

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 705**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0793 (2010.01)

A61K 35/545 (2015.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2019** **PCT/EP2019/066285**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.12.2019** **WO19243462**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2019** **E 19733709 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2023** **EP 3810758**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para producir células del epitelio pigmentario de la retina**

30 Prioridad:

20.06.2018 US 201862687416 P

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

27.02.2024

73 Titular/es:

BIOLAMINA AB (100.0%)
Löfströms Allé 5
172 66 Sundbyberg, SE

72 Inventor/es:

LANNER, FREDRIK;
PLAZA REYES, ALVARO;
PETRUS REURER, SANDRA y
SÁNCHEZ, SARA, PADRELL

74 Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

ES 2 959 705 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

Procedimientos y composiciones para producir células del epitelio pigmentario de la retina

5 CAMPO TÉCNICO

La presente divulgación se refiere a procedimientos y composiciones para producir células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) a partir de células madre. Se utilizan sustratos revestidos de laminina, junto con medios de cultivo celular específicos. También se identifican marcadores de superficie celular que pueden usarse para diversas aplicaciones en la producción *in vitro* de RPE (como control de calidad y enriquecimiento). Además, se divulgan, pero no se reivindican, las poblaciones específicas de células RPE producidas utilizando los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva, así como diversos tratamientos y otros procesos que utilizan los mismos.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Células madre

Una célula madre es una célula no diferenciada de la que posteriormente se derivan células especializadas. El proceso por el cual una célula madre se transforma en una célula más especializada se denomina diferenciación. Las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo o ectodermo. Después de la fertilización, las células madre pluripotentes forman todos los tipos de células del cuerpo humano, incluidas poblaciones de células madre menos plásticas, como las células madre adultas, las células madre fetales y las células madre amnióticas. Las células madre embrionarias son un tipo de células madre pluripotentes y poseen una gran capacidad de autorrenovación y pluripotencia. Las células madre pluripotentes inducidas se producen a partir de células terminalmente diferenciadas de mamíferos mediante un proceso denominado reprogramación de células somáticas.

Lamininas

Las lamininas son una familia de glicoproteínas heterotriméricas que residen principalmente en la lámina basal. Las lamininas funcionan mediante interacciones de unión con receptores de células vecinas, por un lado, y uniéndose a otras moléculas de laminina u otras proteínas de la matriz, como colágenos, nidogénicos o proteoglicanos. Las moléculas de laminina también son importantes moléculas de señalización que pueden influir fuertemente en el comportamiento y la función celular. Las lamininas son importantes tanto para mantener el fenotipo celular/tejido como para promover el crecimiento celular y la diferenciación en la reparación y el desarrollo de tejidos.

Las lamininas son proteínas grandes, multidominio, con una organización estructural común. La molécula de laminina integra varias funciones interactivas de la matriz y la célula en una sola molécula. Una molécula de proteína de laminina comprende una subunidad de cadena α , una subunidad de cadena β y una subunidad de cadena γ , todas unidas en un trímero a través de un dominio en espiral. Las doce cadenas de subunidades de laminina conocidas pueden formar al menos 15 tipos de laminina trimérica en tejidos nativos. Dentro de las estructuras de laminina trimérica hay dominios identificables que poseen actividad de unión hacia otras moléculas de laminina y de la lámina basal, y receptores unidos a la membrana. Por ejemplo, los dominios VI, IVb y IVa forman estructuras globulares, y los dominios V, IIIb y IIIa (que contienen elementos similares a EGF ricos en cisteína) forman estructuras similares a varillas. Los dominios I y II de las tres cadenas participan en la formación de una estructura de triple hebra en espiral (el brazo largo).

Existen cinco cadenas alfa diferentes, tres cadenas beta y tres cadenas gamma que en tejidos humanos se han encontrado en al menos quince combinaciones diferentes. Estas moléculas se denominan laminina-1 a laminina-15 según su descubrimiento histórico, pero una nomenclatura alternativa describe las isoformas según la composición de su cadena, por ejemplo, laminina-111 (laminina-1) que contiene cadenas alfa-1, beta-1 y gamma-1. Se han identificado cuatro grupos de familias de lamininas estructuralmente definidos. El primer grupo de cinco moléculas de laminina identificadas comparten las cadenas $\beta 1$ y $\gamma 1$, y varían según la composición de su cadena α (cadena $\alpha 1$ a $\alpha 5$). El segundo grupo de cinco moléculas de laminina identificadas, incluida la laminina-521, comparten las cadenas $\beta 2$ y $\gamma 1$, y nuevamente varían según la composición de su cadena α . El tercer grupo de moléculas de laminina identificadas tiene un miembro identificado, laminina-332, con una composición de cadena de $\alpha 3\beta 3\gamma 2$. El cuarto grupo de moléculas de laminina identificadas tiene un miembro identificado, laminina-213, con la cadena $\gamma 3$ recientemente identificada ($\alpha 2\beta 1\gamma 3$).

Células del epitelio pigmentario de la retina

La capa pigmentada de la retina o epitelio pigmentario de la retina (RPE) es la capa de células pigmentadas justo fuera de la retina neurosensorial que nutre las células visuales de la retina y está firmemente unida a la coroides

subyacente y a las células visuales de la retina suprayacentes. El RPE está compuesto por una sola capa de células hexagonales (células RPE) que están densamente repletas de gránulos de pigmento. El RPE tiene varias funciones, como la absorción de luz dispersa, el transporte epitelial, el amortiguamiento espacial de iones, el ciclo visual, la fagocitosis, la secreción y la modulación inmune.

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la principal causa de pérdida severa de la visión en personas mayores de 60 años, especialmente entre individuos de etnia caucásica, con 500.000 nuevos casos cada año en los países occidentales. Se estima que la AMD afecta actualmente a 170 millones de personas en todo el mundo, una cifra que se prevé aumentará a 196 millones en los próximos cinco años y hasta 288 millones en 2040, lo que implica importantes consecuencias sociales y financieras. La AMD se presenta en dos formas: AMD neovascular o "húmeda", caracterizada por el crecimiento anormal de vasos coroideos a través de la membrana de Bruch que causa edema y hemorragia subretiniana, y AMD "seca", que en etapas avanzadas se caracteriza por áreas bien delimitadas de pérdida del RPE y degeneración de la retina externa, también conocida como atrofia geográfica. La forma "seca" se adapta al 80-90% de los pacientes con AMD y no existe ningún tratamiento disponible para los pacientes con AMD "seca".

En la forma seca avanzada de la enfermedad de degeneración macular relacionada con la edad (AMD), las células RPE son uno de los principales tipos de células perdidas, lo que conduce a la degeneración posterior de las estructuras retinianas esenciales (por ejemplo, fotorreceptores) que causan una discapacidad visual severa. Como no existe ningún tratamiento disponible para regenerar el tejido afectado, el trasplante de células RPE tiene un gran potencial como terapia de reemplazo celular. Sin embargo, hasta ahora las fuentes para obtener células RPE sanas han sido limitadas, ya que provendrían de donantes fetales o adultos, o se generarían a partir de células madre *in vitro* mediante procedimientos engorrosos.

La clave para cualquier terapia de reemplazo celular basada en células madre pluripotentes es la pureza del producto final. Desde una perspectiva de seguridad, es fundamental garantizar que no queden células madre pluripotentes que puedan dar lugar a la formación de teratoma. Se pueden tomar varias estrategias para reducir este riesgo.

Una estrategia es seleccionar negativamente las células no diferenciadas y seleccionar positivamente el tipo de célula de interés. Aunque se están realizando intensos esfuerzos para lograr tratamientos basados en células madre pluripotentes para la AMD, ha habido una falta de marcadores de superficie celular útiles para el linaje del RPE. Un estudio anterior adoptó una estrategia basada en imágenes para identificar dichos marcadores y sugirió que CD59 sería útil (Choudhary, P. & Whiting, P. J. Stem Cell Res. Ther. 7, 127 (2016)). Sin embargo, en el presente trabajo, los inventores encuentran que, aunque las células RPE son positivas para CD59, tanto las células no diferenciadas como las parcialmente diferenciadas también expresan CD59, lo que las hace menos adecuadas para este propósito.

Otra estrategia para reducir el riesgo de células pluripotentes persistentes es establecer un protocolo de diferenciación que sea lo suficientemente eficaz como para eliminar todas las células no diferenciadas. Generalmente, esto se logra con la mayoría de las estrategias de diferenciación hacia las células RPE, ya que los protocolos actuales abarcan varias semanas, eliminando así las células no diferenciadas. Sin embargo, también es importante generar un producto de RPE puro que no contenga tipos de células diferenciadas alternativas. Estudios anteriores han evaluado la pureza mediante análisis de imágenes combinados de pigmentación junto con tinción de varios marcadores intracelulares. Sin embargo, el análisis transcripcional global ha revelado que aún se pueden encontrar contaminantes de células con destino alternativo, como células similares a lentes que expresan genes *CRYSTALLIN* en <10% de cultivos aparentemente homogéneos. Estos contaminantes pueden ser difíciles de identificar mediante análisis de imágenes para la pigmentación y la tinción intracelular de marcadores del RPE, por lo que la llegada del análisis transcripcional establece un nuevo estándar para la calidad de las células RPE generadas a partir de células madre pluripotentes.

Sería deseable proporcionar soluciones a las necesidades anteriores, en particular proporcionando procedimientos mejorados para generar células RPE *in vitro* a partir de células madre pluripotentes, y proporcionando marcadores celulares útiles en tales procedimientos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona procedimientos para cultivar células madre pluripotentes para obtener células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), como se define en las reivindicaciones adjuntas. Las células madre pluripotentes se cultivan de forma adherente sobre un sustrato de cultivo celular que comprende una laminina, que puede ser laminina-521, laminina-511, laminina-121, laminina-111 o una combinación de las mismas. Luego, las células madre se exponen a un medio de cultivo celular adecuado para obtener una primera población de células que comprende células RPE y/o progenitores de las mismas. Después de un período definido de diferenciación (15-50 días), la primera población de células se disocia y se redistribuye en placas en un segundo sustrato que comprende una laminina, que puede ser laminina-521, laminina-511, laminina-121,

laminina-111 o una combinación de las mismas. Luego, la primera población de células se expande y madura adicionalmente cultivando sobre el segundo sustrato en un medio de diferenciación para obtener una segunda población de células que comprende las células RPE que se van a obtener.

Inesperadamente, esta etapa temprana de disociación/replantación en combinación con cultivo adherente sobre el sustrato de laminina da como resultado una población de células que con una fracción muy alta de células RPE sin la necesidad de una disección manual complicada/laboriosa o cualquier otro tipo de disociación selectiva comúnmente utilizada en la técnica anterior. Además de producir células RPE de alta pureza, el procedimiento también es comparativamente rápido y produce altos rendimientos de células RPE, por lo que es más adecuado para producir células para aplicaciones clínicas que los procedimientos anteriores.

Los procedimientos reivindicados implican el uso de ciertos marcadores de superficie celular (CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220, EGFR, GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 y CD326) en generación *in vitro* de células RPE, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Lo siguiente es una breve descripción de los dibujos, que se presentan con el propósito de ilustrar las realizaciones ejemplares divulgadas en la presente memoria descriptiva y no con el propósito de limitar las mismas.

La **Figura 1** es una imagen de microscopía electrónica de sombreado rotatorio de una molécula de laminina recombinante.

La **Figura 2** muestra los motivos estructurales de las cadenas α , β y γ de laminina. Los dominios globulares N-terminal, interno y C-terminal se representan como óvalos blancos. Los dominios que forman espirales (I y II) se muestran como rectángulos blancos. Las estructuras en forma de varillas (dominios V, IIIb e IIIa) se representan como rectángulos grises.

La **Figura 3** es un gráfico de puntos que muestra el grado relativo de expresión de algunas proteínas de la superficie celular entre vesículas ópticas (OV) y células madre embrionarias humanas (hES). Cada punto representa una proteína de la superficie celular diferente, y su posición a lo largo de los ejes x y y está determinada por el valor porcentual positivo en OV (eje y) y hES (eje x). El eje y va del 0% al 100% en incrementos del 10%. El eje x va del 0% al 100% en incrementos del 20%. La esquina superior izquierda indica proteínas de superficie específicas de OV (en relación con hES), que incluyen CD184, GD2, CD165 y CD140b. La esquina inferior derecha indica proteínas de superficie específicas de hES (en relación con las OV), que incluyen CD10, CD49a, CD171, TRA-1-60, CD49b, SSEA4, CD326, SSEA3, CD30, CD50 y TRA-1-60.

La **Figura 4** es un gráfico de puntos que muestra el grado relativo de expresión de algunas proteínas de la superficie celular entre células maduras del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y células madre pluripotentes humanas (hPSC). Cada punto representa una proteína de la superficie celular diferente, y su posición a lo largo de los ejes x y y está determinada por el valor porcentual positivo en RPE (eje y) y hES (eje x). El eje y va del 0% al 100% en incrementos del 10%. El eje x va del 0% al 100% en incrementos del 20%. La esquina superior izquierda indica proteínas de superficie específicas del RPE (en relación con hES), que incluyen CD80, EGFR, CD104, CD164, CD220 y CD140b. La esquina inferior derecha indica proteínas de superficie específicas de hPSC (en relación con los RPE), que incluyen TRA-1-60, SSEA3, CD49a, CD171, TRA-1-60, SSEA4, CD10, CD50, CD30, CD49b, CD24 y CD326.

La **Figura 5** es un conjunto de inmunotinciones representativas que muestran el patrón de expresión de las proteínas de la superficie celular CD140b, CD56, CD184 y GD2 en células RPE humanas maduras derivadas de PSC (células hPSC-RPE). La fila superior es la expresión de proteínas de la superficie celular y la fila inferior son imágenes de campo brillante. La barra de escala es de 20 micrómetros (μm).

La **Figura 6** es un conjunto de imágenes de inmunohistoquímica que muestran el patrón de expresión de CD140b, CD56 y GD2 en una sección de tejido de retina humana sana (lado derecho). El lado izquierdo es un control negativo. La barra de escala es de 50 μm .

La **Figura 7** es un conjunto de dos imágenes de campo brillante de cultivos celulares con células CD140b positivas y negativas, clasificadas después de 3 semanas de diferenciación hPSC-RPE, usando citometría de flujo. Tras el aislamiento, las células positivas y negativas se cultivaron durante 30 días en LN-521. La población CD140b+ se muestra a la izquierda y la población CD140b- se muestra a la derecha. La barra de escala es de 100 μm .

La **Figura 8** es un conjunto de nueve imágenes de campo brillante que muestran la progresión de la diferenciación de células RPE en diversos sustratos. Las tres columnas corresponden a las semanas 3, 4 y 7. Las tres filas corresponden, de arriba a abajo, a los cuerpos embrioides (EB), a LN-111 y a LN-521.

Las **Figuras 9A-9F** son gráficos que muestran el análisis de la expresión génica de genes RPE, pluripotentes y específicos neurales en los tres sustratos de la **Figura 8**. En todos los gráficos, EB se indica con líneas continuas y círculos, LN-521 se indica con líneas de puntos y guiones y cuadrados, y LN-111 se indica con líneas discontinuas y triángulos. Para todos los gráficos, el eje y representa el cambio de expresión y es logarítmico.

La **Figura 9A** es para MITF. El eje y es logarítmico de 0,1 a 10.000 en incrementos de potencias de 10. El eje x está en semanas e incluye las semanas 0, 1, 2, 3, 4 y 7.

La **Figura 9B** es para BEST1. El eje y es logarítmico de 0,1 a 10.000 en incrementos de potencias de 10. El eje x está en semanas e incluye las semanas 0, 1, 2, 3, 4 y 7.

La **Figura 9C** es para TYR. El eje y es logarítmico de 10^{-5} a 10^{10} en incrementos de potencias de 10^5 . El eje x está en semanas e incluye las semanas 0, 1, 2, 3, 4 y 7.

La **Figura 9D** es para TBB3. El eje y es logarítmico de 0,1 a 1000 en incrementos de potencias de 10. El eje x está en semanas e incluye las semanas 0, 1, 2, 3, 4 y 7.

La **Figura 9E** es para NANOG. El eje y es logarítmico de 0,1 a 10 en incrementos de potencias de 10. El eje x está en semanas e incluye las semanas 0, 1, 2, 3, 4 y 7.

La **Figura 9F** es para POU5F1 (OCT3/4). El eje y es logarítmico de 0,1 a 10 en incrementos de potencias de 10. El eje x está en semanas e incluye las semanas 0, 1, 2, 3, 4 y 7.

La **Figura 10** es un conjunto de 12 imágenes de inmunofluorescencia y de campo brillante que muestran el aumento de la expresión de CD140b y el nivel de pigmentación durante la diferenciación del RPE en laminina-521 y laminina-111. Las tres columnas son para las semanas 3, 4 y 7 de diferenciación. La fila superior es para la expresión de CD140b en LN-111. La segunda fila son imágenes de campo brillante en LN-111. La tercera fila es para la expresión de CD140b en LN-521. La fila inferior son imágenes de campo brillante de la LN-521. La barra de escala es de 100 μ m.

Las **Figuras 11A-11C** son gráficos que muestran el porcentaje de células positivas para ciertos marcadores de superficie medidos mediante citometría de flujo durante la diferenciación del RPE en los tres sustratos diferentes probados (EB, LN-521 y LN-111). Las barras representan la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. En todos los gráficos, EB se indica con líneas continuas y círculos, LN-521 se indica con líneas de puntos y guiones y cuadrados, y LN-111 se indica con líneas discontinuas y triángulos. En todos los gráficos, el eje y va del 0% al 100% en incrementos del 20%. El eje x está en semanas e incluye las semanas 1, 2, 3, 4 y 7.

La **Figura 11A** es para TRA-1-60, un marcador específico de hPSC.

La **Figura 11B** es para CD140b, un marcador específico de RPE.

La **Figura 11C** es para CD56, un marcador progenitor del campo ocular.

La **Figura 12** es un conjunto de tres imágenes de campo brillante que muestran la pigmentación de las células hPSC-RPE y seis tinciones de inmunofluorescencia que muestran la expresión de tres marcadores específicos de RPE (BEST1, MITF y CRALBP). Las fotografías se toman el día 30 después de que los cultivos de RPE se hayan vuelto a sembrar a una densidad celular de 7×10^4 células/cm² sobre un sustrato de laminina-521.

La **Figura 13A** y **Figura 13B** son gráficos que comparan los resultados de la citometría de flujo para los cultivos de RPE resultantes, dependiendo de si los cultivos se indujeron en sustrato LN-111 o LN-521. La citometría de flujo se realizó cuatro semanas después de volver a sembrar los cultivos de RPE en LN-521 en cuatro intervalos de densidad celular diferentes de: $1,4 \times 10^6$ células/cm² (1:1), 7×10^4 células/cm² (1:20), $2,8 \times 10^4$ células/cm² (1:50) y $1,4 \times 10^4$ células/cm² (1:100). La **Figura 13A** indica los resultados para el marcador TRA-1-60 (específico de hPSC), y la **Figura 13B** indica resultados para el marcador CD140b (específico de RPE).

Las **Figuras 14A-14F** son gráficos que muestran el análisis de la expresión génica de genes RPE, pluripotentes y específicos neurales, dependiendo de si los cultivos se indujeron en sustrato LN-111 o LN-521 y su redistribución en placas en cuatro intervalos de densidad celular diferentes de: $1,4 \times 10^6$ células/cm² (1 a 1), 7×10^4 células/cm² (1 a 20), $2,8 \times 10^4$ células/cm² (1 a 50), y $1,4 \times 10^4$ células/cm² (1 a 100). Los valores se normalizan a *GAPDH* y se muestran en relación con hPSC no diferenciada. El eje y de todos los gráficos es el cambio de expresión.

La **Figura 14A** es para RPE65. El eje y va de 0 a 20.000 en incrementos de 5.000.

La **Figura 14B** es para BEST1. El eje y va de 0 a 10.000 en incrementos de 2.000.

La **Figura 14C** es para MITF. El eje y va de 0 a 800 en incrementos de 200.

La **Figura 14D** es para PMEL. El eje y va de 0 a 250 en incrementos de 50.

La **Figura 14E** es para NANOG. El eje y va de 0 a 1,0 en incrementos de 0,5.

La **Figura 14F** es para TBB3. El eje y va de 0 a 1,0 en incrementos de 0,2.

La **Figura 15A** y **Figura 15B** muestran el rendimiento celular relativo durante el protocolo de diferenciación a diversas densidades de redistribución en placas de 1:1 (línea de puntos, hexágonos), 1:20 (línea de puntos y guiones, cuadrados), 1:50 (línea de puntos, triángulos) y 1:100 (línea continua, círculos) en las semanas 0, 5 y 9. La semana 0 es el comienzo de la diferenciación. La **Figura 15A** muestra los resultados para células inducidas en LN-111, y la **Figura 15B** muestra los resultados para células inducidas en LN-521. Para ambos gráficos, el eje y es el rendimiento de producción, medido por el cambio en el número de células. El eje y va de 0 a 100 en incrementos de 20, luego salta a 2000 y va a 10.000 en incrementos de 2000.

Las **Figuras 16A-16C** son ensayos funcionales que demuestran la integridad de la monocapa medida mediante resistencia transepitelial (TEER), secreción del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) medida mediante ELISA (B) e internalización de segmentos externos de fotorreceptores (fagocitosis). Se realizaron para células RPE inducidas en LN-111 o LN-521 con dos densidades de redistribución en placas diferentes de 1 a 20 y de 1 a 50. Las barras representan la media $\pm$ SEM de tres experimentos

independientes.

La **Figura 16A** es el ensayo TEER. El eje y está en unidades de $\Omega \cdot \text{cm}^2$ y va de 0 a 400 en incrementos de 100.

La **Figura 16B** es el ensayo de secreción de PEDF. El eje y está en unidades de nanogramos (ng) y va de 0 a 500.000 en incrementos de 100.000. Apical indica el lado apical de las células hPSC-RPE cultivadas en el cultivo trans-well y Basal indica el lado basal de las células hPSC-RPE cultivadas en el cultivo trans-well.

La **Figura 16C** es el ensayo de fagocitosis. Las mediciones se realizaron a dos temperaturas diferentes: 4 °C y 37 °C. El eje y es el número de segmentos externos de fotorreceptores internalizados y va de 0 a 1500 en incrementos de 500.

La **Figura 16D** es un conjunto de dos imágenes de tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD-OCT) multicolores que muestran la inyección subretiniana de células RPE cultivadas en LN-111 o LN-521 (redistribuidas en placas a una densidad celular de 7×10^4 células/cm²). También se muestra un control negativo (PBS).

Las **Figuras 17A-20B** muestran el análisis de la expresión génica de genes RPE, pluripotentes y específicos neurales en el día 30 (punto de tiempo 1) y en el día 60 (punto de tiempo 2) de diferenciación en células madre cultivadas en LN-111 o LN-521. Se utilizaron cuatro líneas de células madre diferentes (HS980, HS975, H9 y HS983a). Los genes representados son BEST1 (17A-B), MITF (18A-B), PMEL (19A-B) y TBB3 (20A-B). Los valores se normalizan a *GAPDH* y se muestran en relación con hPSC no diferenciada. Para todos los gráficos, el eje y representa el cambio de expresión.

La **Figura 17A** es un gráfico de barras para el gen BEST1 en el punto de tiempo 1. El eje y va de 0 a 4.000 en incrementos de 1.000.

La **Figura 17B** es un gráfico de barras para el gen BEST1 en el punto de tiempo 2. El eje y va de 0 a 8.000 en incrementos de 2.000.

La **Figura 18A** es un gráfico de barras para el gen MITF en el punto de tiempo 1. El eje y va de 0 a 500 en incrementos de 100. La **Figura 18B** es un gráfico de barras para el gen MITF en el punto de tiempo 2. El eje y va de 0 a 600 en incrementos de 200.

La **Figura 19A** es un gráfico de barras para el gen PMEL en el punto de tiempo 1. El eje y va de 0 a 100 en incrementos de 20. La **Figura 19B** es un gráfico de barras para el gen PMEL en el punto de tiempo 2. El eje y va de 0 a 150 en incrementos de 50.

La **Figura 20A** es un gráfico de barras para el gen TBB3 en el punto de tiempo 1. El eje y va de 0 a 40 en incrementos de 10. La **Figura 20B** es un gráfico de barras para el gen TBB3 en el punto de tiempo 2. El eje y va de 0 a 40 en incrementos de 10.

Las **Figuras 21A-25B** muestran el porcentaje de células positivas que expresan los genes TRA-1-60, CD140b, CD56, GD2 y CD184 en el día 30 (punto de tiempo 1) y en el día 60 (punto de tiempo 2) de diferenciación en laminina-111 o laminina-521. Se utilizaron cuatro líneas de células madre diferentes (HS980, HS975, H9 y HS983a). La diferenciación con la línea hESC HS983a no fue posible y aquí se muestra como ejemplo de cómo se ve la expresión de los marcadores de superficie celular mencionados en caso de una diferenciación deficiente o fallida. En todos los gráficos, el eje y es el % de células positivas y va de 0 a 100 en incrementos de 20.

La **Figura 21A** es un gráfico de barras para el gen TRA-1-60 en el punto de tiempo 1. La **Figura 21B** es un gráfico de barras para el gen TRA-1-60 en el punto de tiempo 2.

La **Figura 22A** es un gráfico de barras para el gen CD140b en el punto de tiempo 1. La **Figura 22B** es un gráfico de barras para el gen CD140b en el punto de tiempo 2.

La **Figura 23A** es un gráfico de barras para el gen CD56 en el punto de tiempo 1. La **Figura 23B** es un gráfico de barras para el gen CD56 en el punto de tiempo 2.

La **Figura 24A** es un gráfico de barras para el gen GD2 en el punto de tiempo 1. La **Figura 24B** es un gráfico de barras para el gen GD2 en el punto de tiempo 2.

La **Figura 25A** es un gráfico de barras para el gen CD184 en el punto de tiempo 1. La **Figura 25B** es un gráfico de barras para el gen CD184 en el punto de tiempo 2.

La **Figura 26** muestra el análisis de citometría de flujo de la expresión de CD140b, CD184 y GD2 en las fracciones pigmentadas y no pigmentadas de los EB después de 30 días de diferenciación. Las imágenes representativas de campo brillante que representan las fracciones pigmentadas y no pigmentadas de los EB que se analizaron mediante citometría de flujo. El eje y muestra el recuento relativo de células en una escala de 0 a 100. El eje x representa la expresión del marcador en una escala logarítmica.

La **Figura 27** muestra el porcentaje de células que son positivas para pigmento, BEST-1, CD140b y doblemente positivas para BEST1 y CD140b en poblaciones CD140b positivas y negativas clasificadas por FACS.

Figura 28: Gráficos de puntos de citometría de flujo que comparan el porcentaje de células que expresan altos niveles de proteína de superficie celular CD56 en el día 60 de diferenciación en células que fueron redistribuidas en placas o enriquecidas en CD140b+CD184- o CD140b+GD2- después de 30 días de diferenciación. El eje x representa la expresión del marcador en una escala logarítmica.

Figura 29: Imágenes representativas de tinción de inmunofluorescencia y campo brillante que muestran CD56 enriquecido en áreas no pigmentadas de hESC-RPE después de 60 días de diferenciación, lo que coincide con células menos maduras.

Figura 30: Diagrama de caja que compara la expresión media de NCAM1/CD56 entre los grupos de RPE y

Campo Ocular medidos por el ARN unicelular 10x Genomics en cultivos de hPSC-RPE después de 60 días de diferenciación.

Figura 31 y Figura 32: El análisis de grupos de tSNE de todas las tres muestras diferenciadas reveló tres grupos distintos (**Figura 32**). Los tres grupos expresaron firmas genéticas asociadas con RPE maduro (*MITF*, *BEST1*, *RLBP1*, *PMEL*, *TYR*, *RPE65*), progenitores inmaduros del campo ocular (*SIX6*, *VSX2*, *PAX6*, *OTX2*, *SIX3*, *LHX2*, *RAX*, *ZIC1*) y linaje mesodérmico respectivamente (*MYOZ2*, *CASQ2*, *MYOZ1*, *KLHL41*), como se muestra en los gráficos de características que muestran las puntuaciones del módulo de expresión para los linajes mencionados en el gráfico t-SNE. (**Figura 31**).

La **Figura 33** muestra un análisis de células individuales que reveló que ninguna de las células de las poblaciones redistribuidas en placas o clasificadas expresaron transcripciones de pluripotencia *POU5F1*, *NANOG*, *LIN28A* o *SALL4*, sino que expresaron de manera más robusta las transcripciones asociadas con RPE (*MITF*, *CRALBP*, *PMEL*, *TYR*, *RPE65*, *BEST1*).

La **Figura 34** muestra inmunotinción específica para NCAM1/CD56 en muestras de retina humana.

La **Figura 35** ilustra esquemáticamente el flujo experimental del Ejemplo 2. En la figura, "d" se refiere al día, por ejemplo, "d30" se refiere al "día 30".

La **Figura 36** ilustra esquemáticamente el flujo experimental de enriquecimiento de células RPE usando la clasificación de células CD140b/CD184- y CD140b+/G2- (Ejemplo 2).

La **Figura 37A y Figura 37B** ilustran esquemáticamente el flujo experimental del Ejemplo 1.

La **Figura 38** demuestra que CD59 se expresa significativamente en células madre no diferenciadas (hESC, paneles superiores), mientras que hESC diferenciadas en células RPE (hESC-RPE, paneles inferiores inferiores) expresan menos CD59.

Aunque se utilizan términos específicos en la siguiente descripción en aras de la claridad, estos términos pretenden referirse únicamente a la estructura particular de las realizaciones seleccionadas para ilustración en los dibujos, y no pretenden definir ni limitar el alcance de la divulgación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, el término "que comprende" puede incluir las realizaciones "que consiste en" y "que consiste esencialmente en". Los términos "comprende", "incluye", "tiene", "puede", "contiene" y sus variantes, tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, pretenden ser frases, palabras o términos de transición abiertos que requieren la presencia de los ingredientes/etapas nombrados y permiten la presencia de otros ingredientes/etapas. Sin embargo, dicha descripción debe interpretarse como que también describe composiciones o procesos como "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" los ingredientes/etapas enumerados, lo que permite la presencia únicamente de los ingredientes/etapas nombrados, junto con cualquier impureza que pueda resultar de los mismos, y excluye otros ingredientes/etapas.

Se debe entender que los valores numéricos en la memoria descriptiva y reivindicaciones de la presente solicitud incluyen valores numéricos que son los mismos cuando se reducen al mismo número de cifras significativas y valores numéricos que difieren del valor indicado en menos que el error experimental de la técnica de medición convencional del tipo descrito en la presente solicitud para determinar el valor.

Todos los intervalos divulgados en la presente memoria descriptiva incluyen el punto final citado y se pueden combinar de manera independiente (por ejemplo, el intervalo de "de 2 a 10" incluye los puntos finales, 2 y 10, y todos los valores intermedios).

El término "aproximadamente" se puede utilizar para incluir cualquier valor numérico que pueda variar sin cambiar la función básica de ese valor. Cuando se usa con un intervalo, "aproximadamente" también divulga el intervalo definido por los valores absolutos de los dos puntos finales, por ejemplo, "aproximadamente 2 a aproximadamente 4" también describe el intervalo "de 2 a 4". El término "aproximadamente" puede referirse a más o menos el 10% del número indicado.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "laminina-521" ("LN-521") se refiere a la proteína formada uniendo cadenas $\alpha 5$, $\beta 2$ y $\gamma 1$. El término debe interpretarse en el sentido de que abarca tanto la LN-521 recombinante como la LN-521 heterotrimérica de fuentes de origen natural.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "laminina-511" ("LN-511") se refiere a la proteína formada uniendo cadenas $\alpha 5$, $\beta 1$ y $\gamma 1$. El término debe interpretarse en el sentido de que abarca tanto la LN-511 recombinante como la LN-511 heterotrimérica de fuentes de origen natural.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "laminina-121" ("LN-121") se refiere a la proteína formada uniendo cadenas $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 1$. El término debe interpretarse en el sentido de que abarca tanto la LN-121 recombinante como la LN-121 heterotrimérica de fuentes de origen natural.

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "laminina-111" ("LN-111") se refiere a la proteína formada uniendo las cadenas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$. El término debe interpretarse en el sentido de que abarca tanto LN-111 recombinante como la LN-111 heterotrimérica de fuentes de origen natural.

10 El término "intacta" se refiere a que la proteína está compuesta por todos los dominios de la cadena α , la cadena β y la cadena γ , estando las tres cadenas unidas entre sí para formar la estructura heterotrimérica. La proteína no se descompone en cadenas, fragmentos o dominios funcionales separados. El término "cadena" se refiere a la totalidad de la cadena alfa, beta o gamma de la proteína laminina. El término "fragmento" se refiere a cualquier fragmento de proteína que contiene uno, dos o tres dominios funcionales que posee actividad de unión a otra molécula o receptor. Sin embargo, una cadena no debe considerarse un fragmento porque cada cadena posee más de tres de esos dominios. De manera similar, una proteína laminina intacta no debe considerarse un fragmento. Ejemplos de dominios funcionales incluyen los dominios I, II, III, IV, V, VI y el dominio G.

El término "*hrLN*" significa "laminina recombinante humana".

20 El término "*células RPE*" se refiere a células que tienen características de células RPE maduras. Ser "maduras" en el presente contexto incluye que las células RPE sean capaces de formar monocapas densas que exhiban pigmentación, actividad fagocítica, expresión de marcadores específicos del RPE BEST-1, CRALBP, RPE65 y secreción polarizada de VEGF y PEDF.

