

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 474**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2016** **PCT/IL2016/051155**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017** **WO17072763**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2016** **E 16795439 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025** **EP 3368661**

54 Título: **Preparación de células del epitelio pigmentario de la retina**

30 Prioridad:

26.10.2015 US 201562246214 P

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

16.05.2025

73 Titular/es:

CELL CURE NEUROSCIENCES LTD. (50.00%)
P.O. Box 12247

9112102 Jerusalem, IL y
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND
DEVELOPMENT LTD. (50.00%)

72 Inventor/es:

REUBINOFF, BENJAMIN EITHAN;
SINGER, ORNA;
BOHANA-KASHTAN, OSNAT y
WISER, OFER

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 3 018 474 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

Preparación de células del epitelio pigmentario de la retina

5 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos de preparación de células del epitelio pigmentario de la retina a partir de células madre pluripotentes.

10 El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células pigmentadas, que se encuentra entre la retina neural y la coriocalcar. Las células del EPR desempeñan funciones cruciales en el mantenimiento y funcionamiento de la retina y sus fotorreceptores. Estas incluyen la formación de la barrera hematorretiniana, la absorción de la luz difusa, el suministro de nutrientes a la retina neural, la regeneración del pigmento visual, y la captación y reciclaje de los segmentos externos desprendidos de los fotorreceptores.

15 El tejido retiniano puede degenerarse por varias razones. Entre ellas: oclusión de arterias o venas, retinopatía diabética y retinopatía del prematuro, que habitualmente no son hereditarias. Existen enfermedades hereditarias tales como la retinosis pigmentaria, la retinosquiasis, la degeneración reticular, la enfermedad de Best y la enfermedad de Stargardt, que también implican una degeneración del tejido retiniano. Una afección de degeneración retiniana común es la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE). Estas afecciones se caracterizan por tipos progresivos de degeneración retiniana.

20 Las células del EPR pueden usarse potencialmente para la terapia del EPR degenerado en las enfermedades de la retina mencionadas anteriormente. También pueden usarse como vehículo para la introducción de genes para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. Estas células también pueden servir como modelo *in vitro* de enfermedades degenerativas de la retina, como herramienta para el cribado analítico masivo de un efecto terapéutico de moléculas pequeñas y para el descubrimiento y prueba de nuevos fármacos para enfermedades degenerativas de la retina. Las células del EPR también podrían usarse para la investigación básica del desarrollo, la maduración, las características, las propiedades, el metabolismo, la inmunogenicidad, la función y la interacción del EPR con otros tipos de células.

25 El EPR humano fetal y adulto se ha usado como fuente alternativa de donantes para trasplantes alogénicos. Sin embargo, los problemas prácticos para obtener un suministro suficiente de tejido y las preocupaciones éticas con respecto al uso de tejidos de fetos abortados limitan el uso generalizado de estas fuentes de donantes. Dadas estas limitaciones en el suministro de injertos de EPR adulto y fetal, se ha estudiado el potencial de fuentes alternativas de donantes. Las células madre pluripotentes humanas brindan ventajas significativas como fuente de células del EPR para trasplantes. Su potencial de desarrollo pluripotente puede permitir su diferenciación en células del EPR funcionales auténticas y, dado su potencial de autorrenovación infinita, pueden servir como fuente ilimitada de donantes de células del EPR. De hecho, se ha demostrado que las células madre embrionarias humanas (hESC) y las células madre pluripotentes inducidas humanas (iPS) pueden diferenciarse en células del EPR *in vitro*, atenuar la degeneración retiniana y conservar la función visual después del trasplante subretiniano al modelo de rata de degeneración retiniana del Royal College of Surgeons (RCS) que está provocada por disfunción del EPR. Por tanto, las células madre pluripotentes pueden ser una fuente ilimitada para la producción de células del EPR.

40 Los protocolos actuales para la derivación de células del EPR a partir de células madre pluripotentes requieren mucho trabajo y mucho tiempo, y producen cantidades limitadas de células pigmentadas. Se requieren nuevos métodos para producir células del EPR en cantidades lo suficientemente grandes como para que puedan usarse en el ámbito clínico.

50 La técnica anterior incluye los documentos WO 2013/114360, WO 2008/129554 y WO 2013/184809.

El documento WO 2008/129554 A1 analiza las células del epitelio pigmentario de la retina derivadas de células madre.

55 Idelson *et al.*, Cell Stem Cell, vol. 5, n.º 4, 1 de octubre de 2009 (01-10-2009), páginas 396-408 analizan la diferenciación dirigida de células madre embrionarias humanas a células del epitelio pigmentario de la retina funcionales.

El documento WO 2013/114360 A1 analiza los métodos de selección de células del epitelio pigmentario de la retina.

60 Sorkio *et al.*, Tissue Engineering Part A, 20 de enero de 2014 (20-01-2014), analiza la estructura y las propiedades de barrera de las células del epitelio pigmentario de la retina derivadas de células madre embrionarias humanas que se ven afectadas por el recubrimiento de proteínas de la matriz extracelular.

65 Stern *et al.*, Experimental Biology And Medicine (Maywood, N.J.) agosto de 2015, vol. 240, n.º 8, agosto de 2015 (2015-08), páginas 1079-1086, analizan la proliferación de células del epitelio pigmentario de la retina.

Buchholz *et al.*, Stem Cells Translational Medicine 2013, 2:384-393, analizan la diferenciación dirigida rápida y eficiente de células madre pluripotentes humanas al epitelio pigmentario de la retina.

5 El documento WO 2014/087244 A1 analiza los métodos de producción de células del EPR.

El documento WO 2013/184809 A1 analiza métodos y composiciones para la producción rápida de células del epitelio pigmentario de la retina a partir de células pluripotentes.

10 Sumario

La presente invención se define en las reivindicaciones.

15 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para generar células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) que comprende:

(a) cultivar una población celular de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas sobre una superficie adherente en un medio que comprende un agente de diferenciación para obtener células de diferenciación, en donde al menos el 50 % de las células de la población celular son Oct4⁺TRA-1-60⁺; y

20 (b) cultivar las células de diferenciación sobre la superficie adherente en un medio que comprende uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ para obtener células del EPR, en donde la superficie adherente es laminina 521 y en donde el agente de diferenciación comprende nicotinamida.

25 Según un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar una enfermedad de la retina en un sujeto que lo necesita, que comprende:

(a) generar células del EPR según el método descrito en el presente documento; y

30 (b) trasplantar una cantidad terapéuticamente eficaz de células del EPR en el ojo del sujeto tras la recogida, tratando de ese modo la enfermedad.

Según un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una población de células del EPR generadas según el método descrito en el presente documento.

35 Según un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno de la retina en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las células del EPR descritas en el presente documento al sujeto, tratando de ese modo la enfermedad o trastorno de la retina.

40 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además expandir la población de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas sobre la superficie adherente en ausencia del agente de diferenciación antes de la etapa (a).

45 Según algunas realizaciones de la invención, la expansión se efectúa en ausencia del agente de diferenciación.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además aislar las células del EPR de la superficie adherente después de la etapa (b).

50 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además cultivar las células del EPR tras el aislamiento sobre una superficie adherente adicional para generar una población expandida de células del EPR.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además la recogida de las células del EPR.

55 Según algunas realizaciones de la invención, el aislamiento se efectúa de manera enzimática.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además expandir las células madre pluripotentes humanas en células alimentadoras humanas antes de la etapa (a).

60 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además expandir las células madre pluripotentes humanas sobre células alimentadoras humanas antes de la expansión sobre la superficie adherente.

Según algunas realizaciones de la invención, más del 90 % de las células de la población expandida de células del EPR son CRALBP⁺PMEL17⁺.

65 Según algunas realizaciones de la divulgación, la superficie adherente se selecciona del grupo que consiste en

laminina, fibronectina, colágeno I, vitronectina y colágeno IV.

Según algunas realizaciones de la divulgación, la superficie adherente es laminina o vitronectina.

5 Según la invención, la laminina es laminina humana.

Según la invención, la laminina es la laminina 521.

10 Según algunos aspectos de la divulgación, la superficie adherente adicional se selecciona del grupo que consiste en gelatina, poli-d-lisina, laminina, colágeno I y colágeno IV.

Según algunos aspectos de la divulgación, la superficie adherente adicional es gelatina o poli-d-lisina.

15 Según algunas realizaciones de la invención, el método se efectúa durante al menos 3 semanas.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además crioconservar las células del EPR tras la recogida.

20 Según algunos aspectos de la divulgación, la crioconservación se efectúa en un medio seleccionado del grupo que consiste en 90 % de HS/10 % de DMSO, CryoStor 2 %, CryoStor 5 % y CryoStor 10 %, y Stem Cell Banker.

Según algunas realizaciones de la invención, las células alimentadoras humanas comprenden fibroblastos del cordón umbilical humano.

25 Según algunas realizaciones de la invención, las células madre pluripotentes humanas comprenden células madre embrionarias humanas.

Según la invención, el agente de diferenciación comprende nicotinamida.

30 Según algunas realizaciones de la invención, el medio de la etapa (a) está desprovisto de activina A.

Según algunas realizaciones de la invención, el miembro de la superfamilia de TGF β se selecciona del grupo que consiste en TGF β 1, TGF β 3 y activina A.

35 Según algunas realizaciones de la invención, el medio de la etapa (b) comprende nicotinamida y activina A.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además una etapa de cultivar las células del EPR en un medio que comprende nicotinamida y desprovisto de activina A tras la etapa (b).

40 Según algunas realizaciones de la invención, la etapa (a) se efectúa durante al menos 5 días.

Según algunas realizaciones de la invención, la etapa (b) se efectúa durante al menos una semana.

45 Según algunos aspectos de la divulgación, el trasplante de células del EPR diferenciadas se efectúa en el espacio subretiniano del ojo.

Según algunos aspectos de la divulgación, las células del EPR se trasplantan en una suspensión o como una monocapa de células inmovilizadas sobre una matriz o un sustrato.

50 Según algunos aspectos de la divulgación, la enfermedad o trastorno de la retina se selecciona de al menos uno de retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, degeneración macular hereditaria o adquirida, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), enfermedad de Best, desprendimiento de retina, atrofia girata, coroideremia, distrofia en patrón, distrofias del EPR, enfermedad de Stargardt, EPR y daño retiniano debido a daño provocado por una cualquiera de las lesiones fóticas, por láser, inflamatorias, infecciosas, por radiación, neovasculares o traumáticas.

55 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales a modo de ejemplo. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

65 **Breve descripción de las varias vistas de los dibujos**

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, a modo de ejemplo sólo, con referencia a los dibujos e imágenes adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

La figura 1 es una representación gráfica del procedimiento de derivación de células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 2A-B son fotografías que representan las células del EPR al final de la fase de diferenciación (figura 2A) y al final de la fase P0 (figura 2B).

Las figuras 3A-C son gráficos que ilustran la pureza de las células pigmentadas/poligonales derivadas de hESC generadas sin cuerpos esferoides, tal como se mide mediante análisis de FACS.

Las figuras 4A-D son gráficos que ilustran la pureza de las células pigmentadas derivadas de hESC generadas sin SB al final de P2 tras la crioconservación (figuras 4C-D) en comparación con las células madre embrionarias no diferenciadas (control negativo; figura 4A) y las células del EPR generadas a través de SB y la acción de activina A y nicotinamida (control positivo; figura 4B).

