provocar hemorragias locales durante la incisión o la inyección. Las soluciones actuales requieren además la realización de tres o cuatro incisiones tal como se describe en Zarkin y col. ("Concise Review: Update on Retinal Pigment Epithelium Transplantation for Age-Related Macular Degeneration", Stem Cells Translational Medicine, 2019; 8: 466-477). El documento WO 2017/176810 describe una unidad de tejido retiniano tridimensional que comprende una estructura laminar concéntrica que comprende un centro de células de epitelio pigmentario retiniano, una capa de RGC, una capa de neuronas retinianas de segundo orden, una capa de fotorreceptores y una capa de células de epitelio pigmentario retiniano así como un hidrogel.

El objetivo de la invención es aliviar estos diferentes problemas de la técnica anterior y proponer una solución para la implantación fácil, rápida y poco invasiva, de células de retina correctamente polarizadas, y su integración en el órgano huésped, de manera que se sustituyen de manera duradera y segura las células retinianas que se han degenerado en pacientes afectados por patologías degenerativas de la retina.

Resumen de la invención

Según la invención, la eficacia del injerto de tejidos retinianos depende en gran medida de la correcta incorporación in situ (concretamente polarización apico-basal correcta) del injerto mediante la adhesión de la cara basal de las células del epitelio pigmentario a nivel de la membrana de Bruch. Por ello, para responder al objetivo de la invención, los inventores han puesto a punto redes tridimensionales celulares huecas particulares que comprenden al menos una capa de células de epitelio pigmentario retiniano humanas vivas diferenciadas, organizadas alrededor de una luz, teniendo dichas células del epitelio pigmentario retiniano sus caras basales orientadas hacia el exterior. Esta unidad de tejido también comprende preferiblemente una capa exterior de matriz extracelular a nivel de la cara basal de las células de epitelio pigmentario retiniano que favorece la integración y la supervivencia de las células, una vez inyectadas en el ojo. La unidad de tejido según la invención también puede contener otras células retinianas, organizadas en forma de una o varias capas en el interior de la capa de células de epitelio pigmentario retiniano, en la luz interna, es decir, a nivel de la cara apical de las células de epitelio pigmentario retiniano. Estas otras células forman preferiblemente la totalidad o parte de un tejido neural retiniano.

Por tanto, la invención tiene por objeto una unidad de tejido tridimensional hueca, que comprende, organizada alrededor de una luz interna, al menos una capa de células de epitelio pigmentario retiniano humanas vivas diferenciadas en la que la cara basal de cada célula de epitelio pigmentario retiniano está posicionada hacia el exterior y la cara apical hacia la luz interna. La unidad de tejido según la invención se presenta preferiblemente en forma de un ovoide hueco, de un cilindro hueco, de un esferoide hueco o de una esfera hueca, o de una sección de estos elementos según un plano.

La invención también tiene por objeto una unidad de tejido tridimensional hueca de este tipo para su uso en el tratamiento de las enfermedades de la retina, en particular mediante implantación en el ojo, a nivel de la membrana de Bruch.

Ventajosamente, al realizarse el injerto con unidades de tejido retiniano según la invención, organizadas y de tamaño submilimétrico, la intervención no requiere el posicionamiento preciso de un único injerto como en la técnica anterior. Esto limita la necesidad de desprendimiento (posiblemente traumático) de la retina y, por consiguiente, también la intensidad del drenaje del humor vítreo del ojo. Además, la invención tiene la ventaja de poder limitar la intervención quirúrgica a una única incisión del ojo frente a tres a cuatro en la actualidad.

Además, la polarización de la capa de epitelio pigmentario retiniano (cara basal hacia el exterior y la cara apical hacia la luz interna) permite que las unidades de tejido retiniano se posicionen correctamente cuando se injertan en el ojo y garantizar el éxito del injerto. En efecto, gracias al posicionamiento de su cara basal en el lado exterior, las unidades de tejido retiniano según la invención se unen a la matriz extracelular del fondo del ojo (membrana de Bruch) emitiendo células adherentes al sustrato que migran y forman una monocapa.

La invención también tiene por objeto un procedimiento de preparación de una unidad de tejido retiniano tridimensional hueca que comprende las etapas que consisten en:

– producir un microcompartimento celular que comprende, en el interior de una cápsula de hidrogel:

* células de epitelio pigmentario retiniano y eventualmente otras células retinianas, o

* células adecuadas para diferenciarse para dar células de epitelio pigmentario retiniano y eventualmente para dar otras células retinianas,

eligiéndose las células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano de:

* células madre que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,

* células progenitoras que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,

* células diferenciadas que pueden experimentar una transdiferenciación para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,

* células diferenciadas que pueden experimentar una reprogramación de manera que se convierten en células madre pluripotentes inducidas que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano.

– si el microcompartimento comprende células adecuadas para diferenciarse para dar células de epitelio pigmentario retiniano y eventualmente para dar otras células retinianas: inducir la diferenciación celular en el interior del microcompartimento celular, de manera que se obtienen células de epitelio pigmentario retiniano y eventualmente otras células retinianas,

– eliminar las cápsulas de hidrogel mediante hidrólisis, disolución, perforación y/o ruptura para recuperar las células de epitelio pigmentario retiniano y las otras células retinianas eventuales en forma de una unidad de tejido.

Finalmente, la invención también tiene por objeto un kit de implantación en el ojo de unidades de tejido tridimensionales huecas que comprende al menos:

– entre 1 y 10.000 unidades de tejido, eventualmente encapsuladas en cápsulas de hidrogel, y

– un dispositivo de implantación quirúrgico adecuado para implantar dicha o dichas unidades de tejido en un ojo humano.

Breve descripción de las figuras

– Figura 1: la figura 1 es una representación esquemática de una vista en sección de una unidad de tejido 10 según la invención, con una capa de epitelio pigmentario retiniano 12 y una luz interna 14, correspondiendo A a la cara apical de las células de epitelio pigmentario retiniano y correspondiendo B a la cara basal de las células de epitelio pigmentario retiniano.

– Figura 2: la figura 2 es una representación esquemática de una vista en sección de una unidad de tejido 10 según la invención, con una capa de epitelio pigmentario retiniano 12, una luz 14 y una capa de matriz extracelular 16, correspondiendo A a la cara apical de las células de epitelio pigmentario retiniano y correspondiendo B a la cara basal de las células de epitelio pigmentario retiniano.

– Figura 3: la figura 3 es una representación esquemática de una vista en sección de un microcompartimento 20 que comprende una cápsula de hidrogel 22 y una unidad de tejido 10 según la invención, estando la unidad de tejido 10 constituida por una capa de epitelio pigmentario 12, una luz 14 y una capa de matriz extracelular 16, correspondiendo A a la cara apical de las células de epitelio pigmentario retiniano y correspondiendo B a la cara basal de las células de epitelio pigmentario retiniano.

– Figura 4: la figura 4 es una representación esquemática de una vista en sección de un microcompartimento 20 que comprende una cápsula de hidrogel 22 y una unidad de tejido 10 según la invención, estando la unidad de tejido 10 constituida por una capa de matriz extracelular 16, una capa de epitelio pigmentario retiniano 12, una capa de células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano 18, y una luz 14, correspondiendo A a la cara apical de las células de epitelio pigmentario retiniano y correspondiendo B a la cara basal de las células de epitelio pigmentario retiniano.

– Figura 5: la figura 5 representa una imagen de microscopía de un microcompartimento de hidrogel (alginato) que encapsula una unidad de tejido según la invención.

– Figura 6: la figura 6 representa imágenes de microscopía de microcompartimentos de hidrogel (alginato) que encapsulan una unidad de tejido pequeña según la invención (A) y una unidad de tejido grande según la invención (B).

– Figura 7: la figura 7 representa imágenes de microscopía de microcompartimentos de hidrogel (alginato) que encapsulan una o varias unidades de tejido según la invención con diferentes densidades celulares.

– Figura 8: la figura 8 representa unidades de tejido retiniano según la invención, sin cápsula de hidrogel, sobre un sustrato que simula la matriz extracelular del fondo del ojo (en este caso Matrigel que simula la membrana de Bruch) a diferentes tiempos hasta la formación de una monocapa de epitelio pigmentario retiniano.

– Figura 9: la figura 9 representa imágenes de microscopía y un gráfico que muestran que la polarización de las células puede obtenerse mediante deposición de una capa de matriz sobre la cara interna de cápsulas de alginato.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Por “alginato” en el sentido de la invención, se entienden polisacáridos lineales formados a partir de β -D-manuronato y α -L-guluronato, de sales y de derivados de los mismos.