25 Los términos "*progenitores de células RPE*" o "*células RPE inducidas*" se refieren a células inmaduras que ya no son pluripotentes, que han adquirido una capacidad y tendencia a diferenciarse en una célula RPE (es decir, que han sido inducidas hacia el destino del RPE). Pueden compartir ciertas características específicas, como marcadores de superficie celular con células RPE maduras y otras características específicas con células madre pluripotentes. El término "inmaduras" se utiliza en este contexto en contraste con "maduras", indicando que las células han comenzado la diferenciación hacia células RPE maduras, pero aún no han adquirido todas las características de las células RPE maduras tal como se definen anteriormente.

30 La abreviatura "*hPSC*" significa "células madre pluripotentes humanas". Las abreviaturas "*hESC*" y "*hES*" significan "células madre embrionarias humanas", un subconjunto de hPSC. En el área de superposición, los términos pueden usarse indistintamente.

35 Las abreviaturas "*hPSC-RPE*" y "*hESC-RPE*" representan células RPE derivadas de hPSC y células RPE derivadas de hESC, respectivamente. Como resultará evidente en el presente contexto, estos términos generalmente se refieren a células RPE generadas *in vitro* a partir de células madre.

40 El término "*tratamiento*" en el presente contexto se refiere a tratamientos que resultan en un efecto beneficioso sobre un sujeto o paciente que padece la afección a tratar, incluyendo cualquier grado de alivio, incluyendo alivio menor, alivio sustancial, alivio mayor, así como curación. Preferentemente, el grado de alivio es al menos un alivio menor.

45 Descripción general de la divulgación

La presente invención se basa en parte en los resultados de un cribado integral de anticuerpos de la superficie celular que identifica marcadores positivos y negativos para células RPE (**Ejemplo 1**). Estos marcadores se pueden utilizar para enriquecer células RPE durante y después de la diferenciación, así como medidas cuantitativas para rastrear la diferenciación *in vitro*. Los inventores han identificado que CD140b (*PDGFR β*) se expresa en células RPE a medida que emergen durante las diferenciaciones *in vitro* en varias líneas celulares hES independientes y pueden identificar prospectivamente células RPE a partir de tipos celulares alternativos. CD140b/PDGFR β tiene funciones importantes en la regulación de muchos procesos biológicos, incluido el desarrollo embrionario, la angiogénesis, la proliferación y diferenciación celular, por lo que aparece altamente expresado en varios tejidos y tipos de células, como células vasculares, células deciduales o fibroblastos. Aunque CD140b no se expresa únicamente en células RPE, los inventores muestran que es específico de las células RPE en el marco de la diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes, ya que las células no diferenciadas son negativas para CD140b. CD140b como marcador fue validado aún más por el descubrimiento de que se expresa en células RPE endógenas de la retina y, curiosamente, se encontró que se expresa de manera polarizada y apical.

Aprovechando estos marcadores, los inventores han establecido una metodología de diferenciación directa y robusta que facilitará la fabricación a gran escala de células hPSC-RPE (**Ejemplo 2**, ilustrado esquemáticamente en la **Figura 35**). El análisis combinado del inventor usando citometría de flujo (en particular de CD140b junto

con TRA-1-60) sugirió que no había células pluripotentes persistentes en la población de células RPE obtenida usando el procedimiento inventivo de generación de RPE (**Ejemplo 2, Figuras 21A-21B, 22A-22B**). El análisis imparcial de secuenciación de ARN unicelular es muy eficaz para identificar impurezas conocidas y desconocidas. De acuerdo con la citometría de flujo, un análisis transcripcional global unicelular de más de 2000 células RPE generadas a partir de hESC con un procedimiento de la invención no identificó ninguna célula con propiedades transcripcionales de hESC no diferenciadas (**Ejemplo 3**). De hecho, la gran mayoría expresó perfiles transcripcionales robustos de células RPE, mientras que aproximadamente el 10% de las células se parecían a progenitores del campo ocular más inmaduros con expresión de *SIX3/6*, *PAX6*, *LHX2* y *OTX2*. Los datos transcripcionales mostraron niveles transcripcionales elevados de *NCAM1* en esta población progenitora, lo que se corroboró mediante tinción positiva en células con pigmentación baja o nula, lo que indica que NCAM1/CD56 puede ser un buen marcador para combinar con CD140b para evaluar la presencia de progenitores del campo ocular o RPE inmaduro.

Curiosamente, aproximadamente el 1% de las células expresaron genes asociados con el linaje del mesodermo tal como *MYOD1*. Si bien no se espera que las células del linaje del mesodermo sean ventajosas para aplicaciones de RPE, no es probable que una fracción tan baja del linaje del mesodermo tenga consecuencias funcionales en la práctica. Más bien, los resultados ilustran el poder de la secuenciación de ARN unicelular para identificar incluso impurezas menores de manera imparcial.

La selección positiva combinada para CD140b junto con la selección negativa para CD184 o GD2 eliminó eficientemente la contaminación del mesodermo y redujo la fracción de progenitores inmaduros, lo que demuestra que se puede implementar una etapa de clasificación/enriquecimiento para lograr un producto celular aún más homogéneo (**Ejemplo 3**).

El desarrollo de un protocolo de fabricación clínicamente compatible que permita la producción y el almacenamiento a gran escala de células RPE derivadas de hPSC se basa en varios aspectos, tales como componentes libres de xeno y químicamente definidos, reproducibilidad, proceso optimizado y altos rendimientos de producción. La presente invención muestra que las lamininas biológicamente relevantes soportan eficientemente la diferenciación directa en monocapa de hESC a RPE con un medio de cultivo clínicamente compatible, opcionalmente con la adición de Activina A. El efecto de la Activina A en la diferenciación de RPE en el nuevo procedimiento de generación de RPE estuvo en línea con informes anteriores.

El procedimiento de la invención, que utiliza un medio de cultivo basal junto con el cultivo en laminina relevante, es muy sólido (**Ejemplos 2, 3**) y traducible a múltiples líneas (**Ejemplo 4**). La etapa de disociación permite la eliminación de la diferenciación de EB que implica la disección manual de áreas pigmentadas, lo que hace que el protocolo sea mucho más ágil y susceptible de automatización en sistemas cerrados, ya que solo requiere cambios de medios y un pasaje masivo.

Un beneficio sorprendente de cambiar a la diferenciación en monocapa en las lamininas fue el aumento del rendimiento, con una expansión de hasta 8000 veces a partir del material de hPSC de partida. Teniendo en cuenta que los enfoques actuales de reemplazo celular para el tratamiento de la AMD utilizan una dosis de 100.000 a 200.000 células por ojo, el protocolo inventivo podría generar en 60 días células para tratar de 40.000 a 80.000 pacientes, a partir de un cultivo inicial de solo 1 millón de hPSC no diferenciadas.

En conclusión, la presente divulgación identifica varios marcadores de superficie celular (especialmente CD140b, CD56, CD184 y/o GD2) que juntos pueden usarse como ensayos de control de calidad cuantitativos para evaluar la maduración y la pureza de la diferenciación hPSC-RPE, así como para enriquecimiento positivo y negativo para generar una población de células RPE con pureza mejorada. Con la ayuda de estos marcadores para cuantificar el proceso de diferenciación, los inventores han establecido un proceso de diferenciación que puede utilizar componentes definidos y libres de xeno, no requiere una etapa de disociación selectiva y, por lo tanto, es susceptible de ser una fabricación industrial compatible con las GMP que permite la producción a gran escala y almacenamiento de células RPE derivadas de hPSC.

Procedimientos para obtener células del Epitelio Pigmentario de la Retina (RPE)

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), que comprende:

- a. proporcionar un cultivo de células madre pluripotentes humanas adherentes a un primer sustrato que comprende una primera laminina;
- b. exponer las células madre a un medio de diferenciación durante un primer período de tiempo de 15 a 50 días para obtener una primera población de células adherentes que comprende células RPE y/o progenitores de las mismas;
- c. al final del primer período de tiempo, disociar la primera población del primer sustrato;
- d. redistribuir en placas la primera población disociada de células sobre un segundo sustrato que

comprende una segunda laminina; y

e. cultivar la primera población de células redistribuidas en placas sobre el segundo sustrato durante un segundo período de tiempo para obtener una segunda población de células expandida y madura que comprende las células RPE;

en el que el procedimiento comprende cuantificar la fracción de células que expresan el marcador CD140b; y

en el que la etapa de disociación (c) se inicia cuando al menos el 30% de las células son **positivas** para el marcador y/o en el que la etapa de cultivo (e) continúa hasta que al menos el 80% de las células son **positivas** para el marcador.

Las células RPE se pueden obtener después de un total de 6 a 12 semanas, preferentemente de 8 a 10 semanas, más preferentemente aproximadamente 9 semanas o lo más preferentemente 60 a 66 días, contados desde el inicio del primer período de tiempo.

Sustratos

La primera y segunda lamininas para el primer aspecto se seleccionan independientemente de LN-521, LN-511, LN-111 y LN-121, y son una proteína intacta o un fragmento de proteína que tiene esencialmente la misma actividad que una proteína intacta.

Dado que las lamininas son proteínas multidominio muy grandes, ciertos fragmentos tienen esencialmente la misma actividad que una proteína intacta, siempre que los dominios relevantes se mantengan intactos. Por lo tanto, también se contempla el uso de fragmentos de laminina activa además de proteínas intactas.

La primera y segunda lamininas se pueden revestir en una cantidad de aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Preferentemente, el primer y/o segundo sustrato(s) están libres de xeno.

El primer y/o segundo sustratos pueden contener preferentemente sólo un único tipo de laminina.

En una combinación preferente, la primera laminina es LN-111 o LN-521 y la segunda laminina es LN-521. La primera y la segunda lamininas pueden ser ambas LN-521. Lo más preferentemente, la primera laminina es LN-111 y la segunda laminina es LN-521.

Preferentemente, tanto la primera como la segunda laminina son proteínas intactas.

Cultivo de células madre pluripotentes

En el procedimiento del primer aspecto, el cultivo de células madre pluripotentes puede proporcionarse a una densidad celular de aproximadamente $1,2 \times 10^4$ células/ cm^2 a aproximadamente $4,8 \times 10^4$ células/ cm^2 .

Antes de la exposición al medio de diferenciación, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo de células madre que comprende bFGF y/o TGFbeta. Antes de la exposición al medio de diferenciación, las células madre se pueden cultivar en un medio de cultivo de células madre que comprende bFGF o TGFbeta, y se puede incluir un inhibidor de Rho-quinasa en el medio de cultivo de células madre durante un período de tiempo de 12 a 48 h antes del inicio de la exposición al medio de diferenciación.

Las células madre pluripotentes pueden propagarse en estado no diferenciado, por ejemplo, sobre un sustrato LN-521 o LN-511 en un medio de cultivo de células madre que comprende bFGF y/o TGFbeta. Preferentemente, 12-48 h antes de la exposición al medio de diferenciación, las células madre pluripotentes se siembran a una densidad celular de aproximadamente $1,2 \times 10^4$ células/ cm^2 a aproximadamente $4,8 \times 10^4$ células/ cm^2 sobre el primer sustrato en un medio de cultivo de células madre que comprende bFGF y/o TGFbeta que además comprende un inhibidor de Rho-quinasa.

Se conocen en la técnica varios inhibidores de Rho-quinasa, por ejemplo, Y-27632 (número CAS 129830-38-2), tiazovivina, fasudil, GSK429286A, RKI-1447, etc. Usando una cantidad eficaz de un inhibidor de Rho-quinasa en un medio de cultivo de células madre aumenta la supervivencia de las células madre al bloquear la señalización apoptótica y, por lo tanto, en última instancia, aumenta el rendimiento de células RPE. El bloqueo de la señalización apoptótica con un inhibidor de Rho-quinasa es en particular útil en un período de tiempo posterior a la siembra de células madre pluripotentes en el primer sustrato (preferentemente a la densidad anterior), antes de la exposición al medio de diferenciación.

Las células madre pluripotentes son preferentemente células madre pluripotentes humanas. Las células madre pluripotentes pueden incluir células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias, células madre adultas, células madre fetales, células madre amnióticas y, en general, cualquier célula madre pluripotente.

Medio de diferenciación

El medio de diferenciación usado en un procedimiento de acuerdo con el primer aspecto puede ser un medio de cultivo de células madre desprovisto de cualquier composición para mantener las células madre en un estado pluripotente (es decir, un inhibidor de la diferenciación). Preferentemente, el medio de diferenciación está efectivamente desprovisto de bFGF y TGFbeta, ya que estos factores de crecimiento actuarían para prevenir la diferenciación y promover la proliferación de las células madre en un estado pluripotente.

Las células RPE se inducen espontáneamente a partir de células madre pluripotentes, cuando se retiran los factores de crecimiento que actúan para prevenir la diferenciación y promover la proliferación de las células madre en un estado pluripotente. En otras palabras, no es esencial agregar ningún factor específico al medio de diferenciación para inducir o promover el destino de las células RPE. Sin embargo, la Activina A se puede utilizar para aumentar significativamente el rendimiento de las células RPE promoviendo la inducción del destino de las células RPE.

Preferentemente, se incluye Activina A en el medio de diferenciación, en una cantidad eficaz para aumentar el rendimiento de células RPE. Más preferentemente, la Activina A se incluye en el medio de diferenciación en una concentración de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml. En cuanto al tiempo, la Activina A se incluye preferentemente en el medio de diferenciación no antes de un punto de tiempo de 4 a 8 días desde la exposición, preferentemente durante un período de tiempo que comienza desde 5 a 7 días desde la exposición y termina en el momento de la etapa de disociación. lo más preferentemente 6 días desde la exposición y terminando en el momento de la etapa de disociación.

La composición basal del medio de diferenciación puede ser cualquiera de los medios de cultivo celular conocidos adecuados para el cultivo y mantenimiento de células madre pluripotentes, siempre que se omita cualquier factor de crecimiento que actúe para prevenir la diferenciación y promover la proliferación de las células madre en un estado pluripotente. Preferentemente, el medio de diferenciación está libre de xeno y está químicamente definido. Un ejemplo de un medio de diferenciación es el medio Nutristem™ XF (Biological Industries) desprovisto de bFGF y TGFbeta.

Momento de las etapas de disociación y cultivo

En un procedimiento del primer aspecto, el momento de la etapa de disociación (desde el inicio de la exposición al medio de diferenciación) es importante. Por lo tanto, el primer período de tiempo es de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 días, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 días, más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 33 días, aún más preferentemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 días, lo más preferentemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 22 días. También preferentemente, no hay etapas de disociación adicionales entre el inicio de la diferenciación por exposición al medio de diferenciación (etapa (b)) y la disociación antes mencionada (etapa (c)). Sin embargo, opcionalmente pueden tener lugar etapas de disociación adicionales más adelante, cuando la población celular se haya expandido y deba pasarse o recolectarse.

El momento de la etapa de disociación/redistribución en placas discutida anteriormente es una característica importante de la presente invención. El momento óptimo permite que la disociación se lleve a cabo sin una engorrosa disección manual o disociación selectiva, lo que hace que el procedimiento sea más robusto y más adecuado para aplicaciones industriales (es decir, con fines clínicos). El momento óptimo también permite la combinación de altos rendimientos y alta pureza en un período de cultivo corto. Además de los costes, los períodos de cultivo prolongados generalmente no son deseables, ya que el riesgo de adquirir mutaciones no deseadas aumenta con el tiempo en el cultivo.

El procedimiento del primer aspecto puede comprender cuantificar el número o fracción de células que expresan un marcador seleccionado entre CD56, CD104, CD164, CD220 o EGFR, preferentemente CD140b o CD56, además de CD140b. Preferentemente, la etapa de disociación (c) se inicia cuando al menos el 30%, preferentemente al menos el 40%, más preferentemente al menos el 50%, lo más preferentemente al menos el 60% de las células son **positivas** para el marcador de la lista antes mencionada. La etapa de cultivo (e) puede continuar hasta que al menos el 80%, preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, lo más preferentemente al menos el 95% de las células sean positivas para el marcador.

El procedimiento del primer aspecto puede comprender cuantificar el número o fracción de células que expresan un marcador seleccionado entre GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60, TRA-1-60 o CD326, preferentemente GD2 o CD184. La etapa de disociación (c) se inicia preferentemente cuando al menos el 30%, preferentemente al menos el 40%, más preferentemente al menos el 50%, lo más preferentemente al menos el 60% de las células son **negativas** para el marcador de la lista antes mencionada. La etapa de cultivo (e) puede continuar hasta que al menos el 80%, preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, lo más preferentemente al menos el 95% de las células sean negativas para

el marcador.

El uso de los marcadores como se describió anteriormente es útil para determinar el momento óptimo para la disociación/redistribución en placas. Además de proporcionar un punto de control de calidad, los marcadores permiten adaptar y optimizar el momento de la disociación/redistribución en placas a las variaciones inevitables inherentes a diferentes lotes de cultivo celular.

Disociación

Preferentemente, la disociación de la primera población de células del primer sustrato se realiza de forma indiscriminada. En otras palabras, preferentemente no existe ningún sesgo particular, especialmente intencionado, hacia la disociación de un tipo de célula más o menos que otro. La presente invención es particularmente ventajosa porque se puede prescindir de la laboriosa etapa de disección manual utilizada en varios procedimientos de la técnica anterior para seleccionar células de vesículas ópticas pigmentadas. El procedimiento proporcionado tiene la ventaja de que no requiere necesariamente ningún tipo de selección de células durante todo el procedimiento (aunque en algunas realizaciones se pueden incluir opcionalmente etapas de selección).

La disociación de la primera población de células del primer sustrato puede implicar disociar sustancialmente todo el cultivo en una única suspensión de células. Preferentemente, la primera población disociada de células se redistribuye en placas sin ninguna selección.

Por ejemplo, todo el cultivo adherente se puede desalojar mecánicamente, químicamente o mediante una combinación de disociación mecánica y química. En principio, se puede utilizar cualquiera de los muchos procedimientos de disociación conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden someterse a tripsina, dispasa, EDTA, tripsina-EDTA, otras enzimas colagenolíticas y proteolíticas o similares durante un período de unos pocos minutos, para disociar las células del sustrato. La disociación se puede facilitar mecánicamente pipeteando suavemente o agitando suavemente el depósito de cultivo celular. A continuación, el agente de disociación puede inactivarse o eliminarse adecuadamente, dependiendo del tipo de agente.

Mientras que una disociación selectiva, por ejemplo, la disección manual de células pigmentadas no impediría como tal la generación de células RPE, sino que anularía más o menos muchas de las ventajas del presente procedimiento en el sentido de que aumentaría la mano de obra y reduciría el rendimiento celular.

La disociación del primer sustrato puede implicar la formación de una suspensión de células individuales de la primera población de células. Las células disociadas se vuelven a colocar preferentemente en placas sobre un segundo sustrato a una densidad celular de aproximadamente $1,4 \times 10^4$ células/cm² a aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células/cm².

Enriquecimiento opcional

Aunque es posible obtener una alta pureza incluso sin enriquecimiento, en algunos casos puede ser preferible usar ciertos marcadores de superficie celular para enriquecer la primera población de células junto con la disociación. Esto puede usarse para proporcionar solidez adicional al procedimiento y/o usarse como una etapa de rutina para reemplazar una verificación de control de calidad.

En un procedimiento de acuerdo con el primer aspecto, la primera población disociada de células puede enriquecerse (antes de redistribuirse en placas) mediante las etapas de:

- F1. marcar un marcador de superficie celular en una mezcla inicial de células; y
- F2. separar las células que son positivas para dicho marcador de superficie celular de las células que son negativas para dicho marcador de superficie celular para obtener una mezcla final que está más enriquecida en células RPE y/o progenitores de las mismas que la mezcla inicial.

La mezcla inicial de células pueden ser las células disociadas en la etapa (c), y luego la mezcla final se redistribuye en placas en la etapa (d).

Dicho marcador de superficie celular se puede seleccionar entre CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220, CD165 y EGFR, preferentemente CD140b o CD56. Si el marcador se selecciona del grupo antes mencionado, las células positivas para dicho marcador de superficie celular se seleccionan para la población enriquecida de células que forman la mezcla final que se va a redistribuir en placas.

El marcador de superficie celular también se puede seleccionar entre GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 y CD326, preferentemente GD2 o CD184. Si el marcador se selecciona del grupo antes mencionado, las células negativas para dicho marcador de superficie celular se seleccionan para la

población enriquecida de células que forman la mezcla final que se va a redistribuir en placas. Esto se puede lograr eliminando de la mezcla final las células positivas para dicho marcador de superficie celular.

Expansión y maduración

Después de la etapa de redistribución en placas, la primera población de células (que opcionalmente se enriqueció como se analizó anteriormente) se cultiva adicionalmente en el segundo sustrato durante un segundo período de tiempo. Como medio de cultivo, se puede utilizar un medio de diferenciación como el discutido anteriormente. La Activina A generalmente ya no es útil, ya que en este punto el destino del RPE ya ha sido inducido.

Durante este cultivo continuo, la población de células redistribuidas en placas se expande y madura aún más formando una segunda población de células que comprende las células RPE deseadas. La pureza de la segunda población se puede evaluar, por ejemplo, usando marcadores de superficie celular conocidos en la técnica y divulgados en la presente memoria descriptiva o usando secuenciación de ARN de células individuales.

La segunda población comprende preferentemente al menos 70%, más preferentemente al menos 80%, aún más preferentemente al menos 90%, aún más preferentemente al menos 95%, lo más preferentemente al menos 97% de células RPE.

La segunda población comprende preferentemente no más del 30%, más preferentemente no más del 20%, aún más preferentemente no más del 10%, aún más preferentemente no más del 5%, lo más preferentemente no más del 3% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE.

La segunda población comprende preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5%, aún más preferentemente menos del 3%, aún más preferentemente menos del 2%, incluso más preferentemente menos del 1%, lo más preferentemente menos del 0,5% de células del linaje mesodérmico.

Se prefiere particularmente que la segunda población comprenda al menos un 70% de células RPE, menos del 30% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 10% de células del linaje mesodérmico. Más preferentemente, la segunda población comprende al menos un 80% de células RPE, menos del 20% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 5% de células del linaje mesodérmico. Aún más preferentemente, la segunda población comprende al menos un 90% de células RPE, menos del 10% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 5% de células del linaje mesodérmico. Aún más preferentemente, la segunda población comprende al menos un 95% de células RPE, menos del 5% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 1% de células del linaje mesodérmico. Más preferentemente, la segunda población comprende al menos un 95% de células RPE, menos del 3% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 0,5% de células del linaje mesodérmico.

Las células RPE obtenidas se pueden recolectar, por ejemplo, disociando las células, como se describió anteriormente.

La duración del segundo período de tiempo (es decir, cultivo después de la disociación para obtener las células RPE) puede ser de al menos 15 días, más preferentemente de al menos 20 días, aún más preferentemente de al menos 25 días, lo más preferentemente de al menos 30 días. El segundo período de tiempo puede ser de 15 a 60 días, preferentemente de 20 a 50 días, más preferentemente de 25 a 40 días, lo más preferentemente de 30 a 35 días. En duraciones más cortas, la segunda población contendrá una fracción mayor de células inmaduras, lo que puede ser deseable para algunas aplicaciones y, a la inversa, duraciones más largas proporcionarán una población con una fracción mayor de células maduras, que puede ser deseable en otras aplicaciones.

Se prefiere particularmente que la segunda población resultante sea como se especifica para el segundo aspecto a continuación.

Población de células RPE generadas *in vitro* y usos de las mismas

En un segundo aspecto de la presente divulgación, se describe (pero no se reivindica) una población de células RPE obtenida o que se puede obtener mediante el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto. En un aspecto adicional de la presente divulgación, se describen (pero no se reivindican) células RPE obtenidas o que se pueden obtener mediante el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto.

La población de células RPE comprende preferentemente al menos un 70%, más preferentemente al menos un 80%, aún más preferentemente al menos un 90%, aún más preferentemente al menos un 95%, lo más preferentemente al menos un 97% de células RPE.

La población de células RPE comprende preferentemente no más del 30%, más preferentemente no más del 20%, aún más preferentemente no más del 10%, aún más preferentemente no más del 5%, lo más preferentemente no más del 3% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE.

- 5 La población de células RPE comprende preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5%, aún más preferentemente menos del 3%, aún más preferentemente menos del 2%, incluso más preferentemente menos del 1%, lo más preferentemente menos del 0,5% de células del linaje mesodérmico.

- 10 Se prefiere particularmente que la población de células RPE comprenda al menos un 70% de células RPE, menos del 30% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 10% de células del linaje mesodérmico. Más preferentemente, la población de células RPE comprende al menos un 80% de células RPE, menos del 20% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 5% de células del linaje mesodérmico. Aún más preferentemente, la población de células RPE comprende al menos un 90% de células RPE, menos del 10% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 5% de células del linaje mesodérmico. Aún más preferentemente, la población de células RPE comprende al menos un 95% de células RPE, menos del 5% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 1% de células del linaje mesodérmico. Más preferentemente, la población de células RPE comprende al menos un 95% de células RPE, menos del 3% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 0,5% de células del linaje mesodérmico.

- 20 La población de células RPE del segundo aspecto puede usarse en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (aunque no se reivindica dicho procedimiento o uso). El tratamiento puede comprender inyectar las células de dicha población de células RPE en un ojo del paciente que va a ser tratado por degeneración macular relacionada con la edad.

- 25 La población de células RPE del segundo aspecto puede usarse en el tratamiento de la distrofia macular de Stargardt (SMD) (aunque no se reivindica dicho procedimiento o uso). El tratamiento puede comprender inyectar las células de dicha población de células RPE en un ojo del paciente que va a ser tratado por distrofia macular de Stargardt (SMD).

- 30 La inyección administra preferentemente aproximadamente 50.000-400.000 de las células RPE (más preferentemente aproximadamente 100.000 a 200.000) al ojo.

Procedimientos para enriquecer células RPE o progenitores de células RPE en una mezcla de células

- 35 En un tercer aspecto de la presente divulgación, se describe, pero no se reivindica, un procedimiento para enriquecer células RPE o progenitores de células RPE en una mezcla de células, que comprende:

- 40 a. marcar un marcador de superficie celular en una mezcla inicial de células RPE o progenitores de células RPE; y
b. separar las células que son positivas para dicho marcador de superficie celular de las células que son negativas para dicho marcador de superficie celular para obtener una mezcla final de células RPE o progenitores de células RPE que está más enriquecida en células RPE o progenitores de células RPE en comparación con la mezcla inicial; en la que dicho marcador de superficie celular es CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220, CD165, EGFR, GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 o CD326.

- 50 El procedimiento del tercer aspecto puede comprender seleccionar células positivas para CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220, CD165 y/o EGFR, preferentemente CD140b y/o CD56, más preferentemente CD140b, para la mezcla final enriquecida de células. Como lo demuestran los Ejemplos adjuntos, estos marcadores son capaces de distinguir células madre pluripotentes de progenitores de células RPE o células RPE. Preferentemente, se usan 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de estos marcadores para la selección celular positiva.

- 55 Además, o alternativamente, el procedimiento del tercer aspecto puede comprender seleccionar células negativas para GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 y/o CD326, preferentemente GD2 y/o CD184, para la mezcla final enriquecida de células. Como lo demuestran los ejemplos adjuntos, estos marcadores son capaces de distinguir células madre pluripotentes de progenitores de células RPE o células RPE. Preferentemente, se usan 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de estos marcadores para la selección celular negativa.

- 60 Preferentemente, se usan dos o más marcadores seleccionados de CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220, CD165 y/o EGFR, preferentemente CD140b y CD56 para la selección positiva, en combinación con el uso de dos o más marcadores seleccionados de GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 y/o CD326, preferentemente GD2 y CD184 para selección negativa.

65

Preferentemente, el procedimiento del tercer aspecto comprende seleccionar células que son positivas para CD140b y negativas para GD2 para la mezcla final enriquecida de células.

5 Preferentemente, el procedimiento del tercer aspecto comprende seleccionar células que son positivas para CD140b y negativas para CD184 para la mezcla final enriquecida de células.

La mezcla final enriquecida de células comprende preferentemente al menos 70%, más preferentemente al menos 80%, aún más preferentemente al menos 90%, aún más preferentemente al menos 95%, lo más preferentemente al menos 97% de células RPE.

10

La mezcla final enriquecida de células comprende preferentemente no más del 30%, más preferentemente no más del 20%, aún más preferentemente no más del 10%, aún más preferentemente no más del 5%, lo más preferentemente no más del 3%, de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE.

15

La mezcla final enriquecida de células comprende preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5%, aún más preferentemente menos del 3%, aún más preferentemente menos del 2%, incluso más preferentemente menos del 1%, lo más preferentemente menos del 0,5% de células de linaje mesodérmico.

20

Se prefiere particularmente que la mezcla final enriquecida de células comprenda al menos un 70% de células RPE, menos del 30% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 10% de células del linaje mesodérmico. Más preferentemente, la mezcla final enriquecida de células comprende al menos un 80% de células RPE, menos de un 20% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos de un 5% de células del linaje mesodérmico. Aún más preferentemente, la mezcla final enriquecida de células comprende al menos un 90% de células RPE, menos del 10% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 5% de células del linaje mesodérmico. Aún más preferentemente, la mezcla final enriquecida de células comprende al menos un 95% de células RPE, menos de un 5% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos de un 1% de células del linaje mesodérmico. Más preferentemente, la mezcla final enriquecida de células comprende al menos un 95% de células RPE, menos del 3% de células progenitoras del campo ocular no pertenecientes al RPE y menos del 0,5% de células del linaje mesodérmico.

30

Aunque se puede utilizar cualquier técnica de marcaje conocida en la técnica, el marcaje se realiza preferentemente utilizando un anticuerpo dirigido al marcador de la superficie celular.

35

Mezcla de células RPE y usos de la misma

En un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona, pero no reivindica, una mezcla de células RPE obtenida o que se puede obtener mediante un procedimiento de acuerdo con el tercer aspecto. La mezcla de células RPE puede usarse en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad o la distrofia macular de Stargardt (aunque no se reivindica tal procedimiento o uso). El tratamiento puede comprender inyectar las células en un ojo del paciente que va a ser tratado por degeneración macular relacionada con la edad o distrofia macular de Stargardt.

40

La inyección administra preferentemente aproximadamente 50.000-400.000 de las células RPE (más preferentemente aproximadamente 100.000 a 200.000) al ojo.

45

Procedimientos para analizar un cultivo celular *in vitro* que comprende células RPE maduras

Como quinto aspecto, la presente divulgación describe pero no reivindica un procedimiento para analizar un cultivo celular *in vitro* que comprende células RPE maduras, progenitores de células RPE y/o células madre no diferenciadas (en particular células madre pluripotentes), que comprende cuantificar el número o fracción de células que expresan uno o más marcadores de superficie celular seleccionados de CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220, EGFR, GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 y CD326, preferentemente CD140b, CD56, GD2 y/o CD184, lo más preferentemente CD140b.

50

La expresión de CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220 y/o EGFR, preferentemente CD140b y/o CD56, puede considerarse indicativa de la presencia de células RPE maduras o progenitores de células RPE. Preferentemente, se usan 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de estos marcadores en combinación para el análisis.

55

La expresión de GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 y/o CD326, preferentemente GD2 y/o CD184, puede considerarse indicativa de células precursoras no diferenciadas. Preferentemente, se usan 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de estos marcadores en combinación para el análisis.

60

Preferentemente, se usan dos o más marcadores seleccionados de CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220, CD165 y/o EGFR, preferentemente CD140b y CD56 para cuantificar células en el procedimiento del quinto

65

aspecto, en combinación con el uso de dos o más marcadores seleccionados de GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 y/o CD326, preferentemente GD2 y CD184.

5 Preferentemente, el procedimiento del quinto aspecto comprende cuantificar células que son positivas para CD140b y negativas para GD2.

Preferentemente, el procedimiento del quinto aspecto comprende cuantificar células que son positivas para CD140b y negativas para CD184 para la primera población de células enriquecida.

10 Procedimientos adicionales para obtener células del Epitelio Pigmentario de la Retina (RPE)

El sexto aspecto de la presente divulgación describe pero no reivindica un procedimiento para obtener células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), que comprende:

15 cultivar una o más células madre pluripotentes humanas sobre un primer sustrato que comprende una única primera laminina, en el que la laminina es una proteína intacta o un fragmento de proteína;
exponer las células madre a un primer medio de cultivo celular durante un primer período de tiempo, en el que el primer medio de cultivo celular mantiene la pluripotencia;
20 retirar el primer medio de cultivo celular y exponer las células madre a un segundo medio de cultivo celular durante un segundo período de tiempo de 3 días a 12 días, en el que el segundo medio de cultivo celular es un medio de diferenciación y no contiene factores de crecimiento;
retirar el segundo medio de cultivo celular y exponer las células madre a un tercer medio de cultivo celular que contiene un factor de crecimiento que es Activina A, durante un tercer período de tiempo de 18 días a 35 días para obtener células RPE inducidas;
25 redistribuir en placas las células RPE inducidas sobre un segundo sustrato que comprende una única segunda laminina; y
cultivar las células RPE inducidas en el segundo sustrato durante 14 días a 28 días para obtener las células RPE, en el que el tiempo total para la diferenciación oscila entre 42 días y 70 días.

30 La primera laminina única y la segunda laminina única del sexto aspecto pueden ser independientemente laminina-521, laminina-511, laminina-121 o laminina-111. En una combinación preferente, la primera laminina puede ser LN-111 o LN-521 y la segunda laminina LN-521. La primera y segunda lamininas pueden ser ambas LN-521. Lo más preferentemente, la primera laminina es LN-111 y la segunda laminina LN-521.

35 La primera laminina única y la segunda laminina única pueden revestirse a una concentración de aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La primera laminina y la segunda laminina son preferentemente lamininas recombinantes.

40 El primer medio de cultivo celular puede comprender un inhibidor de Rho-quinasa que está presente en el primer medio de cultivo celular en una concentración de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 20 μM . El primer medio de cultivo celular puede comprender al menos un factor de crecimiento. El al menos un factor de crecimiento en el primer medio de cultivo celular puede comprender bFGF y TGF β .

