

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 659**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/84 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2016** **E 21167900 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 3869195**

54 Título: **Ensayos mejorados de potencia de células de epitelio pigmentario retiniano (EPR) humano y progenitores de fotorreceptores**

30 Prioridad:

23.03.2015 US 201562136660 P

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

02.10.2024

73 Titular/es:

**ASTELLAS INSTITUTE FOR REGENERATIVE
MEDICINE (100.0%)
9 Technology Drive
Westborough, MA 01581, US**

72 Inventor/es:

**KLIMANSKAYA, IRINA, V.;
CARSON, JULIE KATHRYN;
GAY, ROGER y
IVANOVA, YORDANKA GIKOVA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 980 659 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

Ensayos mejorados de potencia de células de epitelio pigmentario retiniano (EPR) humano y progenitores de fotorreceptores

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de un método celular *in vitro* para medir la fagocitosis de los segmentos externos de los bastones fotorreceptores.

Antecedentes

El epitelio pigmentario retiniano (EPR) es la capa celular pigmentada exterior a la retina neurosensorial entre la coroides subyacente (la capa de vasos sanguíneos detrás de la retina) y las células visuales retinianas suprayacentes ((p. ej., bastones y conos fotorreceptores). El EPR es crítico para la función y salud de los fotorreceptores y la retina. El EPR mantiene la función de los fotorreceptores mediante el reciclado de fotopigmentos; transportando, metabolizando y almacenando vitamina A; fagocitando segmentos externos de los bastones fotorreceptores; transportando hierro y moléculas pequeñas entre la retina y la coroides; manteniendo la membrana de Bruch y absorbiendo luz dispersada para conseguir una mejor resolución de la imagen. Ver, p. ej., el documento n.º WO 2009/051671; Engelmann y Valtink (2004) "RPE Cell Cultivation." Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 242(1): 65-67; Irina Klimanskaya, Retinal Pigment Epithelium Derived From Embryonic Stem Cells, en: STEM CELL ANTHOLOGY 335-346 (Bruce Carlson ed., 2009).

La degeneración del EPR puede causar desprendimiento retiniano, displasia retiniana o atrofia retiniana que está asociada a varias enfermedades que alteran la visión y resultan en daños en los fotorreceptores y ceguera, tales como coroideremia, retinopatía diabética, degeneración macular (incluyendo la degeneración macular asociada a la edad, DMAE) y distrofia macular de Stargardt (DMS), siendo estas dos últimas las causas principales de ceguera en adultos y jóvenes, respectivamente, de todo el mundo. Aunque ambas enfermedades actualmente no tienen cura, existen pruebas de modelos preclínicos de degeneración macular de que el trasplante de ERP derivado de células madre embrionarias humanas (CMEh) puede rescatar fotorreceptores y prevenir la pérdida visual (Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic rats. Cloning and Stem Cells 2006; 8,189-199; Lu B, Malcuit C, Wang S, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. Stem Cells 2009; 21, 2125-2135).

También contribuye a las enfermedades anteriormente mencionadas la pérdida adicional de células neuronales postmitóticas. Entre estas enfermedades retinianas están las distrofias de bastones y conos, la degeneración retiniana, la retinitis pigmentosa (RP), la retinopatía diabética, la degeneración macular, la amaurosis congénita de Leber y la enfermedad de Stargardt. En la mayoría de casos de degeneración retiniana, la pérdida de células ocurre principalmente en la capa nuclear externa (CNE), que incluye bastones y conos fotorreceptores.

Una potencial fuente para la sustitución de células fotorreceptoras incluye las células madre. Los primeros estudios evaluaron células de ratón, células madre de ratón o poblaciones heterogéneas de células progenitoras retinianas como posible fuente de células de sustitución para los fotorreceptores perdidos. Estos primeros estudios describieron el trasplante de células precursoras de fotorreceptores procedentes de retina de ratón de día postnatal 1 (Maclaren et al. Nature 444(9):203-207, 2006); la generación *in vitro* de células precursoras retinianas a partir de células madre embrionarias de ratón (Ikeda et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 102(32): 11331-11336, 2005); la generación de células progenitoras retinianas a partir de retinas de ratón de día postnatal 1 (Klassen et al. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 45(11):4167-4175, 2004); la implantación de células madre mesenquimales de médula ósea en un modelo de rata RCS de degeneración retiniana (Inoue et al. Exp. Eye Res. 8(2):234-241, 2007); la producción de células progenitoras retinianas, incluyendo células ganglionares, células amacrinas, fotorreceptores en los que 0,01 % del total de células expresaba S-opsina o rodopsina, células bipolares y células horizontales, a partir de la línea H⁹ de células madre embrionarias humanas (Lamba et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 10(34):12769-12774, 2006) y la inducción de células madre pluripotentes inducidas (CMPI) a partir de fibroblastos humanos para producir células progenitoras retinianas (Lamba et al. PLoS ONE 5(1):e8763. doi: 10.1371/journal.pone.0008763). Ninguno de estos enfoques produjo una población homogénea de células progenitoras de fotorreceptores o células fotorreceptoras para el trasplante. Ninguno de dichos enfoques produjo una población homogénea de células progenitoras de fotorreceptores o células fotorreceptoras que mostrasen función *in vivo* de bastón o cono (p. ej., detectable porque confieren mejoras de la agudeza visual). Los suministros de tejido derivado de donante a partir del cual puedan aislarse fotorreceptores y progenitores de fotorreceptores (tales como cadáveres, tejido fetal y animales vivos) son limitados. Las células madre pueden propagarse y expandirse *in vitro* indefinidamente, proporcionando una fuente potencialmente inacabable de células no derivadas de donante para la terapia humana. La diferenciación de las células madre en una población homogénea de fotorreceptores o progenitores de fotorreceptores podría proporcionar un suministro abundante de células no derivadas de donante para el implante y tratamiento de enfermedades retinianas. Las células progenitoras de fotorreceptores pueden presentar actividad fagocítica.