Las figuras 5A-C son imágenes representativas de contraste de fases de células del EPR derivadas en vitronectina. Figura 5A: células del EPR en el pase 1 (X10); figura 5B: células del EPR en el pase 2 (X10). Figura 5C: células del EPR en el pase 2 (X20).

Las figuras 6A-E son imágenes de inmunofluorescencia de células del EPR derivadas en vitronectina decoradas con anticuerpos que identifican marcadores del EPR. La mayoría de las células en las imágenes expresan los marcadores de las células del EPR (X40). Figura 6A – Anti-bestrofina (contratinción de núcleos con DAPI). Figura 6B – anti-CRALBP (contratinción de núcleos con DAPI). Figura 6C – anti-MITF. Figura 6D – anti-PEDF (contratinción de núcleos con DAPI). Figura 6E – anti-ZO-1.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención se refiere a métodos de preparación de células del epitelio pigmentario de la retina a partir de células madre pluripotentes, tal como se define en las reivindicaciones.

Antes de explicar en detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de diversas maneras.

Se han propuesto las células madre embrionarias humanas como fuente celular para la generación de células del EPR. Se han usado dos enfoques generales para obtener células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) a partir de hESC, diferenciación espontánea y diferenciación dirigida.

En la diferenciación espontánea, las hESC en colonias planas o en cuerpos embrioides (EB) pueden diferenciarse espontáneamente en una población de células que contienen células del EPR pigmentadas.

La diferenciación dirigida de células madre embrionarias humanas (hESC) a células del EPR se realiza tradicionalmente tras la generación de cuerpos embrioides/esferoides (SB); véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8.956.866. Sin embargo, esta etapa es de naturaleza variable, lo que dificulta la ampliación necesaria para un procedimiento comercial.

Los presentes inventores proponen ahora que las células del EPR pueden generarse sin diferenciación inicial como cuerpos embrioides o cuerpos esferoides. Esto se demostró mediante la identificación de la morfología poligonal típica de las células del EPR tras un protocolo de diferenciación dirigida llevado a cabo completamente en condiciones adherentes (figuras 2A-B).

El análisis de FAC, realizado después de la expansión de células aisladas de manera enzimática, demostró que más del 99 % de las células eran CRALBP⁺PMEL17⁺ (figuras 3A-C) indicando que el procedimiento genera poblaciones altamente purificadas de células del EPR.

Por tanto, según la presente invención se proporciona un método para generar células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) que comprende:

(a) cultivar una población celular de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas sobre una superficie adherente en un medio que comprende un agente de diferenciación para obtener células de diferenciación, en donde al menos el 50 % de las células de la población celular son Oct4⁺TRA-1-60⁺; y

5 (b) cultivar las células de diferenciación sobre la superficie adherente en un medio que comprende uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ para obtener células del EPR, en donde la superficie adherente es laminina 521 y en donde el agente de diferenciación comprende nicotinamida.

10 “Células del epitelio pigmentario de la retina”, “células del EPR”, “EPR”, que pueden usarse de manera intercambiable según lo permita el contexto, se refieren a células de un tipo celular funcionalmente similar al de las células del EPR nativas que forman la capa de células del epitelio pigmentario de la retina (por ejemplo, tras el trasplante dentro de un ojo, presentan actividades funcionales similares a las de las células del EPR nativas).

15 Según una realización, las células del EPR expresan al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco marcadores de células del EPR maduras. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a, CRALBP, RPE65, PEDF, PMEL17, bestrofina y tirosinasa. Opcionalmente, las células del EPR también pueden expresar un marcador de un progenitor del EPR, por ejemplo, MITF. En otra realización, las células del EPR expresan PAX-6.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “marcadores de células del EPR maduras” se refiere a antígenos (por ejemplo, proteínas) que están elevados (por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces) en células del EPR maduras con respecto a células no EPR o células del EPR inmaduras.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “marcadores de células progenitoras del EPR” se refiere a antígenos (por ejemplo, proteínas) que están elevados (por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces) en las células progenitoras del EPR con respecto a las células que no son del EPR.

Según otra realización, las células del EPR tienen una morfología similar a la de las células del EPR nativas que forman la capa de células del epitelio pigmentario de la retina, es decir, están pigmentadas y tienen una forma poligonal característica.

30 Según todavía otra realización, las células del EPR son capaces de tratar enfermedades tales como la degeneración macular.

35 Según todavía otra realización, las células del EPR cumplen al menos 1, 2, 3, 4 o todos los requisitos enumerados anteriormente en el presente documento.

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “células madre” se refiere a células que son capaces de permanecer en un estado indiferenciado (por ejemplo, células madre pluripotentes o multipotentes) durante periodos prolongados de tiempo en cultivo hasta que se las induce a diferenciarse en otros tipos de células que tienen una función particular y especializada (por ejemplo, células completamente diferenciadas). Preferiblemente, la expresión “células madre” abarca células madre embrionarias (ESC), células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre adultas, células madre mesenquimales y células madre hematopoyéticas.

45 Según una realización particular, las células del EPR se generan a partir de células madre pluripotentes. Tales células son capaces de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, aparato urogenital) o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Según una realización particular, la célula madre pluripotente es capaz de diferenciarse en todas las células del embrión propiamente dicho, por ejemplo, células madre embrionarias e iPSC (por ejemplo, ESC o iPSC).

50 Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) pueden generarse a partir de células somáticas mediante manipulación genética de células somáticas, por ejemplo, mediante transducción retroviral de células somáticas tales como fibroblastos, hepatocitos, células epiteliales gástricas con factores de transcripción tales como Oct-3/4, Sox2, c-Myc, y KLF4 [Yamanaka S, Cell Stem Cell. 2007, 1(1):39-49; Aoi T, *et al.*, Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. Science. 14 de febrero de 2008. (Epub antes de impresión); IH Park, Zhao R, West JA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 2008;451:141-146; K Takahashi, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007;131:861-872]. Pueden generarse otras células madre similares a las embrionarias mediante transferencia nuclear a ovocitos, fusión con células madre embrionarias o transferencia nuclear a cigotos si las células receptoras están detenidas en la mitosis.

55 La expresión “células madre embrionarias” se refiere a células embrionarias que son capaces de diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias (es decir, endodermo, ectodermo y mesodermo), o que permanecen en un estado indiferenciado. La expresión “células madre embrionarias” puede comprender, como referencia únicamente, células que se obtienen del tejido embrionario formado después de la gestación (por ejemplo, blastocisto) antes de la implantación del embrión (es decir, un blastocisto preimplantacional), células de blastocisto

extendidas (EBC) que se obtienen de un blastocisto en fase de postimplantación/pregastrulación (véase sólo como referencia el documento WO2006/040763) y células germinales embrionarias (EG) que se obtienen del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferiblemente antes de las 10 semanas de gestación. Las células madre embrionarias pueden obtenerse usando métodos de cultivo celular bien conocidos. Por ejemplo, y sólo como referencia, las células madre embrionarias humanas pueden aislarse de blastocistos humanos. Los blastocistos humanos se obtienen normalmente de embriones preimplantacionales *in vivo* o de embriones fertilizados *in vitro* (FIV). Alternativamente, un embrión humano unicelular puede expandirse hasta la etapa de blastocisto. Para el aislamiento de células ES humanas, se retira la zona pelúcida del blastocisto y se aísla la masa celular interna (MCI) mediante un procedimiento en el que las células del trofotodermo se lisan y se retiran de la MCI intacta mediante un pipeteo suave. A continuación, la MCI se coloca en un matraz de cultivo de tejidos que contiene el medio apropiado que permite su crecimiento. Tras de 9 a 15 días, el crecimiento derivado de la MCI se disocia en grupos, o bien mediante una disociación mecánica o bien mediante una degradación enzimática, y las células vuelven a sembrarse en un medio de cultivo de tejidos recién preparado. Las colonias que muestran una morfología indiferenciada se seleccionan individualmente mediante una micropipeta, se disocian mecánicamente en grupos, y vuelven a sembrarse. Las células ES resultantes se dividen rutinariamente cada 4-7 días. Para obtener detalles adicionales sobre los métodos de preparación de células ES humanas, véase sólo como referencia Reubinoff *et al.* Nat Biotechnol 2000, mayo: 18(5): 559; Thomson *et al.*, [patente estadounidense n.º 5.843.780; Science 282: 1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38: 133, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844, 1995]; Bongso *et al.*, [Hum Reprod 4: 706, 1989]; y Gardner *et al.*, [Fertil. Steril. 69: 84, 1998].

Sólo como referencia. Las células ES humanas pueden adquirirse del registro de células madre embrionarias humanas del NIH [www.grants (punto) nih (punto) gov/stem_cells/registry/current (punto) htm]. Ejemplos no limitativos de líneas de células madre embrionarias disponibles comercialmente que se establecen sólo como referencia son HAD-C102, ESI, BG01, BG02, BG03, BG04, CY12, CY30, CY92, CY10, TE03, TE32, CHB-4, CHB-5, CHB-6, CHB-8, CHB-9, CHB-10, CHB-11, CHB-12, HUES 1, HUES 2, HUES 3, HUES 4, HUES 5, HUES 6, HUES 7, HUES 8, HUES 9, HUES 10, HUES 11, HUES 12, HUES 13, HUES 14, HUES 15, HUES 16, HUES 17, HUES 18, HUES 19, HUES 20, HUES 21, HUES 22, HUES 23, HUES 24, HUES 25, HUES 26, HUES 27, HUES 28, CyT49, RUES3, WA01, UCSF4, NYUES1, NYUES2, NYUES3, NYUES4, NYUES5, NYUES6, NYUES7, UCLA 1, UCLA 2, UCLA 3, WA077 (H7), WA09 (H9), WA13 (H13), WA14 (H14), HUES 62, HUES 63, HUES 64, CT1, CT2, CT3, CT4, MA135, Eneavour-2, WIBR1, WIBR2, WIBR3, WIBR4, WIBR5, WIBR6, HUES 45, Shef 3, Shef 6, BJNHem19, BJNHem20, SA001, SA001.

Además, las células ES también pueden obtenerse de otras especies, incluyendo ratón (Mills y Bradley, 2001), hámster dorado [Doetschman *et al.*, 1988, Dev Biol. 127: 224-7], rata [Iannaccone *et al.*, 1994, Dev Biol. 163: 288-92] conejo [Giles *et al.*, 1993, Mol Reprod Dev. 36: 130-8; Graves & Moreadith, 1993, Mol Reprod Dev. 1993, 36: 424-33], varias especies de animales domésticos [Notarianni *et al.*, 1991, J Reprod Fertil suppl. 43: 255-60; Wheeler 1994, Reprod Fertil Dev. 6: 563-8; Mitalipova *et al.*, 2001, Cloning. 3: 59-67] y especies de primates no humanos (macaco de la India y tití) [Thomson *et al.*, 1995, Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 7844-8; Thomson *et al.*, 1996, Biol Reprod. 55: 254-9].

Sólo como referencia, las células de blastocisto extendido (EBC) humanas pueden obtenerse a partir de un blastocisto de al menos nueve días tras la fecundación en una fase anterior a la gastrulación. Antes de cultivar el blastocisto, se digiere la zona pelúcida [por ejemplo, con disolución ácida de Tyrode (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.)] para exponer la masa celular interna. Luego, los blastocistos se cultivan como embriones completos durante al menos nueve y no más de catorce días tras la fecundación (es decir, antes del acontecimiento de gastrulación) *in vitro* usando métodos convencionales de cultivo de células madre embrionarias.