45 Preferentemente, el segundo medio de cultivo celular no contiene factores de crecimiento ni un inhibidor de Rho-quinasa. La Activina A puede estar presente en una concentración de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml.

50 El tercer medio de cultivo celular comprende una cantidad eficaz de Activina A, preferentemente de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml. Preferentemente, el tercer medio de cultivo celular no contiene otros factores de crecimiento además de Activina A (en particular, está desprovisto de bFGF y TGF β). También preferentemente, el tercer medio de cultivo celular no contiene un inhibidor de Rho-quinasa.

55 Preferentemente, el primer medio de cultivo celular, el segundo medio de cultivo celular y el tercer medio de cultivo celular no contienen ningún inhibidor de diferenciación, células alimentadoras o inhibidores de la apoptosis.

60 Preferentemente, las células madre se distribuyen en placas sobre el primer sustrato a una densidad celular de aproximadamente $1,2 \times 10^4$ células/ cm^2 a $4,8 \times 10^4$ células/ cm^2 . Las células RPE inducidas se pueden distribuir en placas sobre el segundo sustrato a una densidad celular de aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células/ cm^2 a aproximadamente $1,4 \times 10^4$ células/ cm^2 .

Aspectos particulares

65 En un séptimo aspecto, la presente divulgación se refiere a procedimientos de cultivo de células madre para obtener células del epitelio pigmentario de la retina (RPE). Los procedimientos del séptimo aspecto sólo se

reivindican en la medida en que entran dentro del alcance de la reivindicación 1. Las células madre se cultivan en un primer sustrato de LN-521, LN-511, LN-121 o LN-111 y luego se diferencian. Luego, las células diferenciadas se redistribuyen en placas en un segundo sustrato de LN-521, LN-511, LN-121 o LN-111. También se utilizan medios de cultivo celular específicos. Se contempla específicamente que el primer y segundo sustratos
 5 contengan cada uno sólo una laminina particular (es decir, una única laminina), aunque también pueden estar presentes otros ingredientes en el sustrato. El término "única" se utiliza para indicar que sólo una laminina está presente en el sustrato.

Las células diferenciadas usualmente requieren dos cosas para sobrevivir y reproducirse: (1) un sustrato o revestimiento que proporcione un soporte estructural para la célula; y (2) un medio de cultivo celular para proporcionar nutrición a la célula. El sustrato o revestimiento (1) usualmente se forma como una capa en un depósito, por ejemplo, una placa de Petri o en el pocillo de una placa de múltiples pocillos. La aplicación de diferentes medios de cultivo celular a intervalos de tiempo apropiados en combinación con los sustratos que
 10 contienen una única laminina da como resultado células RPE maduras.

Las células madre utilizadas con los procedimientos y materiales descritos en el séptimo aspecto son células madre pluripotentes humanas. Dichas células madre pueden incluir células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias, células madre adultas, células madre fetales, células madre amnióticas y, en general, cualquier célula madre pluripotente.
 15

Inicialmente, las células madre pluripotentes se distribuyen en placas sobre un primer sustrato de cultivo celular. Después de exponerse a tres medios de cultivo celular diferentes, las células se redistribuyen en placas en un segundo sustrato de cultivo celular. Las células madre se pueden distribuir en placas sobre la superficie del sustrato de cultivo celular para obtener cultivos monocapa convencionales (es decir, bidimensionales o 2D).
 20

Ambos sustratos del séptimo aspecto comprenden preferentemente una única laminina, que es LN-111, LN-121, LN-511 o LN-521. Cada laminina puede ser una proteína intacta o un fragmento de proteína que tenga esencialmente la misma actividad que una proteína intacta, aunque en realizaciones preferentes las lamininas son proteínas intactas. La laminina puede estar presente en una concentración de aproximadamente 5 µg/cm² a aproximadamente 20 µg/cm², y en realizaciones más específicas una concentración de aproximadamente 5,3 µg/cm² a aproximadamente 15,8 µg/cm². LN-521 y LN-111 activan las integrinas α6β1, lo que a su vez conduce a la activación de la vía PI3K/Akt. El primer y segundo sustratos de cultivo celular se usan en combinación con múltiples medios de cultivo celular para obtener las células RPE deseadas. En el procedimiento del séptimo aspecto se utilizan tres medios de cultivo celular diferentes, que se describen a continuación.
 25

El primer medio de cultivo celular mantiene la pluripotencia y favorece la proliferación celular. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo celular puede contener un inhibidor de la proteína quinasa asociada a Rho (es decir, Rho-quinasa o ROCK). El inhibidor de ROCK puede estar presente en una concentración de aproximadamente 5 µM a aproximadamente 20 µM). Un ejemplo de inhibidor de ROCK es Y-27632 (Millipore). El primer medio de cultivo celular también puede contener al menos un factor de crecimiento. El primer medio de cultivo celular puede incluir factores de crecimiento bFGF y TGFβ. Las cantidades de estos factores de crecimiento son relativamente bajas. Por ejemplo, la concentración de bFGF puede variar desde más de cero hasta aproximadamente 4 ng/ml, y la concentración de TGFβ es inferior a 5 ng/ml. Por ejemplo, el primer medio de cultivo celular puede ser el medio Nutristem™ XF (Biological Industries), que contiene bFGF y TGFβ, que se complementa con un inhibidor de ROCK.
 30
 35

El segundo medio de cultivo celular puede considerarse un medio de diferenciación. En algunas realizaciones, el segundo cultivo celular no contiene un inhibidor de ROCK. Además, el segundo medio de cultivo celular no contiene factores de crecimiento, tales como bFGF o TGFβ. Un ejemplo de un segundo medio de cultivo celular adecuado es el medio Nutristem™ XF sin bFGF o TGFβ (y no suplementado con un inhibidor de ROCK).
 40
 45

El tercer medio de cultivo celular contiene un factor de crecimiento. Sin embargo, el factor de crecimiento en el tercer medio de cultivo celular es diferente de los factores de crecimiento que pueden estar presentes en el primer medio de cultivo celular. Por ejemplo, el factor de crecimiento puede ser Activina A, que puede estar presente en una concentración de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml. Un ejemplo de un tercer medio de cultivo celular adecuado es el medio Nutristem™ XF al que se le ha añadido Activina A (y sin bFGF o TGFβ).
 50
 55

Las células madre primero se distribuyen en placas sobre el primer sustrato de cultivo celular que comprende una única laminina, como se describió anteriormente. Las células madre se pueden distribuir en placas sobre el primer sustrato a una densidad celular de aproximadamente 1,2 × 10⁴ células/cm² a 4,8 × 10⁴ células/cm².
 60

Luego, las células madre se exponen al primer medio de cultivo celular durante un primer período de tiempo de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 48 horas, incluyendo aproximadamente 24 horas (es decir, dos días). Las células madre usualmente se mantienen a 37 °C, atmósfera con 5% de CO₂ y 5% de O₂.
 65

A continuación, se retira el primer medio de cultivo celular y se aplica el segundo medio de cultivo celular a las células madre distribuidas en placas. Las células madre se exponen al segundo medio de cultivo celular durante un segundo período de tiempo de aproximadamente 72 horas (3 días) a aproximadamente 288 horas (12 días), incluyendo aproximadamente 144 horas (6 días). El medio se puede cambiar periódicamente si se desea.

A continuación, se retira el segundo medio de cultivo celular y se aplica el tercer medio de cultivo celular a las células madre distribuidas en placas. Las células madre se exponen al tercer medio de cultivo celular durante un tercer período de tiempo de aproximadamente 432 horas (18 días) a aproximadamente 1176 horas (49 días), incluidas aproximadamente 840 horas (35 días). El medio se puede cambiar periódicamente si se desea. Después de la exposición al tercer medio de cultivo celular, estas células pueden considerarse células RPE inducidas.

Luego se retira el tercer medio de cultivo celular y las células RPE inducidas se redistribuyen en placas en el segundo sustrato de cultivo celular, que también contiene una única laminina (LN-111, LN-121, LN-511 o LN-521). Las células RPE inducidas se pueden redistribuir en placas, por ejemplo, tripsinizando las monocapas del primer sustrato de cultivo celular usando un medio sin inhibidor ROCK o factores de crecimiento (por ejemplo, el segundo medio de cultivo celular) y luego formando una suspensión de células individuales que se puede usar para sembrar el segundo sustrato de cultivo celular. Las células RPE inducidas se pueden distribuir en placas sobre el segundo sustrato a una densidad celular de aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células/cm² a aproximadamente $1,4 \times 10^4$ células/cm².

Luego, las células madre se exponen al segundo medio de cultivo celular (es decir, sin inhibidor ROCK ni factores de crecimiento) en el segundo sustrato durante un cuarto período de tiempo de aproximadamente 336 horas (14 días) a aproximadamente 2400 horas (100 días), incluyendo aproximadamente 672 horas (28 días). El medio se puede cambiar periódicamente si se desea.

Preferentemente, el protocolo de diferenciación puede dar como resultado un tiempo total de aproximadamente nueve (9) semanas desde el comienzo de la diferenciación hasta la maduración de las células RPE resultantes. También preferentemente, el tiempo total para la diferenciación puede variar desde aproximadamente 6 semanas (42 días) hasta aproximadamente 10 semanas (70 días). La diferenciación de células madre a las células RPE deseadas se puede identificar mediante la regulación positiva o negativa de diversos marcadores, como se describe en los ejemplos.

Los procedimientos del séptimo aspecto de la presente divulgación proporcionan una diferenciación definida y libre de xeno de células RPE en monocapas sin disección manual que permite una producción fácil y altamente escalable según las GMP. La purificación basada en anticuerpos de células epiteliales del pigmento de la retina se puede utilizar durante la producción de células epiteliales del pigmento de la retina a partir de células madre pluripotentes (por ejemplo, para enriquecimiento del RPE, fines de control de calidad, etc.). También se describen en la presente memoria descriptiva los criterios de liberación y control de calidad para la pureza de las células epiteliales del pigmento de la retina. El aislamiento de células nativas del RPE también se puede utilizar para trasplantes autólogos o alogénicos.

Estos protocolos 2D robustos y reproducibles que utilizan LN-111, LN-121, LN-511 o LN-521 recombinantes humanos permitirán la inducción fácil y eficiente de un alto rendimiento de células hPSC-RPE, y los marcadores de superficie celular permiten un control de calidad sensible a nivel unicelular y pueden usarse aún más para la purificación y evaluación de células RPE resultantes de protocolos de diferenciación *in vitro*, lo que reducirá la variabilidad de un lote a otro y aumentará el nivel de seguridad del producto final para usar en trasplantes en pacientes con AMD.

Como octavo aspecto, en la presente memoria descriptiva se describen diversos procedimientos de uso de marcadores de superficie celular, que se han identificado como marcadores de selección positivos o negativos para células RPE. Los procedimientos del séptimo y octavo aspectos sólo se reivindican en la medida en que entran dentro del alcance de la reivindicación 1. Los marcadores de selección positiva incluyen CD140b, CD104, CD164, CD220 o EGFR. Los marcadores de selección negativa incluyen GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 o CD326. Estos marcadores de superficie celular se pueden usar, por ejemplo, para enriquecer células RPE en una mezcla de células. El marcador de superficie celular se marca en una mezcla inicial de células; y luego se separan las células que son positivas para dicho marcador de superficie celular de las células que son negativas para dicho marcador de superficie celular para obtener una mezcla final que está más enriquecida en células RPE.

Como noveno aspecto, en la presente memoria descriptiva se divulgan (pero no se reivindican) procedimientos para tratar a un paciente que tiene degeneración macular, que comprenden: inyectar células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) en un ojo del paciente; en el que las células RPE se han obtenido a partir de células madre en condiciones completamente definidas químicamente y libres de xeno. Las células RPE se pueden obtener de conformidad con los procedimientos del séptimo aspecto descrito anteriormente.

Los aspectos primero a noveno descritos anteriormente están relacionados entre sí. Cualquier descripción de parámetros, ingredientes, intervalos, etc. particulares proporcionada en cualquiera de los aspectos debe considerarse aplicable también a los otros ocho aspectos.

5 Declaraciones generales sobre la presente divulgación

Se puede obtener una comprensión más completa de las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Estas figuras son simplemente representaciones esquemáticas basadas en la conveniencia y la facilidad de demostrar la presente divulgación y, por lo tanto, no pretenden definir ni limitar el alcance de las realizaciones ejemplares.

La disposición de la presente divulgación en secciones con títulos y subtítulos es simplemente para mejorar la legibilidad y no debe interpretarse como limitante de ninguna manera, en particular, la división no impide ni limita de ninguna manera la combinación de características bajo diferentes títulos y subtítulos entre sí.

La presente divulgación se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos de trabajo no limitantes, entendiéndose que estos ejemplos pretenden ser solo ilustrativos y que la divulgación no pretende limitarse a los materiales, condiciones, parámetros del proceso y similares tal como se recita en la presente memoria. A otros expertos en la técnica se les ocurrirán modificaciones y alteraciones al leer y comprender la descripción detallada anterior. Se pretende que se interprete que la presente divulgación incluye todas esas modificaciones y alteraciones en la medida en que entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no deben considerarse limitativos. Para obtener más información sobre los detalles experimentales, el lector experto en la técnica debe consultar una sección separada titulada Materiales y Procedimientos.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1: Identificación de Marcadores Celulares

Con el objetivo de encontrar nuevos marcadores de superficie para células RPE derivadas de hPSC (hPSC-RPE), se utilizó un protocolo publicado previamente para diferenciar hPSC en células RPE usando diferenciación de cuerpo embrioide (EB) 3D (Plaza-Reyes et al. *supra*). Después de 5 semanas de cultivo, emergen vesículas ópticas (OV) de los EB que contienen células RPE pigmentadas mezcladas con otros tipos de células. Las OV se aislaron manualmente y la expresión de los marcadores de la superficie celular se comparó con células madre embrionarias humanas no diferenciadas (hESC) usando una biblioteca de anticuerpos que reconoce 242 antígenos CD (BD Biosciences 560747) con citometría de flujo (consulte la **Figura 37A** para un diagrama esquemático, y la **Figura 3** y la **Tabla 2** para los resultados del cribado).

El cribado identificó subconjuntos de marcadores de superficie celular expresados en ambos tipos de células y específicos para las OV o las hESC. Se ha sugerido que CD59 es un marcador de RPE útil, pero tanto el presente cribado como los datos de inmunotinción muestran que se expresa tanto en RPE como en células madre embrionarias no diferenciadas, lo que lo hace menos adecuado (**Figuras 3 y 4 y 38** de la presente divulgación). De acuerdo con las OV que consisten en varios tipos de células, no se detectó un etiquetado homogéneo de todas las células en la muestra de OV. En cambio, los marcadores específicos de OV etiquetaron una fracción de las células, lo que sugiere que marcan diferentes tipos de células dentro de las OV disecados. Para identificar marcadores que podrían ser específicos del RPE y aquellos que pueden etiquetar linajes alternativos, se realizó una segunda selección, esta vez utilizando cultivos de diferenciación en etapa terminal más maduros que previamente demostramos que eran altamente puros en un estudio previo descrito en Plaza-Reyes et al. *supra*. Consulte la **Figura 37B** para ver un diagrama esquemático y la **Figura 4** y la **Tabla 3** para ver resultados del cribado.

Tabla 1. Resumen de los datos de cribado

Proteína de la Superficie Celular	Nombre	Otros nombres	hPSC	OV	RPE
CD10	Metaloendopeptidasa de membrana	CALLA, NEP, SFE, CMT2T, SCA43	X		
CD30	Superfamilia de receptores de TNF, miembro 8 (TNFRSF8)	D1S166E, Ki-1	X		
CD49a	Integrina alfa 1	ITGA1, VLA1	X		
CD49b	Integrina alfa 2	ITGA2, BR, GPIa, HPA-5, VLA-2, VLAA2	X		
CD50	Molécula de adhesión intercelular 3	ICAM3, CDW50, ICAM-R	X		

5	CD104	Integrina beta 4	ITGB4, GP150			X
	CD140b	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo beta	IBGC4, IMF1, JTK12, PDGFR, PDGFR-1, PDGFR1, KOGS, PENTT		X	X
	CD164	Proteína central de sialomucina 24	MGC-24, MUC-24, endolina, DFNA66		X	X
	CD171	Molécula de adhesión celular L1	L1CAM, CAML1, HSAS, HSAS1, MASA, MIC5, NCAM-L1, S10, SPG1	X		
	CD184	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4	D25201E, FB22, HM89, HSY3RR, LAP-3, LAP3, LCR1, LESTR, NPY3R, NPYR, NPYRL, NPY3R, WHIM, WHIMS		X	
10	CD220	Receptor de insulina	IR, INSR, HHF5			X
	CD326	Molécula de adhesión de células epiteliales	DIAR5, EGP-2, EGP314, EGP40, ESA, HNPCC8, KS1/4, KSA, M4S1, MIC18, MK-1, TACSTD1, TROP1	X		
	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	ERBB, ERBB1, HER1, NISBD2, PIG61, Mena			X
20	GD2	Gangliósido GD2	Disialogangliósido GD2		X	

Tabla 2. Datos subyacentes a la Figura 3

25	Marcador de Superficie	hESC		OV	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
30	CD1a	2,08%	34	4,93%	29,1
	CD1b	0,20%	21	0,37%	16,1
	CD1d	0,80%	30,1	0,86%	16,6
	CD2	0,22%	20,5	0,20%	17,9
	CD3	0,24%	20	0,24%	15,4
35	CD4	3,03%	39,3	0,24%	18,2
	CD4v4	0,49%	27,8	0,32%	17,9
	CD5	0,46%	21,5	0,26%	17,4
40	CD6	0,32%	23,1	0,40%	17,7
	CD7	4,06%	48,9	1,20%	24,9
	CD8a	0,17%	20,2	0,15%	14,1
	CD8b	0,46%	15,9	0,32%	12,5
45	CD9	99,10%	1828	53,60%	191
	CD10	50,80%	160	2,86%	16,9
	CD11a	1,23%	20,2	0,87%	15,1
	CD11b	0,23%	20,8	0,15%	15,4
	CD11c	0,24%	20	0,21%	14,8
50	CD13	16,70%	78,4	1,63%	18,7
	CD14	0,23%	19,5	0,17%	15,1
	CD15	1,07%	25,9	29,30%	73,2
	CD15s	0,30%	22,6	0,14%	15,6
55	CD16	0,07%	20,5	0,15%	15,9
	CD18	0,30%	19,5	0,26%	13,6
	CD19	0,21%	13,8	0,11%	12,5
	CD20	0,33%	19,2	0,29%	14,8
60	CD21	5,08%	58,1	1,34%	27,2
	CD22	0,06%	18,7	0,28%	13,8
	CD23	0,21%	20,8	0,17%	15,4

ES 2 959 705 T3

	Marcador de Superficie	hESC		OV	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD24	100%	52869	90,50%	1664
	CD25	0,83%	21,8	0,53%	16,6
	CD26	2,05%	52,4	1,98%	27,5
	CD27	0,29%	21,8	0,16%	16,9
10	CD28	0,22%	21,8	0,24%	18,2
	CD29	87,90%	354	43,20%	135
	CD30	94,80%	713	0,15%	16,1
15	CD31	0,33%	17,9	2,24%	16,4
	CD32	0,23%	15,6	0,23%	13,1
	CD33	0,39%	19,5	0,22%	15,1
	CD34	0,33%	22,8	0,82%	16,1
20	CD35	0,56%	22,1	0,25%	16,1
	CD36	1,35%	21,3	0,98%	17,7
	CD37	0,16%	20,5	0,23%	15,9
	CD38	0,54%	22,6	0,44%	17,7
25	CD39	0,53%	27,5	3,40%	21,8
	CD40	37,30%	127	0,54%	19
	CD41a	0,23%	21	0,23%	17,7
30	CD41b	0,32%	20,8	0,28%	15,6
	CD42a	94,40%	467	29,40%	75,2
	CD42b	0,73%	18,7	0,30%	14,8
	CD43	0,18%	21,3	1,42%	19,5
35	CD44	84,50%	369	55,40%	213
	CD45	4,02%	24,6	3,96%	21,8
	CD4SRA	0,16%	24,1	0,68%	19,7
	CD4SRB	3,20%	22,3	1,72%	15,6
40	CD45RO	0,23%	21,3	0,65%	16,6
	CD46	99,30%	2895	90,60%	1551
	CD47	99,00%	654	99,00%	1802
45	CD48	0,33%	25,2	0,36%	18,2
	CD49a	67,60%	214	2,83%	27,8
	CD49b	96,50%	516	33,30%	90,6
	CD49c	97,60%	647	34,70%	97,9
50	CD49d	3,47%	53,5	3,64%	30,6
	CD49e	88,20%	401	69,40%	277
	CD50	94,70%	793	0,35%	22,3
	CD51/61	0,28%	29,6	0,84%	18,7
55	CD53	0,47%	22,3	7,63%	24,4
	CD54	51,30%	161	32,10%	68,7
	CD55	99,80%	1621	72,50%	296
	CD56	52,90%	167	90,70%	1354
60	CD57	100%	17613	92,00%	1405
	CD58	99,20%	767	84,00%	409
	CD59	100,00%	2694	96,00%	3894
	CD61	7,51%	54	3,82%	29,8
65	CD62E	0,20%	22,6	0,29%	17,9
	CD62L	0,90%	25,2	1,52%	23,1

ES 2 959 705 T3

	Marcador de Superficie	hESC		OV	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD62P	0,76%	34,8	0,38%	21,5
	CD63	84,30%	306	70,70%	305
	CD64	0,19%	22,8	0,15%	16,4
	CD66 (a.c.d.e)	17,10%	69,8	2,07%	24,1
10	CD66b	0,58%	28	0,20%	20,8
	CD66f	0,82%	28,8	0,32%	19,2
	CD69	1,32%	30,1	0,69%	22,1
	CD70	0,58%	27,2	0,64%	21
15	CD71	56,10%	183	53,60%	179
	CD72	3,61%	30,9	7,78%	38,7
	CD73	0,13%	23,6	1,76%	23,1
	CD74	0,26%	25,4	0,21%	16,4
20	CD75	1,50%	28	2,21%	29,3
	CD77	2,73%	36,6	1,93%	24,6
	CD79b	1,66%	29,6	2,22%	27
	CD80	2,71%	34,3	2,60%	29,6
25	CD81	99,20%	3089	91,50%	2247
	CD83	9,43%	39	7,94%	28,3
	CD84	10,10%	48,3	12,50%	51,3
	CD85	6,15%	41,7	10,10%	50,5
30	CD86	2,06%	18,4	1,92%	18,4
	CD87	0,80%	15,9	0,56%	17,7
	CD88	0,11%	10,7	0,16%	15,4
	CD89	0,03%	13,1	0,11%	16,6
35	CD90	99,90%	3570	85,70%	631
	CD91	1,44%	28,5	26,20%	94,2
	CDw93	0,60%	12	1,25%	20
	CD94	0,19%	8,18	0,09%	13,6
40	CD95	0,72%	24,1	6,91%	45,9
	CD97	0,21%	14,3	0,24%	14,1
	CD98	100,00%	7799	94,90%	2077
	CD99	67,60%	235	13,10%	45,4
45	CD99R	0,51%	13,1	0,64%	18,4
	CD100	47,20%	151	0,67%	20
	CD102	0,23%	10,5	0,23%	12,5
	CD103	0,25%	12	0,28%	15,6
50	CD105	0,69%	20	1,49%	18,7
	CD106	0,10%	9,21	0,31%	15,1
	CD107a	0,46%	7,67	0,38%	13,1
	CD107b	0,17%	7,67	1,16%	19,7
55	CD108	0,81%	28,8	0,40%	16,6
	CD109	0,18%	17,4	0,15%	11
	CD112	0,21%	24,6	3,23%	46,5
	CD114	0,79%	12	0,51%	15,4
60	CD116	0,23%	11,5	0,19%	14,6
	CD117	0,82%	33,2	0,55%	17,4
	CD118	0,32%	14,6	0,25%	15,6
	CD119	1,00%	44,1	2,33%	38,7
65	CD120a	0,58%	14,8	0,69%	20

ES 2 959 705 T3

	Marcador de Superficie	hESC		OV	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD121a	0,06%	5,37	0,08%	11
	CD121b	0,09%	4,6	0,07%	9,97
	CD122	0,03%	5,11	0,04%	10,5
	CD123	0,22%	8,69	0,31%	12,5
10	CD124	0%	7,16	0,15%	9,97
	CD126	0,03%	5,11	0,08%	9,72
	CD127	0,46%	12,3	0,48%	15,4
	CD128b	0,22%	7,93	0,09%	13,1
15	CD130	0,76%	15,9	0,95%	25,7
	CD134	0,15%	10,2	0,11%	13,1
	CD135	0,23%	10,2	0,15%	13,6
	CD137	0,79%	9,97	0,50%	13,1
20	Ligando CD137	0,09%	8,44	0,08%	12,8
	CD138	0,03%	7,67	0,10%	11
	CD140a	0,06%	7,16	0,74%	13,3
	CD140b	18,50%	81,4	61,10%	290
25	CD141	0,24%	11,3	5,09%	18,4
	CD142	6,90%	67,6	5,11%	31,1
	CD144	0,72%	12	0,44%	15,4
	CD146	61,80%	192	60,30%	210
30	CD147	100	8211	97,00%	4218
	CD150	1,43%	23,3	2,33%	34,3
	CD151	78,20%	328	79,30%	418
	CD152	0,14%	13,6	1,14%	25,9
35	CD153	0,06%	6,65	0,10%	11
	CD154	0,06%	6,14	0,10%	11,3
	CD158a	0,31%	7,41	0,10%	10,2
	CD158b	0,47%	13,3	0,22%	15,4
40	CD161	0,03%	7,41	0,07%	10,2
	CD162	0%	7,16	0,05%	10,5
	CD163	0,45%	20,5	0,45%	22,8
	CD164	5,76%	37,4	40,00%	107
45	CD165	15,10%	91,5	66,00%	233
	CD166	87,20%	718	34,80%	88,5
	CD171	79,30%	317	17,80%	48,6
	CD172b	1,90%	45,9	2,62%	47
50	CD177	1,22%	23,9	0,98%	14,1
	CD178	0%	6,65	0,08%	9,72
	CD180	0%	4,6	0,09%	8,69
	CD181	2,86%	17,4	1,68%	17,4
55	CD183	0,06%	5,88	0,10%	9,72
	CD184	1,62%	15,1	60,50%	261
	CD193	0,33%	11	0,43%	14,8
	CD195	0,06%	8,44	0,13%	13,6
60	CD196	1,33%	13,6	0,96%	15,4
	CD197	1,19%	18,2	1,57%	23,1
	CD200	95,80%	544	80,10%	353
	CD205	1,39%	33	3,66%	18,2
65	CD206	0,03%	6,39	0,06%	8,69

	Marcador de Superficie	hESC		OV	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD209	0,12%	8,44	0,25%	12,3
	CD220	0,67%	30,4	0,65%	22,8
	CD221	66,40%	203	69,90%	257
	CD226	0,47%	11,5	1,16%	16,4
10	CD227	32,20%	80,5	14,50%	46,2
	CD229	1,75%	15,9	1,37%	17,4
	CD231	0,14%	10,2	0,53%	16,4
	CD235a	1,54%	21,8	1,56%	21,8
15	CD243	2,85%	22,3	3,56%	28,3
	CD244	0,31%	13,8	0,48%	15,6
	CD255	1,69%	16,1	1,43%	17,2
	CD268	0,36%	17,9	0,45%	23,6
20	CD271	42,00%	135	21,30%	42,7
	CD273	1,08%	12,8	0,76%	15,9
	CD274	2,89%	24,9	3,74%	29,3
	CD275	3,13%	29,8	24,40%	53,7
25	CD278	0,86%	15,4	1,31%	18,2
	CD279	0,38%	16,1	0,12%	13,1
	CD282	0,09%	12,3	0,17%	19,5
	CD305	0,09%	10,2	0,25%	12,8
30	CD309	4,95%	46,7	0,24%	19
	CD314	0%	9,21	0	11,8
	CD321	99,80%	1679	32,40%	99,2
	CDw327	0,18%	11,5	0,04%	12
35	CDw328	0%	8,95	0,03%	11,5
	CDw329	0%	9,97	0,15%	12
	CD335	0,10%	7,67	0,07%	10,7
	CD336	0,10%	8,44	0,11%	9,97
40	CD337	0,08%	12,3	0,06%	12,5
	CD338	3,82%	51,6	0,14%	12,5
	CD304	99,40%	3393	75,90%	440
	$\alpha\beta$ TCR	0,23%	13,6	0,18%	12
45	β 2-microglobulina	90,60%	380	29,20%	72,1
	BLTR-1	0,39%	15,9	0,10%	13,3
	CLIP	0,08%	9,21	0,06%	11,3
	CMRF-44	0%	12	0,07%	23,1
50	CMRF-56	0%	7,67	0,06%	10,7
	Receptor EGF	5,46%	54,3	33,60%	85,8
	Receptor fMLP	0,15%	1,53	0,24%	7,93
	$\gamma\delta$ TCR	0,08%	7,67	0,17%	11,5
55	HPC	0,08%	19	1,16%	23,6
	HLA-A.B.C	98,50%	804	55,80%	197
	HLA-A2	0,27%	12,5	0,17%	13,1
	HLA-DQ	0%	10,5	5,90%	26,2
60	HLA-DR	0%	10,2	0,19%	10,5
	HLA-DR.DP.DQ	0,08%	8,18	0,37%	12,8
	NKT Invariante	0,26%	9,21	0,21%	12,5
	Disialogangliósido GD2	9,29%	25,9	64,40%	350
65					

	Marcador de Superficie	hESC		OV	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	MIC A/B	25,80%	112	3,99%	36,6
	NKB1	0%	9,46	0,23%	10,7
	SSEA-1	25,60%	78,7	11,40%	25,4
	SSEA-4	94,90%	19635	15,10%	30,1
10	TRA-1-60	99,80%	11871	0,25%	11,8
	TRA-1-81	99,30%	9444	0,68%	13,8
	V β 23	0,16%	9,97	0,15%	11
	V β 8	0,16%	8,95	0,18%	11,3
15	CD326	99,90%	6850	14,90%	60
	CD49f	96,60%	578	61,00%	272
	CD104	0,41%	23,3	2,77%	24,9
	CD120b	0,24%	13,6	0,08%	11,8
20	CD132	0%	9,46	0,26%	9,21
	CD201	24,00%	101	4,51%	16,6
	CD210	0%	7,93	0,04%	7,93
	CD212	0%	7,93	0,23%	8,18
25	CD267	0,16%	6,65	0,15%	7,67
	CD294	0	8,69	0,11%	7,93
	SSEA-3	95,50%	728	0,04%	8,69
	Linfa cutánea anf.	0,08%	7,16	0,23%	10,5
30	Integrina β 7	0,09%	5,62	0,18%	9,72

Tabla 3. Datos subyacentes a la Figura 4

	Marcador de Superficie	hESC		RPE	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
35	CD1a	0,11%	253	0,01%	325
	CD1b	0,16%	355	0,06%	329
	CD1d	0,12%	329	0,02%	345
	CD2	0,13%	266	0,05%	329
40	CD3	0,15%	263	0,04%	325
	CD4	4,06%	432	0,03%	332
	CD4v4	1,82%	425	0,08%	342
	CD5	0,11%	319	0,04%	345
45	CD6	0,09%	279	0,03%	372
	CD7	5,49%	645	0,08%	355
	CD8a	0,41%	292	0,06%	325
	CD8b	0,10%	335	0,04%	335
50	CD9	98,70%	61761	99,90%	113464
	CD10	98,20%	14842	1,95%	924
	CD11a	0,65%	601	13,20%	1353
	CD11b	0,10%	302	0,05%	349
55	CD11c	0,14%	296	0,06%	422
	CD13	24,70%	1155	0,26%	365
	CD14	0,15%	408	0,64%	813
	CD15	2,68%	445	0,34%	577
60	CD15s	0,06%	279	0,02%	349
	CD16	0,09%	276	0,02%	345

ES 2 959 705 T3

	Marcador de Superficie	hESC		RPE	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD18	0,07%	266	0,02%	335
	CD19	0,03%	269	0,07%	553
	CD20	0,08%	269	0,03%	352
	CD21	25,60%	1336	2,18%	385
10	CD22	0,08%	286	0,03%	359
	CD23	0,06%	272	0,05%	342
	CD24	100,00%	1400000	55,70%	3117
15	CD25	0,04%	263	0,02%	349
	CD26	1,71%	536	3,94%	601
	CD27	0,10%	272	0,03%	349
	CD28	0,08%	279	0,03%	355
20	CD29	96,20%	6731	89,50%	4867
	CD30	99,80%	24708	0,10%	445
	CD31	0,13%	276	0,09%	368
	CD32	0,15%	289	0,05%	349
25	CD33	0,06%	279	0,05%	362
	CD34	0,46%	368	0,04%	418
	CD35	0,94%	282	0,07%	355
30	CD36	0,16%	309	0,20%	368
	CD37	0,05%	279	0,03%	349
	CD38	0,66%	382	2,08%	388
	CD39	4,58%	1034	2,06%	489
35	CD40	72,70%	3310	0,18%	392
	CD41a	0,06%	282	9,39E-05	372
	CD41b	0,05%	286	0,05%	345
	CD42a	0,11%	567	0,03%	365
40	CD42b	0,04%	269	9,14E-05	349
	CD43	0,50%	449	3,53%	584
	CD44	97,10%	14930	97,60%	237727
	CD45	0,07%	276	0,68%	422
45	CD4SRA	0,17%	312	7,59%	607
	CD4SRB	0,06%	269	0,06%	352
	CD45RO	0,10%	359	0,17%	418
50	CD46	99,90%	72892	100,00%	125682
	CD47	99,90%	18113	100,00%	33220
	CD48	0,05%	272	0,02%	355
	CD49a	84,50%	4653	29,30%	1225
55	CD49b	98,60%	9656	11,70%	1026
	CD49c	96,10%	9929	99,90%	21655
	CD49d	4,40%	669	0,72%	425
60	CD49e	94,80%	8163	96,90%	8527
	CD50	99,30%	25248	0,19%	462
	CD51/61	0,05%	302	0,37%	385
	CD53	0,08%	279	0,34%	362
65	CD54	72,20%	3551	99,90%	89262