Por “cápsula en hidrogel” en el sentido de la invención, se entiende una estructura tridimensional formada a partir de una matriz de cadenas de polímeros, inflada por un líquido y preferiblemente agua.

Por “células humanas” en el sentido de la invención, se entienden células humanas o células de mamíferos no humanos inmunológicamente humanizadas. Aunque no se precise, las células, las células madre, las células progenitoras y los tejidos según la invención están constituidos o se obtienen a partir de células humanas o a partir de células de mamíferos no humanos inmunológicamente humanizadas.

Por “célula progenitora” en el sentido de la invención, se entiende una célula madre ya implicada en la diferenciación celular en células de la retina pero aún no diferenciada.

Por “célula madre embrionaria” en el sentido de la invención, se entiende una célula madre pluripotente de célula derivada de la masa celular interna del blastocisto. La pluripotencia de las células madre embrionarias puede evaluarse mediante la presencia de marcadores tales como los factores de transcripción OCT4 y NANOG y marcadores de superficie tales como SSEA3/4, Tra-1-60 y Tra-1-81. Las células madre embrionarias según la invención se obtienen sin destrucción del embrión del que proceden, por ejemplo con la ayuda de la técnica descrita en Chung y col. (Cell Stem Cell, 2008, 2(2)): 113-117). Eventualmente, pueden excluirse las células madre embrionarias de seres humanos.

Por “célula madre pluripotente” o “célula pluripotente” en el sentido de la invención, se entiende una célula que tiene la capacidad de formar todos los tejidos presentes en el organismo de origen en su totalidad, sin por ello poder formar un organismo entero en sí mismo. Puede tratarse en particular de células madre pluripotentes inducidas, de células madre embrionarias o de células MUSE (por “Multilineage-differentiating Stress Enduring”). Por “célula madre pluripotente inducida” en el sentido de la invención, se entiende una célula madre pluripotente inducida a la pluripotencia mediante reprogramación genética de células somáticas diferenciadas. Estas células son concretamente positivas para los marcadores de pluripotencia, tales como la coloración con fosfatasa alcalina y la expresión de las proteínas NANOG, SOX2, OCT4 y SSEA3/4. Ejemplos de procedimientos que permiten la obtención de células madre pluripotentes inducidas se describen en los artículos de Yu y col. (Science 2007, 318 (5858): 1917-1920), Takahashi y col (Cell, 2007, 131(5): 861-872) y Nakagawa y col (Nat Biotechnol, 2008, 26(1): 101-106).

Por células “diferenciadas” en el sentido de la invención, se entienden células que presentan un fenotipo particular, en contraposición a células madre pluripotentes que no están diferenciadas.

Por "diámetro de Feret" de una unidad de tejido se entiende la distancia "d" comprendida entre dos tangentes a dicha unidad de tejido, siendo estas dos tangentes paralelas, de tal manera que el conjunto de la proyección de la unidad de tejido esté comprendido entre estas dos tangentes paralelas.

5 Por "implantación" o "injerto" en el ojo en el sentido de la invención, se entiende la acción de depositar en el ojo en un lugar particular, al menos una unidad de tejido según la invención. La implantación puede realizarse mediante cualquier medio, concretamente mediante inyección.

10 Por "dimensión más grande" de una unidad de tejido en el sentido de la invención, se entiende el valor del diámetro de Feret más grande de dicha unidad de tejido.

Por "dimensión más pequeña" de una unidad de tejido en el sentido de la invención, se entiende el valor del diámetro de Feret más pequeño de dicha unidad de tejido.

15 Por "unidad de tejido" o "unidad de tejido retiniano" según la invención, se entiende una unidad que comprende al menos un tejido de la retina. La unidad de tejido retiniano puede comprender varios tejidos de la retina ensamblados entre sí con una estructuración funcional. La unidad de tejido según la invención comprende al menos un tejido epitelial pigmentario retiniano y también puede contener otro tejido retiniano, concretamente un tejido neural retiniano o vascular retiniano y/o al menos otro constituyente tal como, por ejemplo, una matriz extracelular.

20 Unidad de tejido

Por tanto, la invención tiene por objeto una unidad de tejido retiniano tridimensional.

25 La unidad de tejido según la invención es hueca. Siempre comprende una luz interna o lumen que constituye la parte hueca de la unidad de tejido. Esta luz se genera en el momento de la formación de la unidad de tejido por las células retinianas que se multiplican y se desarrollan. La luz contiene un líquido, concretamente un medio de cultivo (tal como un medio basado en DMEM o DMEM-F12 y/o neurobasal y complementado con B27 o N-2 o NS21) y/o un líquido secretado por las células de la unidad de tejido. Ventajosamente, la presencia de esta parte hueca en la unidad de tejido retiniano permite una mejor integración a nivel de la retina cuando se implanta en el ojo.

30 La unidad de tejido según la invención comprende al menos una capa de células de epitelio pigmentario retiniano. Estas células son células humanas, vivas y diferenciadas para dar células de epitelio pigmentario retiniano. La capa de células de epitelio retiniano está organizada alrededor de la luz interna. Las células que constituyen esta capa forman juntas un epitelio pigmentario retiniano, y sus caras basales están todas ellas posicionadas en dirección hacia el exterior de la unidad de células, y sus caras apicales están todas ellas posicionadas en dirección hacia el interior, es decir hacia la luz interna. Preferiblemente, las células yuxtapuestas están unidas entre sí en sus caras laterales mediante uniones apretadas.

40 Según una realización particularmente adaptada, la unidad de tejido según la invención también comprende una capa externa de matriz extracelular. Esta capa externa de matriz extracelular está situada a nivel de la cara basal de las células de epitelio pigmentario retiniano. La capa de matriz celular puede estar constituida por matriz celular secretada por células de epitelio pigmentario retiniano y/o por matriz extracelular añadida en el momento de la preparación de la unidad de células.

45 La capa de matriz extracelular puede formar un gel. Comprende una mezcla de proteínas y de compuestos extracelulares necesarios para el cultivo de las células de epitelio retiniano pigmentario. Preferiblemente, la matriz extracelular comprende proteínas estructurales, tales como colágeno, lamininas, entactina, vitronectina, colágeno, así como factores de crecimiento, tales como TGF-beta y/o EGF. La capa de matriz extracelular puede consistir en, o comprender, Matrigel[®] y/o Geltrex[®] y/o una matriz de tipo hidrogel de origen vegetal tal como alginatos modificados o de origen sintético o de copolímero de poli(N-isopropilacrilamida) y de polietilenglicol (PNIPAAm-PEG) de tipo MebioI[®].

50 A nivel de la superficie de la capa de matriz extracelular en contacto con la capa de epitelio pigmentario retiniano, la matriz extracelular puede contener eventualmente una o varias células de epitelio pigmentario retiniano.

55 Cuando la matriz extracelular está presente, ventajosamente las células retinianas organizadas en tres dimensiones alrededor de la luz interna, ya interactúan con una matriz extracelular, lo cual facilita su implantación a nivel de la retina.

60 La unidad de tejido según la invención puede comprender una o varias de otras capas de células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano. Estas células son células humanas, que están vivas y diferenciadas para dar células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano. La o las capas de células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano están dispuestas en el interior de la capa de células de epitelio retiniano, es decir a nivel de la cara apical de las células de epitelio pigmentario retiniano, organizadas alrededor de la luz.

65

En una realización, las células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano se eligen de bastones, conos, células ganglionares, células amacrinas, células bipolares y células horizontales.

5 Cuando la unidad celular comprende al menos dos capas de células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano, las diferentes capas están organizadas sucesivamente alrededor de la luz interna.

Preferiblemente, la unidad de tejido según la invención contiene entre 10 y 100.000 células retinianas.

10 Según una realización particular de la invención, tal como se representa en la figura 1, la unidad de tejido retiniano tridimensional hueca 10 está constituida exclusivamente:

– por una luz interna 14, y

15 – por una capa de epitelio pigmentario retiniano 12 organizada alrededor de la luz interna, estando las caras basales B de las células epiteliales pigmentarias retinianas dirigidas hacia el exterior de la unidad de tejido, y estando las caras apicales A de las células epiteliales pigmentarias retinianas dirigidas hacia la luz interna.

20 Según otra realización particular de la invención, tal como se representa en la figura 2, la unidad de tejido retiniano tridimensional hueca 10 está constituida exclusivamente:

– por una luz interna 14,

25 – por una capa de epitelio pigmentario retiniano 12 organizada alrededor de la luz interna, estando las caras basales B de las células epiteliales pigmentarias retinianas dirigidas hacia el exterior de la unidad de tejido, y estando las caras apicales A de las células epiteliales pigmentarias retinianas dirigidas hacia la luz interna, y

– por una capa de matriz extracelular 16 dispuesta alrededor de la capa de células de epitelio pigmentario retiniano, a nivel de las caras basales de dichas células de epitelio pigmentario retiniano.