Otro método para preparar células ES descrito, pero no reivindicado, es Chung *et al.*, Cell Stem Cell, volumen 2, número 2, 113-117, 7 de febrero de 2008. Este método comprende retirar una única célula de un embrión durante un procedimiento de fecundación *in vitro*. En este procedimiento no se destruye el embrión.

Las células EG se preparan a partir de células germinales primordiales obtenidas de fetos de aproximadamente 8 - 11 semanas de gestación (en el caso de un feto humano) usando técnicas de laboratorio conocidas por cualquier experto en la técnica y se divulgan, pero no se reivindican.

Las crestas genitales se disocian y se cortan en pequeños trozos que después de eso se desagregan en células mediante disociación mecánica. Las células EG se cultivan luego en matraces de cultivo de tejidos con el medio apropiado. Las células se cultivan con reemplazo diario del medio hasta que se observa una morfología celular coherente con las células EG, normalmente después de 7-30 días o 1-4 pases. Para obtener detalles adicionales sobre los métodos de preparación de células EG humanas, descritos en el presente documento, pero no reivindicados, véase Shambloott *et al.*, [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726, 1998] y la patente estadounidense n.º 6.090.622.

Aún otro método para preparar células ES es la partenogénesis. El embrión tampoco se destruye en el procedimiento.

Los métodos de cultivo de ES que se practican actualmente se basan principalmente en el uso de capas de células alimentadoras que secretan factores necesarios para la proliferación de células madre, mientras que al mismo tiempo inhiben su diferenciación. El cultivo se efectúa normalmente sobre una superficie sólida, por ejemplo, una superficie recubierta con gelatina o vimentina. Las capas alimentadoras a modo de ejemplo incluyen fibroblastos embrionarios humanos, células epiteliales de Falopio adultas, fibroblastos embrionarios primarios de ratón (PMEF), fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos fetales murinos (MFF), fibroblastos embrionarios humanos (HEF), fibroblastos humanos obtenidos a partir de la diferenciación de células madre embrionarias humanas, células musculares fetales humanas (HFM), células cutáneas fetales humanas (HFS), células cutáneas adultas humanas, fibroblastos de prepucio humano (HFF), fibroblastos de cordón umbilical humano, células humanas obtenidas del cordón umbilical o placenta, y células estromales de médula ósea humana (hMSC). Pueden añadirse factores de crecimiento al medio para mantener las ESC en un estado indiferenciado. Tales factores de crecimiento incluyen bFGF y/o TGF β . En otra realización, pueden añadirse agentes al medio para mantener las hESC en un estado indiferenciado virgen; véase, por ejemplo, Kalkan *et al.*, 2014, Phil. Trans. R. Soc. B, 369: 20130540.

Los sistemas libres de células alimentadoras también se han usado en el cultivo de células ES; tales sistemas utilizan matrices complementadas con reemplazo de suero, citocinas y factores de crecimiento (incluyendo IL6 y quimera del receptor de IL6 soluble) como reemplazo de la capa de células alimentadoras. Las células madre pueden cultivarse sobre una superficie sólida, tal como una matriz extracelular (por ejemplo, Matrigel[®], laminina o vitronectina) en presencia de un medio de cultivo (por ejemplo, el sistema Lonza L7, mTeSR, StemPro, XFKSR, E8, Nutristem). A diferencia de los cultivos basados en células alimentadoras, que requieren el crecimiento simultáneo de células alimentadoras y células madre y que pueden dar lugar a poblaciones celulares mixtas, las células madre cultivadas en sistemas sin células alimentadoras se separan fácilmente de la superficie. El medio de cultivo usado para el crecimiento de las células madre contiene factores que inhiben eficazmente la diferenciación y promueven su crecimiento, tal como el medio acondicionado con MEF y bFGF.

Tras la expansión opcional, las células madre pluripotentes se someten a una diferenciación dirigida sobre una superficie adherente (sin generación intermedia de cuerpos esferoides o embrioides).

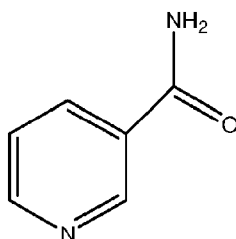
Por tanto, según este aspecto de la presente descripción al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de las células que se someten a diferenciación dirigida sobre la superficie adherente son ESC indiferenciadas y expresan marcadores de pluripotencia. Por ejemplo, al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de las células son Oct4⁺TRA-1-60⁺. Las ESC no diferenciadas expresan preferiblemente otros marcadores de pluripotencia tales como NANOG, Rex-1, fosfatasa alcalina, Sox2, TDGF-beta, SSEA-3, SSEA-4 y/o TRA-1-81.

En un protocolo de diferenciación a modo de ejemplo, las células madre embrionarias no diferenciadas se diferencian hacia el linaje de células del EPR sobre una superficie adherente usando un primer agente de diferenciación y luego se diferencian adicionalmente hacia células del EPR usando un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), (por ejemplo, subtipos TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3, así como ligandos homólogos que incluyen activina (por ejemplo, activina A, activina B, y activina AB), hormona antimülleriana (AMH) nodal, algunas proteínas morfogenéticas óseas (BMP), por ejemplo, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, y BMP7, y factores de crecimiento y diferenciación (GDF)). Según una realización específica, el miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) es activina A, por ejemplo, entre 20-200 ng/ml, por ejemplo, 100-180 ng/ml.

Según la invención, el primer agente de diferenciación es nicotinamida (NA), por ejemplo, entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo, 10 mM.

Según otro aspecto, el primer agente de diferenciación es 3-aminobenzamida.

La NA, también conocida como "niacinamida", es la forma derivada de amida de la vitamina B3 (niacina), que se cree que conserva y mejora la función de las células beta. La NA tiene la fórmula química C₆H₆N₂O. La NA es esencial para el crecimiento y la conversión de alimentos en energía, y se ha usado en el tratamiento de la artritis y en el tratamiento y prevención de la diabetes.



Nicotinamida (NA)

Según una realización particular, la nicotinamida es un derivado de nicotinamida o un mimético de nicotinamida. El término "derivado de nicotinamida (NA)" tal como se usa en el presente documento denota un compuesto que es un derivado modificado químicamente de la NA natural. En una realización, la modificación química puede ser una sustitución del anillo de piridina de la estructura básica de NA (a través del miembro de carbono o nitrógeno del anillo), a través de los átomos de nitrógeno o de oxígeno del resto amida. Cuando se sustituye, uno o más átomos de hidrógeno pueden reemplazarse por un sustituyente y/o un sustituyente puede unirse a un átomo de N para formar un nitrógeno tetravalente con carga positiva. Por tanto, la nicotinamida de la presente invención incluye una nicotinamida sustituida o no sustituida. En otra realización, la modificación química puede ser una delección o reemplazo de un solo grupo, por ejemplo, para formar un análogo de tiobenzamida de NA, todo lo cual es apreciado por los expertos en química orgánica. El derivado en el contexto de la invención también incluye el derivado nucleósido de NA (por ejemplo, nicotinamida adenina). Se describen diversos derivados de NA, algunos también en relación con una actividad inhibidora de la enzima PDE4 (documentos WO03/068233; WO02/060875; GB2327675A), o como inhibidores de la tirosina cinasa del receptor VEGF (documento WO01/55114). Por ejemplo, el procedimiento de preparación de derivados de 4-aril-nicotinamida (documento WO05/014549). Otros derivados a modo de ejemplo de nicotinamida se divulgan en los documentos WO01/55114 y EP2128244.

Los miméticos de nicotinamida incluyen formas modificadas de nicotinamida y análogos químicos de nicotinamida que recapitulan los efectos de la nicotinamida en la diferenciación y maduración de las células del EPR a partir de células pluripotentes. Los miméticos de nicotinamida a modo de ejemplo incluyen ácido benzoico, ácido 3-aminobenzoico, y 6-aminonicotinamida. Otra clase de compuestos que pueden actuar como miméticos de nicotinamida son los inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Los inhibidores de PARP ejemplares a modo de ejemplo incluyen 3-aminobenzamida, iniparib (BSI 201), olaparib (AZD-2281), rucaparib (AG014699, PF-01367338), veliparib (ABT-888), CEP 9722, MK 4827, y BMN-673.

Según una realización particular, la diferenciación se efectúa tal como sigue:

a) cultivo de ESC en un medio que comprende un primer agente de diferenciación (por ejemplo, nicotinamida); y

b) cultivo de células obtenidas de la etapa a) en un medio que comprende un miembro de la superfamilia de TGFβ (por ejemplo, activina A) y el primer agente de diferenciación (por ejemplo, nicotinamida).

Preferiblemente, la etapa (a) se efectúa en ausencia del miembro de la superfamilia de TGFβ.

El protocolo descrito anteriormente puede continuarse cultivando las células obtenidas en la etapa b) en un medio que comprende el primer agente de diferenciación (por ejemplo, nicotinamida), pero desprovisto de un miembro de la superfamilia de TGFβ (por ejemplo, activina A). Esta etapa se denomina en el presente documento etapa (b*).

El protocolo descrito anteriormente se describe ahora en más detalle, con realizaciones adicionales.

Etapas (a): el procedimiento se inicia una vez que se obtienen cantidades suficientes de células madre embrionarias (por ejemplo, después de la expansión en células alimentadoras). Normalmente se retiran del cultivo alimentador (por ejemplo, usando colagenasa A, dispasa, TrypLE select, EDTA) y se siembran sobre un sustrato adherente sin células alimentadoras (por ejemplo, laminina, vitronectina, fibronectina, colágeno I y colágeno IV). Según la invención, el sustrato adherente sin células alimentadoras es la laminina 521. Las células madre embrionarias no diferenciadas pueden expandirse adicionalmente durante 1-10 días en el sustrato adherente, o pueden pasarse y expandirse durante periodos más prolongados (por encima de 10 días) antes del inicio de la diferenciación dirigida en un medio que evita la diferenciación (por ejemplo, un medio que contiene bFGF y TGFβ). Luego se inicia la diferenciación dirigida reemplazando el medio por uno que comprenda el primer agente de diferenciación (por ejemplo, nicotinamida). El medio no comprende miembros de la superfamilia de TGFβ (activina A, bFGF y TGFβ) a los niveles que se usan para la segunda etapa de diferenciación. En una realización, el medio está completamente desprovisto de un miembro de la superfamilia de TGFβ. En otra realización, el nivel de miembro de la superfamilia de TGFβ en el medio es de menos de 20 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml o incluso de menos de 0,1 ng/ml.

Las concentraciones a modo de ejemplo de nicotinamida están entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo, 10 mM.

Esta fase puede efectuarse durante un mínimo de 1 día, más preferiblemente dos días, tres días, 1 semana o incluso 14 días. Preferiblemente, las células no se cultivan en esta fase durante más de 3 semanas en presencia de nicotinamida (y en ausencia de activina).

Según una realización, cuando las células se cultivan sobre el sustrato adherente, por ejemplo, laminina, vitronectina, las condiciones de oxígeno atmosférico son del 20 %. Pueden manipularse de manera que el porcentaje sea de menos de aproximadamente el 20 %, el 15 %, el 10 %, más preferiblemente de menos de aproximadamente el 9 %, de menos de aproximadamente el 8 %, de menos de aproximadamente el 7 %, de menos

de aproximadamente el 6 % y más preferiblemente de aproximadamente el 5 % (por ejemplo, entre el 1 % - 20 %, el 1 % - 10 % o el 0 - 5 %).

Según una realización particular, las células se cultivan sobre el sustrato adherente inicialmente en condiciones normales de oxígeno atmosférico y luego se reducen a condiciones de oxígeno atmosférico inferiores a las normales.