Se ha dado a conocer cierta materia, incluyendo métodos de producción de células del EPR, composiciones de células

del EPR y ensayos de liberación (incluyendo ensayos de fagocitosis) para células del EPR en los documentos de los mismos propietarios n.º US10.485.829 B2 y n.º WO2013/074681. Se da a conocer cierta materia, incluyendo métodos de producción de progenitores de fotorreceptores, composiciones de progenitores de fotorreceptores y métodos de ensayo de la función (incluyendo ensayos de fagocitosis) en los documentos de los mismos propietarios n.º WO2014/145108.

Gordiyenko et al. (2010; Investigative Ophthalmology & Visual Science; 51(2): 1143-1150) describe una preparación de segmentos externos de fotorreceptor marcados con tinte rojo pHrodo® y su utilización en un ensayo de fagocitosis en células del EPR.

Lin et al. (2010; 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences; http://www.rsc.org/binaries/loc/2010/pdfs/Papers/330_0130.pdf) informan de un estudio de endocitosis de tintes no naturales (FM4-64 y AlexaFluor 488 dextrano) por células HeLa.

Sumario

La presente invención proporciona un método para medir la actividad de fagocitosis, que comprende:

(1) medir la fluorescencia de ensayo en una primera alícuota de células incubadas con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con rojo pHrodo® y/o fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C, o a 37 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de ensayo, y

(2) medir la fluorescencia de control en una segunda alícuota de las células incubadas con SEF marcados con rojo pHrodo® y/o fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, o entre 12 °C y 15 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de control, en donde una fluorescencia de ensayo que es superior a la fluorescencia de control indica actividad de fagocitosis de las células, en donde las células son células de EPR humano o células progenitoras de fotorreceptores humanos.

Se han utilizado segmentos externos (SE) de fotorreceptores (normalmente bovinos o porcinos) marcados con FITC para estudiar la fagocitosis por el epitelio pigmentario retiniano (EPR) *in vitro*. Sin embargo, la mayoría de los métodos cuantitativos utilizados para la evaluación de la fagocitosis (lector de placas de fluorescencia FACS) no diferencian entre las partículas unidas a la superficie y las internalizadas, y de esta manera, no permiten estudiar específicamente los mecanismos implicados en los estadios de unión de receptores en superficie y de internalización de la fagocitosis. Además, la fluorescencia de FITC es sensible al pH y se reduce significativamente a un pH inferior a 6, mientras que el pH de los lisosomas y fagosomas fusionados con lisosomas es inferior a 5. De esta manera, la fluorescencia de los SE marcados con FITC no es verdaderamente representativa de la cantidad de SE internalizados.

En la presente memoria se proporciona un ensayo más sensible y exacto para la detección de la fagocitosis internalizada de segmentos externos de fotorreceptores, una medida importante de la función de las células y progenitores de fotorreceptores del EPR y, en consecuencia, un criterio de liberación importante para las células del EPR y progenitores de fotorreceptores para la utilización en el tratamiento de las enfermedades retinianas, tales como las distrofias de bastones y conos, la degeneración retiniana, la retinitis pigmentosa, la coroideremia, la retinopatía diabética, la degeneración macular (incluyendo la degeneración macular asociada a la edad y la degeneración macular miópica), la amaurosis congénita de Leber y la enfermedad de Stargardt (*fundus flavimaculatus*). Ver, p. ej., el documento n.º WO 2009/051671.

Las células del EPR descritas en la presente memoria son funcionales después del trasplante. Con este fin, las células de EPR forman una monocapa entre la retina neurosensorial y la coroides en el sujeto (o paciente) que recibe las células trasplantadas. Las células de EPR también suministran nutrientes a los fotorreceptores contiguos y eliminan los segmentos externos de fotorreceptores mediante fagocitosis.

Las células de EPR adecuadas para el trasplante pueden seleccionarse basándose en varias características funcionales y/o fenotípicas, incluyendo, aunque sin limitación, la actividad de fagocitosis. Por ejemplo, las células de EPR adecuadas para el trasplante pueden evaluarse de acuerdo con su actividad de fagocitosis, así como su potencial proliferativo. Por ejemplo, las células de EPR podrían presentar un mayor potencial proliferativo que las células derivadas de donantes de ojos (p. ej., las células de EPR son «más jóvenes» que las de los donantes de ojos). Lo anterior permite que la célula de EPR descrita en la presente memoria presente un tiempo de vida útil más prolongado que las células derivadas de donantes de ojos.

Uno de los parámetros clave de la potencia de las células de EPR en el contexto clínico es la medida cuantitativa de la actividad de fagocitosis de segmento externo de las preparaciones farmacéuticas de células de EPR. La fagocitosis de los segmentos externos resulta en la acumulación de los fragmentos celulares fagocitados en compartimientos de bajo pH en las células de EPR. La presente invención utiliza segmentos externos de fotorreceptores que se han asociado (es decir, covalente o no covalentemente) a un marcador detectable, que es detectable espectrofotométricamente, para proporcionar una señal espectrofotométrica, en donde el marcador detectable es

selectivo para presentar una primera señal espectrofotométrica cuando está presente a un pH neutro o a pH fisiológico, es decir, un pH de entre 7 y 7,5, y una segunda señal espectrofotométrica cuando está presente en un medio de bajo pH en un compartimiento intracelular, tal como un lisosoma, fagosoma, endosoma o similar. La diferencia entre la primera y segunda señales espectrofotométricas puede ser uno o más de: grado de emisión de fluorescencia (intensidad incrementada a un pH bajo respecto al pH neutro), un cambio en la longitud de onda de emisión de fluorescencia entre el pH neutro y un pH bajo, un cambio en la longitud de onda de excitación de fluorescencia entre pH neutro y un pH bajo, o similar.