30 Las diferentes células diferenciadas que constituyen la unidad de tejido según la invención, sea cual sea la realización, pueden haberse obtenido eventualmente a partir de células madre pluripotentes, en particular de células madre pluripotentes humanas, o eventualmente haberse reprogramado directamente a partir de células adultas tales como fibroblastos o células mononucleares de sangre periférica, por ejemplo.

35 La unidad de tejido según la invención puede presentarse en cualquier forma en tres dimensiones, es decir que puede tener la forma de cualquier objeto en el espacio. Preferiblemente, la unidad de tejido según la invención se presenta en forma de un ovoide hueco, de un cilindro hueco, de un esferoide hueco o de una esfera hueca. Es la capa externa de la unidad de tejido, es decir la capa de epitelio pigmentario retiniano o la capa de matriz extracelular cuando está presente, la que confiere su tamaño y su forma a la unidad de tejido según la invención. Preferiblemente, la dimensión más grande de la unidad de tejido según la invención es inferior a 1 cm, aún más preferiblemente inferior a 0,5 cm. Según una realización adaptada y preferida, la dimensión más grande de la unidad de tejido según la invención está comprendida entre 100 y 1000 μm . También puede estar comprendida entre 200 y 1000 μm o entre 300 y 1000 μm . Esta dimensión permite garantizar una implantación fácil en el ojo, en particular mediante inyección, no debiendo ser la dimensión más grande demasiado importante para poder implantarse con una incisión previa de dimensión muy pequeña. Cuanto más grande es la dimensión más grande, más grande deberá ser la incisión realizada en el ojo, y es importante limitar lo más posible el tamaño de la incisión para limitar los riesgos y el impacto sobre el paciente tratado. Preferiblemente, la dimensión más pequeña de la unidad de tejido es inferior a 1000 μm . Según una realización, está comprendida entre 10 y 1000 μm , preferiblemente entre 100 y 400 μm y aún más preferiblemente entre 200 y 300 μm . Esta dimensión más pequeña es importante para la supervivencia del injerto in vitro, en particular para favorecer la supervivencia de las células retinianas en el interior de la unidad de tejido retiniano y optimizar la reorganización así como la vascularización de la unidad de tejido tras la implantación en el ojo.

55 El grosor de la capa de células de epitelio pigmentario retiniano en la unidad de tejido está preferiblemente comprendida entre 5 μm y 200 μm . Cuando la unidad de tejido según la invención comprende una o varias de otras capas de células retinianas que no son células de epitelio pigmentario retiniano, esta capa o estas capas juntas, si hay varias, presentan un grosor preferiblemente comprendido entre 20 μm y 500 μm . Cuando una capa externa de matriz extracelular está presente en la unidad de tejido según la invención, el grosor de esta capa externa de matriz extracelular está preferiblemente comprendido entre 30 nm y 500 nm.

60 La luz representa preferiblemente entre el 10 % y el 90 % del volumen de la unidad de tejido según la invención.

La unidad de tejido retiniano según la invención es particularmente útil como injerto implantable en el ojo de un ser humano, en particular para el tratamiento de enfermedades de la retina. La forma, el tamaño y la constitución de la unidad de células de la retina según la invención permiten la supervivencia de las células en el interior de la unidad de

tejido antes de la implantación y el éxito de la implantación, de la reorganización y de la vascularización del injerto una vez implantado en el ojo.

5 Hasta la implantación, la unidad de tejido puede estar eventualmente encapsulada en una cápsula de hidrogel, en la que se ha preparado preferiblemente. En este caso, la cápsula de hidrogel se elimina preferiblemente antes de la implantación en el ojo.

Las unidades de tejido según la invención pueden congelarse para su almacenamiento hasta la implantación.

10 Kit de implantación

La invención también tiene por objeto un kit de implantación de al menos una unidad de tejido.

15 El kit de implantación según la invención comprende al menos:

– entre 1 y 10.000 unidades de tejido según la invención, pudiendo estar las unidades de tejido eventualmente encapsuladas en una cápsula de hidrogel,

20 – eventualmente medios de eliminación de cápsula de hidrogel, en el caso en donde las unidades de cápsulas están encapsuladas en una cápsula de hidrogel,

– un dispositivo de implantación quirúrgico adecuado para implantar dicha o dichas unidades de tejido en un ojo humano.

25 Los medios de eliminación de la cápsula de hidrogel deben permitir eliminar la cápsula mediante hidrólisis, disolución, perforación y/o ruptura mediante cualquier medio biocompatible, es decir no tóxico para las células. Preferiblemente, los medios de eliminación se eligen de las disoluciones de tampón (tales como, por ejemplo, el tampón fosfato salino también denominado PBS por “phosphate buffered saline”), un tampón que contiene un quelante de iones divalentes (tal como, por ejemplo, EDTA), las enzimas adecuadas para someter el hidrogel a lisis (a elegir en función de la naturaleza del hidrogel).

30 El dispositivo de implantación quirúrgico puede ser una aguja o una cánula cuyo diámetro interno permite el paso de las unidades de tejido según la invención que van a injertarse, preferiblemente entre 100 µm y 1 mm, y cuyo diámetro externo no es demasiado traumático para la estructura del ojo tratado, preferiblemente menos de 2 mm.

35 El número de unidades de tejido según la invención presentes en el dispositivo está comprendido entre 1 y 10.000, preferiblemente entre 10 y 1000. Este número varía en función de la enfermedad de la retina que va a tratarse y del tamaño de la zona de la retina que ya no es funcional.

40 En el kit de implantación, las unidades de tejido pueden estar fuera del dispositivo de implantación y/o ya introducidas total o parcialmente en el dispositivo de implantación quirúrgico.

45 Las unidades de tejido según la invención presentes en el kit pueden congelarse fuera del dispositivo y/o congelarse en el dispositivo de implantación quirúrgico. En este caso, las unidades de tejido según la invención deben descongelarse antes de su uso mediante cualquier medio adaptado que permita conservar el conjunto de las propiedades de las unidades de tejido. Puede tratarse, concretamente, de protocolos convencionales de biología celular que usan DMSO, tales como antiageles, o aquellos aplicados para la congelación de embriones de fecundación in vitro que usan azúcares tales como sacarosa y alcoholes tales como etilenglicol.

50 Si las unidades de tejido se han congelado encapsuladas en una cápsula de hidrogel, conviene en primer lugar descongelar las unidades de tejido encapsuladas, después eliminar las cápsulas de hidrogel.

Procedimiento de preparación

55 La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de una unidad de tejido según la invención. En particular, el procedimiento consiste en realizar al menos una unidad de tejido según la invención, realizando microcompartimentos celulares que comprenden una cápsula de hidrogel que rodea:

60 – células de epitelio pigmentario retiniano diferenciadas y eventualmente otras células retinianas diferenciadas, o

– células madre o células progenitoras que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano, o

65 – células diferenciadas destinadas a experimentar en la cápsula:

* o bien una transdiferenciación para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,

5 * o bien una reprogramación en la cápsula de manera que se convierten en células madre pluripotentes inducidas que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano.

A continuación se elimina preferiblemente la cápsula con el fin de permitir que las células de la unidad de tejido se implanten a nivel de la retina tras un injerto en el ojo.

10 El procedimiento de preparación de una unidad de tejido según la invención, comprende al menos la puesta en práctica de las etapas que consisten en:

– producir un microcompartimento celular que comprende, en el interior de una cápsula de hidrogel:

15 * preferiblemente al menos elementos de la matriz extracelular, secretados por las células o aportados por el operario, preferiblemente al menos una parte de la matriz extracelular se aporta además de la matriz extracelular secretada de manera natural por las células,

20 * células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano, o al menos células de epitelio pigmentario retiniano diferenciadas,

eligiéndose las células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano de:

25 * células madre que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,

* células progenitoras que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,

30 * células diferenciadas que pueden experimentar una transdiferenciación para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,

35 * células diferenciadas que pueden experimentar una reprogramación de manera que se convierten en células madre pluripotentes inducidas que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano

– si las células introducidas en el microcompartimento son células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano: inducir la diferenciación celular en el interior del microcompartimento celular, de manera que se obtienen al menos células de epitelio pigmentario retiniano y eventualmente otras células retinianas,

45 – eliminar las cápsulas de hidrogel, mediante hidrólisis, disolución, perforación y/o ruptura, para recuperar las células de epitelio pigmentario retiniano y las otras células retinianas eventuales en forma de una unidad de tejido retiniano tridimensional hueca que comprende, organizada alrededor de una luz interna, al menos una capa de epitelio pigmentario retiniano en la que la cara basal de cada célula de epitelio pigmentario retiniano está posicionada hacia el exterior y la cara apical hacia la luz.