Preferiblemente, una vez que las ESC no diferenciadas se siembran sobre sustrato adherente, no se retiran hasta que se observan células pigmentadas.

Etapa (b): tras la primera fase de diferenciación dirigida (etapa a, es decir, cultivo en presencia de nicotinamida (por ejemplo, entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo, 10 mM), se obtienen células semidiferenciadas. Tales células semidiferenciadas (también denominadas en el presente documento células de diferenciación) se diferencian a lo largo de la ruta del epitelio pigmentario de la retina. Tales células pueden expresar marcadores de células progenitoras neuronales o marcadores tempranos de células del EPR.

Las células de diferenciación se someten luego a una fase adicional de diferenciación sobre el sustrato adherente: cultivo en presencia de nicotinamida (por ejemplo, entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo, 10 mM) y activina A (por ejemplo, 20-200 ng/ml o 100-200 ng/ml - por ejemplo, 140 ng/ml, 150 ng/ml, 160 ng/ml o 180 ng/ml). Esta frase podrá efectuarse durante de 1 día a 10 semanas, de 3 días a 10 semanas, de 1 semana a 10 semanas, de una semana a ocho semanas, de una semana a cuatro semanas, por ejemplo, durante al menos un día, al menos dos días, al menos tres días, al menos 5 días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas.

Según una realización específica, esta fase se efectúa durante aproximadamente dos semanas. Esta fase de diferenciación puede llevarse a cabo en condiciones de oxígeno atmosférico bajo o normal, tal como se detalla anteriormente en el presente documento.

Etapa (b*): tras la segunda fase de diferenciación dirigida (es decir, cultivo en presencia de nicotinamida y activina A sobre un sustrato adherente; etapa (b)), las células diferenciadas adicionalmente se someten opcionalmente a una fase posterior de diferenciación sobre el sustrato adherente - cultivo en presencia de nicotinamida (por ejemplo, entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo, 10 mM), en ausencia del miembro de la superfamilia de TGFβ, por ejemplo, activina A.

En una realización, este medio está completamente desprovisto de un miembro de la superfamilia de TGFβ. En otra realización, el nivel de la superfamilia de TGFβ en el medio es de menos de 20 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml o incluso de menos de 0,1 ng/ml.

Esta fase puede efectuarse durante al menos un día, 2 días, 5 días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas o incluso cuatro semanas. Preferiblemente, esta fase se efectúa durante aproximadamente una semana. Esta fase de diferenciación también puede llevarse a cabo en condiciones de oxígeno atmosférico bajo o normal, tal como se detalla anteriormente en el presente documento.

El procedimiento de diferenciación se lleva a cabo normalmente hasta que al menos el 1 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 6 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % de las células de la placa son células pigmentadas.

El medio básico en el que se diferencian las ESC es cualquier medio de cultivo celular conocido en la técnica para respaldar el crecimiento celular *in vitro*, normalmente, un medio que comprende una disolución base definida, que incluye sales, azúcares, aminoácidos y cualquier otro nutriente requerido para el mantenimiento de las células en el cultivo en un estado viable. Según una realización específica, el medio básico no es un medio acondicionado. Los ejemplos no limitativos de medios básicos disponibles comercialmente que pueden usarse según la invención comprenden Nutristem (sin bFGF ni TGFβ para la diferenciación de ESC, con bFGF y TGFβ para la expansión de ESC) Neurobasal™, medio KnockOut SR libre de componentes foráneos, KO-DMEM, DMEM, DMEM/F12, medio de crecimiento de células madre Cellgro™, o X-Vivo™. El medio básico puede complementarse con una variedad de agentes tal como se conoce en la técnica que trata con cultivos celulares. Lo siguiente es una referencia no limitativa a diversos complementos que pueden incluirse en el sistema de cultivo que va a usarse según la presente divulgación:

- suero o con un medio que contenga un reemplazo de suero, tal como, sin limitarse a ello, reemplazo de suero KnockOut (KOSR), Nutridoma-CS, TCH™, N2, derivado de N2, o B27 o una combinación;
- un componente de la matriz extracelular (ECM), tal como, sin limitarse a ello, fibronectina, laminina, colágeno y gelatina. La ECM puede usarse entonces para transportar uno o más miembros de la

superfamilia de factores de crecimiento, TGFβ;

– un agente antibacteriano, tal como, sin limitarse a ellos, penicilina y estreptomicina; y

5 – aminoácidos no esenciales (NEAA),

neurotrofinas que se sabe que desempeñan un papel en la promoción de la supervivencia de las SC en cultivo, tales como, sin limitarse a ellos, BDNF, NT3, NT4.

10 Según una realización preferida, el medio usado para diferenciar las ESC es medio Nutristem (Biological Industries, 05-102-1A o 05-100-1A).

Según una realización particular, la diferenciación de las ESC se efectúa en condiciones libres de componentes foráneos.

15 Según una realización, el medio de proliferación/crecimiento está desprovisto de contaminantes foráneos, es decir, libres de componentes derivados de animales tales como suero, factores de crecimiento derivados de animales y albúmina. Por tanto, según esta realización, el cultivo se realiza en ausencia de contaminantes foráneos.

20 Otros métodos para cultivar las ESC en condiciones libres de componentes foráneos se proporcionan en la solicitud de patente estadounidense n.º 20130196369.

Las preparaciones que comprenden células del EPR pueden prepararse según las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) (por ejemplo, las preparaciones son conformes a las BPF) y/o las Buenas Prácticas de Tejidos (BPT) (por ejemplo, las preparaciones pueden ser conformes a las BPT) actuales.

25 Durante las etapas de diferenciación, las células madre embrionarias pueden monitorizarse para determinar su estado de diferenciación. La diferenciación celular puede determinarse tras el examen de marcadores específicos de células o tejidos que se sabe que son indicativos de diferenciación.

30 Pueden detectarse marcadores específicos de tejidos/células usando técnicas inmunológicas bien conocidas en la técnica [Thomson JA *et al.*, (1998). Science 282: 1145-7]. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo para marcadores intracelulares o unidos a la membrana, inmunohistoquímica para marcadores extracelulares e intracelulares e inmunoensayo enzimático, para marcadores moleculares secretados.

35 Tras las fases de diferenciación descritas anteriormente en el presente documento, se obtiene una población mixta de células que comprende células tanto pigmentadas como no pigmentadas.

40 Según una realización de este aspecto de la presente invención, todas las células de la población mixta de células se retiran de la placa.

45 Esto puede efectuarse de manera enzimática (por ejemplo, usando tripsina, (TrypLE Select)). Según este aspecto de la presente invención, al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 % de las células que se retiran del sistema de cultivo (y posteriormente se expanden) son células no pigmentadas. En una realización, después de retirarse todas las células de la placa (por ejemplo, de manera enzimática), se purifican (por ejemplo, usando un tamiz, tal como un tamiz de 40 μm) y sólo posteriormente se expanden.

50 Además, al menos el 10 %, el 20 % o incluso el 30 % de las células que se retiran del sistema de cultivo (y posteriormente se expanden) son células pigmentadas.

Preferiblemente, se retiran al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 100 % de todas las células en el sistema de cultivo (y posteriormente se expanden).

55 Según otra realización, se aíslan inicialmente las células no pigmentadas y se retiran de la placa de cultivo de manera mecánica y posteriormente se retiran las células pigmentadas.

60 Las células pueden someterse a un procedimiento de filtración antes de la expansión y tras la recogida de las células. Por tanto, por ejemplo, las células pueden filtrarse a través de un tamiz de 10-100 μm (por ejemplo, un tamiz de 40 μm).

65 La expansión de las células del EPR puede realizarse sobre una matriz extracelular, por ejemplo, gelatina, colágeno I, colágeno IV, laminina y poli-D-lisina. Para la expansión, las células pueden cultivarse en KOM libre de suero, suero que comprende medio (por ejemplo, DMEM + 20 %) o medio Nutristem (06-5102-01-1A Biological Industries). En estas condiciones de cultivo, después del pase en condiciones adecuadas, la razón de células pigmentadas:células

no pigmentadas aumenta de modo que se obtiene una población de células del EPR purificadas. Tales células muestran la morfología de forma poligonal característica y la pigmentación de células del EPR.

5 Las células del EPR pueden expandirse en suspensión (con o sin un microportador) o en una monocapa. La expansión de la población mixta de células en cultivos monocapa o en cultivos en suspensión puede modificarse a una expansión a gran escala en biorreactores mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

10 Según una realización, la fase de expansión se efectúa durante al menos una semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas o incluso 10 semanas. Preferiblemente, la fase de expansión se efectúa durante 1 semana - 10 semanas, más preferiblemente 2 semanas - 10 semanas, más preferiblemente, 3 semanas - 10 semanas, más preferiblemente 4 semanas - 10 semanas, o 4 semanas - 8 semanas.

15 Según todavía otra realización, las células del EPR se hacen pasar al menos 1 vez durante la fase de expansión, al menos dos veces durante la fase de expansión, al menos tres veces durante la fase de expansión, al menos cuatro veces durante la fase de expansión o al menos cinco veces durante la fase de expansión.

20 La población de células del EPR generadas según los métodos descritos en el presente documento puede caracterizarse según varios parámetros diferentes.

Por tanto, por ejemplo, las células del EPR obtenidas pueden tener forma poligonal y estar pigmentadas.

25 La recogida de la población expandida de células del EPR puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando una enzima tal como tripsina).

Tras la recogida, la población expandida de células del EPR puede crioconservarse opcionalmente usando métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de medios adecuados para la crioconservación incluyen, pero no se limitan a, 90 % de suero humano/10 % de DMSO, CryoStor 10 %, 5 % y 2 %, Stem Cell banker y Prime XV® FreezIS.

30 Se apreciará que las poblaciones de células divulgadas en el presente documento están desprovistas de células madre embrionarias humanas indiferenciadas. Según una realización, menos de 1:250.000 células son células Oct4⁺TRA-1-60⁺, tal como se mide, por ejemplo, mediante FACS. Las células también una expresión regulada por disminución (en más de 5.000 veces) de GDF3 o TDGF tal como se mide mediante PCR.

35 Las células del EPR de este aspecto de la presente descripción no expresan otros marcadores de células madre embrionarias. Dicho uno o más marcadores de células madre embrionarias pueden comprender OCT-4, NANOG, Rex-1, fosfatasa alcalina, Sox2, TDGF-beta, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y/o TRA-1-81.

40 Las preparaciones de EPR pueden estar sustancialmente purificadas, con respecto a las células no del EPR, que comprenden al menos aproximadamente el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, o el 100 % de células del EPR. La preparación de células del EPR puede estar esencialmente libre de células que son no del EPR o consistir en células del EPR. Por ejemplo, la preparación de células del EPR sustancialmente purificada puede comprender menos de aproximadamente el 25 %, el 20 %, el 15 %, el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, o el 1 % de tipo de células que no son del EPR. Por ejemplo, la preparación de células del EPR puede comprender menos de aproximadamente el 25 %, el 20 %, el 15 %, el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 %, el 1 %, el 0,9 %, el 0,8 %, el 0,7 %, el 0,6 %, el 0,5 %, el 0,4 %, el 0,3 %, el 0,2 %, el 0,1 %, el 0,09 %, el 0,08 %, el 0,07 %, el 0,06 %, el 0,05 %, el 0,04 %, el 0,03 %, el 0,02 %, el 0,01 %, el 0,009 %, el 0,008 %, el 0,007 %, el 0,006 %, el 0,005 %, el 0,004 %, el 0,003 %, el 0,002 %, el 0,001 %, el 0,0009 %, el 0,0008 %, el 0,0007 %, el 0,0006 %, el 0,0005 %, el 0,0004 %, el 0,0003 %, el 0,0002 %, o el 0,0001 % de células que no son del EPR.