En la presente memoria se describe un marcador detectable que puede ser un sensor fluorescente de pH, tal como un tinte fluorescente. Los tintes fluorescentes de ejemplo pueden ser una fracción de tinte fluorescente que presenta un grupo amino (alifático o aromático) como la fracción indicadora sensible al pH, es decir, una amina que no está protonada al pH del medio de cultivo en el que se incuban juntas las células de EPR y los segmentos externos (es decir, un pH neutro o pH fisiológico) y que se protona al pH del compartimiento intracelular al que resultan absorbidos los segmentos externos por las células, tales como las células de EPR, por fagocitosis. Cuando el tinte absorbe un fotón, creando un estado electrónico excitado, el electrón de la pareja no compartida del grupo amino se transfiere al orbital vaciado por la excitación. Dicha transferencia electrónica, denominada transferencia de electrones fotoinducida (TEF), evita la transición de emisión de la molécula excitada, y por lo tanto, la fluorescencia del tinte se extingue. La protonación del grupo amino modifica la naturaleza y la energía del orbital de la pareja y detiene la TEF. En consecuencia, la fracción informadora fluorescente responde al cambio del pH. Debido a que la protonación del grupo amino cancela la extinción, los sensores basados en TEF se vuelven más fluorescentes a medida que baja el pH.

Un ejemplo de un tinte fluorescente es un tinte sensible al pH basado en la rodamina, tal como el descrito en el documento n.º WO 2005/098437. Estos tintes presentan un anillo de benceno sustituido en orto respecto a la fracción xanteno por -OH o -SH (o sus formas desprotonadas). Estos tintes muestran una dependencia del pH similar a los indicadores amina de TEF, aunque fueron diseñados para presentar valores de pKa inferiores a 6 basándose en la necesidad de un sensor del pH con diana en compartimientos celulares diana con un pH inferior a 6.

Otro ejemplo de un marcador fluorescente es una nanopartícula fluorescente sensible al pH. Las nanopartículas fluorescentes sensibles al pH utilizan principalmente polímeros conjugados con tintes sensibles al pH de molécula pequeña (Srikun, D., J. Chem. Sci. 2011, 2, 1156; Benjaminsen, R. V., ACS Nano 2011, 5, 5864; Albertazzi, L., J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 18158; Urano, Y., Nat. Med. 2009, 15, 104) o la utilización de conectores sensibles al pH que se conjugan con tintes no sensibles al pH (Li, C, Adv. Fund. Mater. 2010, 20, 2222; Almutairi, J. Am. Chem. Soc. 2007, 130, 444.). A título ilustrativo adicional, el documento n.º WO 2013/152059 describe nanoplateformas fluorescentes multicolor altamente activables y ajustables por el pH que pueden adaptarse para la utilización en los presentes ensayos.

Aunque no forma parte de la presente invención, en la presente memoria se describe un método para evaluar la actividad de fagocitosis que comprende incubar células con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) durante un tiempo y temperatura suficientes para que las células fagociten los SEF, en donde los SEF emiten fluorescencia en mayor medida a un pH ácido que a un pH más alto, y detectar la intensidad de fluorescencia de las células después de la incubación, en donde un incremento de fluorescencia respecto al control indica fagocitosis de los SEF por las células.

En la presente realización que no forma parte de la invención, las células pueden incubarse con SEF a una temperatura comprendida entre aproximadamente la temperatura ambiente y aproximadamente 37 °C, o entre aproximadamente la temperatura ambiente y aproximadamente 40 °C. Las células pueden incubarse con los SEF a aproximadamente la temperatura ambiente, a aproximadamente temperatura fisiológica, o aproximadamente 37 °C.

En la presente realización que no forma parte de la invención, el control pueden ser células incubadas con los SEF a una temperatura inferior a la temperatura ambiente. El control pueden ser células incubadas con los SEF a 4 °C.

Aunque no forma parte de la invención, en la presente memoria también se describe un método para evaluar la actividad de fagocitosis de una población celular adherente, que comprende incubar la población celular adherente con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) durante un tiempo y temperatura suficientes para que las células fagociten los SEF, en donde los SEF emiten fluorescencia en mayor medida a un pH ácido que a un pH más alto, y detectar la intensidad de fluorescencia de las células después de la incubación, en donde un incremento de fluorescencia respecto al control indica fagocitosis de los SEF por las células.

En la presente realización que no forma parte de la invención, la población celular adherente puede incubarse con los SEF a una temperatura comprendida entre aproximadamente 17 °C y 40 °C, o entre aproximadamente 25 °C y 40 °C, o entre aproximadamente 34 °C y 40 °C, o a una temperatura aproximada de 37 °C. El control puede ser una población celular incubada con los SEF a una temperatura de aproximadamente 10 °C y 16 °C. El control puede ser una población celular incubada con los SEF a una temperatura de entre aproximadamente 12 °C y 15 °C.

Aunque no forma parte de la invención, en la presente memoria también se describe un método de evaluación de la actividad de fagocitosis, que comprende proporcionar segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con un

marcaje fluorescente que presenta una señal de fluorescencia alterada al ser internalizado por fagocitosis en un compartimiento de pH bajo en una célula respecto a la señal de fluorescencia cuando está presente extracelularmente; incubar las células de ensayo con los SEF marcados, bajo condiciones permisivas para la fagocitosis de los SEF marcados; y detectar la alteración de la fluorescencia, en caso de ocurrir, en las células de ensayo después de la incubación con los SEF marcados, y cuantificar la actividad de fagocitosis de las células de ensayo a partir de dicha alteración.

La señal de fluorescencia alterada (cuando el marcaje es internalizado por fagocitosis a un compartimiento de pH bajo) puede ser un incremento de la intensidad de la señal de fluorescencia respecto a la señal cuando el marcaje fluorescente está presente extracelularmente. La señal de fluorescencia alterada (cuando el marcaje ha sido internalizado por fagocitosis a un compartimiento de pH bajo) puede ser detectable mediante citometría de flujo. La señal de fluorescencia alterada puede distinguir entre SEF marcados que han sido internalizados por fagocitosis y SEF marcados que están unidos a la superficie de las células de ensayo pero que no han sido internalizados. La señal de fluorescencia alterada que se detecta en las células de ensayo en comparación con una población celular de control incubada con SEF marcados con el fin de cuantificar la actividad de fagocitosis de las células de ensayo.