ES 2 959 705 T3

	Marcador de Superficie	hESC		RPE	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD55	99,70%	35718	99,80%	17843
	CD56	69,50%	3508	91,10%	10927
	CD57	100%	233798	77,20%	7388
	CD58	99,90%	15698	99,90%	11868
10	CD59	100%	95000	100,00%	210157
	CD61	0,11%	279	0,55%	385
	CD62E	0,10%	292	0,26%	382
15	CD62L	0,11%	479	0,11%	506
	CD62P	0,05%	286	0,02%	372
	CD63	65,10%	2803	87,20%	5106
	CD64	0,06%	269	0%	362
20	CD66 (a.c.d.e)	33,60%	1260	16,40%	756
	CD66b	0,07%	296	0,03%	405
	CD66f	0,08%	299	0,02%	378
	CD69	0,10%	296	0,03%	372
25	CD70	0%	299	0,34%	368
	CD71	38,90%	1716	60,60%	3351
	CD72	0,20%	292	1,63%	465
30	CD73	0,24%	342	2,61%	415
	CD74	0,08%	339	0,04%	405
	CD75	0,21%	292	0,10%	375
	CD77	2,20%	375	0,11%	392
35	CD79b	0,26%	286	0,15%	365
	CD80	0,72%	362	63,80%	3383
	CD81	98,70%	33115	99,90%	193383
40	CD83	0,26%	711	0,30%	673
	CD84	0,16%	299	0,23%	721
	CD85	0,18%	279	0,01%	359
	CD86	0,97%	329	0,01%	322
45	CD87	0,08%	259	0,06%	329
	CD88	0,03%	253	6,95E-05	329
	CD89	0,05%	263	0,06%	332
	CD90	100,00%	336451	21,30%	1140
50	CD91	9,76%	763	31,90%	1665
	CDw93	0,09%	309	0,02%	349
	CD94	0,05%	259	0,04%	332
	CD95	49,40%	2110	37,70%	1876
55	CD97	0,04%	289	0,05%	352
	CD98	100%	311545	100,00%	136960
	CD99	86,90%	5984	100,00%	67416
60	CD99R	0,29%	266	42,60%	2196
	CD100	71,30%	2857	0,24%	587
	CD102	3,34%	359	0,07%	335
	CD103	0,06%	276	7,54E-05	342
65	CD105	6,29%	774	0,16%	352

ES 2 959 705 T3

	Marcador de Superficie	hESC		RPE	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD106	0,07%	276	0,11%	342
	CD107a	1,20%	428	0,72%	452
	CD107b	1,13%	368	1,93%	502
	CD108	72,10%	2934	0,67%	479
10	CD109	5,49%	1004	0,13%	472
	CD112	36,90%	1800	23,80%	1916
	CD114	9,00E-05	263	0,02%	332
15	CD116	0,05%	253	0,09%	339
	CD117	3,67%	611	0,05%	352
	CD118	0,09%	359	0,03%	345
	CD119	96,20%	5742	94,40%	4595
20	CD120a	0,33%	482	0,16%	502
	CD121a	0,09%	269	0,08%	339
	CD121b	0,05%	276	0,03%	342
	CD122	0,04%	309	8,20E-05	339
25	CD123	0,08%	263	0,12%	352
	CD124	0,11%	342	0,07%	345
	CD126	0,73%	676	0,29%	649
	CD127	0,03%	256	0,02%	335
30	CD128b	1,06%	365	8,25E-05	335
	CD130	1,17%	732	15,00%	1511
	CD134	0,04%	279	0,05%	375
	CD135	0,13%	342	5,54%	1038
35	CD137	0,03%	279	0,06%	349
	Ligando CD137	0,05%	266	0,10%	342
	CD138	0,39%	418	0,07%	422
40	CD140a	0,05%	286	0,43%	368
	CD140b	44,10%	1891	99,90%	82248
	CD141	2,34%	690	0,90%	382
45	CD142	82,30%	3383	71,80%	3568
	CD144	22,60%	1444	12,40%	1316
	CD146	98,20%	16074	98,00%	10958
	CD147	100,00%	339845	100,00%	236148
50	CD150	0,04%	269	0,02%	349
	CD151	94,30%	7427	99,40%	12284
	CD152	0,05%	296	0,23%	405
	CD153	0,09%	279	0,06%	345
55	CD154	0,18%	279	0,05%	352
	CD158a	0,10%	269	0,08%	342
	CD158b	0,05%	319	0,04%	349
60	CD161	0,11%	279	0%	355
	CD162	0,09%	272	2,15%	536
	CD163	0,19%	611	0,04%	683
	CD164	33,40%	1456	69,90%	4688
65	CD165	94,90%	4664	99,90%	30426

ES 2 959 705 T3

	Marcador de Superficie	hESC		RPE	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD166	97,10%	26944	99,70%	17369
	CD171	97,20%	8389	13,00%	625
	CD172b	0,04%	282	9,19E-05	368
	CD177	6,95%	614	0,05%	345
10	CD178	0,08%	286	0,02%	375
	CD180	0,04%	276	0%	352
	CD181	0,73%	279	0,66%	428
15	CD183	0,18%	269	0,14%	342
	CD184	0,17%	325	1,59%	523
	CD193	0,13%	332	0,02%	355
	CD195	3,31%	1071	2,83%	1120
20	CD196	0,09%	279	0,03%	355
	CD197	0,02%	269	0,02%	385
	CD200	100,00%	41994	38,50%	1940
	CD205	40,60%	1809	32,10%	1486
25	CD206	0,07%	282	0,03%	349
	CD209	0,44%	322	0,09%	378
	CD220	42,00%	1930	79,10%	3375
30	CD221	98,20%	7368	97,10%	5145
	CD226	0,05%	286	0,04%	355
	CD227	66,50%	3517	51,40%	2632
	CD229	0,03%	279	0,02%	342
35	CD231	0,06%	253	0,03%	349
	CD235a	0,05%	272	0,08%	349
	CD243	0,29%	342	6,41%	425
	CD244	0,04%	272	0,02%	352
40	CD255	0,02%	289	0,04%	352
	CD268	0,14%	465	0,14%	563
	CD271	97,20%	12249	2,25%	442
45	CD273	0,07%	282	0,04%	365
	CD274	0,08%	312	0,54%	662
	CD275	13,40%	997	21,10%	964
	CD278	0,06%	266	0,01%	345
50	CD279	2,64%	580	0,34%	442
	CD282	0,05%	269	0,03%	342
	CD305	0,10%	249	8,17E-05	325
	CD309	35,50%	1529	25,10%	1828
55	CD314	0,07%	253	7,94E-05	322
	CD321	100%	55690	96,90%	6985
	CDw327	0,08%	253	0,02%	322
60	CDw328	0,02%	253	0,03%	329
	CDw329	0,17%	239	0,09%	322
	CD335	0,03%	243	0,04%	319
	CD336	0,09%	243	7,89E-05	319
65	CD337	0,16%	263	0,02%	322

	Marcador de Superficie	hESC		RPE	
		% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana	% Positivo	Intensidad Fluorescente Mediana
5	CD338	62,40%	2645	7,80E-05	365
	CD304	100,00%	90736	100,00%	15241
	$\alpha\beta$ TCR	0,36%	746	0,07%	428
	β 2-microglobulina	96,70%	11178	99,80%	34175
10	BLTR-1	0,04%	279	0,06%	332
	CLIP	0,05%	302	0,04%	335
	CMRF-44	0,12%	289	0,31%	526
	CMRF-56	0,14%	289	0,07%	325
15	Receptor EGF	19,20%	1086	62,60%	3383
	Receptor fMLP	0,03%	259	0,03%	335
	$\gamma\delta$ TCR	0,02%	266	8,62E-05	329
20	HPC	12,60%	788	24,70%	1427
	HLA-A.B.C	100,00%	39782	100%	118043
	HLA-A2	0,05%	345	0,03%	368
	HLA-DQ	1,63%	395	3,19%	704
25	HLA-DR	3,52%	502	0,14%	349
	HLA-DR.DP.DQ	0,15%	442	0,03%	329
	NKT Invariante	0,05%	259	0,03%	335
30	Disialogangliósido GD2	1,45%	286	4,46%	398
	MIC A/B	93,30%	6875	80,00%	4629
	NKB1	0,07%	259	0,05%	335
	SSEA-1	29,90%	1163	0,40%	349
35	SSEA-4	100%	407000	7,09%	529
	TRA-1-60	99,10%	158973	0,91%	445
	TRA-1-81	99,10%	155326	1,03%	523
40	V β 23	0,05%	279	8,60E-05	372
	V β 8	0,14%	496	0,05%	342
	CD326	100%	227647	52,80%	2697
	CD49f	99,80%	46069	100,00%	55511
45	CD104	31,10%	1529	99,70%	21655
	CD120b	0,91%	492	0,06%	415
	CD132	0,05%	286	0,03%	388
	CD201	81,50%	4372	3,05%	516
50	CD210	0,11%	276	9,36E-05	332
	CD212	0,06%	259	0,07%	342
	CD267	0,04%	256	0,03%	335
	CD294	0,06%	263	0,03%	342
55	SSEA-3	92,40%	11633	0,48%	445
	Linfa cutánea anf.	0,06%	259	0,06%	329
	Integrina β 7	0,09%	259	0,04%	342
60					

El análisis identificó un conjunto de marcadores que marcan específicamente las hPSC no diferenciadas, que serán útiles para discriminar posibles células no diferenciadas persistentes durante la diferenciación, y marcadores útiles para el destino del RPE temprano y maduro. Mediante la recopilación de los resultados más prometedores de ambas pruebas, CD140b se identificó como un marcador de células hESC-RPE tempranas y más maduras, mientras que GD2 y CD184 marcan linajes alternativos en los cultivos tempranos. Se encontró que CD56 se expresaba en las primeras etapas de las células hPSC-RPE, pero en menor grado que en los cultivos maduros.

De conformidad con este hallazgo, CD140b demostró estar más restringido a las OV pigmentadas disecadas que a las estructuras de EB no pigmentadas restantes, mientras que GD2 y CD184 se detectaron en niveles más altos en las estructuras no pigmentadas (**Figura 26**). Además, las células CD140b positivas estaban presentes en cultivos de células RPE maduras derivadas de hESC (hESC-RPE), mientras que las células que expresaban GD2 y CD184 estaban completamente ausentes, tal como se confirmó mediante tinción de inmunofluorescencia en células hESC-RPE en cultivo (**Figura 5**). La histología de hESC-RPE trasplantado en subretina de conejo albino mostró expresión apical de CD140b en células hESC-RPE pigmentadas y basales positivas para BEST1. La expresión apical de CD140b también se confirmó mediante inmunohistoquímica en RPE humano adulto (**Figura 6**) de acuerdo con el patrón de expresión conocido en el ratón. Funcionalmente, se observó que después de la clasificación celular mediante citometría de flujo, solo la fracción celular CD140b positiva, pero no la negativa de las diferenciaciones tempranas, se expandió hacia células hESC-RPE con morfología empedrada y homogénea, lo que evidencia que este marcador de superficie celular captura selectivamente las células hESC-RPE tempranas durante la diferenciación *in vitro* (**Figura 7**).

En conclusión, se identificaron varios marcadores que podrían usarse para distinguir células RPE diferenciadas de células no diferenciadas.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2: La diferenciación en monocapa de laminina recombinante humana aumenta potentemente la diferenciación del RPE en comparación con el cultivo en suspensión

Se distribuyeron en placas hESC a una densidad celular de $2,4 \times 10^4$ células/cm² sobre sustratos LN-111 y LN-521 y se evaluaron 30 días después de la distribución en placas. Se observó una pigmentación prominente en ambos sustratos (datos no mostrados). De acuerdo con estudios previos que sugieren que la Activina A es un potente inductor del destino de la retina, se observó un aumento significativo de la pigmentación junto con la correspondiente maduración transcripcional hacia el destino del RPE con la adición de Activina A (datos no mostrados).

El análisis de citometría de flujo utilizando los nuevos marcadores derivados del **Ejemplo 1** respaldó este resultado con un aumento de la fracción positiva de CD140b de aproximadamente el 40% al 90% con la adición de Activina A en ambos sustratos (datos no mostrados).

A continuación, se comparó la diferenciación en monocapa con la diferenciación en suspensión previamente establecida como EB preparados como en Plaza-Reyes et al, *supra*.

El cultivo en monocapa sobre LN-111 o LN-521 respaldó eficazmente la inducción inicial del destino del RPE desde el estado pluripotente no diferenciado. En tres semanas, estos cultivos generaron pigmentación robusta e inducción de genes marcadores de RPE a niveles que superaban claramente el protocolo de diferenciación de EB, mientras que ambos mostraron una fuerte reducción de marcadores de pluripotencia (**Figura 8 y Figuras 9A-9F**). Si bien los cultivos de EB en suspensión generaron algunas estructuras pigmentadas como se describió anteriormente, las monocapas estaban dominadas por células pigmentadas al final de 7 semanas de diferenciación (**Figura 8**).

La fuerte inducción del RPE se validó adicionalmente midiendo la expresión génica para diversos marcadores del RPE (**Figuras 9A-C**).

LN-111 generalmente indujo pigmentación y marcadores de RPE más rápidamente, pero LN-521 alcanzó entre 4 y 7 semanas. La expresión del marcador de pluripotencia TRA-1-60 (**Figura 11A**) se redujo fuertemente con el tiempo, lo que respalda la conclusión de que se produjo una diferenciación sólida.

Este aumento se reflejó en la expresión de la proteína CD140b a lo largo del tiempo (**Figura 10**). La evaluación de la pureza basándose en células pigmentadas es difícil, particularmente en cultivos de EB, pero la cuantificación de células CD140b positivas indicó que los cultivos de EB contienen aproximadamente un 10% de células RPE potenciales, mientras que los cultivos de laminina en monocapa alcanzaron niveles del 90% (**Figuras 11A-11C**). Además, la dinámica transcripcional mostró un aumento de aproximadamente diez veces en los transcritos asociados al RPE tales como MITF, BEST1 y TYR mientras reducía la expresión del transcrito neuronal TBB3 en ambas lamininas en comparación con la diferenciación de EB en suspensión (**Figuras 9A-9F**).

La redistribución en placas después de la inducción inicial de hESC-RPE proporciona un alto rendimiento de células hESC-RPE puras, homogéneas y funcionales

Como los cultivos en monocapa de laminina eran permisivos para la diferenciación de hESC-RPE con >80% de las células positivas para CD140b a las 4 y 7 semanas, se exploró si se podía lograr un producto hESC-RPE final más puro introduciendo una estrategia de redistribución en placas. Esto eliminaría la necesidad de disección manual de células pigmentadas, que es un procedimiento que requiere mucha mano de obra y que introduce riesgos de variación y contaminación en el proceso de producción.

Después de 30 días de diferenciación en monocapa de hESC-RPE en hrLN-111 o hrLN-521, los cultivos se disociaron en una suspensión de células individuales y se sembraron en placas en hrLN-521 en cuatro diluciones diferentes 1:1 ($1,4 \times 10^6$ células/cm²), 1:20 (7×10^4 células/cm²), 1:50 ($2,8 \times 10^4$ células/cm²) y 1:100 ($1,4 \times 10^4$ células/cm²) (véase la **Figura 35** para una ilustración esquemática).

Después de 30 días adicionales observamos cultivos fuertemente pigmentados de células epiteliales hexagonales que también expresaban BEST1, MITF y CRALB (**Figura 12**). El análisis de citometría de flujo mostró cultivos homogéneos de hESC-RPE, ahora con >99% de las células positivas para CD140b y negativas para TRA-1-60 (**Figuras 13A-13F**). El análisis transcripcional también mostró una inducción robusta de marcadores relacionados con el RPE como MITF, BEST1, RPE65 y una regulación negativa de los transcritos pluripotentes NANOG y POU5F1 (este último también conocido como OCT-4) con patrones similares en todas las diluciones independientemente del revestimiento de laminina inicial (**Figuras 14A-15B**).

Se realizaron experimentos de titulación, en los que las células disociadas se redistribuyeron en placas en diluciones crecientes de 1:1 a 1:100. El rendimiento final de células hESC-RPE positivas para CD140b siguió a las diluciones crecientes hasta un rendimiento máximo de 8000 veces con respecto al número de células madre pluripotentes iniciales (**Figura 15B**). Esto significa que con un punto de partida muy modesto de 1 millón de hPSC, se podrían derivar 8×10^9 células hPSC-RPE en aproximadamente 60 días, un equivalente a 80.000 dosis de tratamiento clínico.

El producto final pasó además pruebas funcionales *in vitro* con integridad de la monocapa medida por resistencia transepitelial (TEER), secreción polarizada de factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) medida por ELISA y fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptores (POS) (**Figuras 16A-16D** y datos no mostrados). La reubicación de cultivos a una dilución 1:20 en células que inicialmente se sembraron en hrLN-111 mostró un mayor grado de maduración en todas las pruebas.

Se confirmó la integración retiniana exitosa de hESC-RPE redistribuida en placas dentro de un modelo animal preclínico de ojos grandes (véase Plaza-Reyes et al. *supra*). Las imagenología sagital de tomografía de coherencia óptica de dominio espectral y frontal multicolor (SD-OCT) en conejos albinos trasplantados mostró integración de células pigmentadas y estructura retiniana conservada con hESC-RPE inicialmente derivado de hrLN-521 y hrLN-111 (**Figura 16D**).

EJEMPLO DE REFERENCIA 3: El análisis de secuenciación de ARN unicelular garantiza hESC-RPE

Pureza de diferenciación

Aunque el procedimiento demostrado en el Ejemplo 2 generó células hESC-RPE aparentemente puras, todavía quedaba la pregunta de si el uso del aislamiento con los marcadores de superficie celular identificados (Ejemplo 1) podría mejorar aún más la pureza del producto final. Otro objetivo era garantizar que no hubiera células pluripotentes contaminantes u otro tipo de célula alternativa en el cultivo final con o sin el uso de aislamiento celular.

Para este propósito, se realizó un estudio comparativo de cultivos que se volvieron a sembrar como se describió anteriormente en el Ejemplo 2 o se purificaron adicionalmente con una combinación de CD140b como selección positiva y selección negativa usando GD2 o CD184 el día 30. Las poblaciones redistribuidas en placas y clasificadas se analizaron después de 30 días de cultivo adicionales en hrLN-521 como se indica (**Figura 36**). El análisis de células individuales reveló que ninguna de las células de las poblaciones redistribuidas en placas o clasificadas expresaba transcripciones de pluripotencia POU5F1, NANOG, LIN28A o SALL4, sino que expresaban de manera más robusta las transcripciones asociadas con RPE (MITF, CRALBP, PMEL, TYR, RPE65, BEST1) (**Figura 33**). El análisis de conglomerados tSNE de las tres muestras diferenciadas reveló tres conglomerados distintos (**Figura 32** y datos no mostrados). Los tres grupos expresaron firmas genéticas asociadas con el RPE maduro, los progenitores del campo ocular inmaduros y el linaje mesodérmico, respectivamente (**Figura 31**). La distribución de los cultivos mediante aislamiento redistribución en placas o prospectivo con los nuevos marcadores mostró que las células redistribuidas en placas contenían preferentemente el contaminante del mesodermo, aunque la importancia funcional de dicha impureza con una contaminación del 1,2% es cuestionable. Las células redistribuidas en placas también albergaban un 11,3% de

progenitores del campo ocular en contraste con poco menos del 3% en los cultivos enriquecidos (**Figuras 31-32**). Finalmente, se evaluaron las firmas de varios tipos de células presentes en la retina humana, incluidas las bipolares, amacrinas, células ganglionares, fotorreceptores, cristalino, células endoteliales y panneuronas, y no se encontró ninguna agrupación distinta para ninguno de los tipos de células (datos no mostrados).

Al examinar el grupo de secuenciación de ARN de células individuales que contenía genes asociados con progenitores del campo ocular, se encontró que NCAM1 también conocido como CD56 estaba enriquecido en esta fracción de células en comparación con el grupo de RPE más maduro (**Figura 30**). La tinción de los cultivos redistribución en placas mostró pequeños grupos con mayor intensidad de CD56, que también coincidió con niveles bajos de pigmentación consistentes con células menos maduras (**Figura 29**). De acuerdo con los datos de secuenciación, se detectó una población "alta" de CD56 más grande en los cultivos redistribución en placas en comparación con los clasificados (**Figura 28**). Además, no se detectó NCAM1/CD56 en células maduras después de la integración en la subretina de conejo o en el RPE humano adulto, lo que respalda que NCAM1/CD56 se pierde en células RPE maduras (**Figura 34**).

EJEMPLO DE REFERENCIA 4: Los marcadores de superficie celular identificados muestran una diferenciación reproducible en múltiples hESC

Un problema general con los protocolos de diferenciación *in vitro* es generalmente el requisito de optimización para líneas celulares individuales. Esto también ha sido un desafío para el protocolo de diferenciación basado en EB de suspensión anterior. Se observaron fuertes variaciones entre líneas, pero también diferencias sorprendentes entre lotes, incluso dentro de la misma línea celular, lo que hizo que una producción sólida fuera un gran desafío. Por lo tanto, se probaron 4 líneas hESC (HS980, HS975, H9 y HS983a) en el nuevo sistema de diferenciación monocapa usando hrLN-111 o hrLN-521 (Ejemplo 2). Después de 30 días de diferenciación, tres (HS980, HS975, H9) de cuatro líneas fueron 70-90% positivas para CD140b y 50-65% positivas para CD56, lo que indica una inducción robusta de RPE temprano (**Figuras 21A-25B**). Por el contrario, la línea HS983a no logró alcanzar el 20% de células positivas para ninguno de los marcadores de diferenciación a los 30 días, lo que indica una diferenciación deficiente. De acuerdo con esta observación, se encontró que la misma línea todavía expresaba el marcador de pluripotencia TRA-1-60 en el 80% de las células (**Figuras 20A-21B**). Treinta días después de la redistribución en placas, las tres líneas funcionales habían alcanzado niveles de CD140b cercanos al 100% y ahora redujeron el marcador progenitor NCAM1/CD56 a niveles por debajo del 10%, correlacionándose con los resultados de secuenciación anteriores (**Figuras 22A-23B**). Habían reducido aún más la fracción de células positivas para GD2 y CD184 a niveles generalmente inferiores al 10% (**Figuras 24A-25B**). En esta etapa, la línea con mala respuesta había perdido toda expresión significativa de TRA-1-60 y obtuvo algunos signos de diferenciación retiniana con niveles modestos de CD140b y CD56, mientras aún expresaba niveles significativos de los marcadores de destino alternativos GD2 y CD184, lo que indica por lo tanto que la línea puede diferenciarse en esta configuración pero con una cinética significativamente reducida (**Figuras 21A-25B**). Estos resultados se confirmaron también con análisis transcripcional de genes asociados al RPE tales como MITF, BEST1 y PMEL (**Figuras 17A-19B**).

Como tres de cuatro líneas se diferenciaron bien con una cinética similar, se puede concluir que el protocolo de diferenciación en monocapa del Ejemplo 2 es reproducible en la mayoría de las líneas hPSC sin necesidad de modificaciones adicionales. Por último, estos datos también ilustran la utilidad de los marcadores identificados en el Ejemplo 1 como control de calidad durante la producción para eliminar la variabilidad entre lotes o para eliminar líneas hPSC que podrían ser resistentes a la diferenciación.

En resumen, se ha demostrado una metodología sin disección que utiliza diferenciación hPSC-RPE *in vitro* en un formato 2D en el sustrato biológicamente relevante, LN-111 o LN-521 recombinante humano. También se identificó un conjunto de marcadores de superficie celular únicos para las células RPE que pueden usarse para optimizar la metodología de producción, realizar el control de calidad del proceso de producción y definir la composición celular final del producto o aislar estas células de otros tipos de células contaminantes que surgen del proceso de diferenciación *in vitro*. Las células se pueden volver a colocar en placas para enriquecer y expandir la población del RPE y al mismo tiempo eliminar otros tipos de células. Este protocolo libre de disección, libre de xeno, definido y altamente escalable es compatible con la producción GMP de células RPE, que pueden usarse para trasplantes subretinianos.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Cribado de marcadores de superficie de células humanas

Se disociaron células hESC y hESC-RPE en células individuales usando TrypLE™ durante 5-10 minutos. Las vesículas ópticas se disociaron en células individuales usando TrypLE™ durante 10 minutos seguido de disociación física a través de una aguja de 20G. Para permitir el análisis simultáneo de estas diferentes poblaciones en la misma muestra, las células hESC, hESC-RPE y OV se marcaron con CellTrace™ CFSE (0,25 µM) durante 7 minutos a 37 °C o CellTrace™ Violet (5 µM) durante 20 minutos a 37 °C siguiendo el protocolo del

fabricante (Thermo Fisher Scientific). Luego, los tres tipos de células se tiñeron utilizando los paneles de detección BD Lyoplate™ (BD Biosciences) siguiendo el protocolo del fabricante. El código de barras de las células permitió distinguir fácilmente entre los tres grupos de células y minimizar la variabilidad de la muestra durante el cribado. Las muestras se analizaron en placas de 96 pocillos en un LSRFortessa™ equipado con láseres de 405 nm, 640 nm, 488 nm, 355 nm y 561 nm (BD Biosciences) o un CytoFLEXS™ equipado con analizadores de células con láseres de 405 nm, 638 nm, 488 nm y 561 nm (Beckman Coulter). Las células no viables se excluyeron del análisis utilizando un tinte de ácido nucleico 7-AAD (BD Biosciences). El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo v.10 (Tree Star). Véanse las Figuras 37A-37B para una ilustración.

10 Cultivo celular

Las líneas hESC HS980, HS975 y HS983 se derivaron y cultivaron en condiciones definidas y libres de xeno de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente (Rodin, S. et al. Nat. Commun. 5, 3195 (2014)). La línea hESC WA09/H9 se obtuvo de Wicell y se adaptó a un cultivo sin alimentador en hrLN-521. Las células se mantuvieron mediante propagación clonal en placas revestidas con hrLN-521 (BioLamina AB) en medio NutriStem™ hPSC XF (Biological Industries), en una incubadora con 5% de CO₂/5% de O₂ y se pasaron enzimáticamente en una proporción de 1:10 cada 5 -6 días.

Para los pasos, los cultivos confluentes se lavaron dos veces con PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C, 5% CO₂/5% de O₂ con TrypLE Select (GIBCO, Invitrogen). Luego se retiró cuidadosamente la enzima y las células se recogieron en medio NutriStem™ hPSC XF recién calentado mediante pipeteo suave para obtener una suspensión de células individuales. Las células se centrifugaron a 300 G durante 4 minutos, el sedimento se resuspendió en medio NutriStem™ hPSC XF recién calentado y las células se distribuyeron en placas en un disco recién revestido con hrLN-521. Dos días después del paso, el medio se reemplazó con medio NutriStem™ hPSC XF fresco precalentado y se cambió diariamente.

Diferenciación de monocapa hESC-RPE

Se distribuyeron en placas hESC a una densidad celular de $2,4 \times 10^4$ células/cm² en placas revestidas con laminina (LN-111 o LN-521 recombinante humana, Biolamina AB) usando medio NutriStem™ hPSC XF. Se añadió inhibidor de rho-quinasa (Y-27632, Millipore) a una concentración de 10 µM durante las primeras 24 horas, mientras que las células se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO₂/5% de O₂. Después de 24 horas, el medio hESC se reemplazó con medio de diferenciación (NutriStem™ hPSC XF sin bFGF y TGFβ) y las células se colocaron a 37 °C, 5% de CO₂/21% de O₂. A partir del día 6 después del cultivo en placas, se añadieron al medio 100 ng/ml de Activina A (R&D Systems). Las células se alimentaron tres veces por semana y se mantuvieron durante 30 días. Luego se tripsinizaron las monocapas usando TrypLE™ Select (GIBCO, Invitrogen) durante 10 minutos a 37 °C, 5% de CO₂. La enzima se retiró cuidadosamente y las células se recogieron en medio NutriStem™ hPSC XF fresco precalentado sin bFGF y TGFβ mediante pipeteo suave para obtener una suspensión de células individuales. Las células se centrifugaron a 300 G durante 4 minutos, el sedimento se resuspendió, se pasó a través de un colador celular (Ø 40 µm, BD Bioscience) y las células se sembraron en placas revestidas con laminina (hrLN-111 y hrLN521 a 20 µg/ml) a diferentes densidades celulares que oscilan entre $1,4 \times 10^6$ y $1,4 \times 10^4$ células/cm². Las células redistribuidas en placas se alimentaron tres veces por semana durante los 30 días siguientes con medio NutriStem™ hPSC XF sin bFGF ni TGFβ. Para la diferenciación *in vitro* de hESC-RPE en EB en suspensión 3D, consulte Plaza-Reyes et al. *supra*. Las imágenes de campo brillante se adquirieron con el microscopio Nikon Eclipse™ TE2000-S y se usó una cámara Canon SX170 IS para capturar la pigmentación desde la parte superior de los pocillos.

PCR cuantitativa en tiempo real

Se aisló ARN total usando el mini kit RNeasy™ Plus y se trató con ADNasa libre de ARNasa (ambos de Qiagen). El ADNc se sintetizó utilizando 1 µg de ARN total en 20 µl de mezcla de reacción, que contenía hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa Superscript™ III (GIBCO Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

Se usó polimerasa Taq junto con sondas Taqman™ (Thermo Fisher Scientific) para *GAPDH* (N.º de Cat. 4333764F), *NANOG* (N.º de Cat. Hs02387400_g1), *POU5F1* (N.º de Cat. Hs03005111_g1), *BEST1* (N.º de Cat. Hs00188249_m1), *RPE65* (N.º de Cat. Hs01071462_m1), *TYR* (N.º de Cat. Hs00165976_m1), *PMEL* (N.º de Cat. Hs00173854_m1) y *TBB3* (N.º de Cat. Hs00801390_s1). Las muestras se sometieron a un protocolo de amplificación por PCR en tiempo real en el sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems). Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición y se realizaron duplicados técnicos para cada reacción. Los resultados se presentan como media ± SEM (error estándar de la media).

Citometría de flujo

Las hESC-RPE que crecían en los sustratos probados se disociaron en células individuales usando TrypLE™ Select. Las muestras se tiñeron con BV421 Anti-CD140b Humana de Ratón (BD, #564124, clon 28D4, a una

concentración de 10 µg/mL), PE Anti-CD140b Humana de Ratón (BD, #558821, clon 28D4, a una concentración de 10 µg/mL), BB515 Anti-CD56 Humana de Ratón (BD, #564489, clon B159, a una concentración de 2,5 µg/mL), Alexa Fluor 647 Anti-TRA-1-60 Humana de Ratón (BD, #560850, a una concentración de 0,6 µg/mL), BV421 Anti-CD184 Humana de Ratón (BD, #562448, clon 12G5, a una concentración de 2,5 µg/mL) y BV421 Anti-Disialogangliósido GD2 Humano de Ratón (BD, #564223, clon 14.G2a, a una concentración de 2,5 µg/mL) anticuerpos conjugados, diluidos en FBS al 2% y EDTA 1 mM (Sigma). Las células se incubaron con los anticuerpos conjugados en hielo durante 30 minutos. Se incluyeron controles de fluorescencia menos uno (FMO) para cada condición para identificar y controlar las células negativas y positivas. Las células teñidas se analizaron usando un citómetro de flujo CytoFLEX™ equipado con láseres de 488 nm, 561 nm, 405 nm y 640 nm (Beckman Coulter). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software FlowJo™ v.10 (Tree Star).

La clasificación de células se realizó en cultivos de hPSC-RPE después de 21 días o 30 días de diferenciación. Las células se incubaron con los anticuerpos conjugados mencionados en hielo durante 30 minutos. Se incluyeron controles de fluorescencia menos uno (FMO) para cada condición para identificar y controlar las células negativas y positivas. Luego, las células teñidas se clasificaron utilizando un BD FACS Aria Fusion Cell Sorter™ (BD Bioscience).

Immunofluorescencia

La expresión de proteínas de monocapas de hESC-RPE maduras se evaluó con inmunofluorescencia. Las células se fijaron con formaldehído libre de metanol al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido de permeabilización con Triton X-100™ al 0,3% en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) durante 10 minutos y bloqueo con suero bovino fetal al 4% (FBS) y Tween-20™ al 0,1% en DPBS durante 1 hora. Los anticuerpos primarios se diluyeron a las concentraciones especificadas en FBS al 4%, Tween-20™ al 0,1%, solución de DPBS: NANOG (1:200, ReproCell™ RCAB003P), Bestrophin 1 (BEST1) (1:100, Millipore MAB5466), Factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) (1:200, Abcam ab3201, clon [D5]), Zonula occludens-1 (ZO-1) (1:100, Invitrogen 40-2200), PDGFRβ (CD140b) (1:200, BD #564124, clon 28D4), CXCR4 (CD184) (1:200, Novus Biologicals MAB172, clon [44716]) y Gangliósido GD2 (1:200, Santa Cruz sc-53831, clon [14G2a]). Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4 °C seguido de 2 horas de incubación a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo de burro Alexa Fluor 647 y IgG anti-ratón de burro Alexa Fluor 488 (ambos de Thermo Fisher Scientific, A31573 y A21202, respectivamente) diluidos 1:1000 en solución de FBS al 4%, Tween-20 al 0,1% y DPBS. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (1:1000, Invitrogen). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal de barrido puntual Zeiss LSM710-NLO™. El análisis posterior a la adquisición de las imágenes se realizó utilizando IMARIS™ (Bitplane) y/o Fiji/ImageJ™.