55 Las preparaciones de células del EPR pueden ser sustancialmente puras, tanto con respecto a las células que no son del EPR y con respecto a las células del EPR de otros niveles de madurez. Las preparaciones pueden estar sustancialmente purificadas, con respecto a células que no son del EPR, y enriquecidas en células del EPR maduras. Por ejemplo, en preparaciones de células del EPR enriquecidas en células del EPR maduras, al menos aproximadamente el 30 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99 %, o el 100 % de las células del EPR son células del EPR maduras. Las preparaciones pueden estar sustancialmente purificadas, con respecto a células que no son del EPR, y enriquecidas en células del EPR diferenciadas en lugar de células del EPR maduras. Por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, o el 100 % de las células del EPR pueden ser células del EPR diferenciadas en lugar de células del EPR maduras.

65 Las preparaciones descritas en el presente documento pueden estar sustancialmente libres de contaminación o infección bacteriana, vírica, o fúngica, incluyendo, pero sin limitarse a, la presencia de VIH 1, VIH 2, VHB, VHC,

VHA, CMV, HTLV 1, HTLV 2, parvovirus B19, virus de Epstein-Barr, o virus del herpes 1 y 2, SV40, HHV5, 6, 7, 8, CMV, poliomavirus, VPH, enterovirus. Las preparaciones descritas en el presente documento pueden estar sustancialmente libres de contaminación o infección micoplasmática.

- 5 Otro modo de caracterización de las poblaciones de células dadas a conocer en el presente documento es mediante la expresión de marcadores. Por tanto, por ejemplo, al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % de las células expresan bestrofina 1, tal como se mide mediante inmunotinción. Según una realización, entre el 85-100 % de las células expresan bestrofina.
- 10 Según otra realización, al menos el 80 %, el 85 %, el 87 %, el 89 %, el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 100 % de las células expresan factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF), tal como se mide mediante inmunotinción. Por ejemplo, entre el 85-100 % de las células expresan MITF.
- 15 Según otra realización, al menos el 80 % el 85 %, el 87 %, el 89 %, el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 100 % de las células expresan gen box emparejado 6 (PAX-6) tal como se mide mediante inmunotinción o FACS.
- 20 Según otra realización, al menos el 80 %, el 85 %, el 87 %, el 89 %, el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 100 % de las células expresan proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), tal como se mide mediante inmunotinción. Por ejemplo, entre el 85-100 % de las células expresan CRALBP.
- 25 Las células del EPR expresan normalmente marcadores de coexpresión indicativos de diferenciación terminal, por ejemplo, bestrofina 1, proteína premelanosoma (PMEL17), CRALBP y/o RPE65.
- 30 Tas la fase de expansión se obtienen poblaciones de células que comprenden células del EPR mediante lo cual al menos el 70 %, el 71 %, el 72 %, el 73 %, el 74 %, el 75 %, el 76 %, el 77 %, el 78 %, el 79, el 80 %, el 81 %, el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 o incluso el 100 % de las mismas son CRALBP⁺PMEL17⁺.
- 35 Los expertos en la técnica apreciarán que la derivación de células del EPR es de gran beneficio. Puede usarse como modelo *in vitro* para el desarrollo de nuevos fármacos para promover su supervivencia, regeneración y función. Las células del EPR pueden servir para cribado analítico masivo de compuestos que tiene un efecto tóxico o regenerativo sobre las células del EPR. Pueden usarse para descubrir mecanismos, nuevos genes, factores unidos a la membrana o solubles que son importantes para el desarrollo, la diferenciación, el mantenimiento, la supervivencia y la función de células fotorreceptoras.
- 40 Las células del EPR también pueden servir como fuente ilimitada de células del EPR para el trasplante, abastecimiento y soporte de células del EPR disfuncionales o degeneradas en degeneraciones retinianas. Además, las células del EPR modificadas genéticamente pueden servir como vector para portar y expresar genes en el ojo y la retina después del trasplante.
- 45 Las afecciones oculares para las que las células del EPR pueden servir como agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades o trastornos retinianos generalmente asociados con disfunción retiniana, lesión retiniana y/o pérdida del epitelio pigmentario de la retina. Una lista no limitativa de afecciones que pueden tratarse según la descripción comprende retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, degeneración macular hereditaria o adquirida, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), DMRE seca, enfermedad de Best, desprendimiento de retina, atrofia girata, coroideremia, distrofia en patrón, así como otras distrofias del EPR,
- 50 enfermedad de Stargardt, daño del EPR y retiniano debido a daño provocado por una cualquiera de lesión fótica, por láser, inflamatoria, infecciosa, por radiación, neovascular o traumática.
- 55 Los sujetos que pueden tratarse incluyen primates (incluyendo humanos), caninos, felinos, ungulados (por ejemplo, equinos, bovinos, porcinos (por ejemplo, cerdos)), aves y otros sujetos. Los animales humanos y no humanos que tienen importancia comercial (por ejemplo, ganado y animales domésticos) son de particular interés. Los mamíferos a modo de ejemplo que pueden tratarse incluyen caninos; felinos; equinos; bovinos; ovinos; roedores, etc. y primates, particularmente humanos. Los modelos animales no humanos, particularmente mamíferos, por ejemplo, primates, murinos, lagomorfos, etc., pueden usarse para investigaciones experimentales.
- 60 Las células del EPR generadas tal como se describe en el presente documento pueden trasplantarse a diversos sitios diana dentro de un eje del sujeto. El trasplante de las células del EPR puede ser al espacio subretiniano del ojo, que es la ubicación anatómica normal del EPR (entre los segmentos externos de los fotorreceptores y la coroides). Además, dependiendo de la capacidad migratoria y/o de los efectos paracrinos positivos de las células, el
- 65 trasplante en compartimentos oculares adicionales puede considerarse que incluyen el espacio vítreo, la retina interna o externa, la periferia retiniana y dentro de la coroides.

El número de células viables que pueden administrarse al sujeto puede ser de entre 50.000-5×10⁶ por inyección o entre 50.000-500.000.

- 5 Las células se formulan normalmente en un portador (por ejemplo, una solución isotónica y/o una solución salina) como BSS plus™. El portador puede comprender opcionalmente factores adicionales que apoyan el injerto, la integración, la supervivencia, la potencia, etc. del EPR.

10 El trasplante puede realizarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Métodos para realizar trasplantes de EPR se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.962.027, 6.045.791, y 5.941.250 y en Eye Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, marzo de 1997; 235(3):149-58; Biochem Biophys Res Commun, 24 de febrero de 2000; 268(3): 842-6; Ophthalmic Surg, febrero de 1991; 22(2): 102-8. Métodos para realizar trasplantes de córnea se describen en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.755.785, y en Eye 1995; 9 (Pt 6 Su):6-12; Curr Opin Ophthalmol, agosto de 1992; 3 (4): 473-81; Ophthalmic Surg Lasers, abril de 1998; 29 (4): 305-8; Ophthalmology, abril de 2000; 107 (4): 719-24; y Jpn J Ophthalmol, noviembre-diciembre de 1999; 43(6): 502-8. Si van a utilizarse efectos principalmente paracrinos, las células también pueden administrarse y mantenerse en el ojo encapsuladas dentro de un recipiente semipermeable, que también disminuirá la exposición de las células al sistema inmunitario del huésped (Neurotech USA CNTF delivery system; PNAS, 7 de marzo de 2006, vol. 103(10) 3896-3901).

- 20 La etapa de administración puede comprender la administración intraocular de las células del EPR en un ojo que lo necesita. La administración intraocular puede comprender la inyección de las células del EPR en el espacio subretiniano.

25 El trasplante puede realizarse a través de cirugía por vitrectomía a través de la parte plana seguido de administración de las células a través de una pequeña abertura de la retina en el espacio subretiniano o por inyección directa.

30 Las células del EPR pueden trasplantarse de diversas formas. Por ejemplo, las células del EPR pueden introducirse en el sitio diana en forma de suspensión celular, con una matriz o adheridas a una matriz o membrana, matriz extracelular o sustrato tal como un polímero biodegradable o una combinación. Las células del EPR también pueden trasplantarse juntas (cotrasplante) con otras células de la retina, tal como, por ejemplo, con fotorreceptores.

35 La efectividad del tratamiento puede evaluarse mediante diferentes medidas de la función y la estructura visual y ocular, que incluyen, entre otras, la mejor agudeza visual con corrección (BCVA), la sensibilidad de la retina a la luz tal como se mide por perimetría o microperimetría en estados oscuros y adaptados a la luz, electroretinografía (ERG) de campo completo, multifocal, focal o de patrón, sensibilidad al contraste, velocidad de lectura, visión del color, examen biomicroscópico clínico, fotografía del fondo de ojo, tomografía de coherencia óptica (OCT), autofluorescencia del fondo de ojo (FAF), obtención de imágenes infrarrojas y multicolores, angiografía con fluoresceína o ICG y medios adicionales usados para evaluar la función visual y la estructura ocular.

40 Al sujeto pueden administrársele corticosteroides antes de o de manera simultánea con la administración de las células del EPR, tales como prednisolona o metilprednisolona, Pred Forte.

45 Según otro aspecto, no se le administran al sujeto corticosteroides antes de o de manera simultánea con la administración de las células del EPR, tales como prednisolona o metilprednisolona, Pred Forte.

Pueden administrársele fármacos inmunosupresores al sujeto antes de, de manera simultánea con y/o tras el tratamiento.

- 50 El fármaco inmunosupresor puede pertenecer a las siguientes clases:

55 Glucocorticoides, citostáticos (por ejemplo, agentes alquilantes o antimetabolitos), anticuerpos (policlonales o monoclonales), fármacos que actúan sobre las inmunofilinas (por ejemplo, ciclosporina, tacrolímús o sirolímús). Los fármacos adicionales incluyen interferones, opioides, proteínas de unión al TNF, micofenolato y pequeños agentes biológicos.

60 Los ejemplos de fármacos inmunosupresores incluyen: células madre mesenquimales, anticuerpo policlonal de globulina antilinfocítica (ALG), anticuerpo policlonal de globulina antitimocítica (ATG), azatioprina, BAS1 L1X1MAB® (anticuerpo anti-receptor IL-2Ra), ciclosporina (ciclosporina A), DACLIZUMAB® (anticuerpo anti-receptor IL-2Ra), everolímús, ácido micofenólico, RITUX1MAB® (anticuerpo anti-CD20), sirolímús, tacrolímús, Tacrolimus y/o micofenolato de mofetilo.

65 Pueden administrarse antibióticos al sujeto antes de, de manera simultánea con y/o tras el tratamiento. Los ejemplos de los antibióticos incluyen Oflox, gentamicina, cloranfenicol, Tobrex, Vigamox o cualquier otra preparación antibiótica tópica autorizada para uso ocular.

Tal como se usa en el presente documento el término “aproximadamente” se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye, pero sin limitarse a”.

El término “que consiste en” significa “que incluye y se limita a”.

El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir componentes, etapas y/o partes adicionales, pero sólo si los componentes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, el método o la estructura reivindicados.