En la presente realización que no forma parte de la invención, las células de ensayo pueden incubarse con SEF marcados, a aproximadamente la temperatura ambiente, a aproximadamente temperatura fisiológica, a aproximadamente 37 °C, a aproximadamente 15 °C a 40 °C, o a una temperatura entre la ambiente y 37 °C, o entre la temperatura ambiente y 40 °C.

En la presente realización que no forma parte de la invención, la población celular de control puede incubarse con SEF marcados a una temperatura inferior a la ambiente, incluyendo a aproximadamente 4 °C.

Aunque no forma parte de la invención, también se describe un método de evaluación de la actividad de fagocitosis, que comprende proporcionar segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con un marcaje fluorescente que presenta una señal de fluorescencia alterada al ser internalizado por fagocitosis en un compartimiento de pH bajo en una célula respecto a la señal de fluorescencia cuando está presente extracelularmente; incubar las células de ensayo adherentes con los SEF marcados, bajo condiciones permisivas para la fagocitosis de los SEF marcados; y detectar la alteración de la fluorescencia, en caso de ocurrir, en las células de ensayo adherentes después de la incubación con los SEF marcados, y cuantificar la actividad de fagocitosis de las células de ensayo adherentes a partir de dicha alteración.

En la presente realización que no forma parte de la invención, las células de ensayo pueden incubarse con los SEF a una temperatura comprendida entre aproximadamente 17 °C y 40 °C, o entre aproximadamente 25 °C y 40 °C, o entre aproximadamente 34 °C y 40 °C, o a una temperatura aproximada de 37 °C. La señal de fluorescencia alterada que se detecta en las células de ensayo adherentes pueden compararse con una población celular de control incubada con SEF marcados, a una temperatura que mantiene la viabilidad de las células pero que induce un nivel bajo o nulo de fagocitosis, opcionalmente dicha temperatura puede estar comprendida entre aproximadamente 12 °C y 15 °C, con el fin de cuantificar la actividad de fagocitosis de las células de ensayo. La población celular de control puede incubarse con los SEF a una temperatura de aproximadamente 10 °C a 16 °C.

Aunque no forma parte de la invención, en la presente memoria también se describe una preparación de segmentos externos de fotorreceptores (SEF) marcados para la evaluación de la actividad fagocítica de una población celular de ensayo, en donde los SEF se marcan con un marcaje fluorescencia que presenta una señal de fluorescencia alterada cuando son internalizados por fagocitos a un compartimiento de pH bajo en la célula, respecto a la señal de fluorescencia cuando el marcaje fluorescente está presente extracelularmente. La señal de fluorescencia alterada (cuando el marcaje es internalizado por fagocitosis a un compartimiento de pH bajo) puede ser un incremento de la intensidad de la señal de fluorescencia respecto a la señal cuando el marcaje fluorescente está presente extracelularmente. La señal de fluorescencia alterada (cuando el marcaje ha sido internalizado por fagocitosis a un compartimiento de pH bajo) puede ser detectable mediante citometría de flujo. El marcaje fluorescente puede ser rojo pHrodo®. Los SEF pueden marcarse con rojo pHrodo® y biopartículas de *E. coli* con rojo pHrodo®.

Aunque no forma parte de la invención, en la presente memoria también se describe un método para medir la actividad de fagocitosis en una población celular que comprende medir la fluorescencia de ensayo en una población celular de ensayo puesta en contacto con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados fluorescentemente no con FITC, y comparar la fluorescencia de ensayo medida con una fluorescencia de control, en donde los SEF marcados fluorescentemente no con FITC emiten fluorescencia a pH ácido pero no emiten fluorescencia, o emiten un nivel mínimo, a pH más alto.

En la presente realización que no forma parte de la invención, la población celular de ensayo puede ponerse en contacto con SEF marcados fluorescentemente no con FITC, a una temperatura comprendida entre aproximadamente la ambiente y aproximadamente la temperatura fisiológica, incluyendo por ejemplo aproximadamente 37 °C (es decir, entre aproximadamente la temperatura ambiente y aproximadamente 37 °C), o entre aproximadamente la temperatura ambiente y aproximadamente 40 °C. La población celular de ensayo puede ponerse en contacto con SEF marcados fluorescentemente no con FITC, a una temperatura entre aproximadamente 15 °C y 40 °C, o a aproximadamente la

temperatura fisiológica, incluyendo por ejemplo aproximadamente 37 °C. La fluorescencia de control puede ser la fluorescencia de una población celular puesta en contacto con los SEF marcados fluorescentemente no con FITC a una temperatura inferior a la ambiente. La fluorescencia de control puede ser la fluorescencia de una población celular puesta en contacto con los SEF marcados fluorescentemente no con FITC a 4 °C.

Aunque no forma parte de la invención, en la presente memoria también se describe un método para medir la actividad de fagocitosis en una población celular adherente que comprende medir la fluorescencia de ensayo en una población celular de ensayo adherente puesta en contacto con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados fluorescentemente no con FITC, y comparar la fluorescencia de ensayo medida con una fluorescencia de control, en donde los SEF marcados fluorescentemente no con FITC emiten fluorescencia a pH ácido pero no emiten fluorescencia, o emiten un nivel mínimo, a pH más alto.

En la presente realización que no forma parte de la invención, la población celular de ensayo puede ponerse en contacto con SEF marcados fluorescentemente no con FITC a una temperatura comprendida entre aproximadamente 17 °C y 40 °C, o entre aproximadamente 25 °C y 40 °C, o entre aproximadamente 34 °C y 40 °C, o a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

En la presente realización que no forma parte de la invención, la fluorescencia de control puede ser la fluorescencia de una población celular adherente puesta en contacto con los SEF marcados fluorescentemente no con FITC a una temperatura de aproximadamente 12 °C a 15 °C. En algunas realizaciones, la fluorescencia de control puede ser la fluorescencia de una población celular adherente puesta en contacto con los SEF marcados fluorescentemente no con FITC a una temperatura de aproximadamente 10 °C a 16 °C.