Ventajosamente, la encapsulación total o parcial en el hidrogel y el aporte de matriz extracelular combinados, es un medio adaptado para permitir la polarización de las células del epitelio pigmentario retiniano. En efecto, la polarización de dichas células puede obtenerse mediante deposición de una capa de matriz sobre la cara interna de las cápsulas de hidrogel que posiciona la cara basal de las células, el tejidos se organiza alrededor de la luz siguiendo esta indicación de polaridad (tal como se ilustra en la figura 9 que muestra que una capa de matriz extracelular anclada a la cubierta de alginato induce la polarización de las células tal como lo demuestra el aplanamiento de los tejidos contra el alginato debido a la alta resistencia a la tracción del gel que dicta la forma del tejido). Preferiblemente, el hidrogel usado es biocompatible, es decir que no es tóxico para las células. La cápsula de hidrogel debe permitir la difusión de oxígeno y de nutrientes para alimentar a las células contenidas en el microcompartimento y permitir su supervivencia. Según una realización, la cápsula comprende alginato. Puede estar constituida exclusivamente por alginato. El alginato puede ser, en particular, un alginato de sodio, compuesto por el 80 % de α -L-guluronato y el 20 % de β -D-manuronato, con un peso molecular promedio de 100 a 400 kDa y una concentración total comprendida entre el 0,5 y el 5 % en peso.

65 La cápsula de hidrogel permite proteger las células del medio exterior, limitar la proliferación descontrolada de las células, y su diferenciación controlada para dar células retinianas, al menos para dar células de epitelio pigmentario retiniano. Una cápsula rodea muy preferiblemente una única unidad de tejido según la invención y cada unidad de tejido está rodeada por una única cápsula de hidrogel.

Una vez obtenida la unidad de tejido retiniano según la invención, es decir cuando las células están diferenciadas para dar células retinianas, entre ellas al menos una capa de células de epitelio pigmentario retiniano, y la forma y el tamaño son los buscados, se elimina la cápsula. La eliminación de la cápsula puede realizarse al final del procedimiento o más tarde en el tiempo antes de la implantación en el ojo. La eliminación de la cápsula puede realizarse mediante hidrólisis, disolución, perforación y/o ruptura mediante cualquier medio biocompatible, es decir no tóxico para las células. Por ejemplo, la eliminación puede realizarse usando un tampón de fosfato salino, un quelante de iones divalentes, una enzima tal como alginato liasa si el hidrogel comprende alginato y/o la microdissección por láser. Dado que la eliminación del hidrogel es total, la unidad de tejido según la invención carece de hidrogel cuando se implanta en el ojo.

Puede usarse cualquier procedimiento de producción de microcompartimentos celulares que contienen en el interior de una cápsula de hidrogel al menos células de epitelio pigmentario retiniano o células susceptibles de proporcionar al menos células de epitelio pigmentario retiniano y eventualmente matriz extracelular y/u otras células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano o células susceptibles de proporcionar al menos células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano. Un método adaptado se describe concretamente en la solicitud WO2018/096277. En una realización particular, la etapa de producción de un microcompartimento celular del procedimiento de preparación según la invención, comprende las etapas que consisten en:

- incubar células madre pluripotentes en un medio de cultivo, preferiblemente un medio de cultivo basado en DMEM o DMEM-F12, FGF-2 o una molécula que reproduce su acción sobre la célula, TGF-beta o una molécula que reproduce su acción sobre la célula.
- mezclar las células madre pluripotentes con una matriz extracelular,
- encapsular la mezcla en una capa de hidrogel.

Las células encapsuladas para la preparación de unidad de tejido según la invención se eligen preferiblemente de:

- células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano, siendo estas células:
 - * o bien células madre que pueden diferenciarse para dar células de la retina, para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano, preferiblemente células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas, muy preferiblemente células madre pluripotentes inducidas, y/u
 - * o bien células progenitoras que pueden diferenciarse para dar células de la retina, para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano,
 - y/o células de epitelio pigmentario retiniano diferenciadas y eventualmente células retinianas diferenciadas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano,
 - y/o células diferenciadas que pueden experimentar una transdiferenciación para dar células de la retina, para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano,
 - y/o células diferenciadas que pueden experimentar una reprogramación de manera que se convierten en células madre pluripotentes inducidas que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano.

Las células encapsuladas pueden ser inmunocompatibles con la persona destinada a recibir la unidad de tejido, para evitar cualquier riesgo de rechazo. En una realización, las células encapsuladas se han extraído previamente de la persona en la que deben implantarse la o las unidades de tejido.

La diferenciación para dar células de epitelio pigmentario retiniano puede realizarse mediante cualquier procedimiento adaptado. Puede tratarse, concretamente, de un método conocido tal como uno de los métodos descritos en Leach y col. ("Concise Review: Making Stem Cells Retinal: Methods for Deriving Retinal Pigment Epithelium and Implications for Patients With Ocular Disease", Stem Cells 2015; 33: 2363-2373). El medio de base puede ser DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's medium") o DMEMF12 que puede complementarse por KSR-XF ("KnockOut DMEM medium") o N-2 y/o B27, el 1 % de GlutaMax, y el 1 % de disolución de aminoácidos no esenciales. La inducción también puede obtenerse con la secuencia tal como se publica en Choudhary y col. ("Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage" STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE 2016; 5: 1-12).

La diferenciación para dar células retinianas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano puede realizarse mediante cualquier procedimiento adaptado. Puede tratarse concretamente de un método conocido tal como el método descrito en Barnea-Cramer y col. ("Function of human pluripotent stem cell-derived photoreceptor progenitors in blind mice", Nature, Scientific Reports, publicado el 13 de julio de 2016). Por tanto, la diferenciación puede realizarse con

DMEMF12 que puede complementarse por KSR-XF (KnockOut DMEM medium) o N-2 y/o B27, el 1 % de GlutaMax, y el 1 % de disolución de aminoácidos no esenciales.

5 En una realización particular, la etapa de inducción de la diferenciación celular del procedimiento de preparación según la invención, comprende las etapas que consisten en:

– cultivar el microcompartimento en un medio de cultivo de células pluripotentes hasta obtener al menos 10 células, preferiblemente 100 células,

10 – cultivar el microcompartimento en un medio de cultivo DMEMF12 complementado por N-2 y B27, el 1 % de GlutaMax, y el 1 % de disolución de aminoácidos no esenciales y LDN193189 y SB431542 y 20 µg/ml de insulina humana,

15 – cultivar el microcompartimento en un medio de cultivo DMEMF12 complementado por N-2 y B27, el 1 % de GlutaMax, y el 1 % de disolución de aminoácidos no esenciales y LDN193189 y SB431542,

20 – cultivar el microcompartimento en un medio de cultivo DMEMF12 complementado por N-2 y B27, el 1 % de GlutaMax, y el 1 % de disolución de aminoácidos no esenciales y 10 ng/ml de BDNF humano, 10 ng/ml de CNTF humano, 2 µM de ácido retinoico y 10 µM de DAPT. Preferiblemente, los microcompartimentos se cultivan durante al menos 18 días, preferiblemente entre 18 y 50 días.

25 En una realización de una unidad de tejido que comprende una capa de epitelio pigmentario retiniano y al menos una capa de otras células retinianas, el procedimiento consiste en encapsular conjuntamente las células de epitelio pigmentario retiniano y las otras células. Preferiblemente, las células después de algunos días de cada diferenciación se encapsulan conjuntamente para formar una estructura que contiene un epitelio pigmentario retiniano y una retina neural. A continuación se hacen madurar las células en la cápsula durante de 5 a 50 días, más preferiblemente de 10 a 25 días, antes de obtener una unidad de tejido según la invención.

30 La luz se genera en el momento de la formación de la unidad de tejido en tres dimensiones, por las células que se multiplican y se desarrollan. La luz puede contener un líquido y, en particular, el medio de cultivo usado para la puesta en práctica del procedimiento.

35 El procedimiento según la invención puede comprender una etapa de amplificación de las células de epitelio pigmentario retiniano en el microcompartimento.