Histología e inmunotinción tisular

Inmediatamente después del sacrificio mediante inyección intravenosa de 100 mg/kg de pentobarbital (Allfatal™ vet. 100 mg/ml, Omnidea), se enuclearon los ojos y se marcó el área de inyección de la ampolla con tinte verde para marcar tejidos (TMD) (Histolab Products). Se realizó una inyección intravítrea de 100 µl de solución fijadora (FS) que consistía en formaldehído tamponado al 4% (Solvenco AB) antes de la fijación en FS durante 24-48 horas y la inclusión en parafina. Se realizaron secciones seriadas de 4 µm a través del área marcada con TMD y cada 4 secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE).

Para la inmunotinción, los portaobjetos se desparafinaron en xileno, se deshidrataron en alcoholes graduados y se enjuagaron con dH₂O y solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,6). La recuperación del antígeno se realizó en tampón citrato 10 mM (citrato trisódico dihidrato, Sigma-Aldrich, pH 6,0) con Tween-20™ 1:2000 (Sigma-Aldrich) a 96 °C durante 30 min, seguido de 30 min de enfriamiento a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con TBS y se bloquearon durante 30 minutos con Suero de Burro Normal al 10% (Abcam) diluido en TBS que contenía IgG al 5% (p/v) y albúmina sérica bovina libre de proteasa (Jackson ImmunoResearch) en una cámara humidificada. Los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo se incubaron durante la noche a 4 °C: proteína del aparato mitótico nuclear humano (NuMA) (1:200, Abcam ab84680), BEST1 (1:200, Millipore MAB5466), CD140b/PDGFRβ (1:100, Santa Cruz Biotechnology sc-432) y CD56/NCAM1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology sc-7326). Los anticuerpos secundarios (IgG anti-conejo de burro Alexa Fluor 555 A31572 y IgG anti-ratón de burro Alexa Fluor 647 A31571, ambos de Thermo Fisher Scientific) diluidos 1:200 en tampón de bloqueo, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se montaron con vector vectashield con medio de montaje DAPI (Vector Laboratories) en un cubreobjetos de 24x50 mm.

Para la inmunohistoquímica, los portaobjetos se desparafinaron seguido de la recuperación del epítipo (solución ER2, pH 9 20 min, Leica Biosystems) y tinción (Protocolo IHC F) para CD140b/PDGFRβ (1:100, Santa Cruz Biotechnology sc-432) y CD56/ Anticuerpos NCAM1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology sc-7326) en el instrumento Bond RXm™ (Leica Biosystems).

Se tomaron imágenes con un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX81™. El análisis posterior a la

adquisición de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ™.

Ensayo de fagocitosis

- 5 Se aislaron segmentos externos de fotorreceptores bovinos (POS) marcados con FITC y fueron amablemente cedidos por el Dr. E.F. Nandrot del Institut de la Vision, París (Parinot et al. J. Vis. Exp. (2014). doi:10.3791/52100). Se cultivaron hESC-RPE en membrana Transwell (0,33 cm², Corning) revestida con hrLN-521 20 µg/ml durante un mes después de la siembra. Las células se incubaron a 37 °C o 4 °C durante 16 horas con 2,42 x 10⁶ POS/Transwell descongelado diluido en medio DMEM o CO₂ independiente (ambos de Thermo Fisher Scientific), respectivamente. Después de la incubación, las células se inactivaron con Solución de Azul de Tripano al 0,2% (GIBCO, Invitrogen) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se fijaron con formaldehído libre de metanol al 4% (Polysciences) a temperatura ambiente durante 10 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100™ al 0,3% en DPBS durante 15 min. Se utilizó tinción con rodamina faloidina (1:1000, 20 minutos a temperatura ambiente, Thermo Fisher Scientific) para visualizar los límites celulares. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (1:1000, 20 minutos a temperatura ambiente, Invitrogen).

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal de barrido puntual Zeiss LSM710-NLO™. El análisis posterior a la adquisición de las imágenes se realizó utilizando IMARIS™ (Bitplane).

20 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

- Se cultivaron hESC-RPE en membranas Transwell™ (0,33 cm², Millipore) revestidas con diferentes sustratos. Los sobrenadantes de los lados apical y basal de hESC-RPE (es decir, los compartimentos superior e inferior del transwell, respectivamente) se recogieron 60 horas después de que se cambió el medio. Los niveles de secreción de VEGF y PEDF se midieron por triplicado para cada condición con kits ELISA de VEGF y PEDF humanos disponibles comercialmente (VEGF: Cat#DVE00, R&D Systems; PEDF: Cat#RD191114200R, BioVendor), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, después 60 días de cultivo. Las lecturas de densidad óptica se midieron utilizando el lector de microplacas SpectraMax™ 250 (MolecularDevices). Los resultados se presentan como media ± SEM (error estándar de la media).

30 Mediciones de resistencia transepitelial

- La resistencia eléctrica transepitelial (TER) de las células RPE sembradas en Transwells™ (0,33 cm², Millipore) se midió usando el voltímetro del sistema de resistencia eléctrica Millicell™ (Millicell ERS-2, Millipore), según las instrucciones del fabricante. Los cultivos de 60 días se equilibraron fuera de la incubadora a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos antes del experimento. Las mediciones se realizaron en medios de cultivo sin cambios por triplicado para cada condición, en tres posiciones diferentes de cada pocillo. Se utilizaron promedios para análisis posteriores. La resistencia de fondo se determinó a partir de un inserto de cultivo en blanco en el mismo medio revestido con el sustrato correspondiente pero sin células, y se restó de la condición del experimento respectivo. Las mediciones se informan como resistencia en ohmios multiplicada por el área en centímetros cuadrados (Ω*cm²). Los resultados se presentan como media ± SEM (error estándar de la media).

Análisis bioinformático de secuenciación de ARN unicelular

- 45 Se disociaron células hESC-RPE de 60 días usando TrypLE™ Select y se pasaron a través de un filtro celular (ø 40 µm, BD Bioscience). Se resuspendieron en 1000 células/µl en BSA al 0,04% en PBS. Las células se transportaron a 4 °C a la Instalación de genómica de células individuales eucariotas (ESCG, SciLifeLab, Estocolmo, Suecia), donde se preparó una biblioteca de ADNC 3' para la secuenciación de ARN de células individuales con la plataforma 10X Genomics.
- 50 Se usó el proceso Cell Ranger™ 2.1.1 (10X Genomics) para convertir archivos de llamadas base de Illumina al formato fastq, alinear lecturas de secuenciación con el transcriptoma hg19 usando el alineador STAR y generar matrices de códigos de barras de características. Las células filtradas de control de calidad Cell Ranger™ se analizaron en R versión 3.5.1 (R Core Team), utilizando la suite Seurat™ versión 2.3.4. Como medida adicional de control de calidad, se seleccionaron células RPE con genes expresados únicos (≥ 2000 a ≤ 5000), UMI (≥ 10000 a ≤ 30000) y porcentaje de UMI mapeados a genes MT (≥ 0,025 a ≤ 0,10). De manera similar, las células hESC con genes expresados únicos (≥ 2000 a ≤ 8000), UMI (≥ 10000 a ≤ 80000) y porcentaje de UMI mapeados a genes MT (≥ 0,025 a ≤ 0,10). Esta etapa de filtración dio como resultado un conjunto de datos final de 905, 616, 725 y 779 células para hESC, CD140b+GD2-, CD140b+CD184- y muestras redistribuidas en placas 1:20, respectivamente. Antes de la reducción de dimensionalidad mediante análisis de componentes principales (PCA), la variación célula-célula en la expresión genética impulsada por UMI, la expresión de genes mitocondriales y las etapas del ciclo celular retrocedieron durante el proceso de escalado de datos. Los genes variables dentro de las muestras de RPE se seleccionaron en función de su expresión y dispersión promedio normalizadas (límite de expresión = 0,0125 a 5 y límite de dispersión inferior = 0,5). Para la selección del componente principal (PC), se evaluaron los resultados de PCHeatmap™, jackStraw™, desviaciones estándar

de PC y análisis Clustree™. Los primeros 15 PC se utilizaron para la proyección t-SNE y el análisis de agrupamiento (resolución = 0,1, perplejidad = 40).

Se analizaron agrupaciones de células mediante dos enfoques. Los genes diferenciales superiores se identificaron primero para cada grupo mediante la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon. Se calculó la expresión genética secundaria (puntuaciones de módulo) para hESC no diferenciadas y varios tipos de células presentes en la retina humana. Las células que expresan marcadores de mesodermo se subdividieron manualmente en un grupo separado utilizando funciones de trazado interactivo de Seurat™.

10 Animales

Después de la aprobación por parte del Comité de Ética Experimental con Animales del Norte de Estocolmo, en este estudio se utilizaron 9 conejos albinos blancos de Nueva Zelanda (proporcionados por la granja de conejos Lidköpings, Lidköping, Suecia) de 5 meses de edad y con un peso de 3,5 a 4,0 kg. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Declaración para el Uso de Animales en Investigaciones Oftálmicas y de la Visión.

Trasplante subretiniano

Se lavaron monocapas de hESC-RPE con PBS, se incubaron con TrypLE™ y se disociaron en una suspensión de células individuales. Las células se contaron en una cámara de hemocitómetro Neubauer usando azul de tripano al 0,4% (ThermoFisher Scientific Corp.), se centrifugaron a 300 g durante 4 minutos y el sedimento celular se resuspendió en PBS recién esterilizado por filtración hasta una concentración final de 1000 células/μl. Luego se dividieron asepticamente alícuotas de la suspensión celular en unidades de 600 μl y se mantuvieron en hielo hasta la cirugía.

Los animales se sometieron a anestesia general mediante administración intramuscular de 35 mg/kg de ketamina (Ketaminol™, 100 mg/ml, Intervet) y 5 mg/kg de xilazina (Rompun™ vet. 20 mg/ml, Bayer Animal Health), y las pupilas se dilataron con una mezcla de 0,75% ciclopentolato/2,5% fenilefrina (APL). Las microcirugías se realizaron en ambos ojos utilizando una técnica pars plana transvitrea de 25G de 2 puertos (Alcon Accurus, Alcon Nordic) como se describió anteriormente (Petrus-Reurer, S. et al., J. Vis. Exp. (2018). doi:10.3791 /56702). La suspensión celular se introdujo en una jeringa de 1 ml conectada a un tubo de extensión y una cánula de punta de polietileno de 38 G (MedOne Surgical Inc). Sin vitrectomía previa se insertó la cánula a través del trocar temporal superior. Después de la colocación adecuada de la punta, determinada mediante un blanqueamiento focal de la retina, se inyectaron lentamente 50 μL de suspensión celular (equivalente a 50.000 células) por vía subretiniana aproximadamente 6 mm por debajo del margen inferior de la cabeza del nervio óptico, formando una ampolla uniforme que era claramente visible bajo el microscopio operatorio. Se tuvo cuidado de mantener la punta dentro de la ampolla durante la inyección para minimizar el reflujo. Después de retirar el instrumento, se aplicó una ligera presión a las esclerotomías autosellantes sin sutura. Se administraron 2 mg (100 μl) de triamcinolona intravítrea (Triescencia™, Alcon Nordic) una semana antes de la cirugía y no se administraron antibióticos posquirúrgicos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la obtención de células del Epitelio Pigmentario de la Retina (RPE), que comprende:
 - a. proporcionar un cultivo de células madre pluripotentes humanas adherentes a un primer sustrato que comprende una primera laminina;
 - b. exponer las células madre a un medio de diferenciación durante un primer período de tiempo de 15 días a 50 días para obtener una primera población de células adherentes que comprende células RPE y/o progenitores de las mismas;
 - c. al final del primer período de tiempo, disociar la primera población del primer sustrato;
 - d. redistribuir en placas la primera población disociada de células sobre un segundo sustrato que comprende una segunda laminina; y
 - e. cultivar la primera población de células redistribuidas en placas sobre el segundo sustrato durante un segundo período de tiempo para obtener una segunda población de células expandida y madura que comprende las células RPE;

en el que la primera y segunda lamininas se seleccionan independientemente entre LN-521, LN-511, LN-111 y LN-121, y son una proteína intacta o un fragmento de proteína que tiene esencialmente la misma actividad que una proteína intacta;

en el que el procedimiento comprende cuantificar la fracción de células que expresan el marcador CD140b; y

en el que la etapa de disociación (c) se inicia cuando al menos el 30% de las células son **positivas** para el marcador y/o en el que la etapa de cultivo (e) continúa hasta que al menos el 80% de las células son **positivas** para el marcador.
2. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer y/o segundo sustrato contienen sólo un único tipo de laminina; o

en el que la primera laminina es LN-111 o LN-521 y la segunda laminina es LN-521; o

en el que la primera laminina es LN-111 y la segunda laminina es LN-521; o

en el que la primera y segunda lamininas son ambas LN-521.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la(s) laminina(s) es(son) una(s) proteína(s) intacta(s).
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células madre se cultivan en un medio de cultivo de células madre que comprende bFGF o TGFbeta, y se incluye un inhibidor de Rho-quinasa en el medio de cultivo de células madre durante un período de tiempo de 12 horas a 48 horas antes del inicio de la exposición al medio de diferenciación.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la Activina A está incluida en el medio de diferenciación.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la Activina A se incluye en el medio de diferenciación no antes de un punto de tiempo de 4 días a 8 días desde la exposición y que finaliza en el tiempo de la etapa de disociación.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende cuantificar el número o fracción de células que expresan un marcador seleccionado entre CD56, CD104, CD164, CD220 o EGFR.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa de disociación (c) se inicia cuando al menos el 30% de las células son **positivas** para el marcador y/o en el que la etapa de cultivo (e) se continúa hasta que al menos el 80% de las células son **positivas** para el marcador.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende cuantificar el número o fracción de células que expresan un marcador seleccionado entre GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 o CD326.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la etapa de disociación (c) se inicia cuando al menos el 30% de las células son **negativas** para el marcador y/o en el que la etapa de cultivo (e) se continúa hasta que al menos el 80% de las células son **negativas** para el marcador.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera población de células disociadas se redistribuye en placas sin ninguna selección.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera población de células disociadas se enriquece antes de redistribuirla en placas mediante las etapas de:

F1. marcar un marcador de superficie celular en la primera población de células disociada;
 F2. separar las células que son positivas para dicho marcador de superficie celular de las células que son negativas para dicho marcador de superficie celular para obtener una primera población de células enriquecida que está más enriquecida en células RPE y/o progenitores de las mismas que la primera población de células disociadas; y
 F3. utilizar la primera población de células enriquecida en la etapa de redistribución en placas.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el marcador de superficie celular se selecciona entre CD140b, CD56, CD104, CD164, CD220, CD165 y EGFR, y en el que las células positivas para dicho marcador de superficie celular se seleccionan preferentemente para la primera población de células enriquecida.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el marcador de superficie celular se selecciona entre GD2, CD184, CD10, CD30, CD49a, CD49b, CD50, CD171, TRA-1-60 y CD326, y en el que las células son negativas para dicho marcador de superficie celular se seleccionan preferentemente para la primera población enriquecida.

15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la disociación del primer sustrato implica formar una suspensión de células individuales de la primera población de células.