Según las reivindicaciones, la presente invención proporciona un método para medir la actividad de fagocitosis que comprende: (1) medir la fluorescencia de ensayo en una primera alícuota de células incubada con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados fluorescentemente que están marcados con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con rojo pHrodo® y/o con fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C, o a 37 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de ensayo, y (2) medir una fluorescencia de control en una segunda alícuota de células incubada con SEF marcados con rojo pHrodo® y/o fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, o entre 12 °C y 15 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de control, en donde una fluorescencia de ensayo superior a la fluorescencia de control indica actividad de fagocitosis de la población celular, en donde las células son células de EPR humano o células progenitoras de fotorreceptor humanas.

En la presente memoria se proporciona, además, un método para medir la actividad de fagocitosis, que comprende: (1) medir la fluorescencia de ensayo en una primera alícuota de células adherentes incubadas con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con rojo pHrodo® y/o fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C, o a 37 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de ensayo, y (2) medir la fluorescencia de control en una segunda alícuota de las células adherentes incubadas con SEF marcados con rojo pHrodo® y/o fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, o entre 12 °C y 15 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de control, en donde una fluorescencia de ensayo superior a la fluorescencia de control indica actividad de fagocitosis de la población celular, en donde las células son células de EPR humanas o células progenitoras de fotorreceptor humanas.

En algunas realizaciones, la primera alícuota de las células adherentes se incuba con los SEF marcados, a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C, o a una temperatura de 37 °C. En algunas realizaciones, la segunda alícuota de las células adherentes se incuba con los SEF marcados, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C o entre 12 °C y 15 °C.

En la presente memoria se proporciona, además, un método para medir la actividad de fagocitosis, que comprende: (1) medir la fluorescencia de ensayo en una primera alícuota de células incubadas con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con rojo pHrodo® y/o con biopartículas de *E. coli* con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C, o a 37 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de ensayo, y (2) medir la fluorescencia de control en una segunda alícuota de las células adherentes incubadas con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con rojo pHrodo® y/o con biopartículas de *E. coli* con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, o entre 12 °C y 15 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de control, en donde una fluorescencia de ensayo superior a la fluorescencia de control indica actividad de fagocitosis de la población celular, en donde las células son células de EPR humanas o células progenitoras de fotorreceptor humanas.

En la presente memoria se proporciona, además, un método para medir la actividad de fagocitosis, que comprende: (1) medir la fluorescencia de ensayo en una primera alícuota de células incubadas con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con rojo pHrodo® y/o con biopartículas de *E. coli* con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C, o a 37 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de ensayo, y (2) medir la fluorescencia de control en una segunda alícuota de las células adherentes incubadas con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con rojo pHrodo® y/o con biopartículas de *E. coli* con rojo pHrodo®, a una

temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, o entre 12 °C y 15 °C, en donde una fluorescencia de ensayo superior a la fluorescencia de control indica actividad de fagocitosis de la población celular, en donde las células son células de EPR humanas o células progenitoras de fotorreceptor humanas.

5 Diversas realizaciones se aplican igualmente a todos y cada uno de los aspectos anteriormente mencionados. Estas se enumeran posteriormente.

10 Las células, población celular, células de ensayo, o población de ensayo descritos en la presente memoria pueden incubarse con los SEF a aproximadamente la temperatura ambiente, a aproximadamente temperatura fisiológica, o a aproximadamente 37 °C, a una temperatura entre la ambiente y aproximadamente 40 °C, o a una temperatura entre aproximadamente la ambiente y aproximadamente 37 °C, o a aproximadamente 15 °C a 40 °C. De acuerdo con las reivindicaciones, las células, la población celular, las células de ensayo, o la población celular de ensayo, se incuban con SEF marcados con rojo pHrodo® y/o con fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo®, a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 ° y 40 °C, o a una temperatura de 37 °C.

15 Según las reivindicaciones, las células de control, la población celular de control, las células de ensayo de control, o la población celular de ensayo de control se incuban con los SEF a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, o entre 12 °C y 15 °C.

20 En algunas realizaciones, las células, población celular, células de ensayo o población celular de ensayo comprenden células de epitelio pigmentario retiniano (EPR) humanas. En algunas realizaciones, las células, población celular, células de ensayo o población celular de ensayo comprenden células progenitoras de fotorreceptor humanas. Según las reivindicaciones, las células, población celular, células de ensayo o población celular de ensayo son células de EPR humanas o células progenitoras de fotorreceptor humanas.

25 En algunas realizaciones, las células, población celular, células de ensayo o población celular de ensayo se producen mediante diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes.

30 En algunas realizaciones, las células, población celular, células de ensayo o población celular de ensayo se crioconservan y descongelan antes del uso.

En algunas realizaciones, las células, población celular, células de ensayo o población celular de ensayo se proporcionan en forma de una monocapa confluyente.

35 En algunas realizaciones, las células, población celular, células de ensayo o población celular de ensayo se digieren enzimáticamente antes del uso.

En algunas realizaciones, las células, población celular, células de ensayo o población celular de ensayo se proporcionan en forma de una población de células adherentes.

40 En algunas realizaciones, los SEF son SEF fragmentados. En algunas realizaciones, los SEF son SEF sonificados.

45 Según las reivindicaciones, el marcaje fluorescente es rojo pHrodo®. De esta manera, en algunas realizaciones, los SEF se marcan con tinte rojo pHrodo®. En algunas realizaciones, las células se incubaron con SEF marcados con rojo pHrodo® y con biopartículas de *E. coli* con rojo pHrodo®.

En algunas realizaciones, la fluorescencia se detecta mediante citometría de flujo. En algunas realizaciones, la fluorescencia se detecta utilizando un lector de placas.

50 En algunas realizaciones, las células se incuban con los SEF durante aproximadamente 15 a 30 horas, o durante 16 a 20 horas, o durante 20 a 28 horas.