En la figura 3 se representa una realización de un microcompartimento 20 que comprende una unidad de tejido retiniano tridimensional hueca 10 según la invención. En esta realización, el microcompartimento está constituido exclusivamente:

40 – por una capa de hidrogel 22, y

– por una unidad de tejido 10, constituida:

45 * por una luz interna 14,

* por una capa de epitelio pigmentario retiniano 12 organizada alrededor de la luz interna, estando las caras basales B de las células epiteliales pigmentarias retinianas dirigidas hacia el exterior de la unidad de tejido, y estando las caras apicales A de las células epiteliales pigmentarias retinianas dirigidas hacia la luz interna,

50 * por una capa de matriz extracelular 16 dispuesta alrededor de la capa de células de epitelio pigmentario retiniano, a nivel de las caras basales de dichas células de epitelio pigmentario retiniano.

55 En la figura 4 se representa otra realización de un microcompartimento 20 que comprende una unidad de tejido retiniano tridimensional hueca 10 según la invención. En esta realización, el microcompartimento está constituido exclusivamente:

– por una capa de hidrogel 22, y

60 – por una unidad de tejido 10, constituida:

* por una luz interna 14,

* por una capa 18 de células retinianas distintas de células epiteliales pigmentarias retinianas, de manera preferida una capa de retina neural,

65

* por una capa de epitelio pigmentario retiniano 12 organizada alrededor de la luz interna, estando las caras basales B de las células epiteliales pigmentarias retinianas dirigidas hacia el exterior de la unidad de tejido, y estando las caras apicales A de las células epiteliales pigmentarias retinianas dirigidas hacia la luz interna,

5 * por una capa de matriz extracelular 16 dispuesta alrededor de la capa de células de epitelio pigmentario retiniano, a nivel de las caras basales de dichas células de epitelio pigmentario retiniano.

Tras la etapa de diferenciación, en cualquier momento antes de la implantación de las unidades de tejido en el ojo, el procedimiento según la invención puede comprender una etapa que consiste en verificar el fenotipo de las células contenidas en la cápsula. Esta verificación puede realizarse identificando la expresión de RPE65 por el epitelio pigmentario en posición externa de las unidades de tejido, en una determinada realización y en particular para el caso de elementos de tejidos que contienen elementos de la retina neural de recoverina en posición interna de las unidades de tejido, en el lado de la luz, expresados por el conjunto de los fotorreceptores y de rodopsina/PDE6beta para los bastones, en una determinada realización la luz puede contener vitrosina y opticina.

15 El procedimiento según la invención puede comprender una etapa de congelación de los microcompartimentos que contienen las unidades de tejido según la invención antes de la eliminación de la capa de hidrogel o de congelación de las unidades de tejido tras la etapa de eliminación de la cápsula de hidrogel. La congelación se realiza preferiblemente a una temperatura comprendida entre -190 °C y -80 °C.

20 Los microcompartimentos que contienen las unidades de tejido según la invención antes de la eliminación de la capa de hidrogel o las unidades de tejido tras la etapa de eliminación de la cápsula de hidrogel, pueden almacenarse en las siguientes condiciones a entre +4 °C y la temperatura ambiente. Las unidades de tejido según la invención también pueden usarse directamente tras la puesta en práctica del procedimiento según la invención, sin almacenamiento.

25 El procedimiento de preparación según la invención, antes o después de la descongelación eventual de los microcompartimentos que contienen las unidades de tejido antes de la eliminación de la capa de hidrogel o las unidades de tejido, también puede comprender una etapa complementaria que consiste en cargar un dispositivo de implantación quirúrgico con al menos una unidad de tejido según la invención, preferiblemente entre 10 y 1000 unidades de tejido, aún más preferiblemente entre 10 y 100 unidades de tejido.

Implantación de unidades de tejido en el ojo

35 La unidad de tejido tridimensional hueca, que comprende, organizada alrededor de una luz interna, al menos una capa de células de epitelio pigmentario retiniano en la que la cara basal de cada célula de epitelio pigmentario retiniano está posicionada hacia el exterior y la cara apical hacia la luz interna, puede usarse en el tratamiento de una enfermedad de la retina, concretamente en un paciente que lo necesita. Por tratamiento se entiende un tratamiento preventivo, curativo o sintomático, es decir cualquier acción destinada a mejorar la vista de una persona de manera temporal o definitiva, y preferiblemente también erradicar la enfermedad y/o detener o retrasar la progresión de la enfermedad y/o favorecer la regresión de la enfermedad.

40 En efecto, las unidades de tejido según la invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades de la retina en el ser humano, en particular de enfermedades degenerativas de la retina, y preferiblemente una enfermedad elegida de la degeneración macular asociada a la edad, la retinopatía diabética, las retinopatías asociadas a un traumatismo del ojo y las retinopatías hereditarias.

45 El tratamiento consiste en implantar, en injertar las unidades de tejido según la invención en el ojo, a nivel de la retina, y en particular a nivel de la membrana de Bruch, es decir entre la membrana de Bruch y la retina neural. Muy preferiblemente se usa un dispositivo de implantación quirúrgico adaptado a una implantación en el ojo. Puede tratarse concretamente de agujas, de cánulas o de otro dispositivo que permite depositar las unidades de tejido tales como, por ejemplo, las usadas para la implantación de endoprótesis en las arterias o de microimplantes quirúrgicos. La implantación puede realizarse concretamente mediante la puesta en práctica de las etapas que consisten en:

55 – penetrar o realizar una incisión en la retina con el dispositivo de implantación quirúrgico en la zona de tratamiento,

– inyectar las unidades de tejido bajo la retina, preferiblemente a nivel de la membrana de Bruch, es decir entre la membrana de Bruch y la retina neural,

60 – retirar el dispositivo de implantación quirúrgico impidiendo la expulsión en el cuerpo vítreo de las células.

En una realización, durante una misma implantación, se implantan entre 1 y 10000 unidades de tejido según la invención.

65 Si es necesario, es posible realizar varias implantaciones simultáneas o sucesivas en diferentes zonas de la retina, preferiblemente a nivel de la membrana de Bruch, en particular en el caso en donde varias zonas independientes

están afectadas por la enfermedad o si la zona en la que debe realizarse el injerto está demasiado extendida como para realizar un injerto en un único lugar.

5 Asimismo, en una misma zona, si un único injerto no es suficiente, pueden realizarse de nuevo varias implantaciones en la misma zona, en un transcurso de tiempo más o menos importante.

La implantación de unidades de tejido según la invención permite a los pacientes afectados por enfermedades de la retina, y en particular por enfermedades degenerativas de la retina, recuperar al menos parcialmente la vista.

10 La invención se ilustra ahora mediante resultados ilustrados en las figuras 5 a 8.

Los tejidos de epitelio retiniano ilustrados en estas diferentes figuras se obtuvieron mediante la puesta en práctica de un procedimiento que comprende las etapas que consisten en:

15 – producir un microcompartimento celular que comprende, en el interior de una cápsula de hidrogel:

* elementos de la matriz extracelular aportados por el operario,

20 * células de epitelio retiniano pigmentado,

Estas células de epitelio retiniano pigmentado pueden obtenerse de la siguiente manera:

25 – cultivar células madre inducidas a la pluripotencia en el interior i) de una placa de Petri hasta obtener colonias que contienen varias decenas de células ii) del microcompartimento en un medio de cultivo de células pluripotentes, hasta obtener en el microcompartimento al menos 10 células, preferiblemente 100 células,

30 – cultivar: i) las colonias ii) el microcompartimento en un medio de cultivo DMEMF12 complementado por N-2 y B27, el 1 % de GlutaMax, y el 1 % de disolución de aminoácidos no esenciales y LDN193189 y SB431542 y 20 µg/ml de insulina humana,

– cultivar: i) las colonias ii) el microcompartimento en un medio de cultivo DMEMF12 complementado por N-2 y B27, el 1 % de GlutaMax, y el 1 % de disolución de aminoácidos no esenciales y LDN193189 y SB431542,

35 – cultivar: i) las colonias ii) el microcompartimento en un medio de cultivo DMEMF12 complementado por N-2 y B27, el 1 % de GlutaMax, y el 1 % de disolución de aminoácidos no esenciales y 10 ng/ml de BDNF humano, 10 ng/ml de CNTF humano, 2 µM de ácido retinoico y 10 µM de DAPT.

40 En la figura 5, la cápsula obtenida mediante encapsulación de células epiteliales pigmentadas de la retina procedentes de la diferenciación de células inducidas han proliferado en el interior del microcompartimento para organizarse en forma de una unidad de tejido polarizado. En la figura 5 se observa bien la formación de un epitelio monoestratificado recubierto pigmentado (flecha negra) maduro (normalmente permitido por la formación de uniones apretadas, flecha blanca) típico de la estructura tisular de las células epiteliales pigmentadas de la retina in vivo.