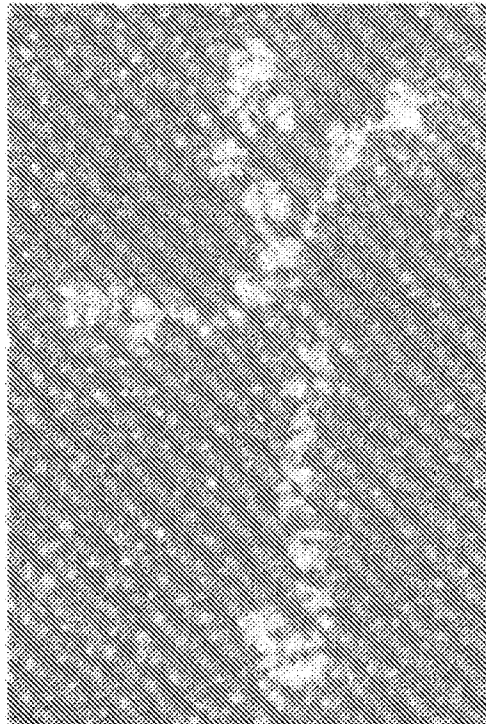


FIG. 1

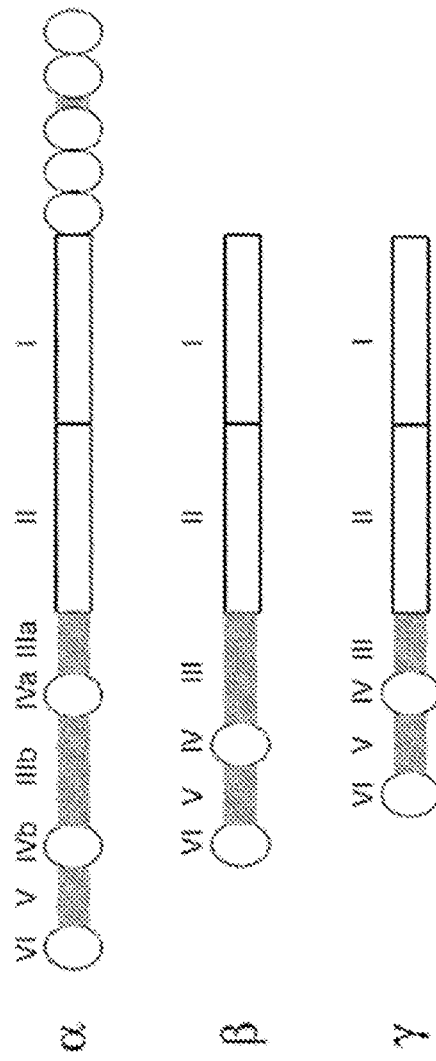


FIG. 2

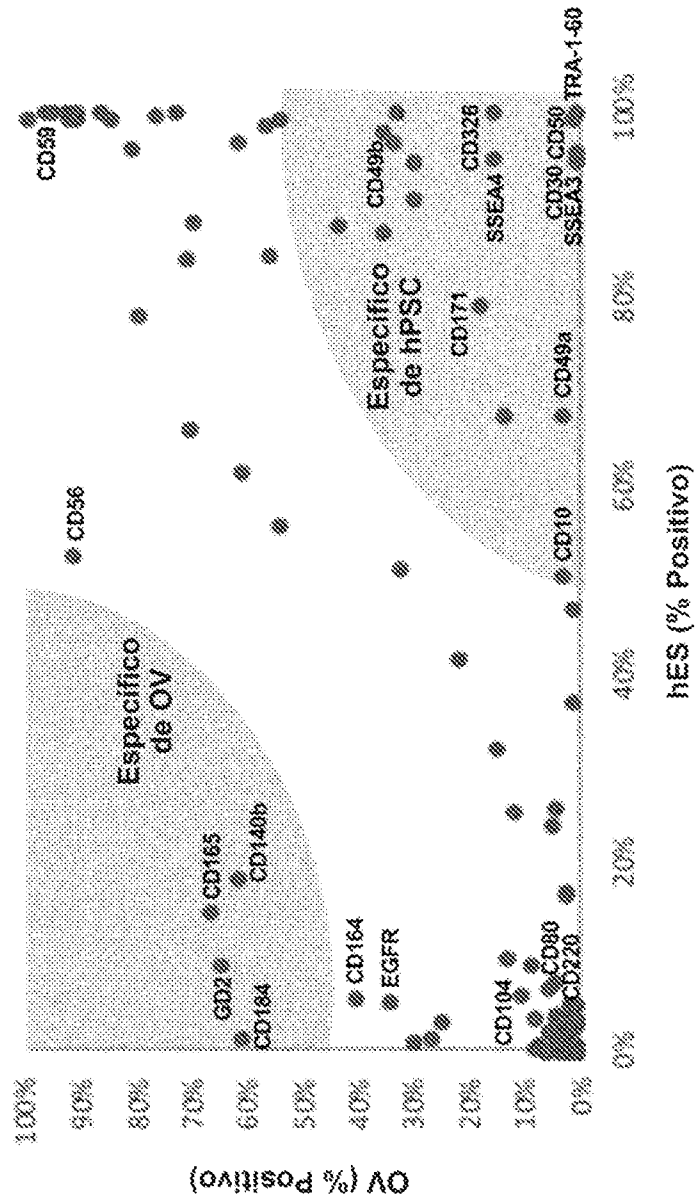


FIG. 3

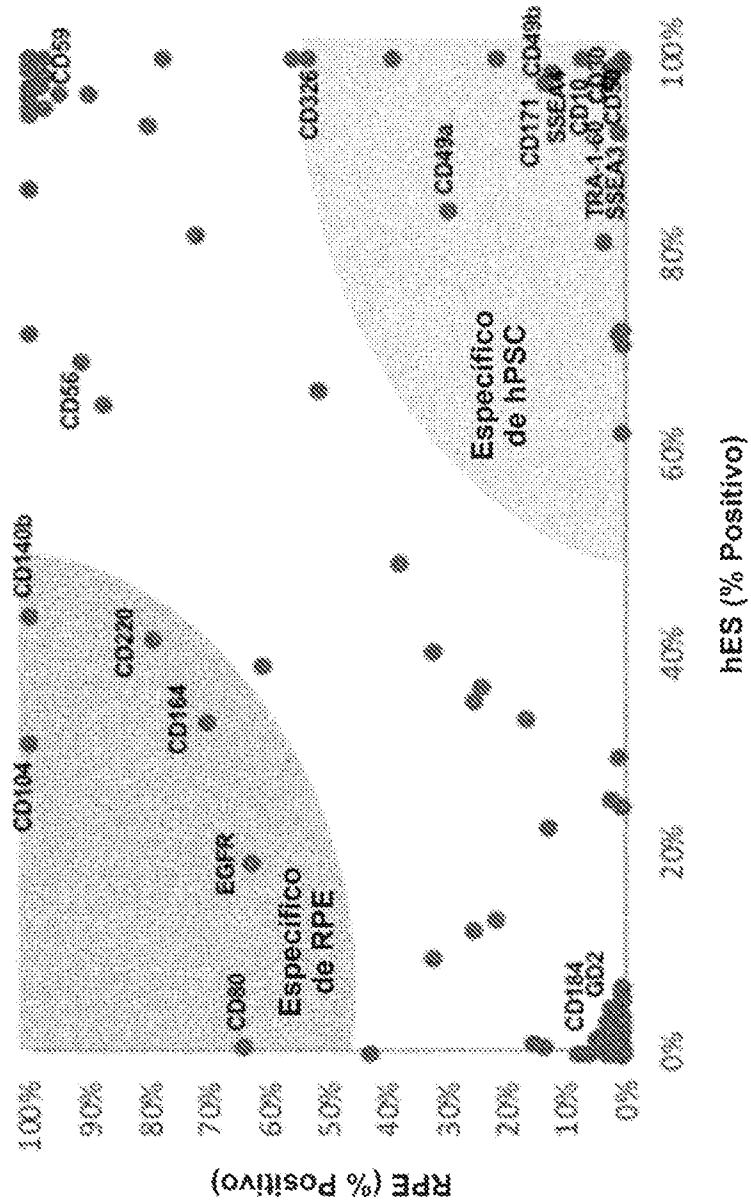


FIG. 4

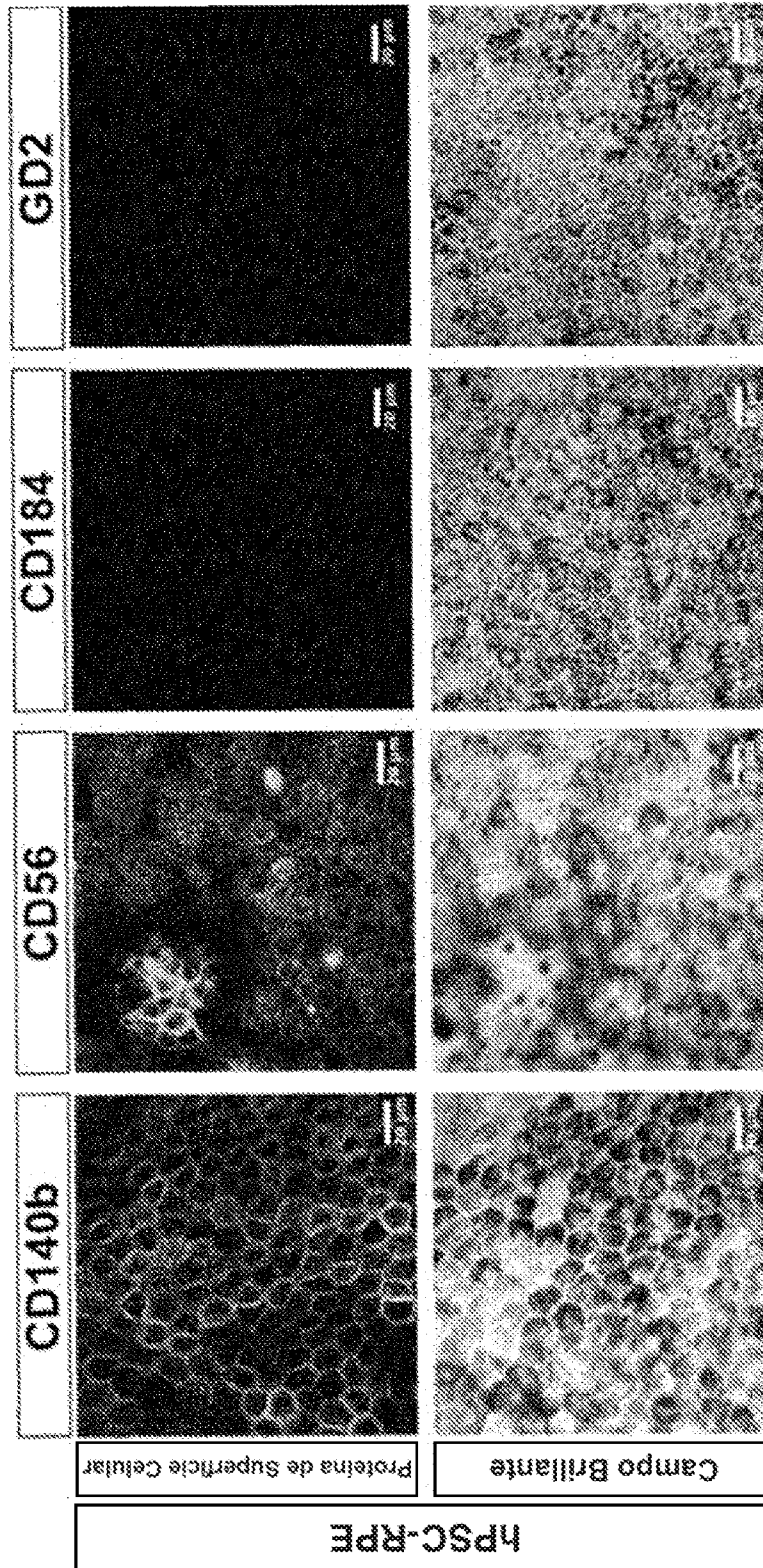


FIG. 5

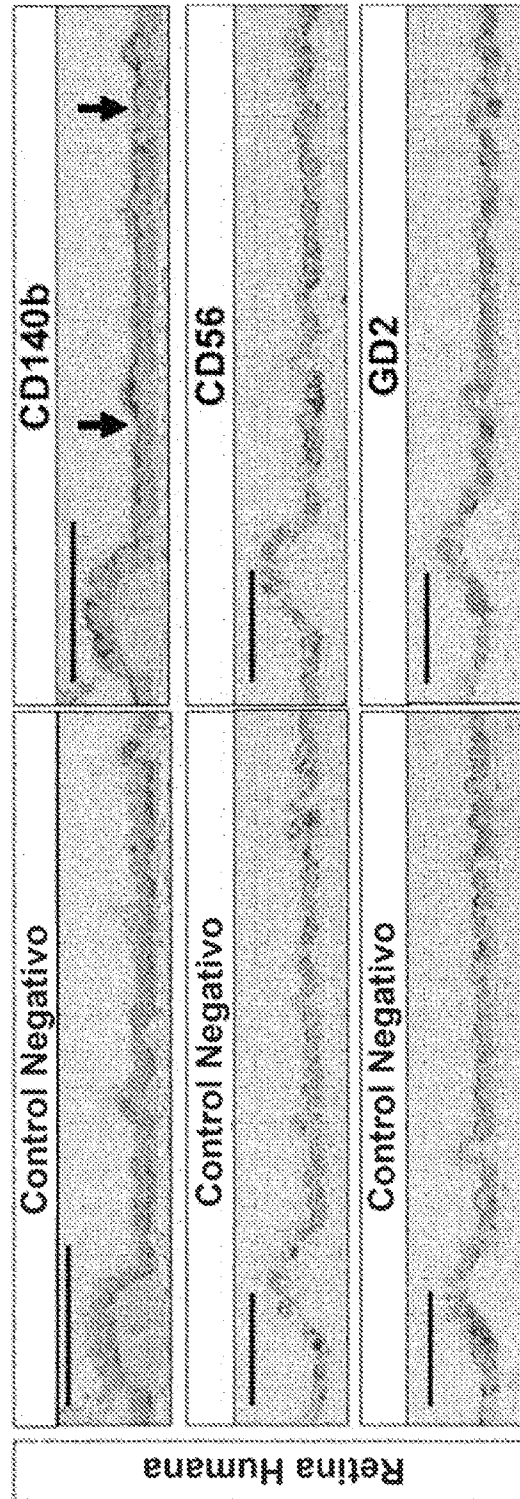


FIG. 6

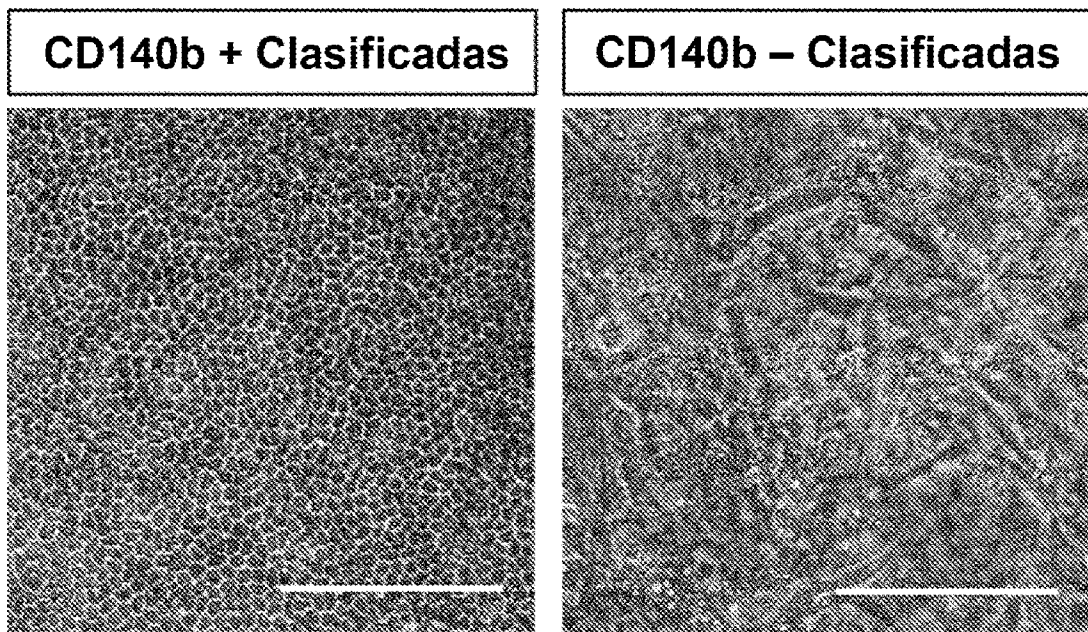


FIG. 7

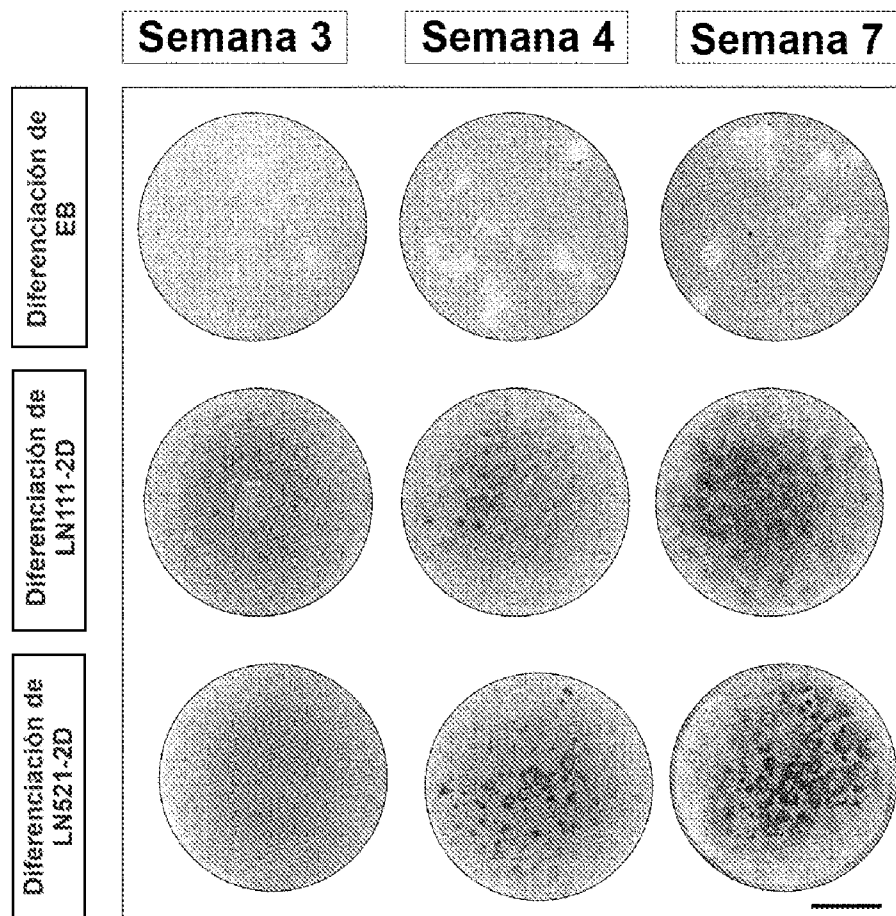


FIG. 8

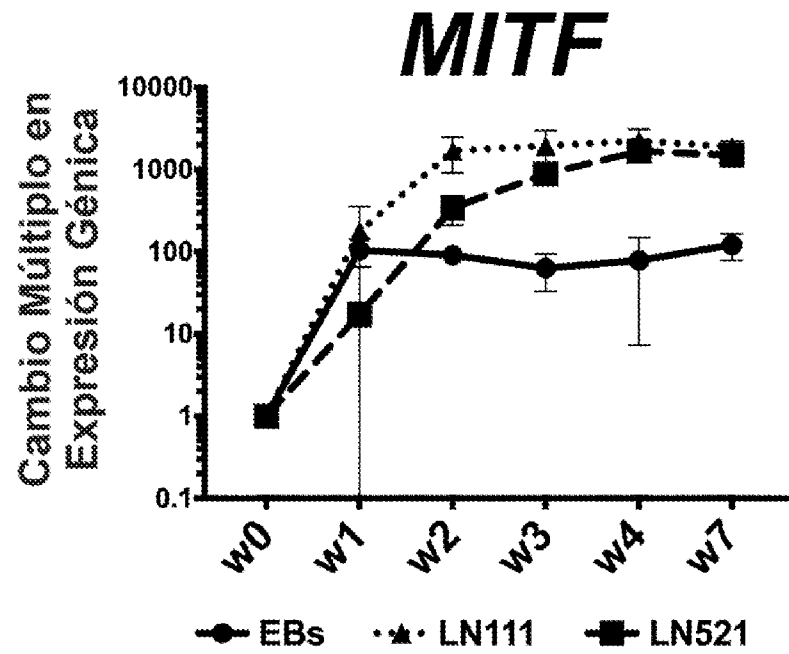


Fig 9A

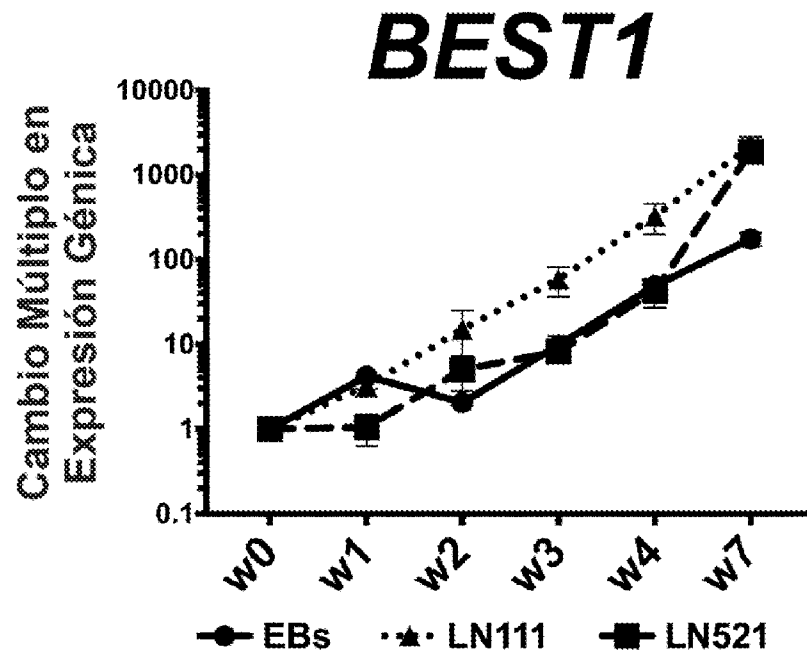


Fig 9B

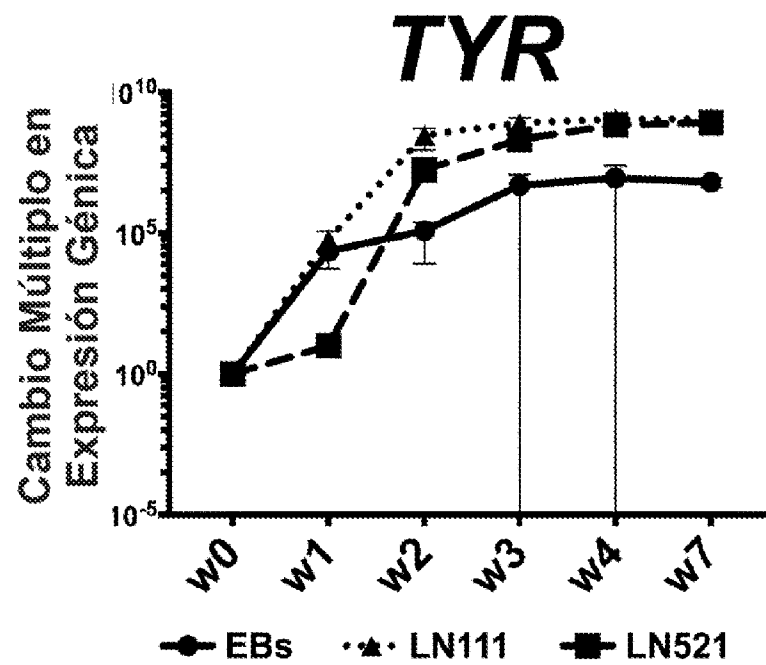


Fig 9C

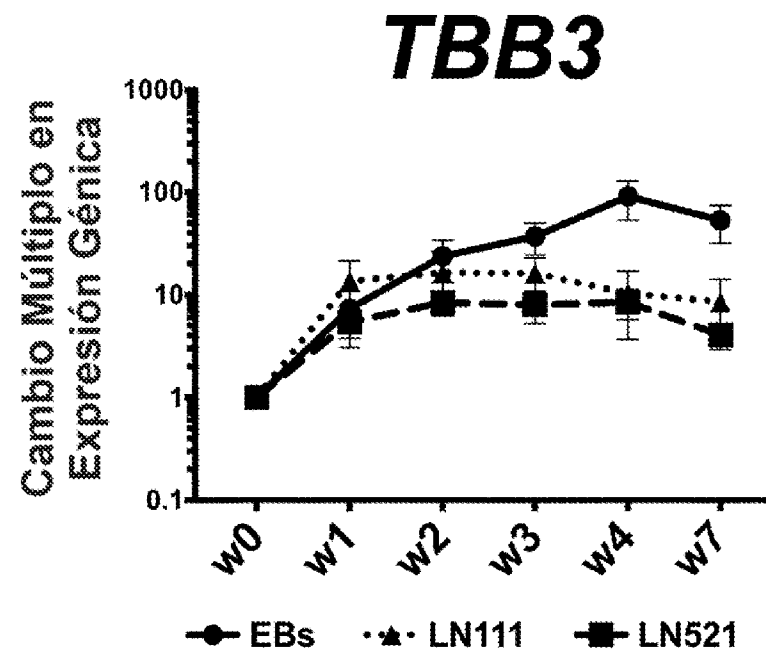


Fig 9D

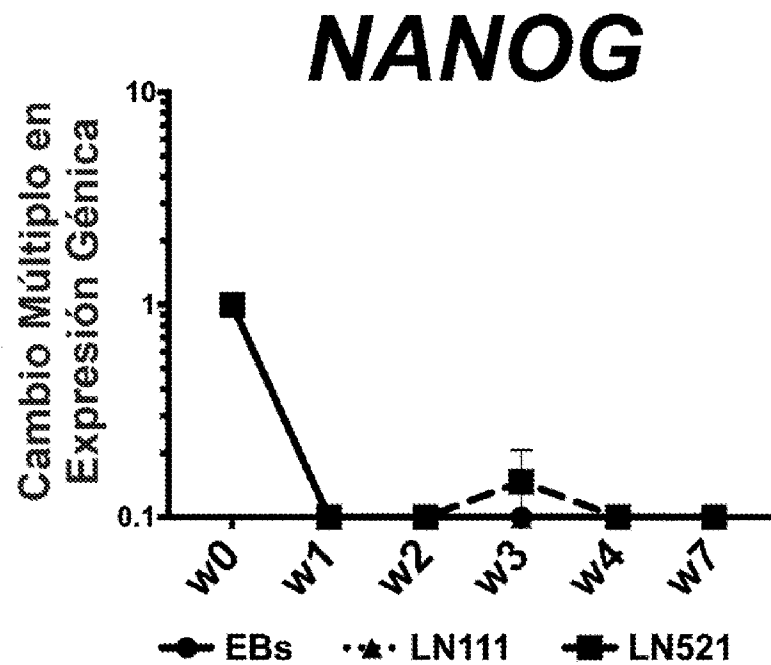


Fig 9E

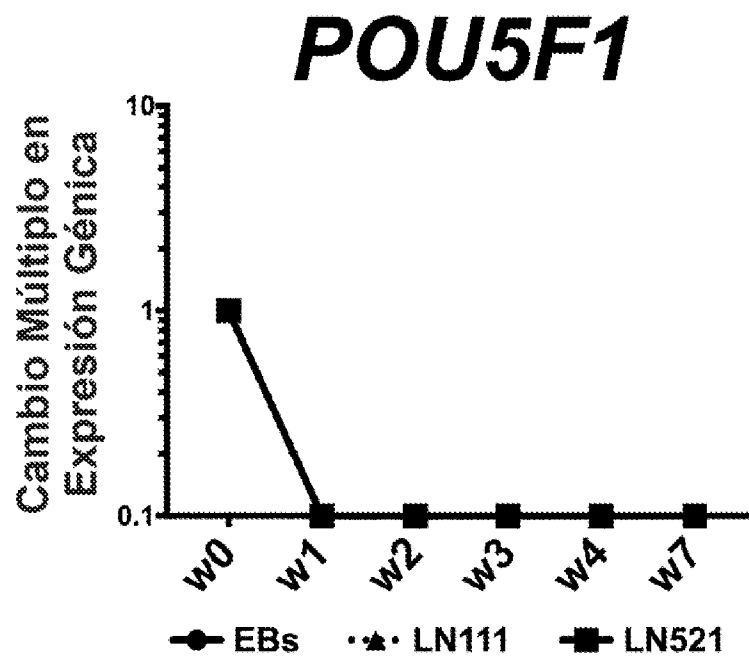


Fig 9F

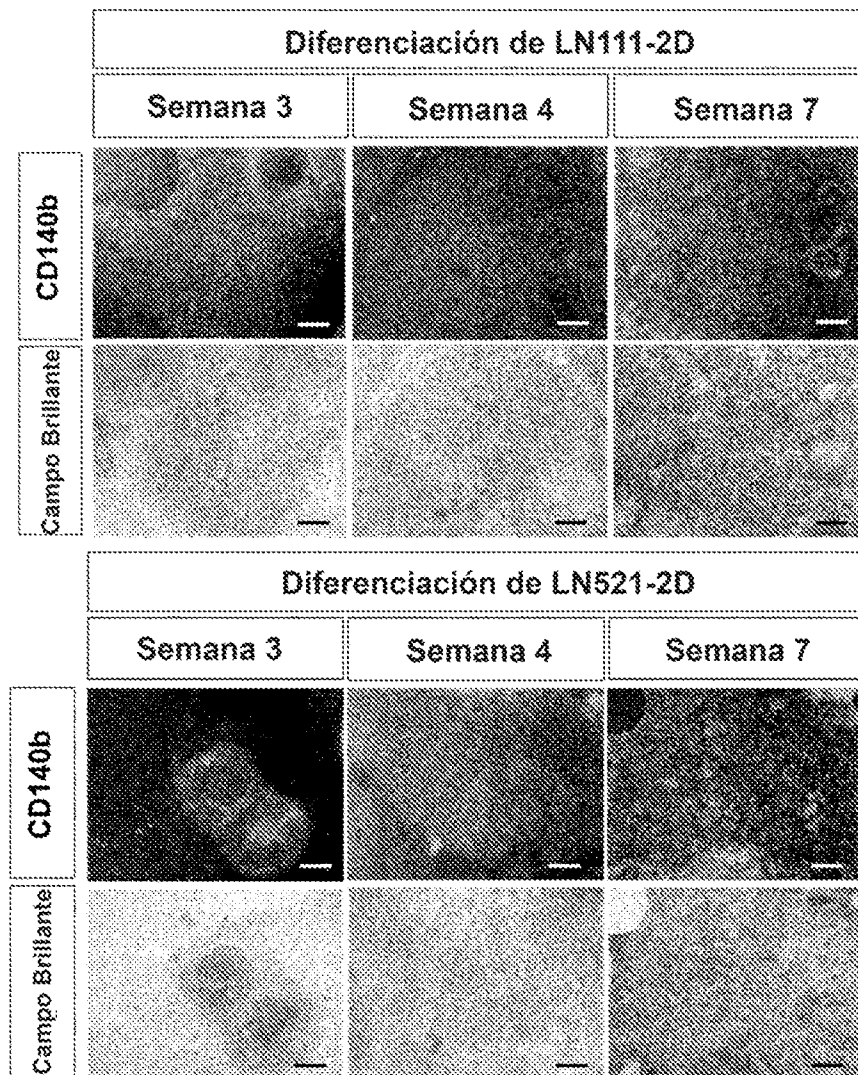


FIG. 10

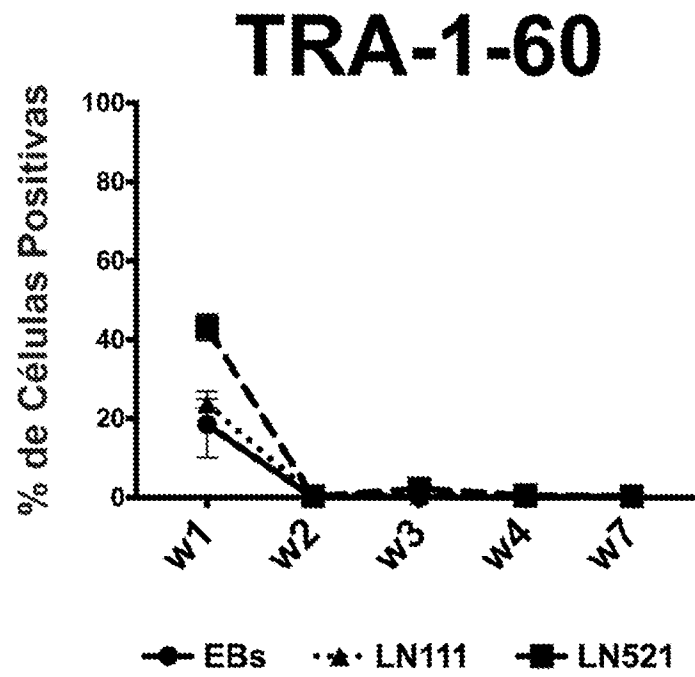


Fig 11A

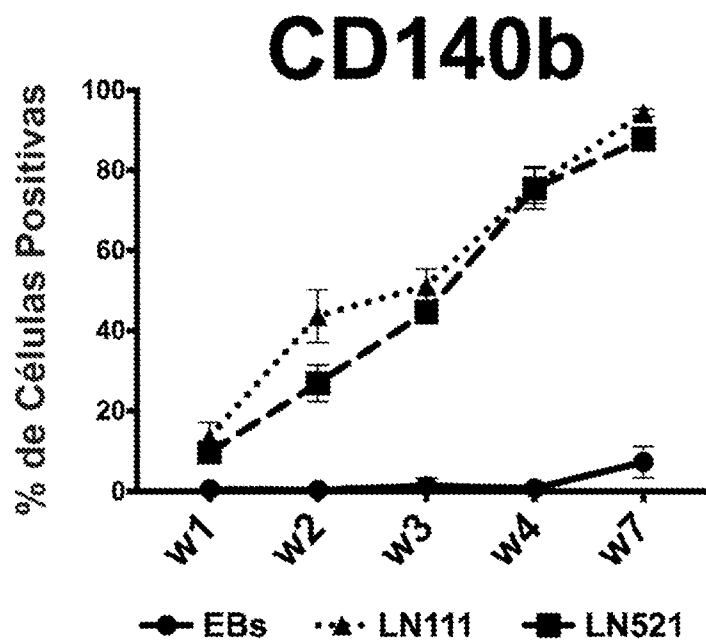


Fig 11B

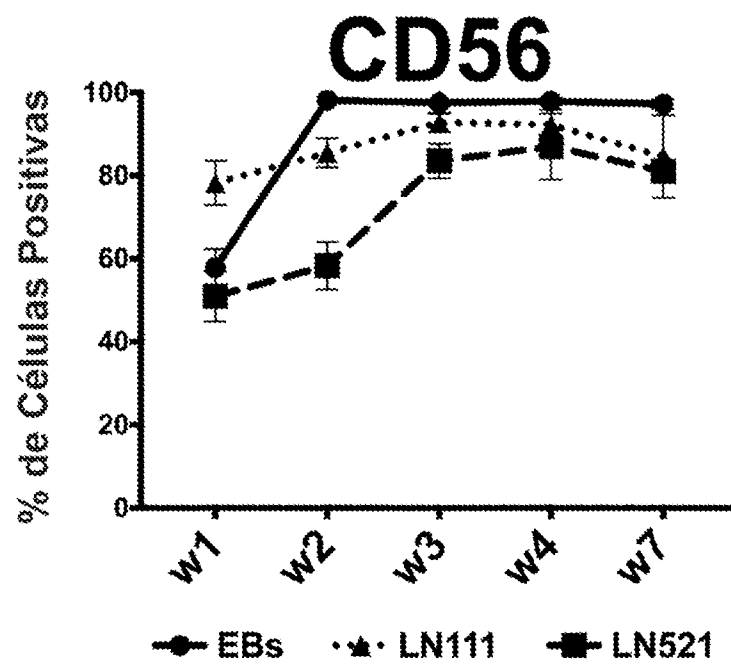


Fig 11C

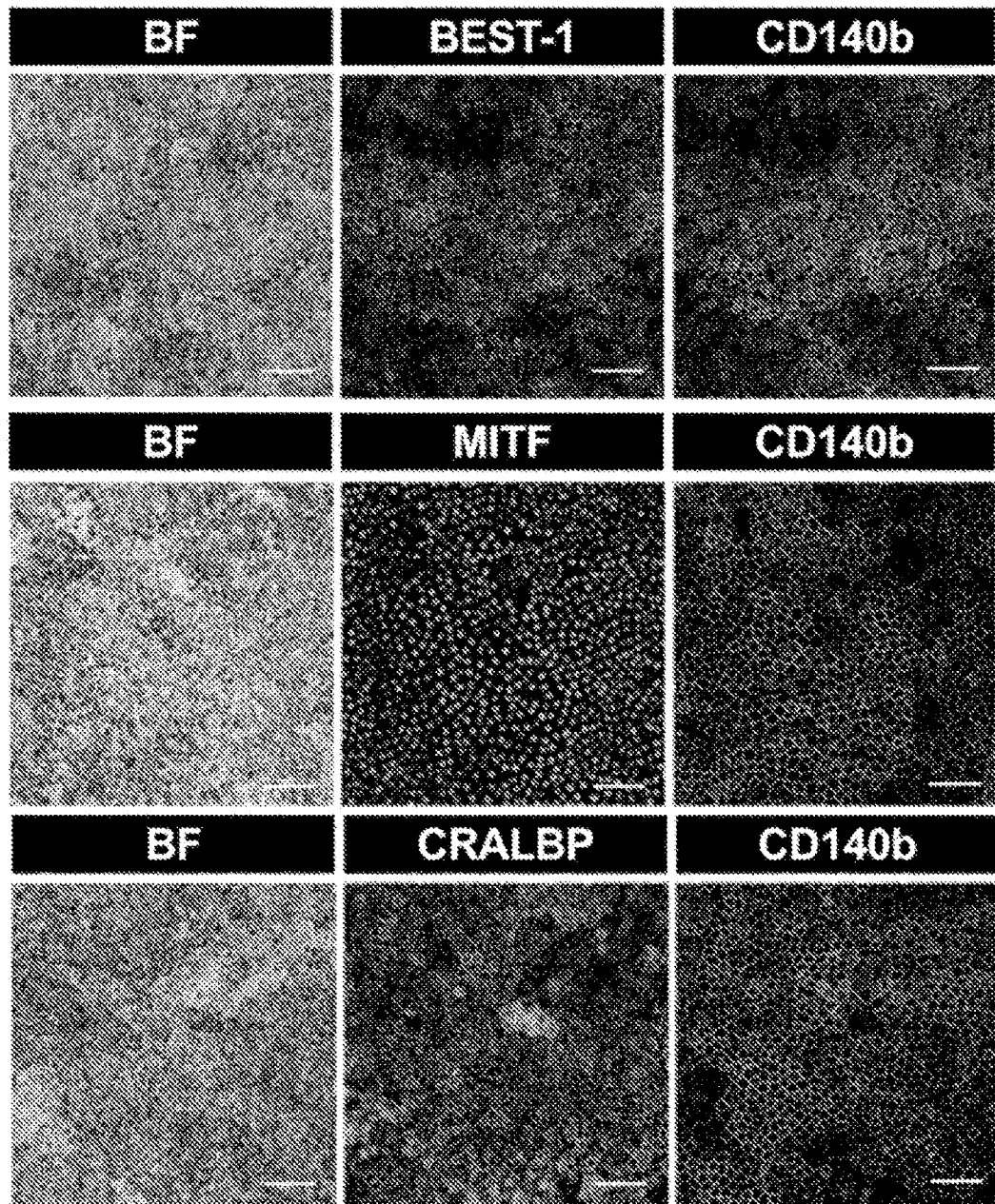


Fig 12

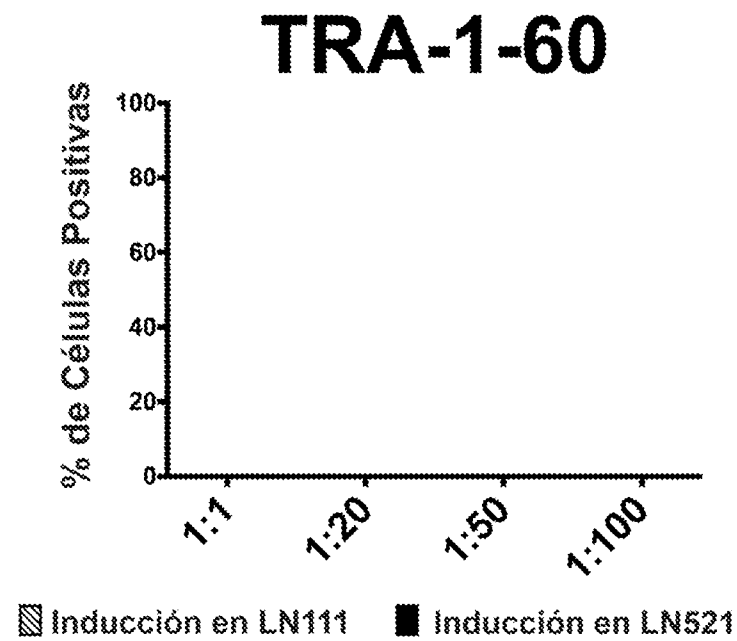