Tal como se usa en el presente documento, la forma singular “un/uno”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se pretende incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las expresiones “que oscila/oscila entre” un primer número indicado y un segundo número indicado y “que oscila/oscila entre” un primer número indicado “y” un segundo número indicado se usan en el presente documento de manera intercambiable y se pretende que incluyan el primer y el segundo número indicados y todos los números fraccionarios y enteros intermedios.

Tal como se usa en el presente documento, el término “método” se refiere a modos, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos modos, medios, técnicas y procedimientos o bien conocidos o bien fácilmente desarrollados a partir de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye anular, inhibir sustancialmente, retardar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones independientes, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención que, para mayor brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se delinearon anteriormente en el presente documento y tal como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de manera no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican de manera exhaustiva en la bibliografía. Véase, por ejemplo, “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook *et al.*, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tal como se expone en las patentes estadounidenses n.ºs 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique” de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; “Current Protocols in Immunology” volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen de manera extensa en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R.

I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de todo ese documento. Se cree que los procedimientos en las mismas son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Ejemplo de referencia 1

Derivación de células del EPR sin generación de cuerpos esferoides (laminina)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se fabricaron células del EPR a partir de hESC HAD-C 102 que se expandieron manualmente en células alimentadoras de cordón umbilical humano (hUCF; cordón 008) en placas de pocillos centrales que luego se pasaron usando colagenasa a matraces recubiertos con laminina 521 libre de células alimentadoras (5 µg/ml durante 2 horas a 37 °C; Biolamina, Lam-521) y se cultivaron con Nutristem™ que contiene medio HSA que contiene bFGF y TGFβ (Biological Industries, 05-100-1A). El día 6 del crecimiento de hESC en laminina 521, se inició la diferenciación reemplazando el medio por Nutristem Minus (sin bFGF ni TGFβ; Biological Industries, 06-5102-01-1A) que contenía nicotinamida 10 mM (Sigma, N-5535) durante una semana (el medio se reemplazó el día 9) seguido de 2 semanas con Nutristem Minus que contenía nicotinamida 10 mM y activina A 140 ng/ml (Peprotech, G-120-14E) y ~1 semana con Nutristem Minus que contenía nicotinamida 10 mM hasta que se observaron parches de células pigmentadas. Luego, se recogieron las células usando TrypLE select (Invitrogen, 12563-011), se filtraron a través de un tamiz de 40 µm y se centrifugaron. Se contaron las células viables y se sembraron en 3 pocillos recubiertos con gelatina humana recombinante (rhgelatina, fibrógeno RhG100-001) (de una placa de 6 pocillos) en presencia de DMEM (HyClone, SH30081) que contenía suero humano al 20 % (Akron, AK9905) durante hasta 3 días y hasta 11 días en presencia de Nutristem Minus. Luego, se recogieron las células viables al final del pase 0 (P0, en el día 10) y se sembraron en un matraz T75 sin rhgelatina con medio de suero humano al 20 % en presencia de DMEM que contenía suero humano al 20 % durante hasta 3 días y hasta el día 11 en presencia de Nutristem Minus. Esta etapa se repitió una vez más y se recogieron las células del final del pase 2 y se crioconservaron. La representación esquemática del procedimiento puede encontrarse en la figura 1.

RESULTADOS

Al final del procedimiento de diferenciación se generaron parches de células pigmentadas (figura 2A, flechas amarillas). Tras la recogida de todas las células con TrypLE Select, la filtración a través de un tamiz de 40 µm y una etapa de expansión, las células con morfología poligonal cubrieron toda la placa de cultivo celular (figura 2B, células al final de P0).

Al final de P1, se sometieron a prueba las células para determinar su identidad/pureza usando el ensayo de FACS de doble tinción con CRALBP/PMEL17. Tal como se muestra en las figuras 3A-C, por encima del 99 % de las células eran doble positivo para CRALBP y PMEL17.

Al final de P2, se sometieron a prueba las células para determinar su identidad y pureza usando el ensayo de FACS de doble tinción con CRALBP/PMEL17. Tal como se muestra en las figuras 4A-D, por encima del 99 % de las células eran doble positivo para CRALBP y PMEL17.

Ejemplo de referencia 2

Derivación de células del EPR sin generación de cuerpos esferoides (vitronectina)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se fabricaron células del EPR a partir de hESC HAD-C 102 que se expandieron manualmente en células alimentadoras de cordón umbilical humano (hUCF; cordón 008) en placas de pocillos centrales que luego se pasaron usando colagenasa a matraces recubiertos con vitronectina libre de células alimentadoras (5-10 µg/200 ml de PBS por pocillo de la placa de 6 pocillos) y se cultivaron con Nutristem™ que contiene medio HSA que contiene bFGF y TGFβ (Biological Industries, 05-100-1A). En algunos experimentos, se hicieron pasar las hESC indiferenciadas con colagenasa y volvieron a sembrarse en placa con vitronectina. El día 6 ó 7 del crecimiento de hESC en vitronectina, se inició la diferenciación reemplazando el medio por Nutristem Minus (sin bFGF ni TGFβ; Biological Industries, 06-5102-01-1A) que contenía nicotinamida 10 mM (Sigma, N-5535) durante dos semanas (el medio se reemplazó el día 9) seguido de 2 semanas con Nutristem Minus que contenía nicotinamida 10 mM y activina A 140 ng/ml (Peprotech, G-120-14E) y ~1 semana con Nutristem Minus que contenía nicotinamida 10 mM hasta que se observaron parches de células pigmentadas. Luego, se recogió todo el cultivo usando. Se contaron las células viables y se sembraron en 3 pocillos recubiertos con gelatina humana recombinante (rhgelatina, fibrógeno

RhG100-001) (de una placa de 6 pocillos) en presencia de DMEM (HyClone, SH30081) que contenía suero humano al 20 % (Akrón, AK9905) durante hasta 3 días y hasta 11 días en presencia de Nutristem Minus. Luego, se recogieron las células viables al final del pase 0 (P0, en el día 10) y se sembraron en un matraz T75 sin rhgelatina con medio de suero humano al 20 % en presencia de DMEM que contenía suero humano al 20 % durante hasta 3 días y hasta el día 11 en presencia de Nutristem Minus. Esta etapa se repitió una vez más y se recogieron las células del final del pase 2 y se crioconservaron. El experimento se repitió 4 veces, dos veces bajo concentraciones bajas de oxígeno y dos veces bajo concentraciones normales de oxígeno.

RESULTADOS

Al final del procedimiento de diferenciación se generaron parches de células pigmentadas. Se recogió todo el cultivo mediante digestión enzimática y volvió a sembrarse en placa para cultivo y expansión adicionales en condiciones que promueven el crecimiento de las células del EPR. Las células con morfología poligonal cubrieron todas las placas de cultivo celular. La mayoría de las células presentan pigmentación oscura (figuras 5A-C). La inmunotinción mostró que la mayoría de las células expresaban marcadores de células del EPR, incluyendo bestrofina, CRALBP, MITF, PEDF y ZO-1 (figuras 6A-E).

Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Además, la mención o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que tal referencia esté disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que se usen encabezamientos de sección, no deben interpretarse como necesariamente limitativos.

REIVINDICACIONES

1. Método para generar células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) que comprende:
 - 5 (a) cultivar una población celular de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas sobre una superficie adherente en un medio que comprende un agente de diferenciación para obtener células de diferenciación, en donde al menos el 50 % de las células de dicha población celular son Oct4⁺TRA-1-60⁺; y
 - 10 (b) cultivar dichas células de diferenciación sobre dicha superficie adherente en un medio que comprende uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ para obtener células del EPR; en donde dicha superficie adherente es laminina 521; y en donde el agente de diferenciación comprende nicotinamida.
2. Método según la reivindicación 1, en donde las células del EPR se generan sin diferenciación inicial como
15 cuerpos embrioides o cuerpos esferoides.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además expandir dicha población de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas sobre dicha superficie adherente en
20 ausencia de dicho agente de diferenciación antes de la etapa (a), opcionalmente en donde dicha expansión se efectúa en ausencia de dicho agente de diferenciación, o que comprende además expandir dichas células madre pluripotentes humanas sobre células alimentadoras humanas antes de la etapa (a).
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además aislar dichas células del EPR de dicha superficie adherente después de la etapa (b); o que comprende además cultivar dichas
25 células del EPR después de dicho aislamiento sobre una superficie adherente adicional para generar una población expandida de células del EPR, que opcionalmente comprende además cosechar dichas células del EPR; o en donde dicho aislamiento se efectúa de manera enzimática.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, que comprende además expandir dichas células madre pluripotentes humanas sobre células alimentadoras humanas antes de dicha expansión sobre dicha
30 superficie adherente; opcionalmente en donde dichas células alimentadoras humanas comprenden fibroblastos del cordón humano.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde más del 90 % de las células de dicha población expandida de células del EPR son CRALBP⁺PMEL17⁺.
35
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que se efectúa durante al menos 3 semanas.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, que comprende además crioconservar dichas células del EPR después de dicha recogida, opcionalmente en donde dicha crioconservación se efectúa en
40 un medio que consiste en 90 % de HS/10 % de DMSO.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dichas células madre pluripotentes humanas comprenden células madre embrionarias humanas; o en donde dicho medio de la etapa (a) está desprovisto de activina A; o en donde dicho miembro de la superfamilia de TGFβ se selecciona del grupo
45 que consiste en TGFβ1, TGFβ3 y activina A; o en donde dicho medio de la etapa (b) comprende nicotinamida y activina A.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además una etapa de cultivar dichas células del EPR en un medio que comprende nicotinamida y desprovisto de activina A después de la
50 etapa (b).
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la etapa (a) se efectúa durante al menos 5 días.
- 55 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la etapa (b) se efectúa durante al menos una semana.