45 En la figura 6, las cápsulas obtenidas mediante encapsulación de células epiteliales pigmentadas de la retina procedentes de la diferenciación de células inducidas a la pluripotencia muestran la estructuración en lámina epitelial pigmentada independientemente del número de células en los tejidos (del orden de un centenar de células a la izquierda, tamaño: 50 µm, inserto A, y del orden de un millar de células a la derecha, tamaño: 250 µm, inserto B) típico de la estructura tisular de las células epiteliales pigmentadas de la retina in vivo. Más particularmente, en la figura 6 se observa que las células están organizadas para dar un esferoide hueco (inserto B), ovoide hueco (inserto E), según una polarización apico-basal caracterizada por que la cara apical está posicionada hacia el interior de la unidad de tejido y la cara basal hacia el exterior de la unidad de tejido situada en este caso en contacto con la capa de alginato. En particular, los pigmentos intracelulares están situados en la cara apical de las células (inserto D, luz transmitida, flecha blanca) con una organización basal de los núcleos (inserto B, DAPI, flecha blanca) correspondiente a la topología encontrada in vivo.

55 En la figura 7, las cápsulas obtenidas mediante encapsulación de células epiteliales pigmentadas de la retina procedentes de la diferenciación de células inducidas a la pluripotencia, se amplificaron 10 veces en 4 semanas (figuras 7a y 7b) y 4 veces en 4 semanas (figuras 7c y 7d). Estas figuras ilustran que las unidades de tejido retiniano según la invención pueden tener densidades celulares variables.

60 Finalmente, en las imágenes secuenciales de la figura 8, se dispusieron varias unidades de tejido retiniano según la invención (sin cápsula de hidrogel) en un sustrato que simula la matriz extracelular del fondo del ojo (en este caso Matrigel que simula la membrana de Bruch). Se constata que las unidades de tejido retiniano (flechas negras), gracias al posicionamiento de su cara basal en el lado exterior, pueden unirse al sustrato que simula la matriz extracelular del

ES 3 013 617 T3

fondo del ojo emitiendo células adherentes al sustrato (flechas blancas) que migran (flechas grises) para recubrir el sustrato y forman una monocapa (inserto en la parte inferior derecha correspondiente a 122 horas de cultivo).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Unidad de tejido retiniano tridimensional hueca, que comprende, organizada alrededor de una luz interna, al menos una capa de células de epitelio pigmentario retiniano humanas vivas diferenciadas en la que la cara basal de cada célula de epitelio pigmentario retiniano está posicionada hacia el exterior y la cara apical hacia la luz interna.
- 10 2. Unidad de tejido retiniano según la reivindicación 1, **caracterizada por que** también comprende una capa externa de matriz extracelular situada a nivel de la cara basal de las células de epitelio pigmentario retiniano.
- 15 3. Unidad de tejido retiniano según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** se presenta en forma de un ovoide hueco, de un cilindro hueco, de un esferoide hueco o de una esfera hueca.
- 20 4. Unidad de tejido retiniano según la reivindicación anterior, **caracterizada por que** su dimensión más grande está comprendida entre 100 y 1000 µm.
- 25 5. Unidad de tejido retiniano según la reivindicación anterior, **caracterizada por que** su dimensión más pequeña está comprendida entre 10 y 1000 µm.
- 30 6. Unidad de tejido retiniano según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las células de epitelio pigmentario retiniano yuxtapuestas están unidas entre sí en sus caras laterales mediante uniones apretadas.
- 35 7. Unidad de tejido retiniano según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** también comprende, a nivel de la cara apical de las células de epitelio pigmentario retiniano, organizada alrededor de la luz interna, al menos una capa de células retinianas humanas vivas diferenciadas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano.
- 40 8. Unidad de tejido retiniano según la reivindicación anterior, **caracterizada por que** las células retinianas humanas vivas diferenciadas distintas de células de epitelio pigmentario retiniano se eligen de bastones, conos, células ganglionares, células amacrinas, células bipolares y células horizontales.
- 45 9. Unidad de tejido retiniano según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** contiene de 10 a 100.000 células retinianas.
- 50 10. Unidad de tejido retiniano según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las células de epitelio pigmentario retiniano y/o las otras células retinianas eventuales se han obtenido a partir de células madre inducidas a la pluripotencia (IPS).
- 55 11. Unidad de tejido retiniano según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** está encapsulada en una cápsula de hidrogel.
- 60 12. Procedimiento de preparación de una unidad de tejido retiniano según una de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas que consisten en:
 - producir un microcompartimento celular que comprende, en el interior de una cápsula de hidrogel:
 - * eventualmente al menos elementos de la matriz extracelular, secretados por las células o añadidos,
 - * células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano, o al menos células de epitelio pigmentario retiniano diferenciadas, eligiéndose las células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano de:
 - * células madre que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,
 - * células progenitoras que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,
 - * células diferenciadas que pueden experimentar una transdiferenciación para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano,
 - * células diferenciadas que pueden experimentar una reprogramación de manera que se convierten en células madre pluripotentes inducidas que pueden diferenciarse para dar células de la retina, al menos células de epitelio pigmentario retiniano

- 5
- si las células introducidas en el microcompartimento son células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano: inducir la diferenciación celular en el interior del microcompartimento celular, de manera que se obtienen al menos células de epitelio pigmentario retiniano y eventualmente otras células retinianas,
 - eliminar las cápsulas de hidrogel mediante hidrólisis, disolución, perforación y/o ruptura para recuperar las células de epitelio pigmentario retiniano y las otras células retinianas eventuales en forma de una unidad de tejido retiniano tridimensional hueca.
- 10
13. Procedimiento según la reivindicación anterior, **caracterizado por que** comprende una etapa de amplificación de las células de epitelio pigmentario retiniano
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 o 13, **caracterizado por que** las células adecuadas para diferenciarse para dar al menos células de epitelio pigmentario retiniano son células madre pluripotentes.
- 15
15. Procedimiento según la reivindicación anterior, **caracterizado por que** las células madre pluripotentes son células madre inducidas a la pluripotencia (IPS).
- 20
16. Procedimiento de preparación de unidad de tejido retiniano según una de las reivindicaciones 12 a 15, **caracterizado por que** comprende una etapa complementaria que consiste en cargar un dispositivo de implantación quirúrgico adecuado para una inyección en el ojo, con dicha unidad de tejido.
- 25
17. Kit de implantación en el ojo de unidades de tejido según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** comprende:
- entre 1 y 10.000 unidades de tejido según una de las reivindicaciones 1 a 11,
 - un dispositivo de implantación quirúrgico adecuado para implantar dicha o dichas unidades de tejido en un ojo humano.
- 30
18. Kit de implantación en el ojo de unidades de tejido según la reivindicación 17 **caracterizado por que** comprende:
- entre 1 y 10.000 unidades de tejido según la reivindicación 11,
 - medios de eliminación de cápsula de hidrogel,
 - un dispositivo de implantación quirúrgico adecuado para implantar dicha o dichas unidades de tejido en un ojo humano.
- 35