Fig 13A

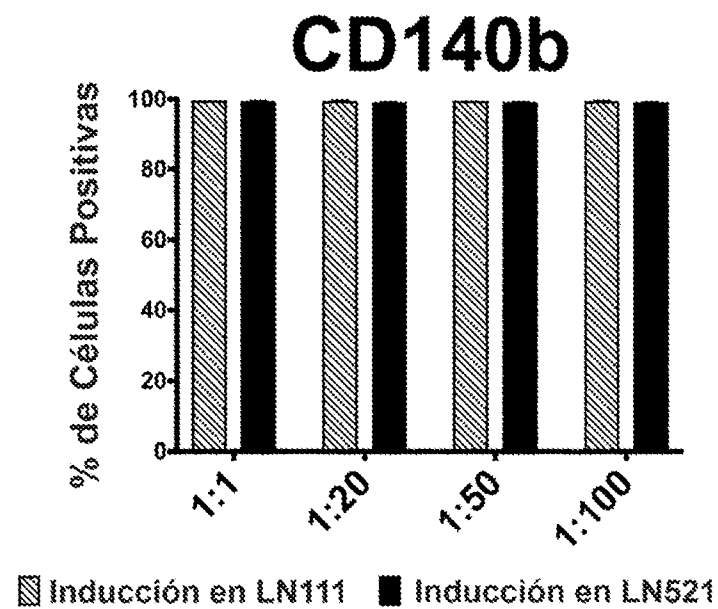


Fig 13B

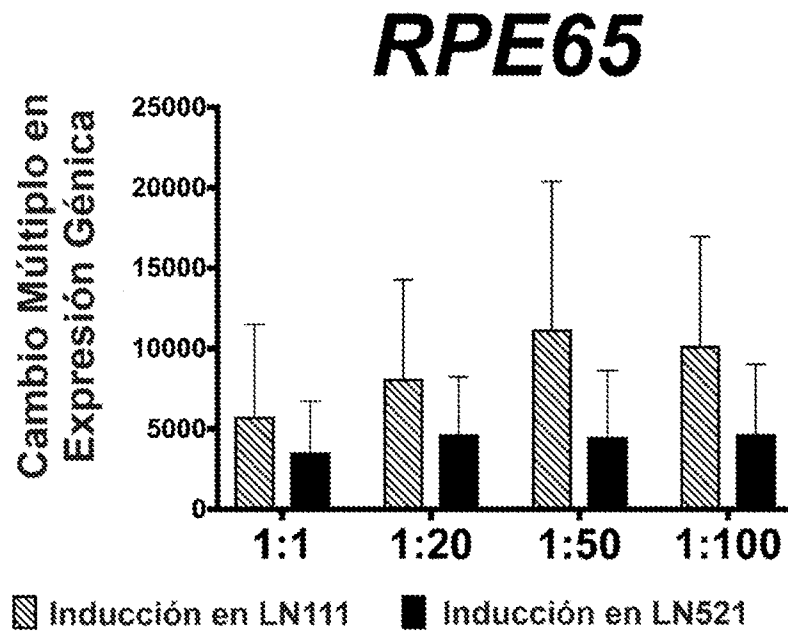


Fig 14A

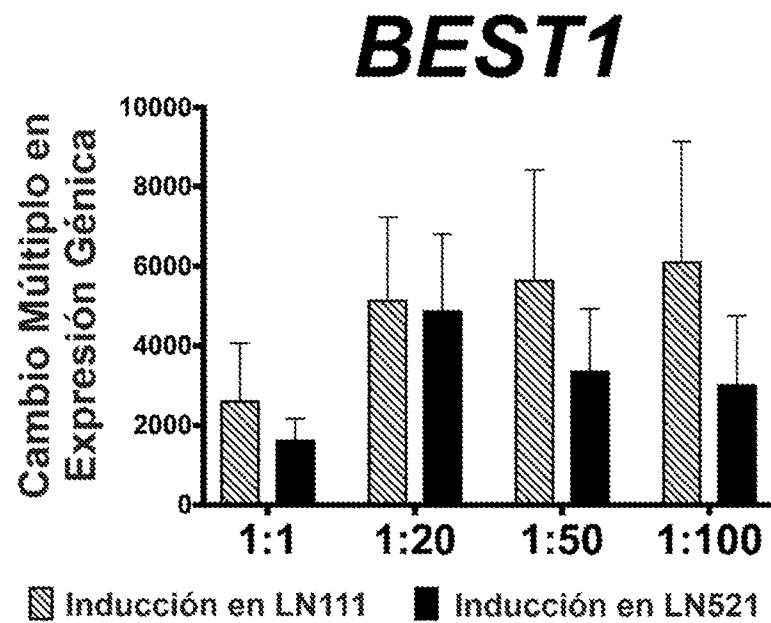


Fig 14B

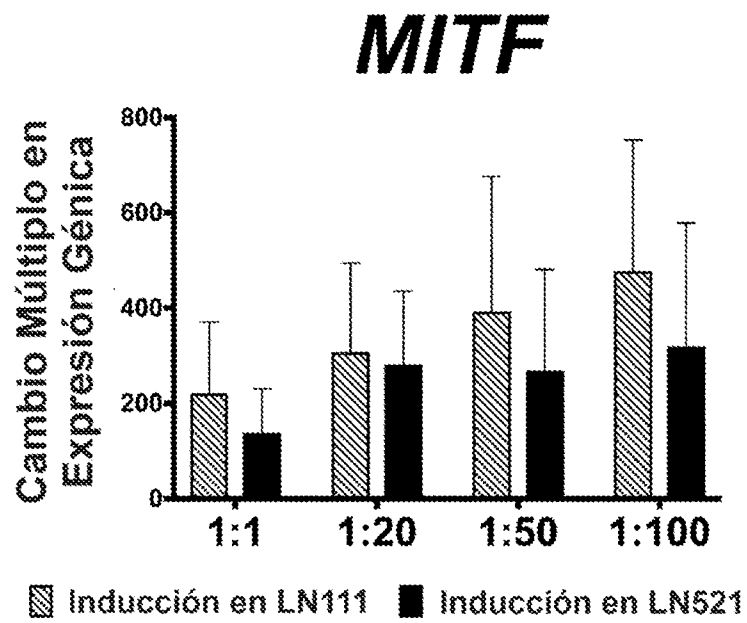


Fig 14C

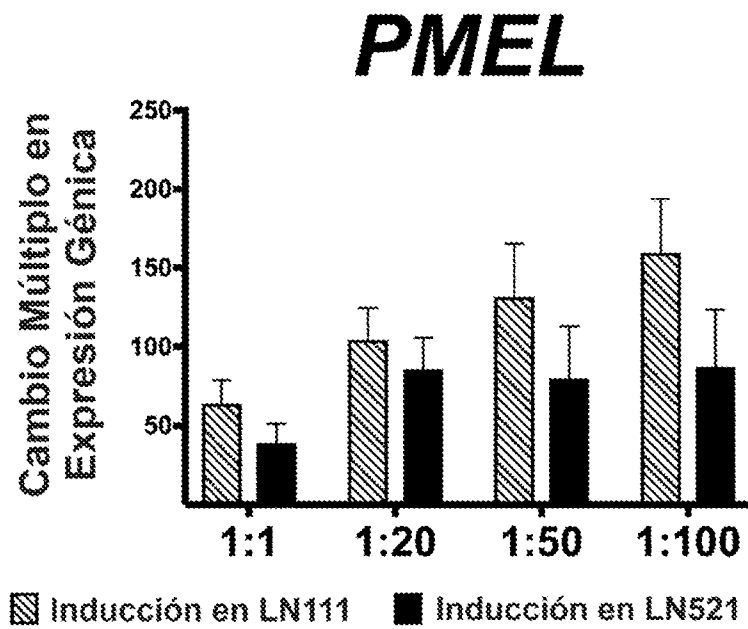


Fig 14D

NANOG

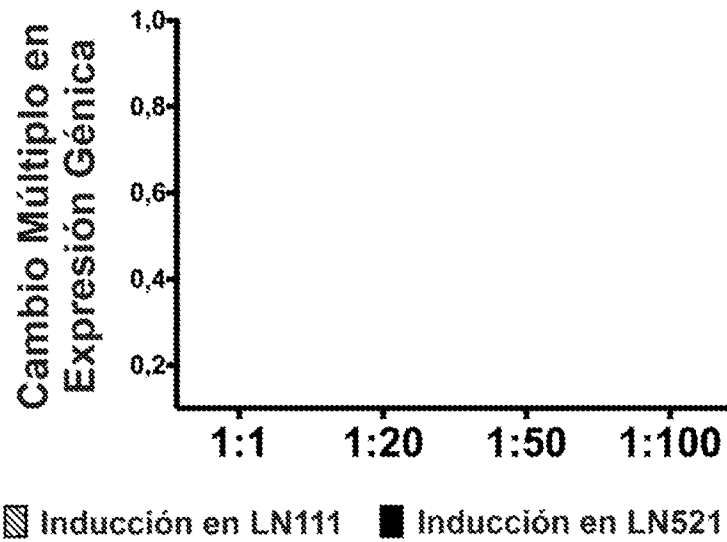


Fig 14E

TBB3

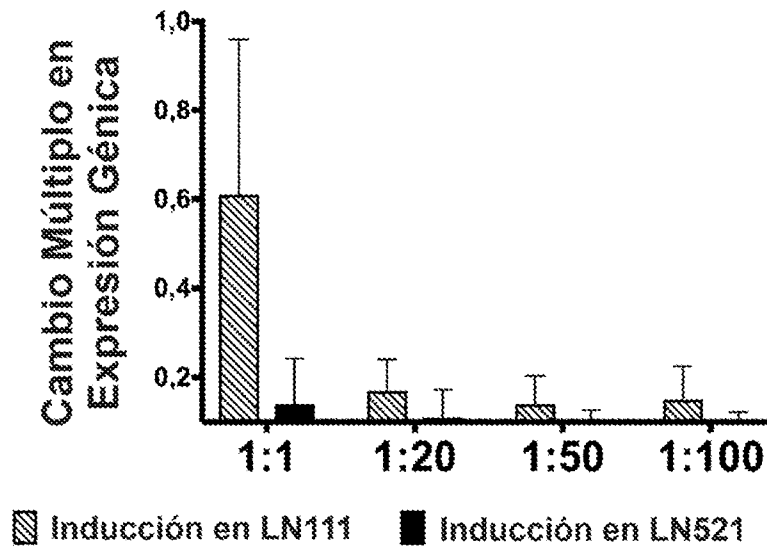


Fig 14F

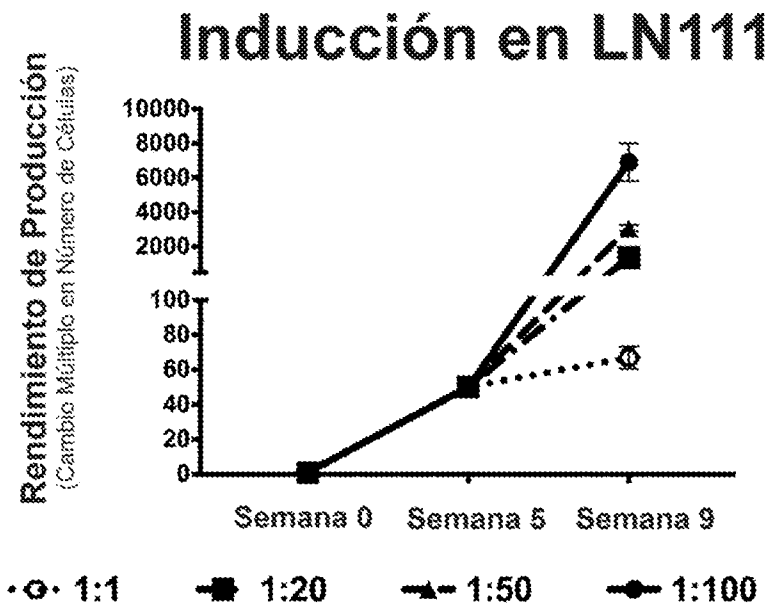


Fig 15A

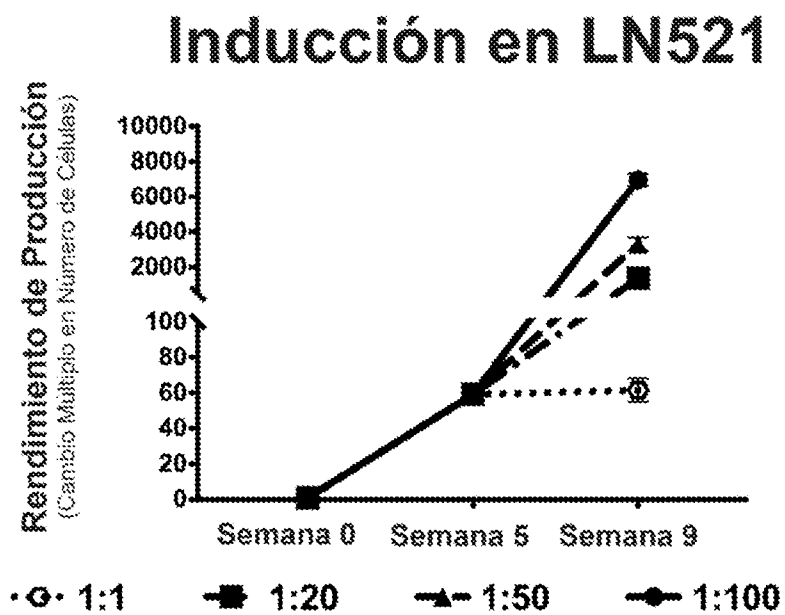


Fig 15B

TEER

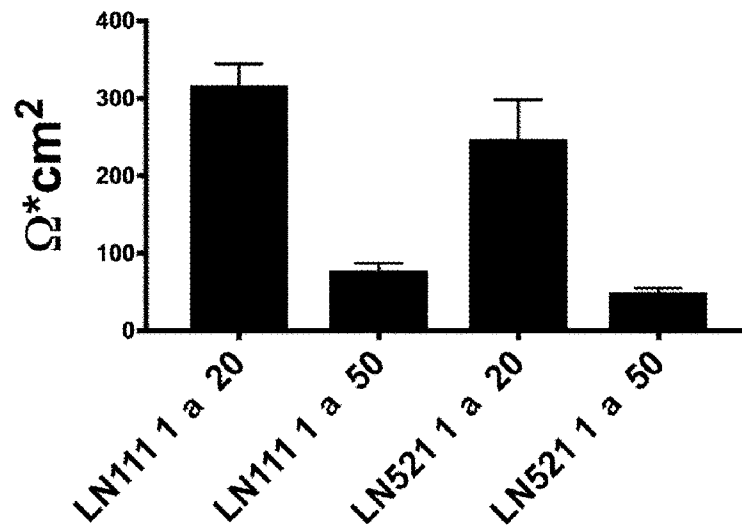


Fig 16A

Secreción de PEDF

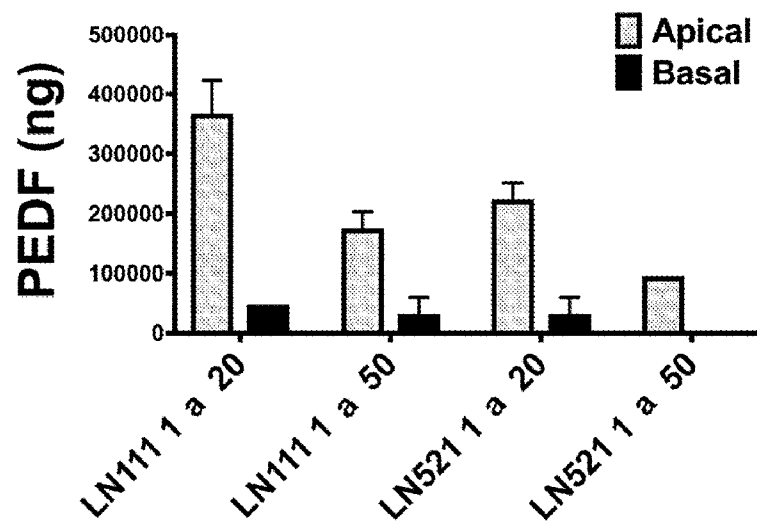


Fig 16B

Fagocitosis

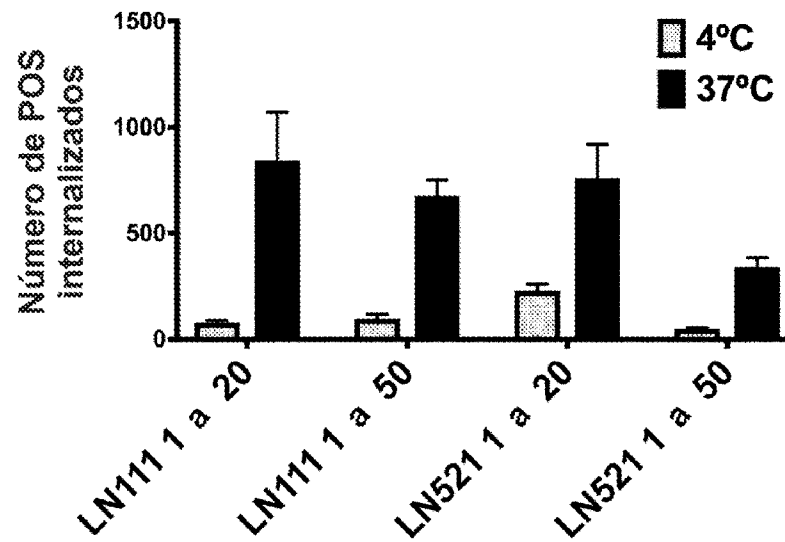
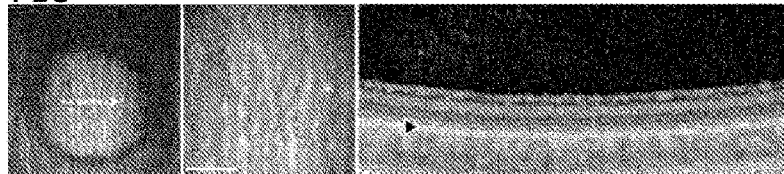


Fig 16C

PBS



LN521



LN111

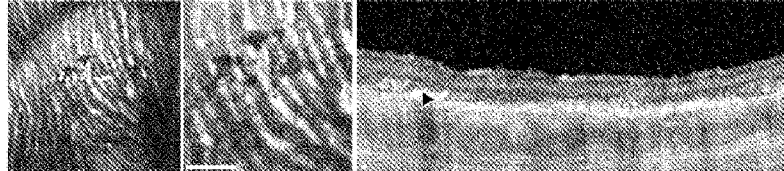
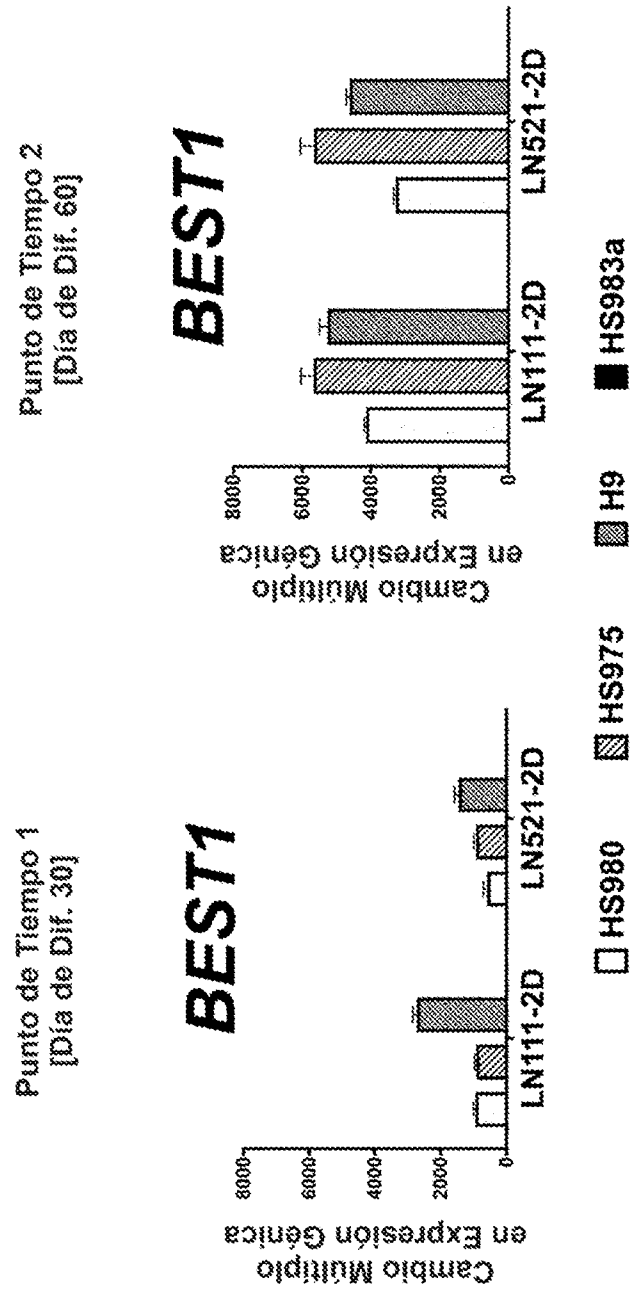


Fig 16D



Figs 17A,17B

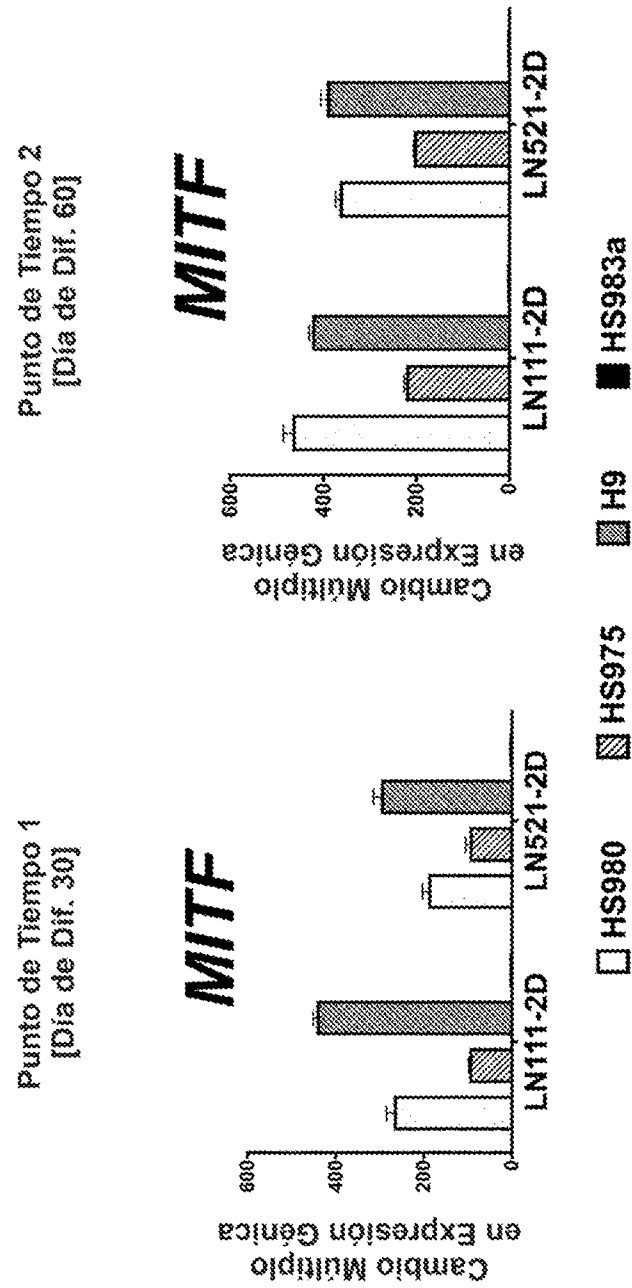
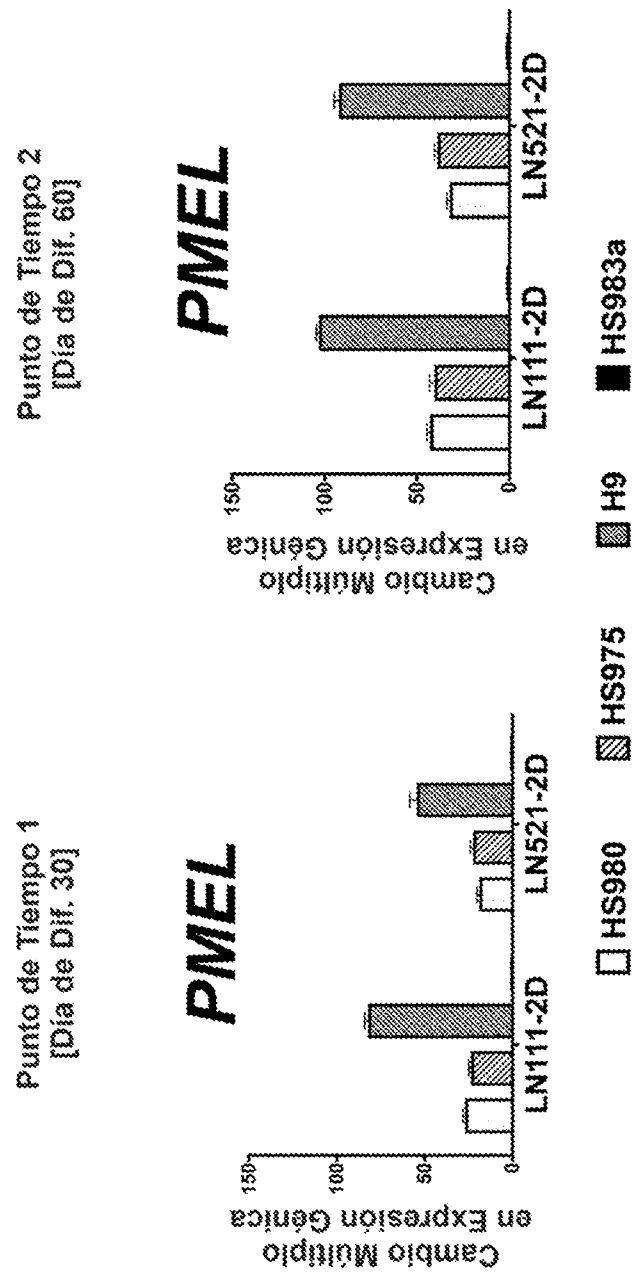
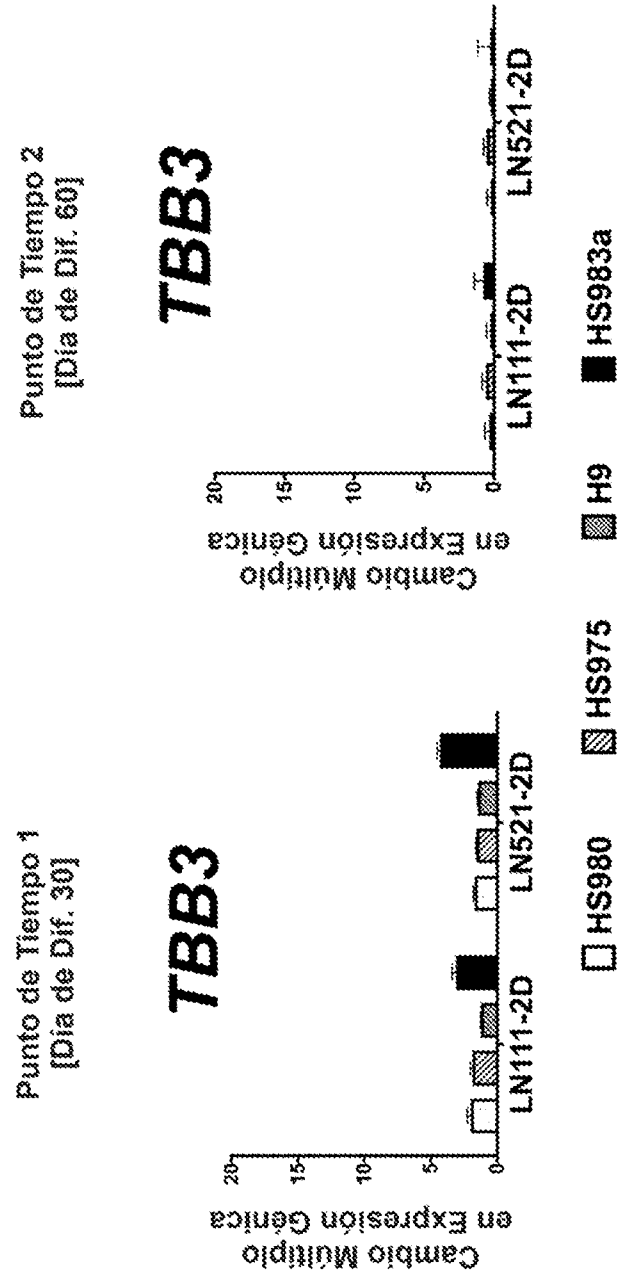