FIG. 1

hESC cultivadas en hUCF en 4 placas de pocillos centrales



Colagenasa →



hESC sometidas a pase en matraces T25 recubiertos con laminina 521 sin hUCF



- Diferenciación con nicotinamida y activina A
- Filtración
- Expansión



Células al final de P0



Tryple Select →



- Expansión en matraces

Células al final de P2

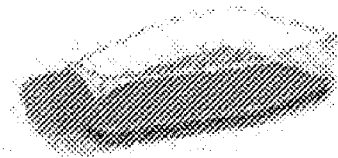


FIG. 2B

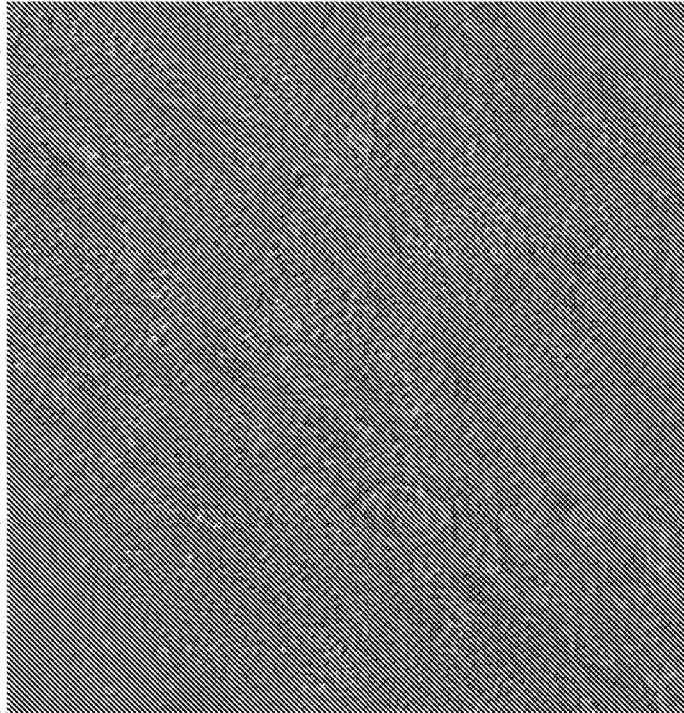


FIG. 2A

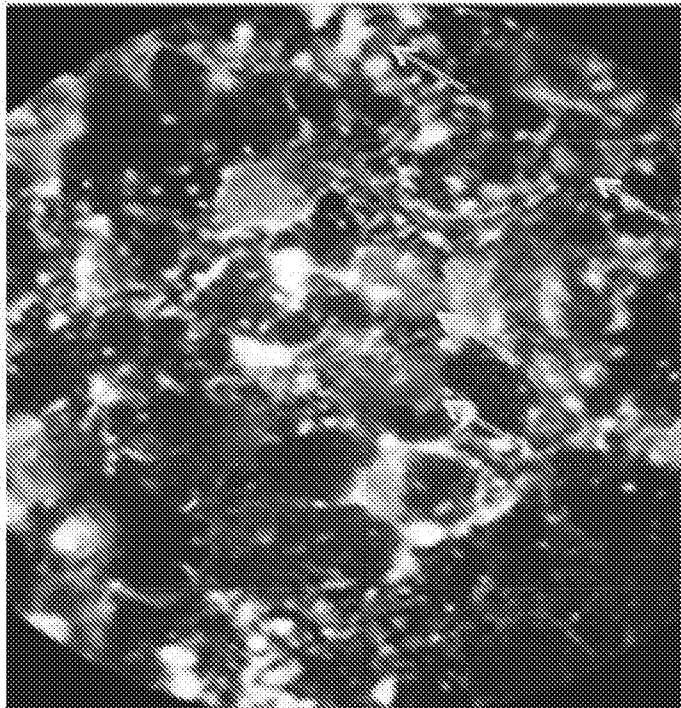
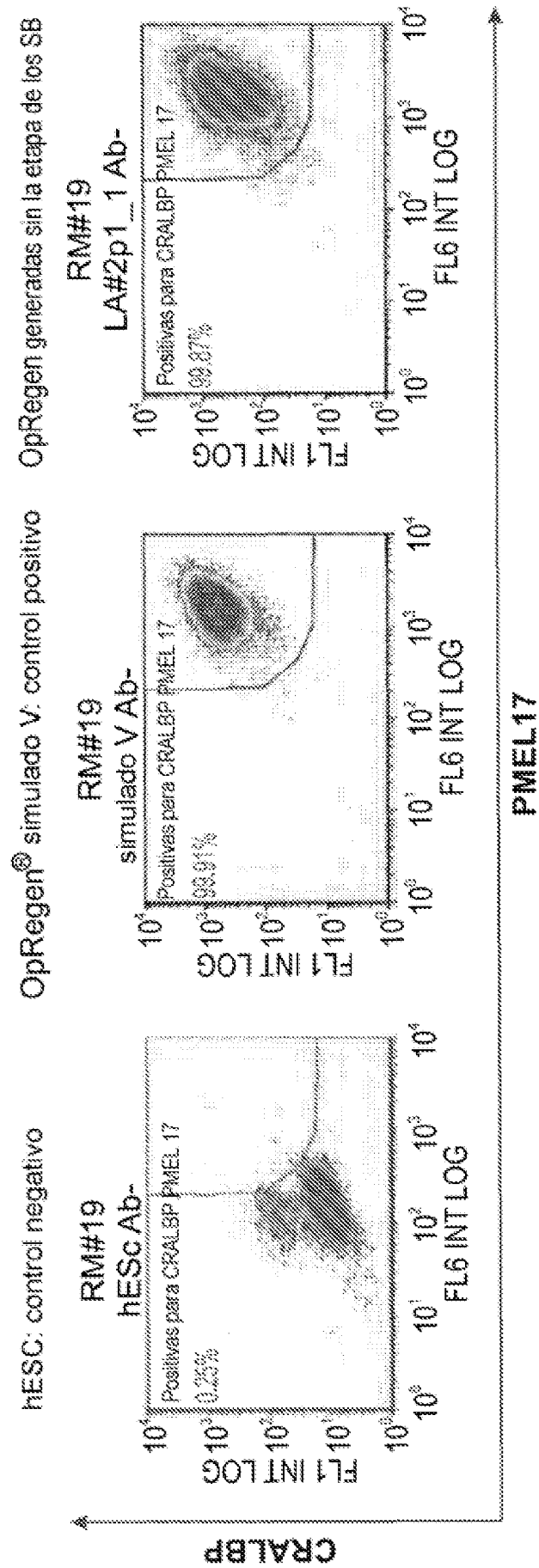