En algunas realizaciones, las células se proporcionan en forma de un cultivo celular. En algunas realizaciones, las células son un cultivo celular confluyente.

55 Debe entenderse que las células de ensayo y de control pueden ser alícuotas diferentes de la misma población celular.

Aunque no forma parte de la invención, la presente exposición describe una población celular aislada que se caracteriza por presentar una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que es por lo menos 60 50 % superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de células primarias. La población celular puede ser una población celular de EPR. La población celular puede ser una población celular de EPR obtenida mediante diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes y las células primarias son células de EPR procedentes de ojos adultos aislados. La población celular puede ser de progenitores de fotorreceptores.

65 Estos aspectos y otros diversos aspectos y realizaciones se describen en mayor detalle en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

Figs. 1A-C. Análisis de FACS de la fagocitosis por EPR. (A) SEF marcados con FITC. (B) SEF marcados con pHrodo®. Se muestran gráficos del control en el que no se añadieron SEF; el control en el que se habían añadido SEF y las células se habían incubado a 4 °C, y del ensayo en el que se habían añadido SEF y las células se habían incubado a 37 °C. (C) Biopartículas (fragmentos bacterianos) marcadas con pHrodo®. Se muestran gráficos para el control, en el que no se habían añadido partículas; el control al que se habían añadido partículas y en el que se habían incubado las células a 4 °C, y el ensayo en el que se habían añadido partículas y las células se habían incubado a 37 °C. Debe entenderse que SEF y SEB (segmentos externos de bastones) se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria para referirse a segmentos externos de bastones fotorreceptores.

Figs. 2A-B. Dependencia del pH de la fluorescencia de FITC (A) y SEB marcados con pHrodo® (B). Se representa gráficamente la fluorescencia a pH neutro y a un pH ácido.

Figs. 3A-F. Análisis de FACS de la fagocitosis de SEB marcados fluorescentemente por células ARPE19 en monocapa. Se observó una respuesta no dependiente de la dosis de fagocitosis al incubarse diferentes concentraciones de SEB marcados fluorescentemente, con ARPE-19 durante 24 horas en una monocapa celular. (A) ARPE-19 incubadas con 6×10^6 SEB marcados con rojo pHrodo® a 37 °C. (B) ARPE-19 incubadas con 3×10^6 SEB marcados con rojo pHrodo® a 37 °C. (C) ARPE-19 incubadas con $1,5 \times 10^6$ SEB marcados con rojo pHrodo® a 37 °C. (D) ARPE-19 incubadas con 6×10^6 SEB marcados con rojo pHrodo® a 15 °C. (E) ARPE-19 incubadas con 3×10^6 SEB marcados con rojo pHrodo® a 15 °C. (F) ARPE-19 incubadas con $1,5 \times 10^6$ SEB marcados con rojo pHrodo® a 15 °C. En cada uno, se muestran gráficos para las células incubadas sin SEF y para células incubadas con SEF.

Figs. 4A-F. Análisis de FACS de la fagocitosis de SEB marcados fluorescentemente por células de EPR derivadas de CMEh. No se observó una respuesta no dependiente de la dosis de fagocitosis al incubarse diferentes concentraciones de SEB marcados fluorescentemente, incubadas con RPE durante 24 horas a 37 °C en una monocapa celular. La sonicación con pulsos de los SEB marcados fluorescentemente durante la reconstitución incrementó la fagocitosis en aproximadamente 10 %. (A) Células de EPR incubadas con $3,75 \times 10^6$ SEB marcados con rojo pHrodo® reconstituidos sin sonicación. (B) Células de EPR incubadas con 5×10^6 SEB marcados con rojo pHrodo® reconstituidos sin sonicación. (C) Células de EPR incubadas con $7,5 \times 10^6$ SEB marcados con rojo pHrodo® reconstituidos sin sonicación. (D) Células de EPR incubadas con 10×10^6 SEB marcados con rojo pHrodo® reconstituidos sin sonicación. (E) Células de EPR incubadas con 10×10^6 SEB marcados con rojo pHrodo® reconstituidos con sonicación. (F) Células de EPR incubadas con $13,5 \times 10^6$ SEB marcados con rojo pHrodo® reconstituidos con sonicación.

Descripción detallada

La fagocitosis (ensayo de potencia) puede evaluarse mediante análisis cuantitativo de separación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) de cultivos de EPR expuestos a segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con tinte rojo pHrodo® (Life Technologies, Molecular Probes).

La fagocitosis puede evaluarse mediante un ensayo basado en FACS utilizando SEF marcados con tinte rojo pHrodo® (Life Technologies, Molecular Probes). El tinte y los SEF marcados de esta manera emiten fluorescencia al ser internalizados en el medio de pH reducido de los fagosomas intracelulares. Los SEF pueden marcarse tal como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, los cultivos de células de EPR son confluentes. A modo de ejemplo, las EPR confluentes pueden cultivarse en placas multipocillo y pueden incubarse con SEF marcados con tinte rojo pHrodo® en la presencia de medio independiente de CO₂ (Invitrogen). La incubación puede realizarse durante cualquier tiempo suficiente para que las células de EPR fagociten los SEF. A modo de ejemplo, la incubación puede realizarse durante 16 a 20 horas. El ensayo se realiza a una temperatura suficiente para que las células de EPR fagociten los SEF. En algunas realizaciones, el ensayo se produce a 37 °C. En algunas realizaciones, el ensayo se produce a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C. En algunas realizaciones, las placas de control (o de control negativo) se incuban a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, o entre 12 °C y 15 °C. Las células pueden examinarse bajo el microscopio, medirse la fluorescencia utilizando lectores de placa y/o las células pueden recolectarse después de la digestión enzimática (p. ej., la digestión con tripsina) y analizarse mediante citometría de flujo.