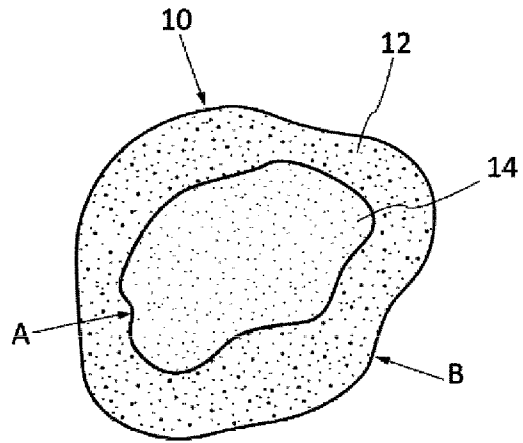


Figura 1

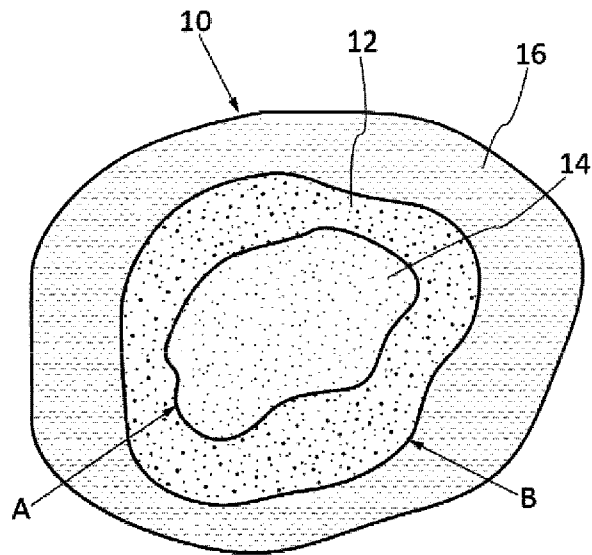


Figura 2

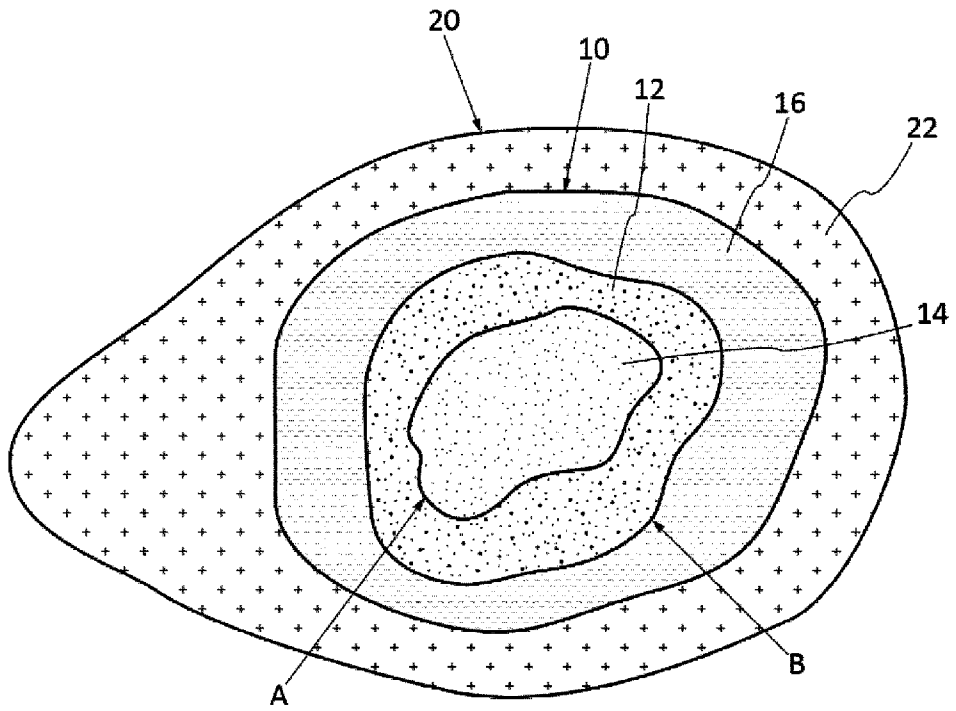


Figura 3

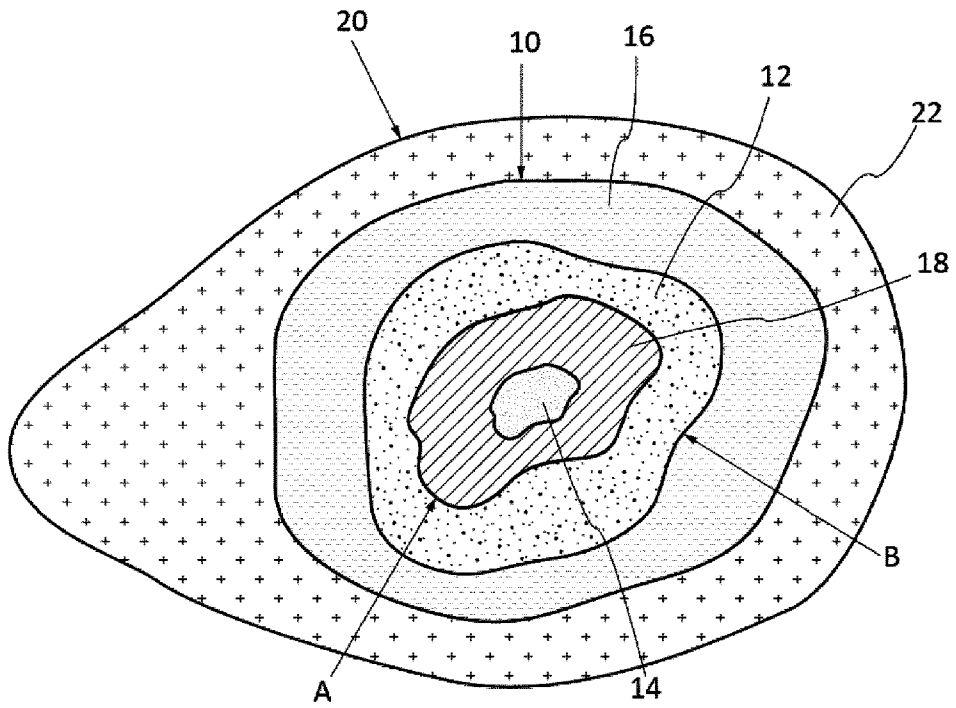


Figura 4

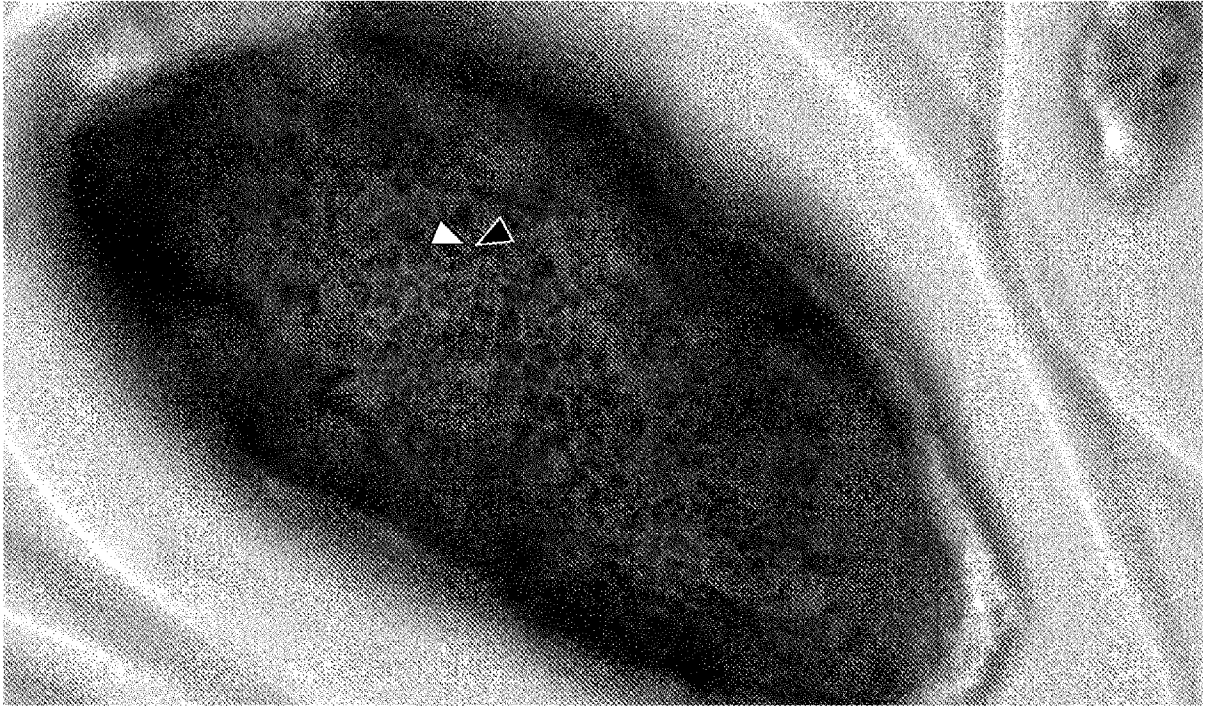