FIG. 3C

FIG. 3B

FIG. 3A



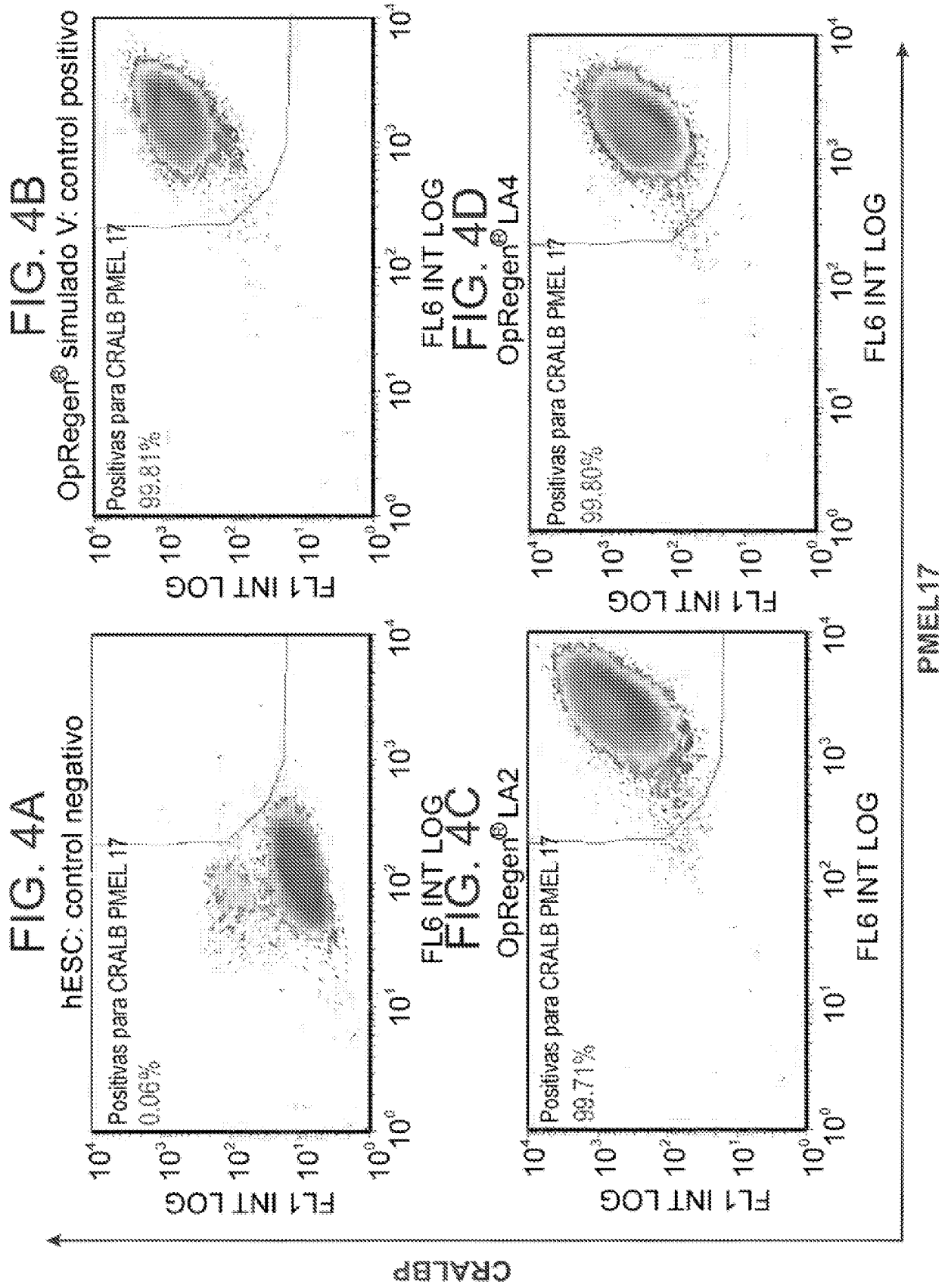


FIG. 5A

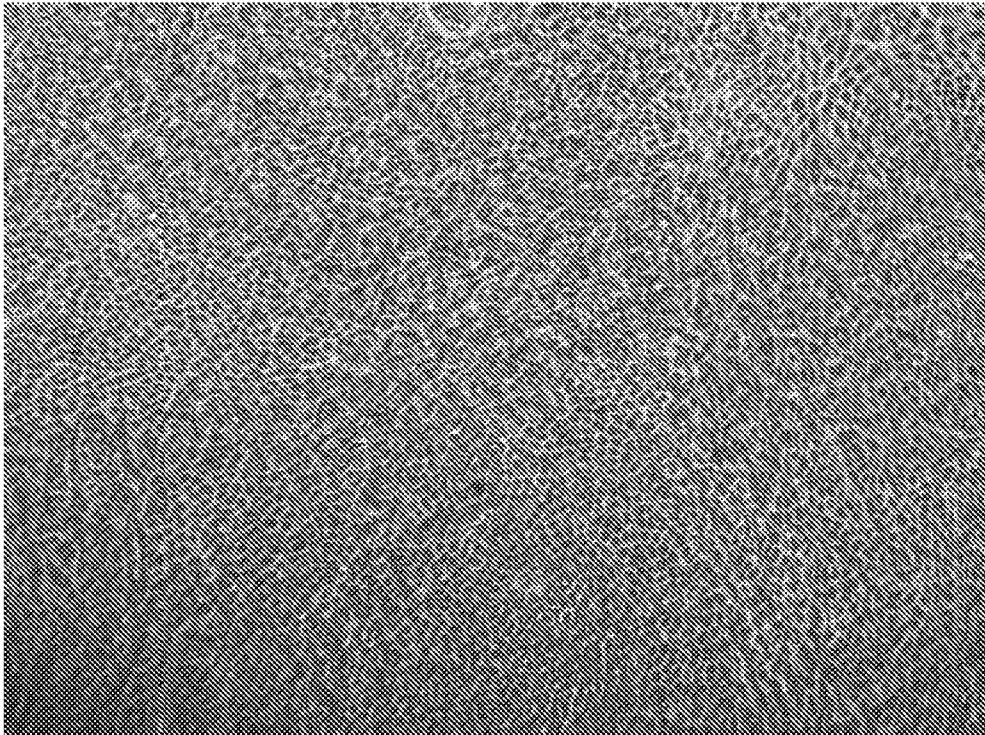


FIG. 5B

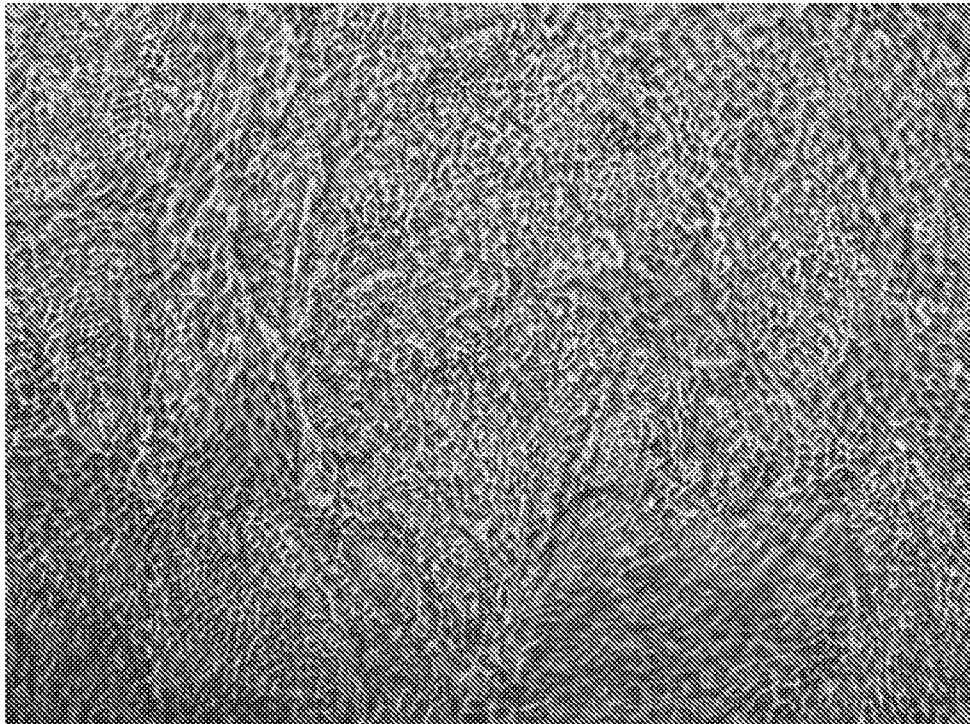


FIG. 5C

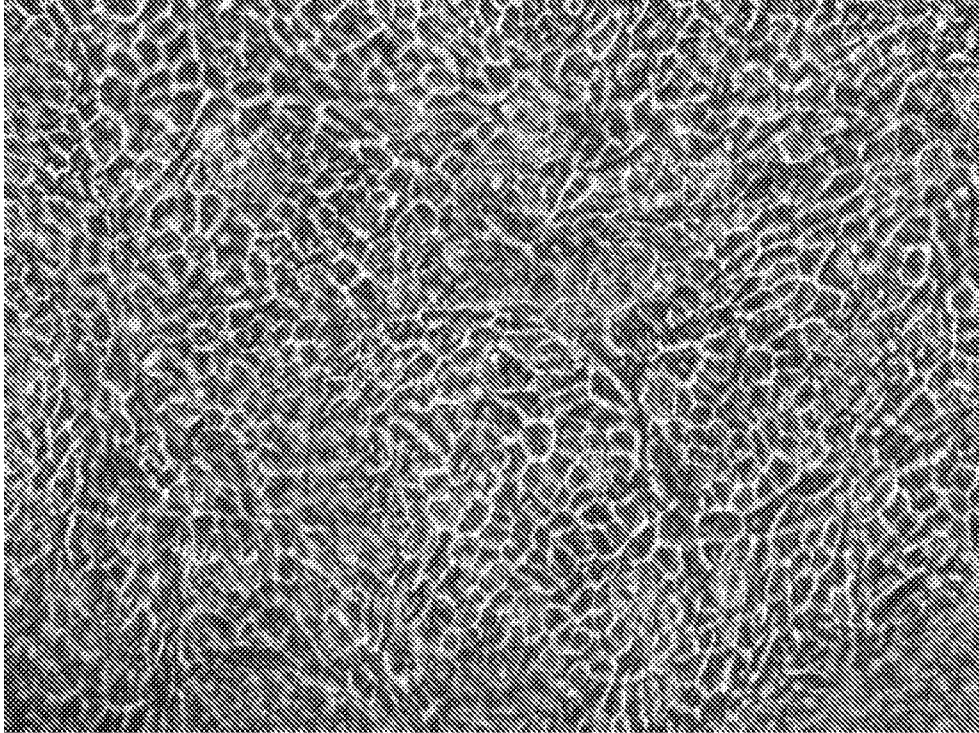


FIG. 6A

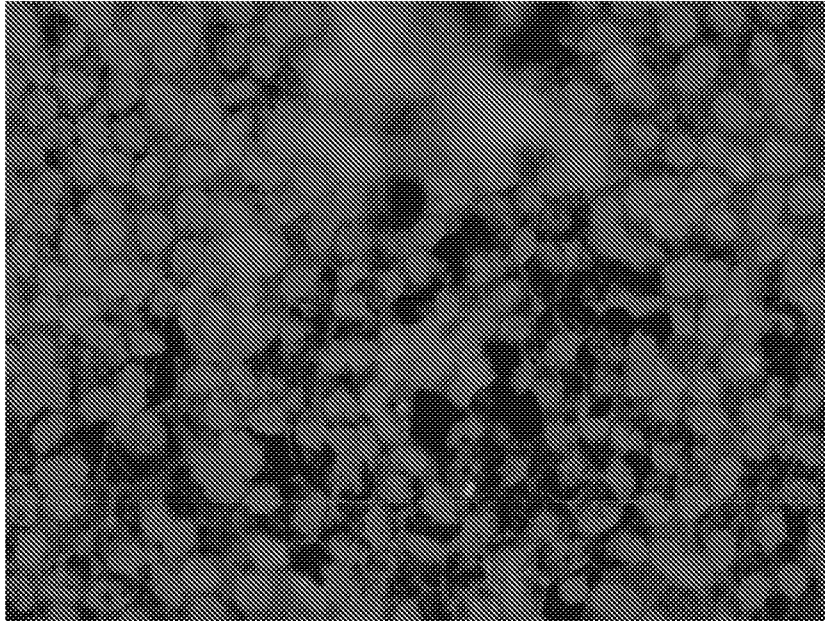


FIG. 6B

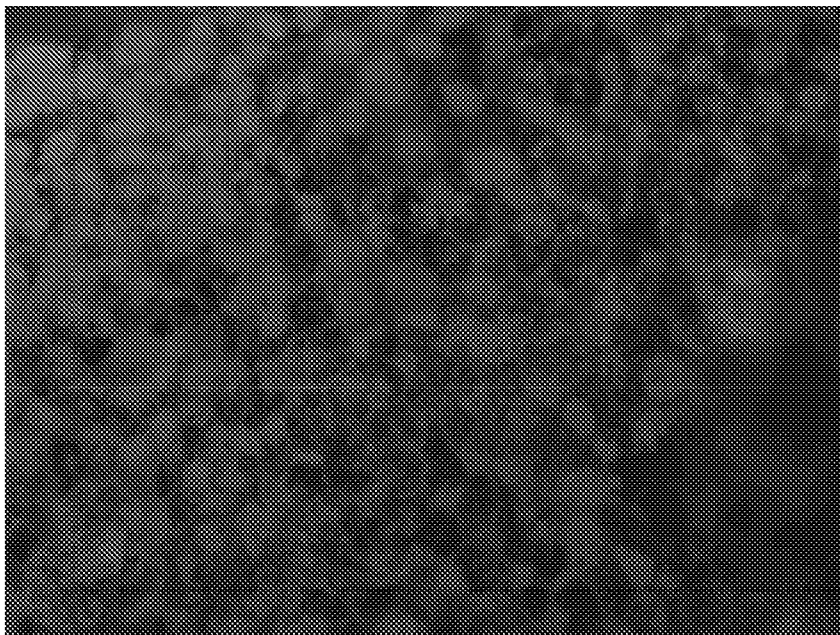


FIG. 6C

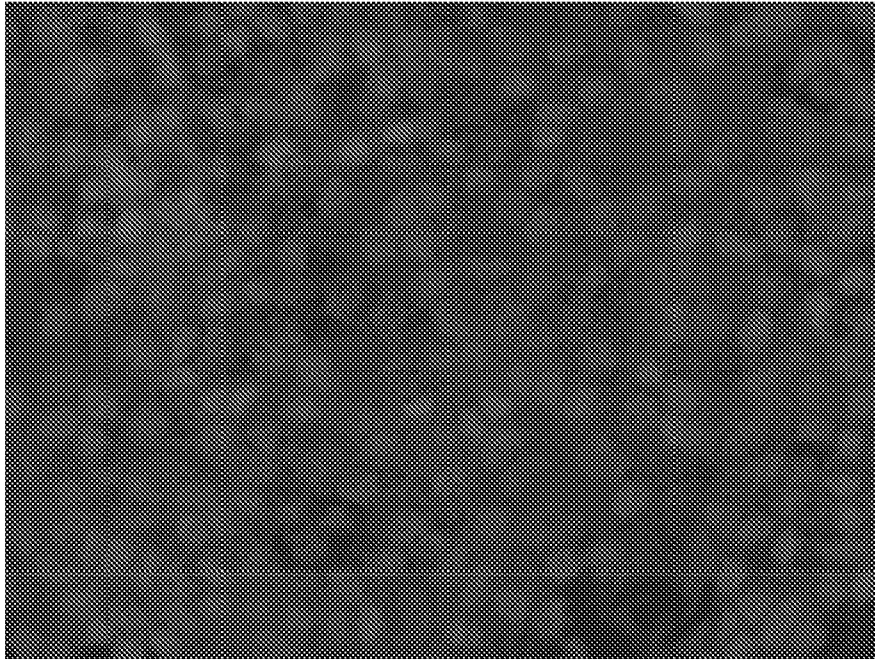


FIG. 6D

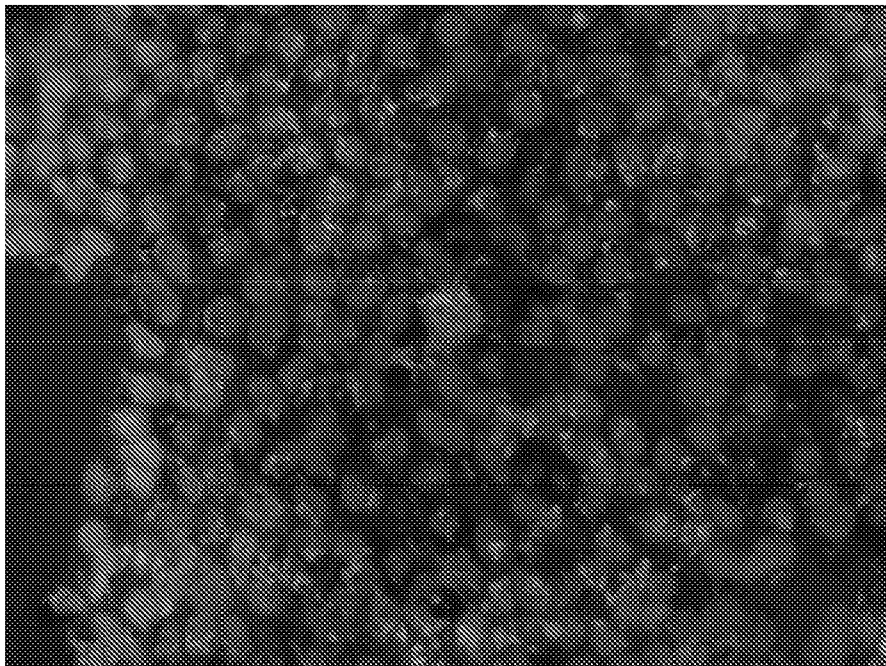


FIG. 6E