Un ensayo de ejemplo, no limitativo, es el siguiente:

El EPR preparado a partir de células madre pluripotentes (tales como, aunque sin limitación, células madre embrionarias (ME) y células madre pluripotentes inducidas (MPI)) tal como se ha descrito anteriormente se somete a ensayo para su capacidad de fagocitar. El EPR criopreservado puede haberse congelado previamente y descongelarse antes del uso. Las células de EPR se siembran en un cultivo en un medio adecuado y se cultivan hasta la confluencia y se mantienen en cultivo antes de los ensayos para su capacidad de fagocitar los SEF marcados con tinte rojo pHrodo®, que emite fluorescencia al ser internalizado al medio ácido de los fagosomas de las células de EPR. Las células de EPR se incuban con los SEF marcados, a 37 °C para permitir la fagocitosis, o a 4 °C a modo de un control negativo. Los cambios en la intensidad de la fluorescencia pueden detectarse mediante citometría de flujo de las células incubadas a 37 °C, indicando fagocitosis de los SEF marcados. La integración estadística de los picos

rinde los porcentajes de células positivas para fagocitosis para cada lote de células de EPR y temperatura de incubación.

Tal como se entenderá en la presente descripción, se detecta fagocitosis mediante incubación de las células de EPR con SEF marcadas que emiten fluorescencia en el espectro rojo en el medio ácido del fagosoma. Pueden mostrarse los porcentajes de células positivas para fagocitosis para las células incubadas a 37 °C o a 4 °C (control negativo), según la detección mediante citometría de flujo.

La población de células de EPR resultante puede caracterizarse basándose en su actividad fagocítica según los métodos proporcionados en la presente memoria. Pueden determinarse las tasas de fagocitosis y caracterizarse de esta manera las células de EPR. Por ejemplo, las células de EPR pueden caracterizarse como presentando una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que es por lo menos 50 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de células de EPR aisladas de ojos adultos, o que es por lo menos 75, 100, 150 o 200 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de células de EPR aisladas de ojos adultos. Alternativa o adicionalmente, las células de EPR pueden caracterizarse por una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que es por lo menos 20 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas, o que es por lo menos 25, 30, 25, 40 o 50 por ciento de la concentración total de EPR tras 24 horas.

De esta manera, utilizando los métodos descritos en la presente memoria, se han conseguido poblaciones de células de EPR que presentan una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que es por lo menos 50 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de células de EPR aisladas de ojos adultos (es decir, pacientes adultos humanos de edades comprendidas entre 25 y 80, más preferentemente adultos de entre 50 y 80 años de edad), y más preferentemente que es por lo menos 75, 100, 150 o incluso 200 por ciento superior.

Utilizando los métodos descritos en la presente memoria, se han conseguido poblaciones celulares de EPR que presentan una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que es por lo menos 20 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas, y más preferentemente que es por lo menos 25, 30, 25, 40 o incluso 50 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas.

De esta manera, aunque no forma parte de la invención, la presente exposición describe un método que comprende detectar o medir la fluorescencia en una célula de EPR (o una población celular de EPR) puesta en contacto con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados fluorescentemente que están marcados fluorescentemente no con FITC (considerada la fluorescencia de ensayo o, generalmente, «el ensayo») y comparar la fluorescencia detectada o medida con un control (considerada la fluorescencia de control o, generalmente, «el control»). El ensayo puede llevarse a cabo a una temperatura que es aproximadamente la temperatura ambiente, o una temperatura de entre aproximadamente 15 °C y 40 °C, o a aproximadamente la temperatura fisiológica (p. ej., a aproximadamente 37 °C). El control puede llevarse a cabo a aproximadamente 4 °C. De esta manera, la fluorescencia de control puede ser la fluorescencia que se detecta o se mide después de la incubación de las células de EPR con SEF marcados no con FITC a 4 °C. Los SEF marcados fluorescentemente no con FITC son SEF que han sido marcados con un fluoróforo que no es FITC. El marcaje fluorescente no FITC es un marcaje que emite fluorescencia a un pH ácido, tal como el pH de los fagosomas, y particularmente los fagosomas de las células del EPR, pero que no emite fluorescencia, o que emite niveles mínimos de fluorescencia, a pH más altos, tales como pH neutro (o un pH del medio extracelular). El marcaje fluorescente no FITC resulta útil para discriminar entre el marcaje de la superficie y los marcajes internalizados. Un ejemplo de dicho fluoróforo es el tinte rojo pHrodo® (Life Technologies, Molecular Probes). Una fluorescencia más alta que la del control indica un grado más alto de fagocitosis en el ensayo.

De esta manera, también se describe un método que comprende:

- (1) detectar o medir la fluorescencia en una primera alícuota de una célula del EPR (o una población celular de EPR) puesta en contacto con (e incubada con) segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados fluorescentemente que están marcados con tinte rojo pHrodo® a 37 °C (considerada la fluorescencia de ensayo o, generalmente, «el ensayo») y
- (2) detectar o medir la fluorescencia en una segunda alícuota de una célula del EPR (o una población celular de EPR) puesta en contacto con (e incubada con) segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados fluorescentemente que están marcados con tinte rojo pHrodo® a 4 °C (considerada la fluorescencia de ensayo o, generalmente, «el control») y
- (3) opcionalmente comparar, determinar y/o cuantificar las fluorescencias de ensayo y de control en las que una fluorescencia de ensayo que es superior a una fluorescencia de control es una indicación de actividad de fagocitosis de la célula (o población celular) de EPR.

Debe entenderse que los métodos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para someter a ensayo la actividad de fagocitosis en células progenitoras (o precursoras) de fotorreceptor.

En determinadas realizaciones, las células de EPR y progenitoras de fotorreceptor presentan actividad fagocítica, tal

como la capacidad de fagocitar segmentos externos de fotorreceptor con rojo pHrodo® aislados, biopartículas de *E. coli* con rojo pHrodo®, o ambos, y los métodos proporcionados en la presente memoria someten a ensayo una o más de dichas funciones.