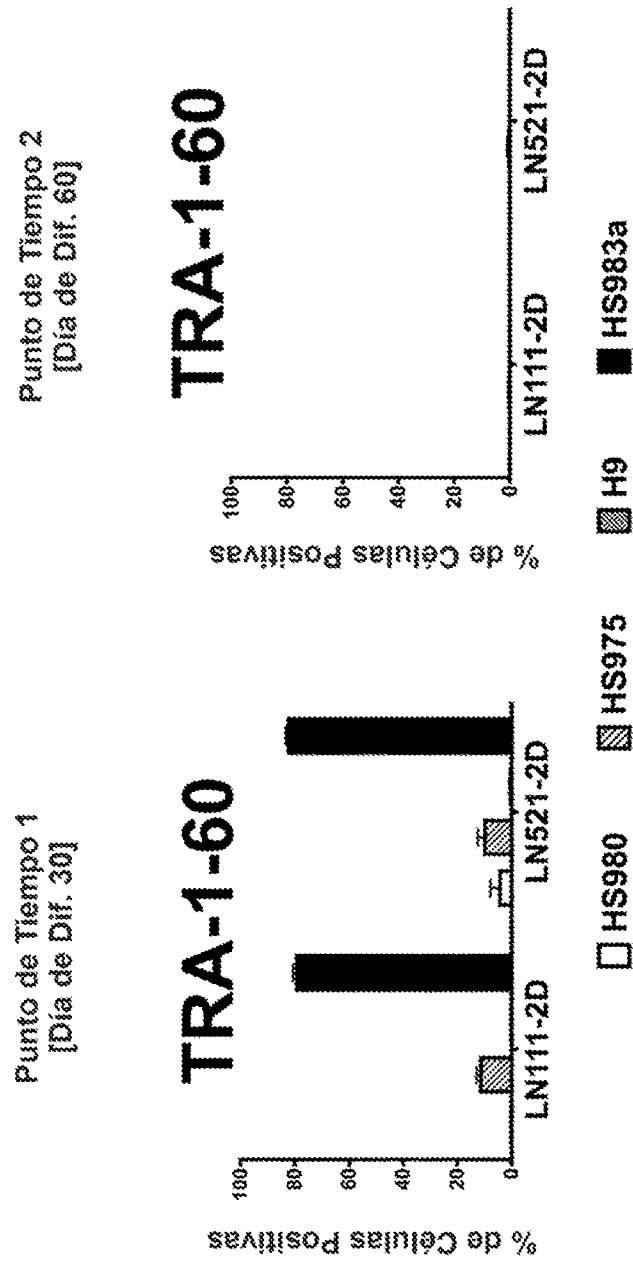
Fig 18A, 18B



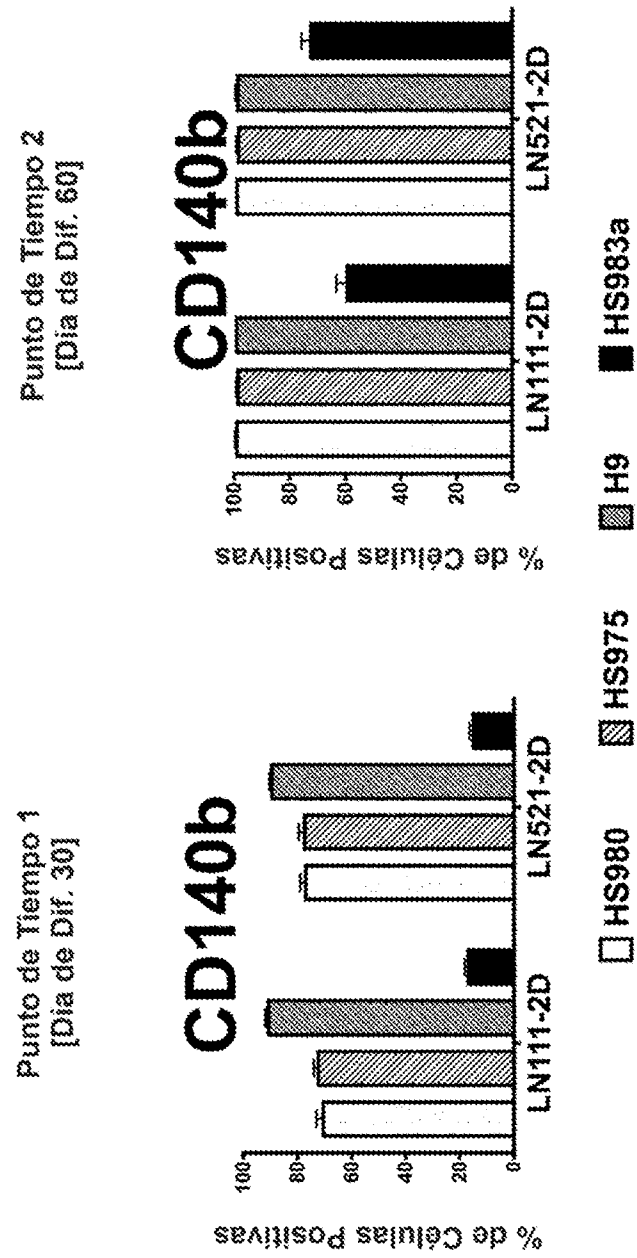
Figs 19A, 19B



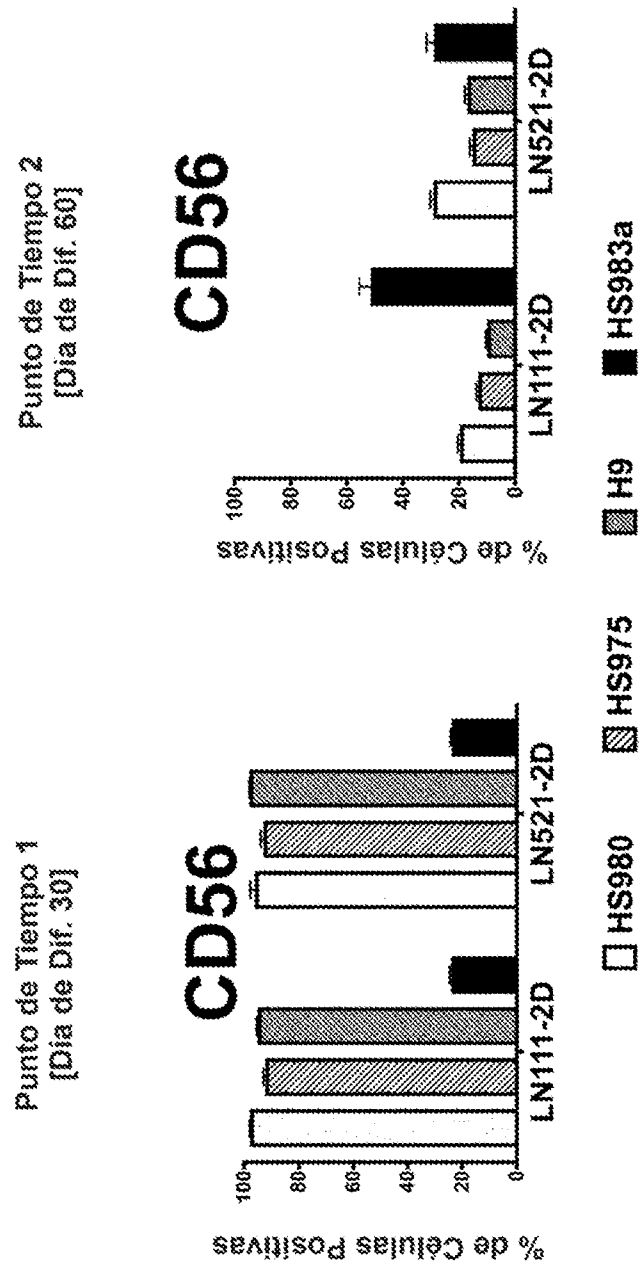
Figs 20A, 20B



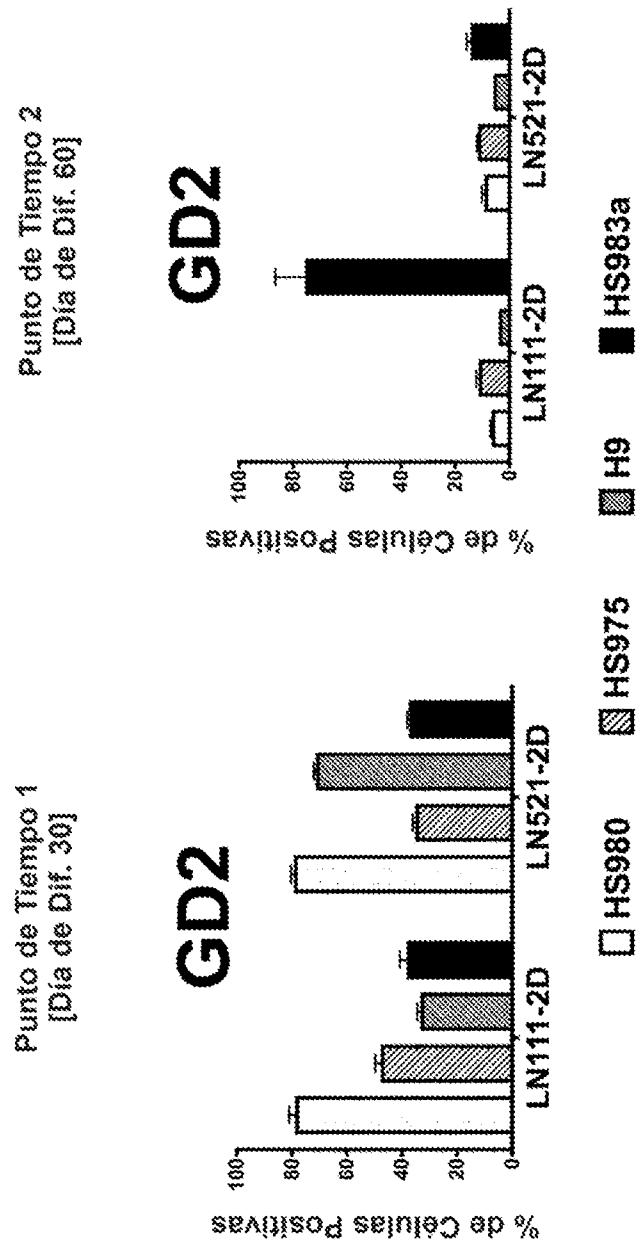
Figs 21A, 21B



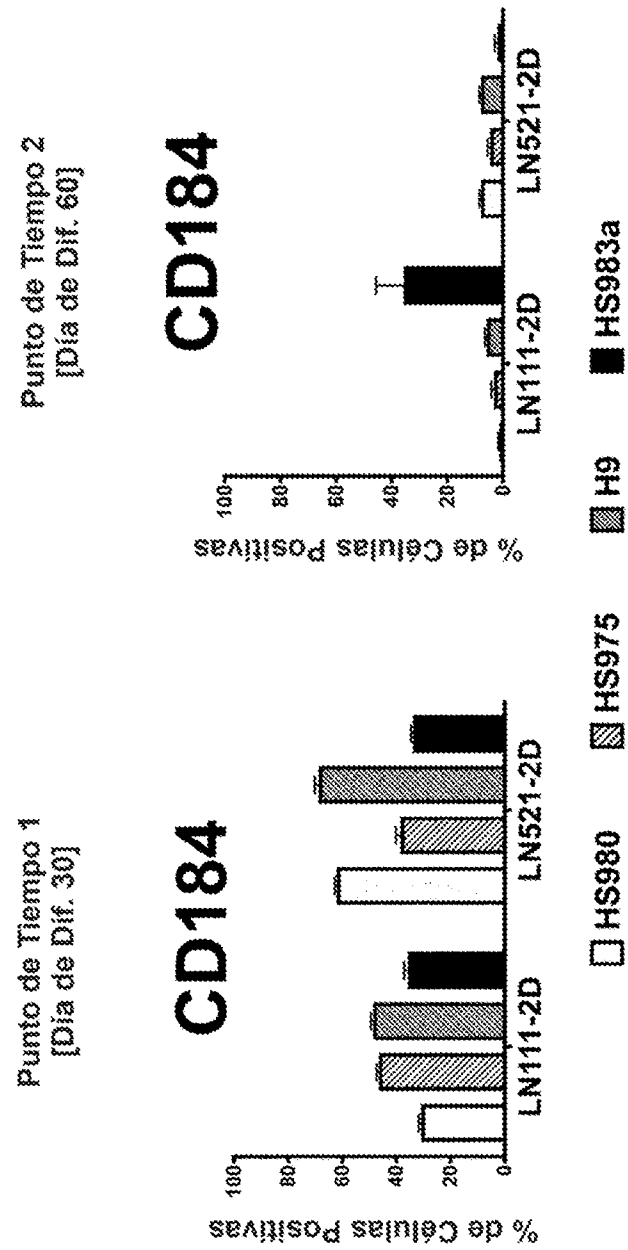
Figs 22A, 22B



Figs 23A, 23B

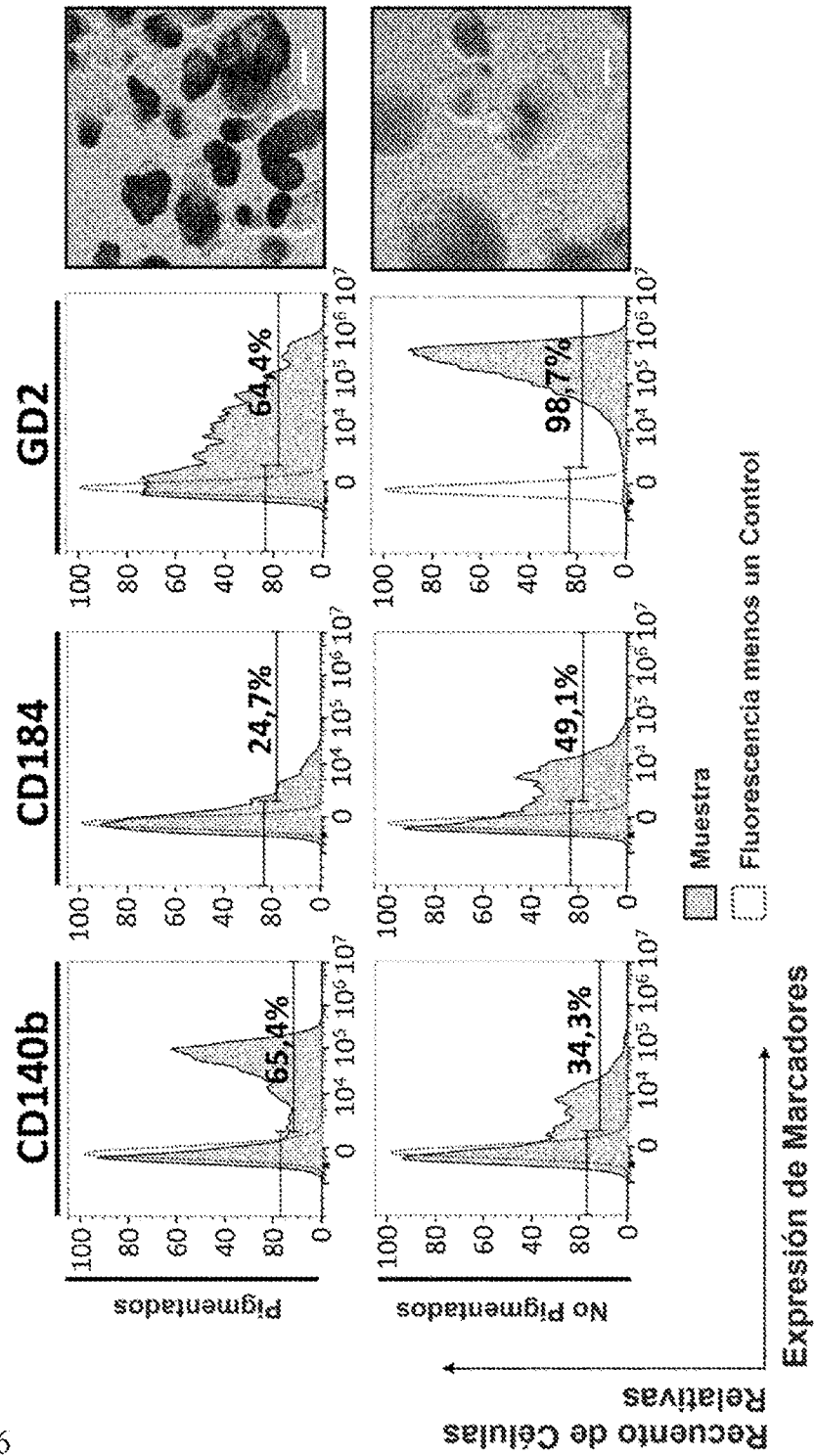


Figs 24A, 24B



Figs 25A, B

Fig 26



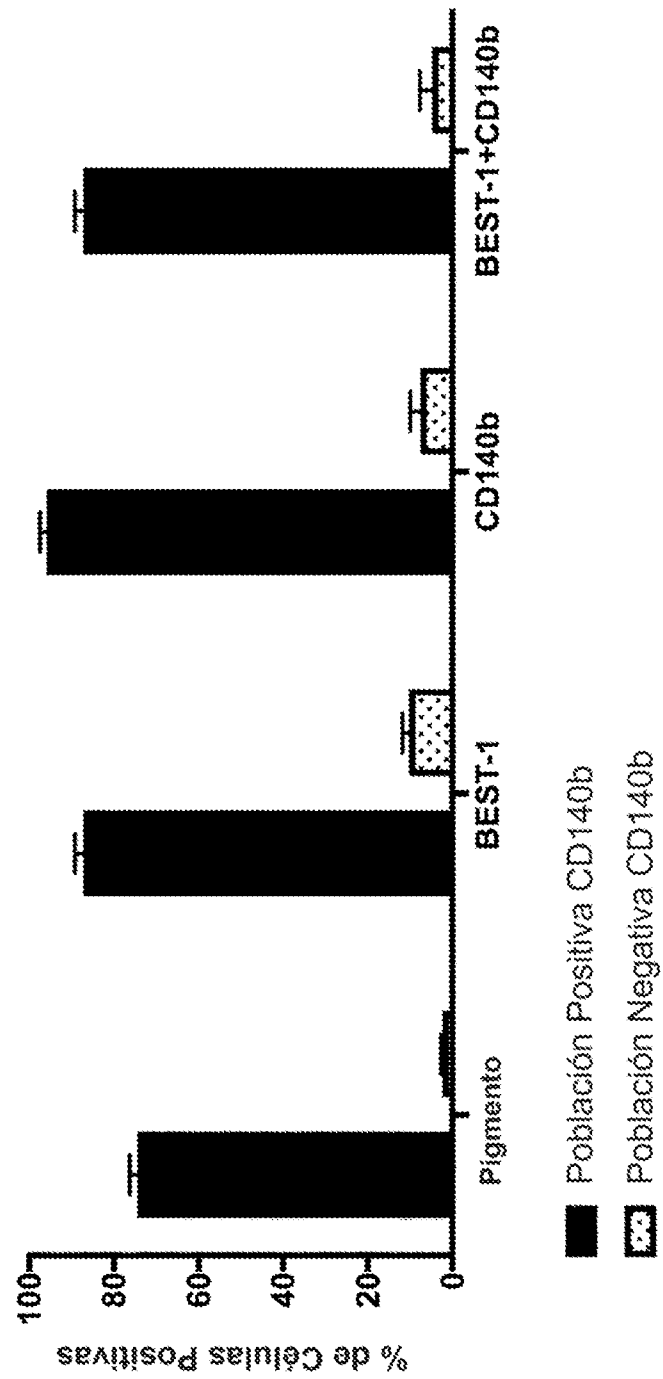
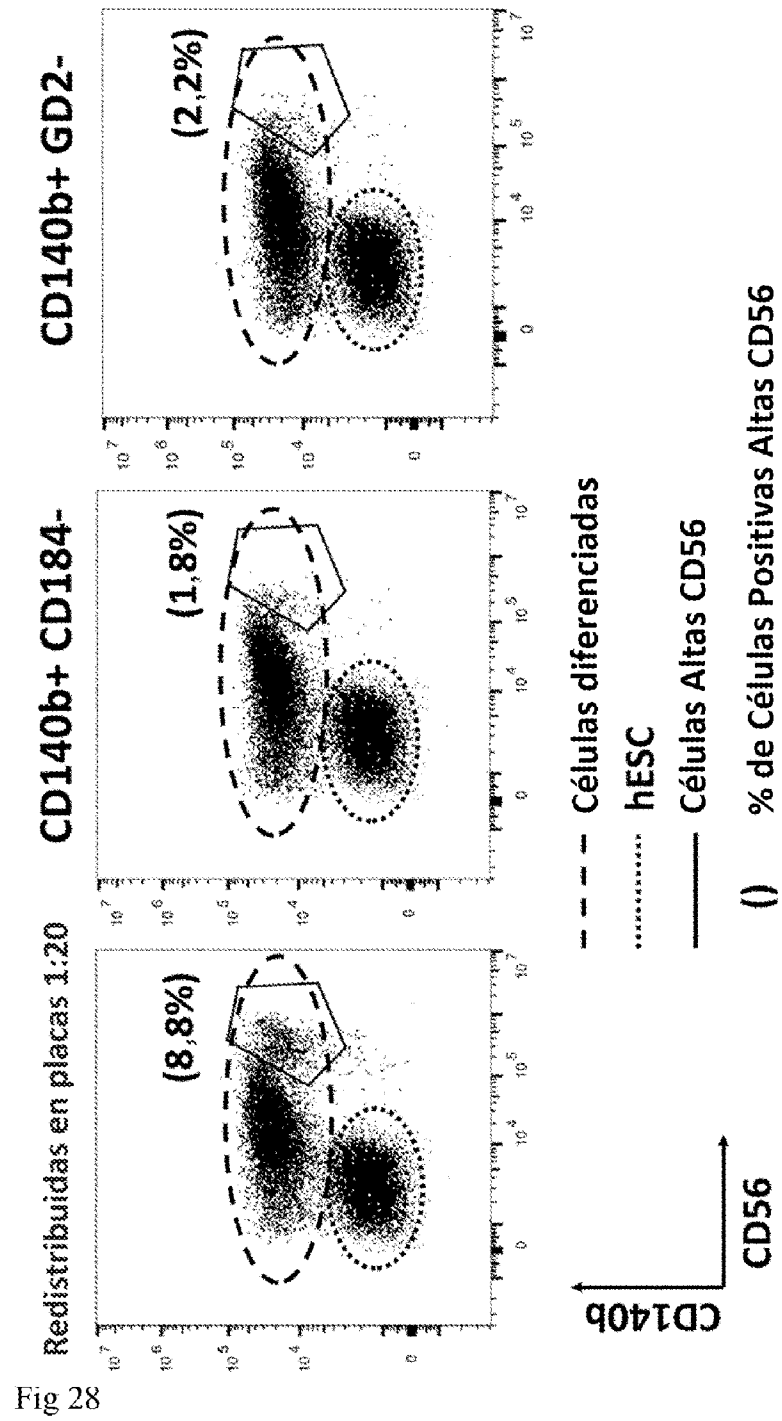


Fig 27



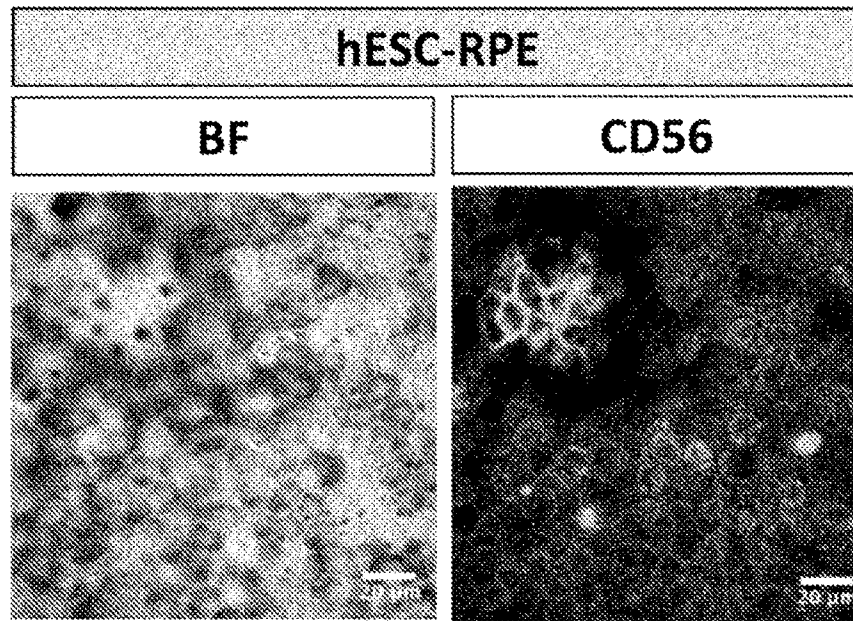


Fig 29

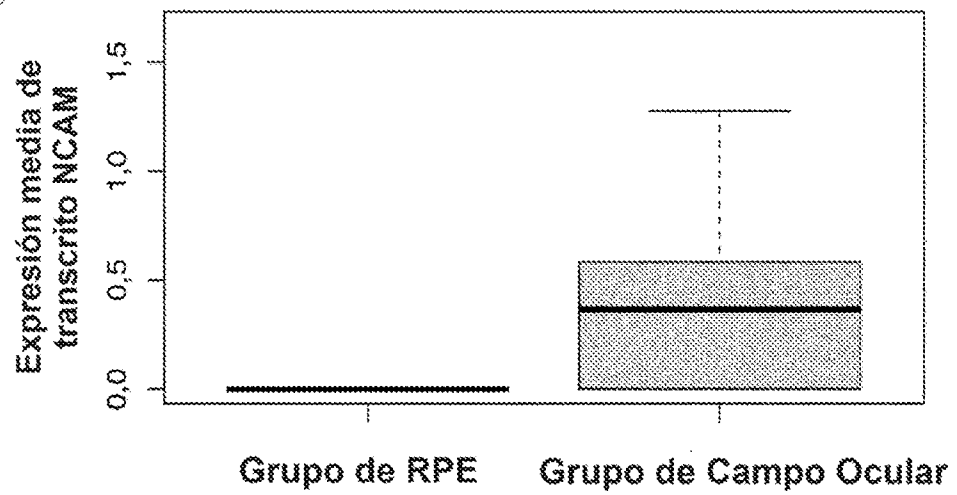


Fig 30

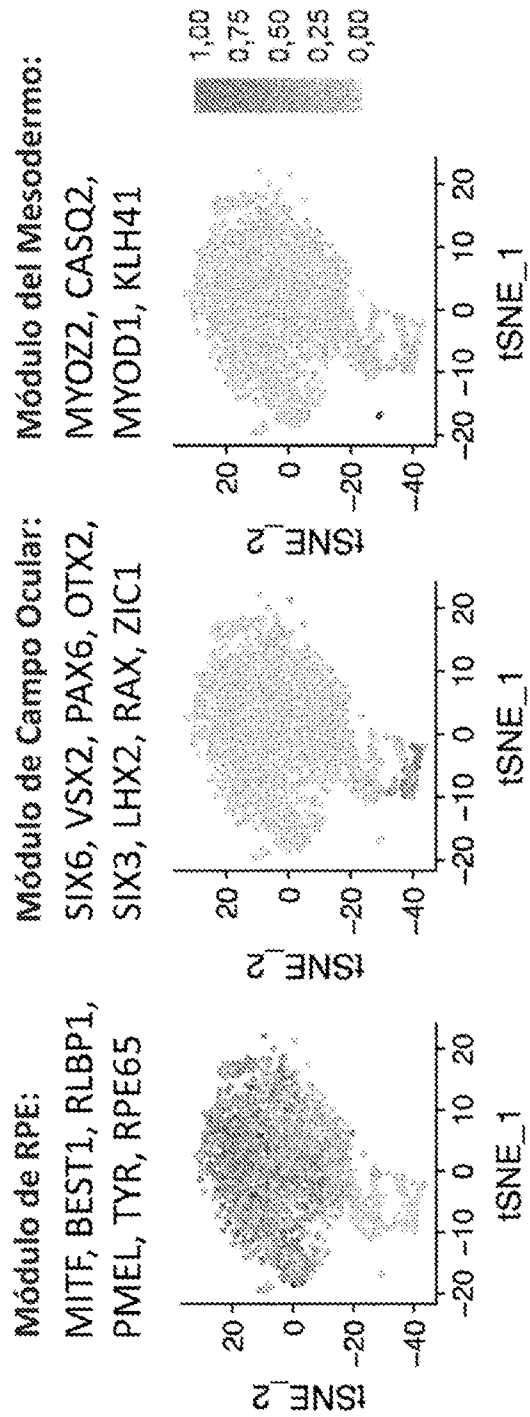


Fig 31

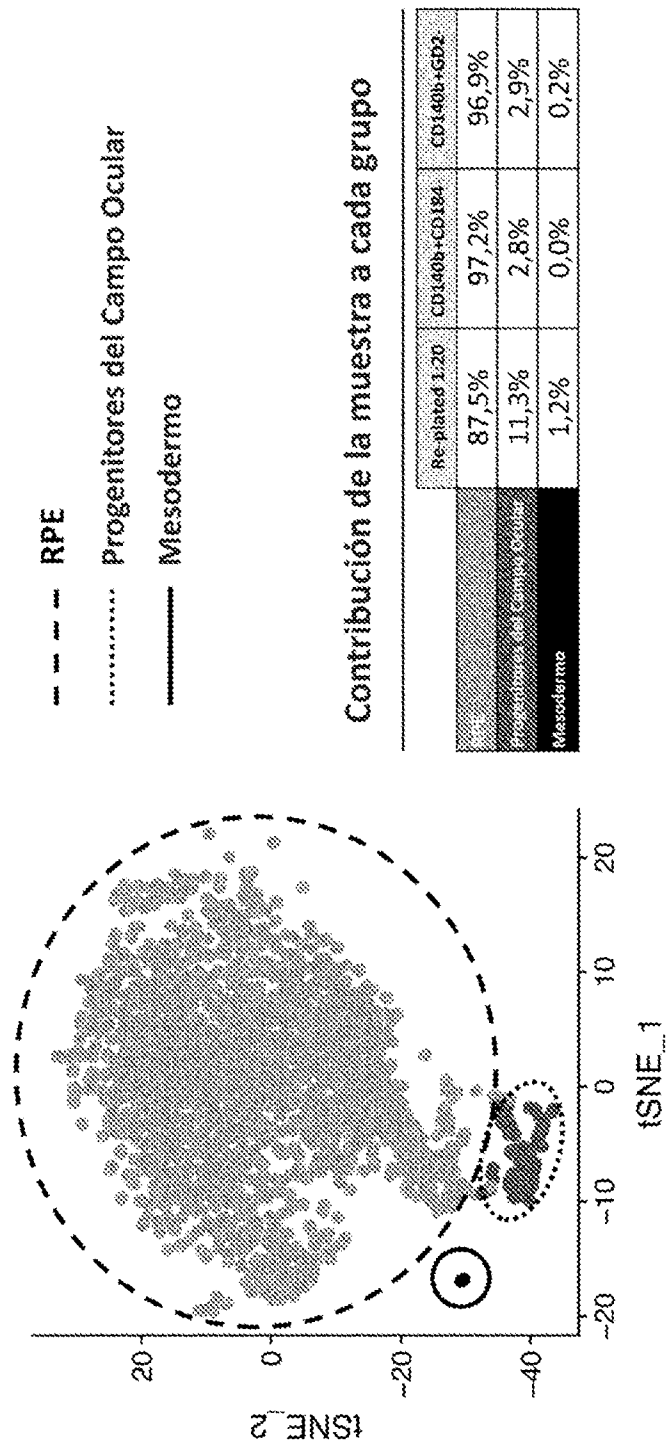


Fig 32

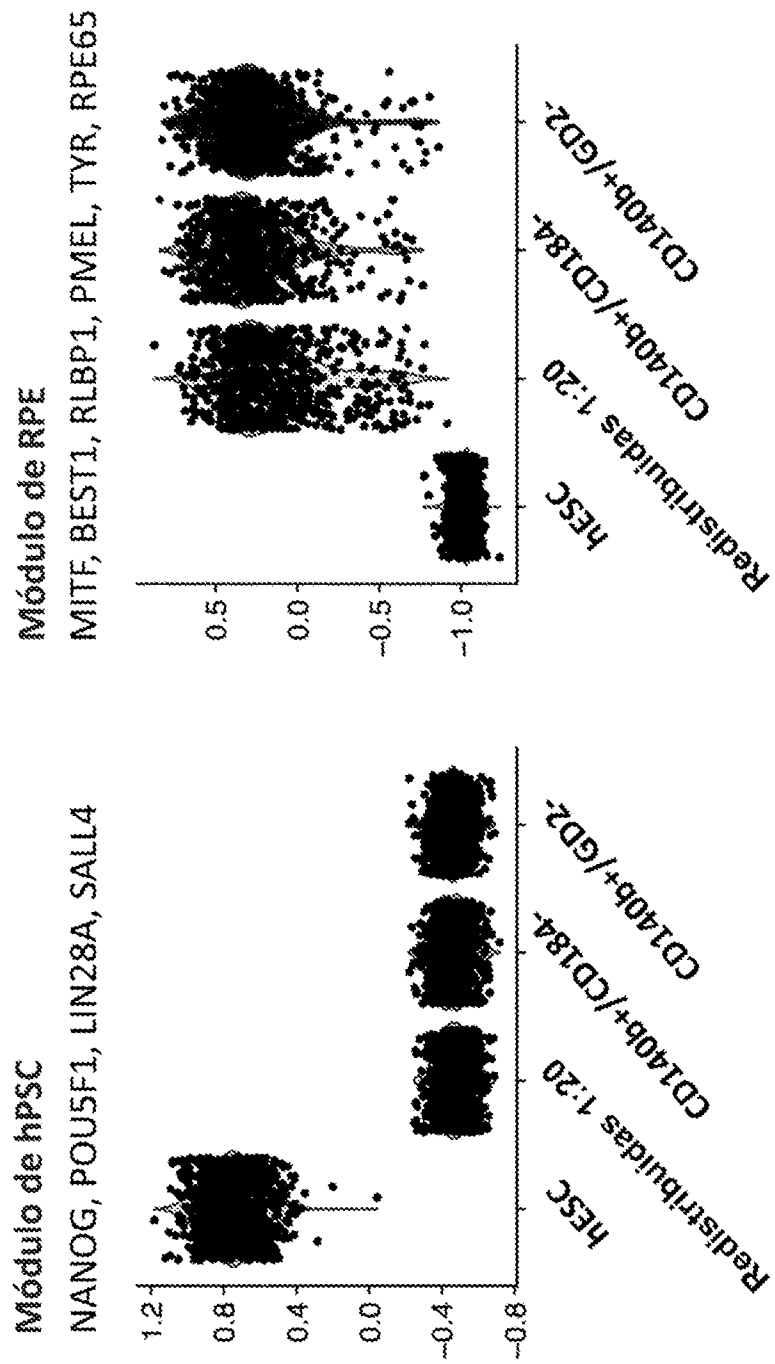


Fig 33

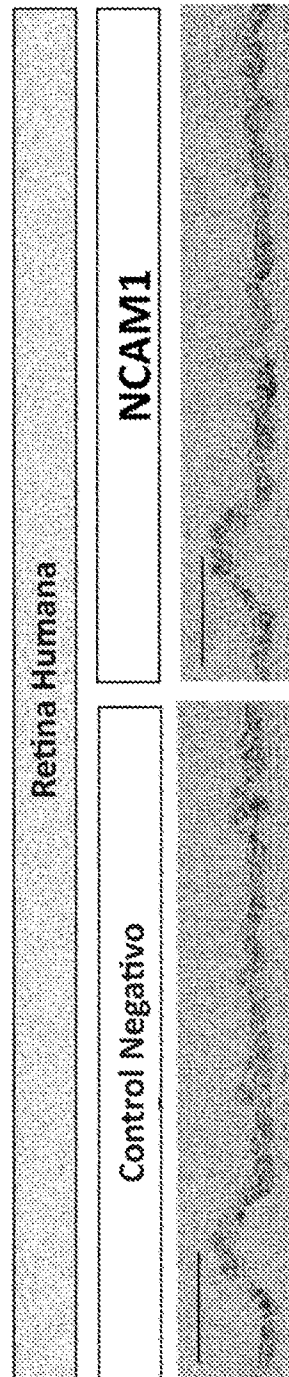


Fig 34

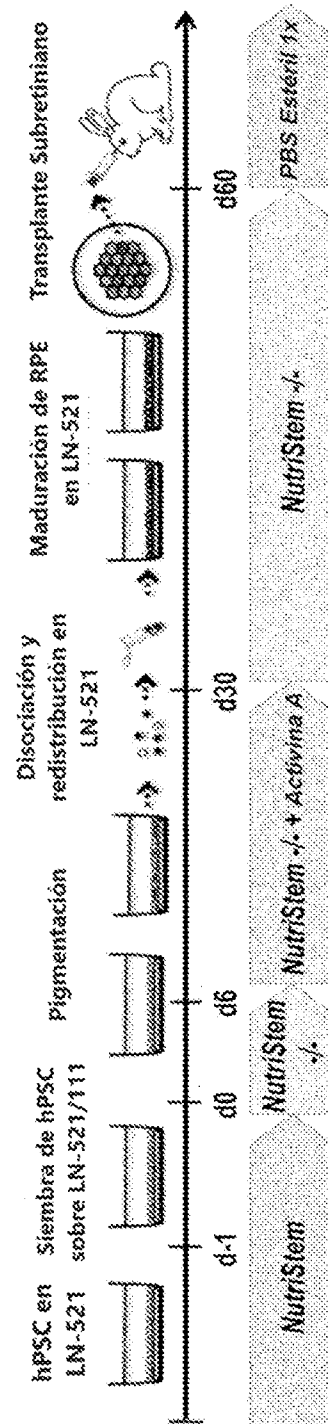


Fig 35

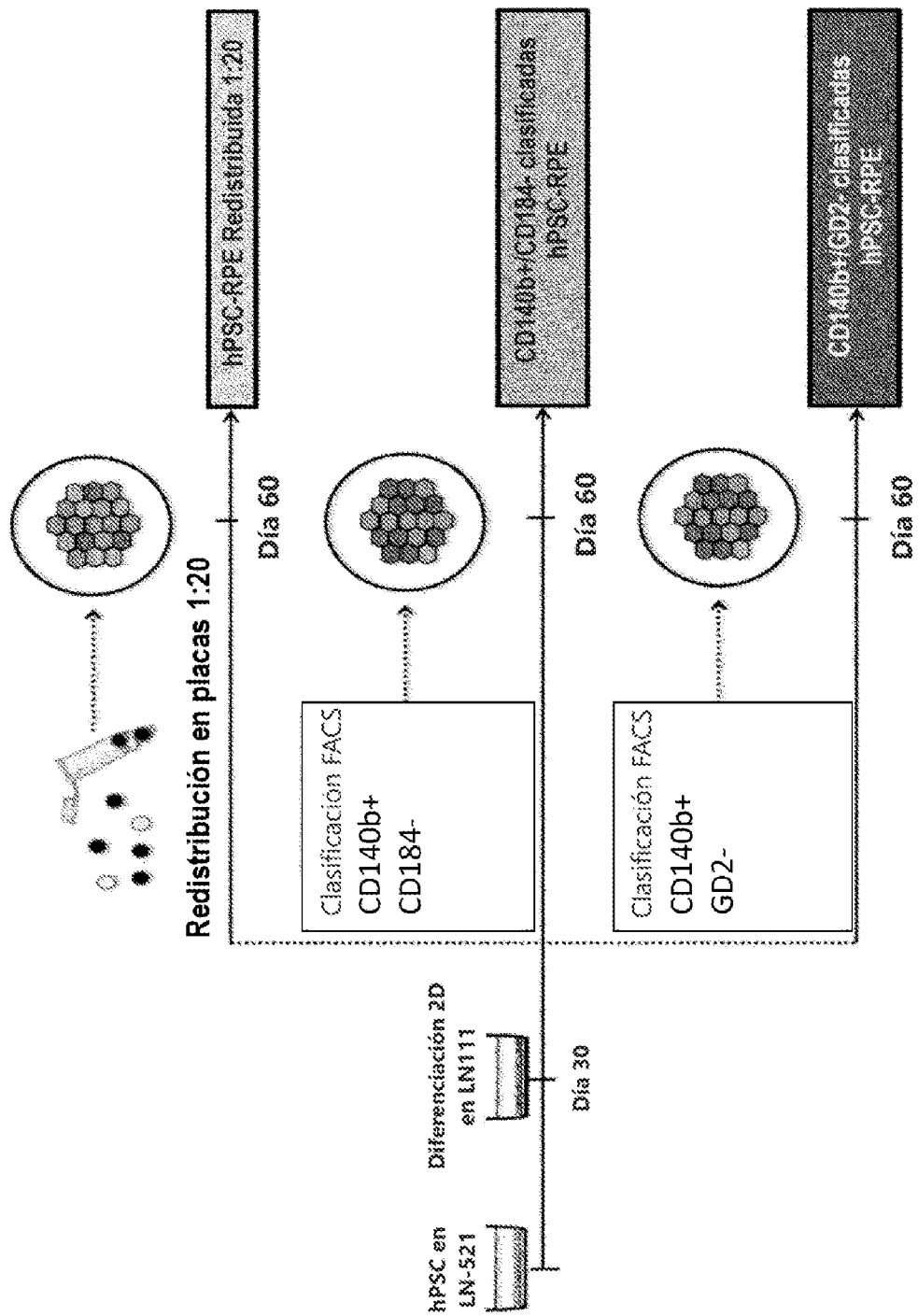


Fig 36

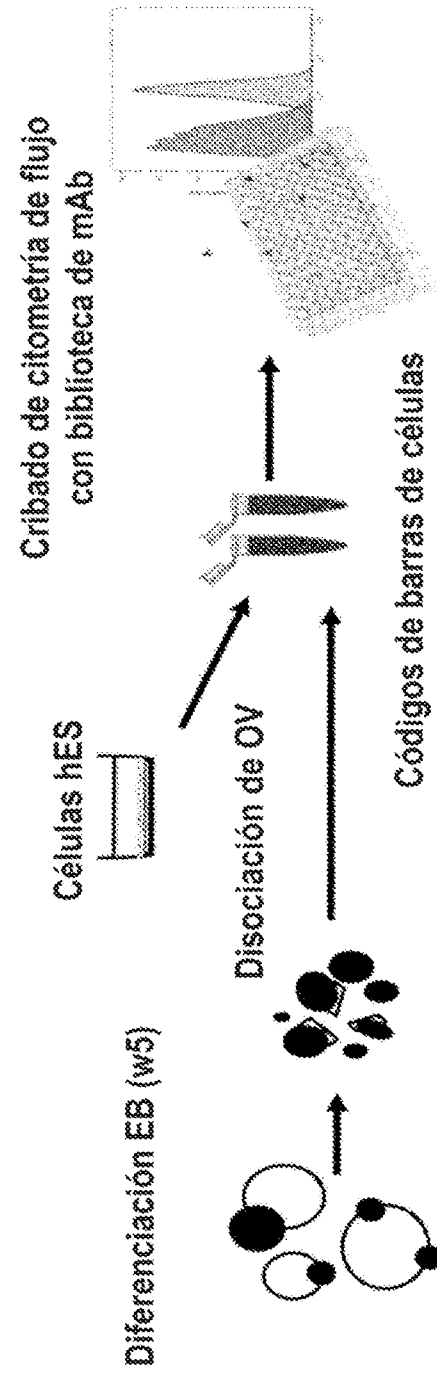


Fig 37A

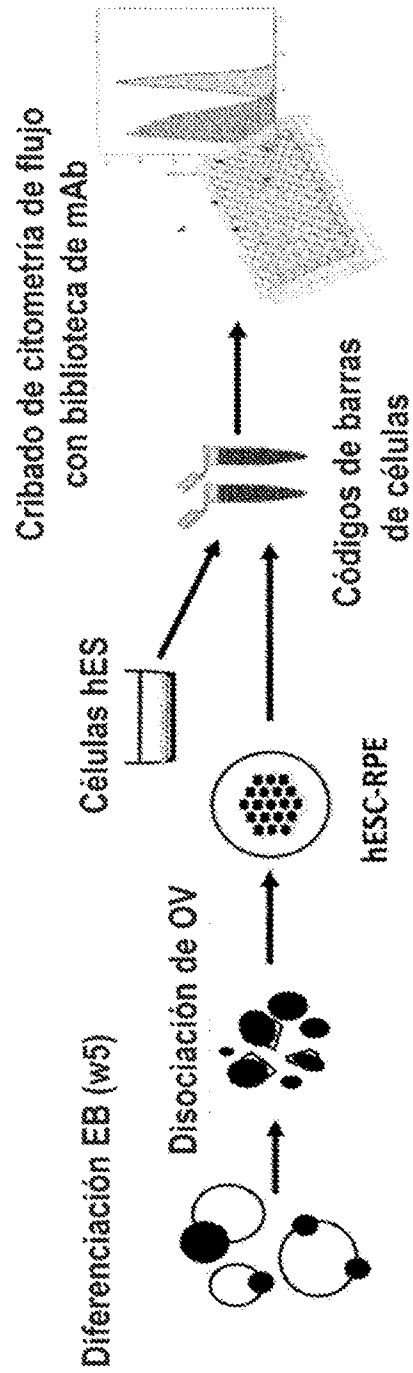


Fig 37B

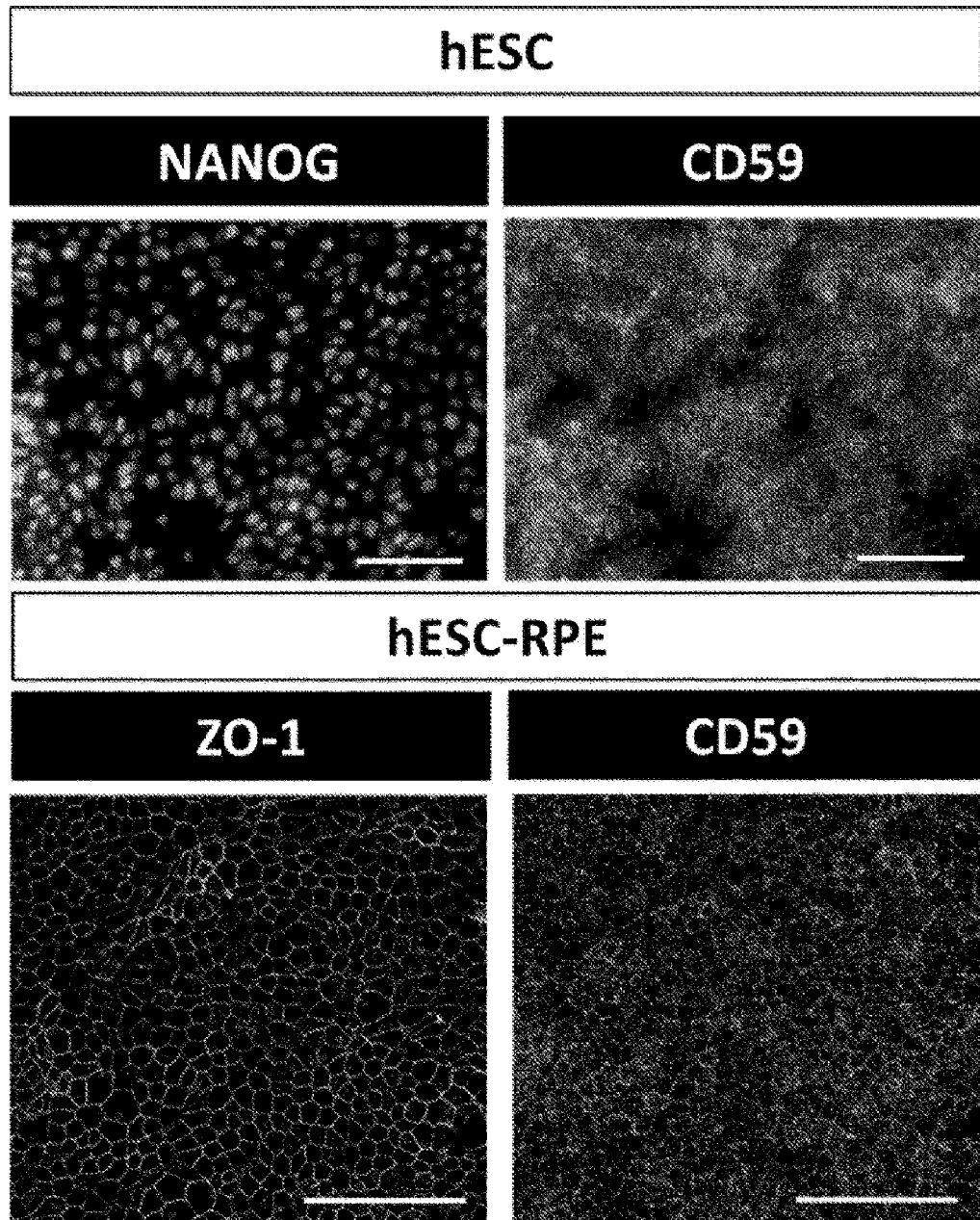


Fig 38