Figura 5

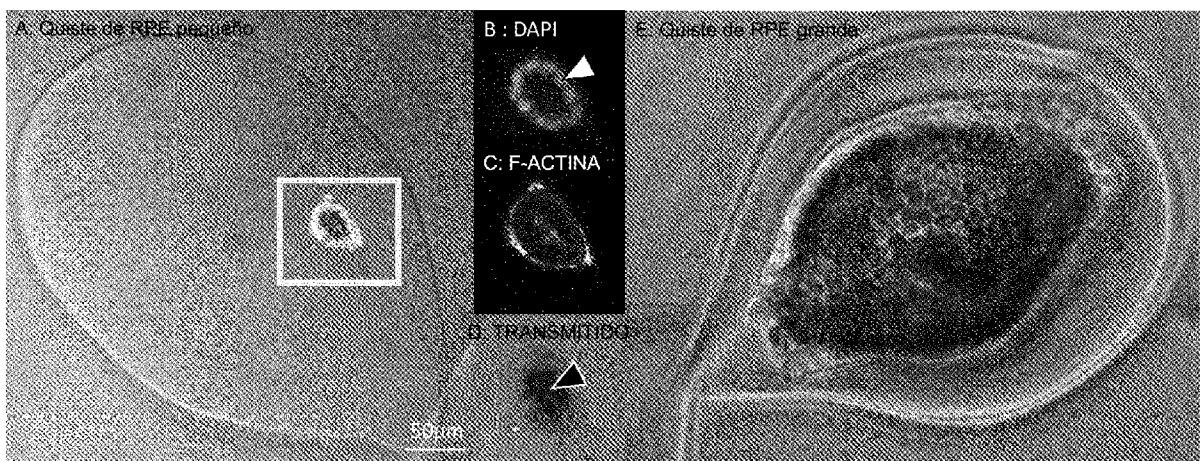


Figura 6

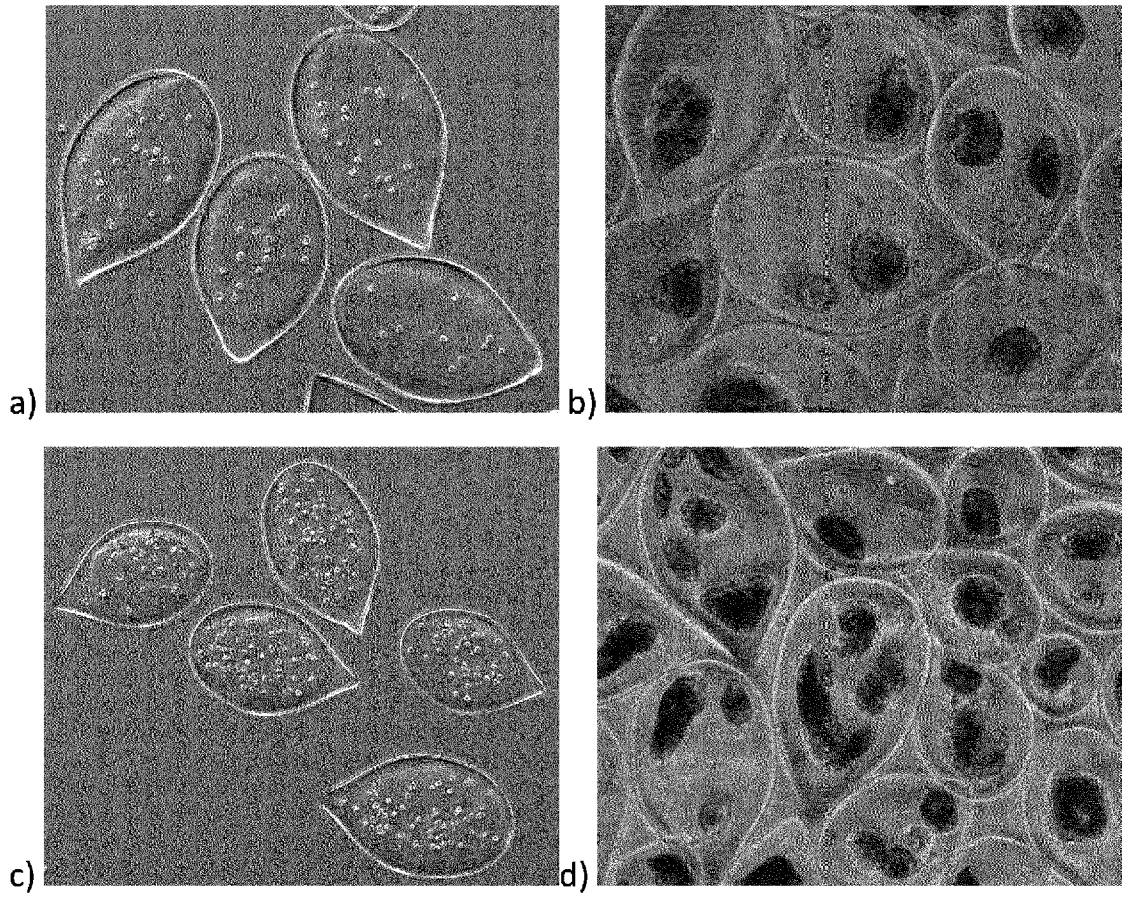


Figura 7

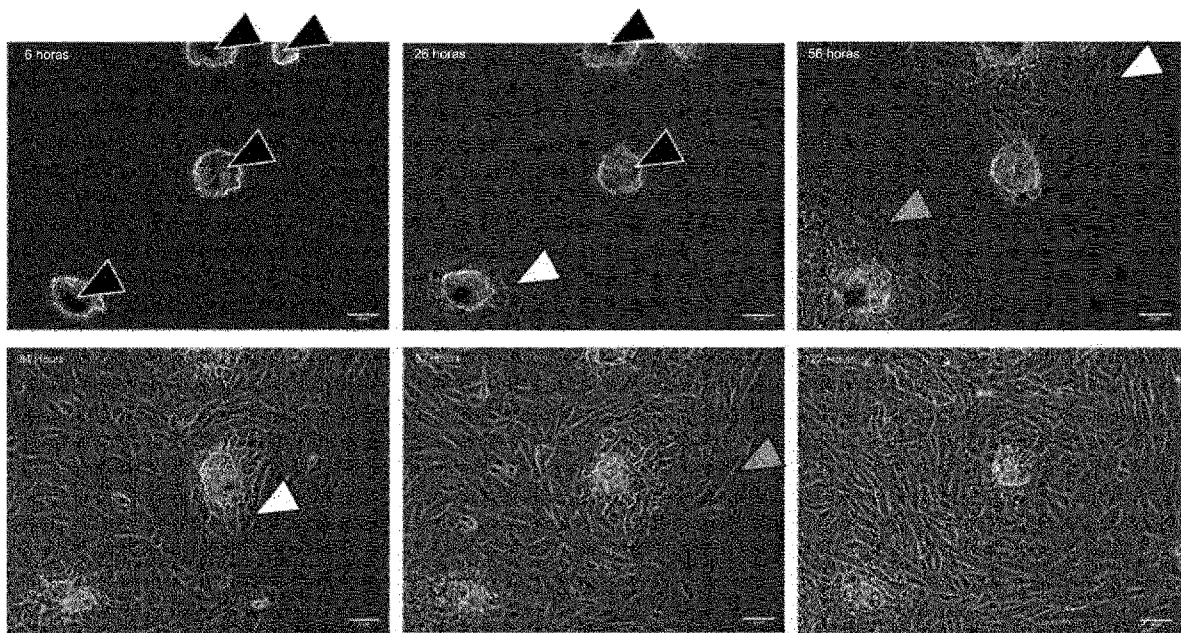


Figura 8

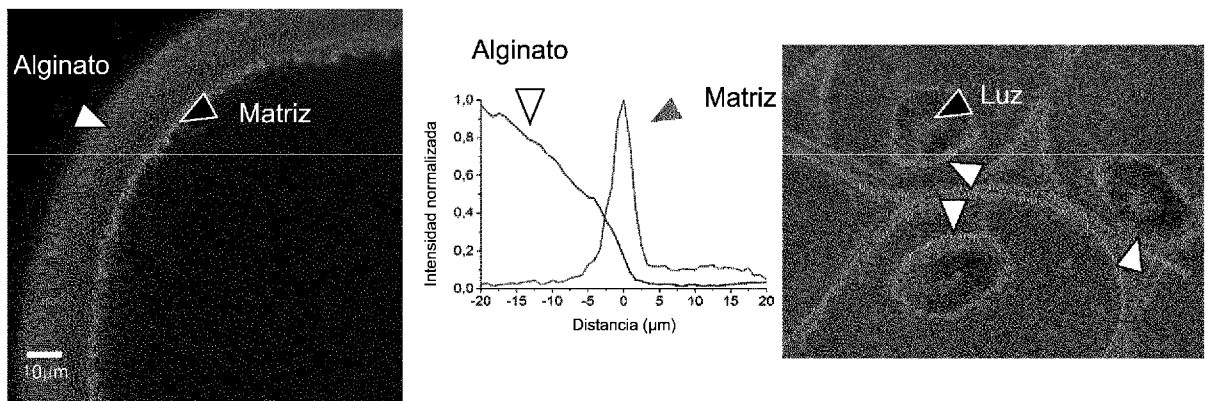


Figura 9