Aunque no forma parte de la invención, la presente exposición describe un ensayo para determinar la potencia de una composición farmacéutica, que comprende: una pluralidad de células epiteliales de pigmento retiniano (EPR) o células progenitoras de fotorreceptor, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, el contenido medio de melanina de dicha pluralidad de células de EPR es inferior a 8 pg/célula. Dichas células de EPR o células progenitoras de fotorreceptor pueden estar contenidas en una suspensión, gel, coloide, matriz, sustrato, andamiaje o injerto.

Dicho portador farmacéuticamente aceptable puede comprender una solución estéril que presenta una osmolalidad de entre aproximadamente 290 mOsm/kg y aproximadamente 320 mOsm/kg, o de entre aproximadamente 300 mOsm/kg y 310 mOsm/kg o de aproximadamente 305 mOsm/kg. Dicho portador farmacéuticamente aceptable puede comprender una solución salina equilibrada. Dicha solución salina equilibrada puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, en cada ml, 7,14 mg de cloruro sódico, 0,38 mg de cloruro potásico, 0,154 mg de dihidrato de cloro, 0,2 mg de hexahidrato de cloruro de magnesio, 0,42 mg de fosfato sódico dibásico, 2,1 mg de bicarbonato sódico, 0,92 mg de dextrosa, 0,184 mg de disulfuro de glutatión (glutatión oxidado) y ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico (para ajustar el pH a aproximadamente 7,4) en agua.

El volumen de dicha composición farmacéutica puede ser de entre aproximadamente 100 µl y 1000 µl, o puede ser de por lo menos aproximadamente 150 µl. Dicha composición farmacéutica puede comprender entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 1×10^9 células de EPR viables. Dicha composición farmacéutica puede comprender entre aproximadamente 333 células de EPR viables/µl y aproximadamente 2.000 células de EPR viables/µl, entre aproximadamente 444 células de EPR viables/µl y aproximadamente 1766 células de EPR viables/µl, aproximadamente 333 células de EPR viables/µl, aproximadamente 444 células de EPR viables/µl, aproximadamente 666 células de EPR viables/µl, aproximadamente 888 células de EPR viables/µl, aproximadamente 999 células de EPR viables/µl, o aproximadamente 1.333 células de EPR viables/µl.

La concentración de células de EPR en dicha composición farmacéutica puede ser suficientemente alta para que no más de aproximadamente 30 % de dichas células de EPR pierdan la viabilidad en 60 minutos, y opcionalmente no más de aproximadamente 10 % de dichas células de EPR pierdan viabilidad en 4 horas. Dicha concentración de células de EPR puede ser de por lo menos aproximadamente 1.000 células/µl, por lo menos aproximadamente 2.000 células/µl, entre aproximadamente 1.000 y 10.000 células/µl, o entre aproximadamente 2.000 y 5.000 células/µl.

La preparación farmacéutica puede comprender menos de aproximadamente 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, o 0,0001 % células que pueden no ser células de EPR.

El contenido medio de melanina de dichas células de EPR puede ser inferior a 8 pg/célula, inferior a 7 pg/célula, inferior a 6 pg/célula, inferior a 5 pg/célula, inferior a 4 pg/célula, inferior a 3 pg/célula, inferior a 2 pg/célula y de por lo menos 0,1 pg/célula y opcionalmente de por lo menos 0,5 pg/célula o 1 pg/célula; de entre 0,1 y 8 pg/célula, de entre 0,1 y 7 pg/célula, de entre 0,1 y 6 pg/célula, de entre 0,1 y 5 pg/célula, de entre 0,1 y 4 pg/célula, de entre 0,1 y 3 pg/célula, de entre 0,1 y 2 pg/célula, de entre 0,1 y 1 pg/célula, de entre 1 y 7 pg/célula, de entre 0,5 y 6 pg/célula, o de entre 1 y 5 pg/célula.

Por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, por lo menos 70 % o por lo menos 80 % de las células en dicha composición farmacéutica pueden ser positivas para bestrofina. Por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 99 % de las células en dicha composición farmacéutica pueden ser positivas para PAX6 y/o MITF. Por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 99 % de las células en dicha composición farmacéutica pueden ser positivas para PAX6 y/o bestrofina. Por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 99 % de las células en dicha composición farmacéutica pueden ser positivas para ZO-1. Por lo menos 50 %, por lo menos 60 % o por lo menos 70 % de las células en la composición farmacéutica pueden ser positivas para PAX6 y bestrofina. Por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 99 % de las células en la composición farmacéutica pueden ser positivas para PAX6.

No más de aproximadamente una célula por millón de células y opcionalmente no más de dos células por nueve millones de células en dicha composición farmacéutica puede ser positiva para la expresión de tanto OCT-4 como la fosfatasa alcalina (FA).

Una aguja o una cánula de inyección puede contener por lo menos una parte de dichas células de EPR. La concentración de dichas células de EPR en el momento de la carga en dicha aguja o cánula de inyección puede ser de entre aproximadamente 444 células viables/µl y aproximadamente 1.766 células viables/µl. La concentración de dichas células de EPR viables que va a administrarse con dicha aguja o cánula de inyección puede ser de entre aproximadamente 333 células viables/µl y aproximadamente 1.333 células viables/µl. El diámetro de dicha aguja o cánula de inyección puede ser de entre aproximadamente 0,3 mm y aproximadamente 0,9 mm. El diámetro de dicha aguja o cánula de inyección puede ser de entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 0,6 mm. Dicha aguja o cánula de inyección puede comprender una punta con un diámetro de entre aproximadamente 0,09 mm y

aproximadamente 0,15 mm. Dicha cánula puede ser una cánula 25/38g MEDONE POLYTIP® (una cánula de 0,50 mm (25g) x 28 mm con punta de 0,12 mm (38g) x 5 mm) o una cánula de inyección 39 g angulada de Synergetics.

Dichas células de EPR pueden comprender células de EPR que han sido crioconservadas y descongeladas.

Dichas células de EPR pueden ser humanas.

Dichas células de EPR, tales como las células de EPR humanas, pueden producirse a partir de cualquier fuente, incluyendo células pluripotentes, tales como células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas, así como tejido donante adulto o fetal. Dichas células madre pluripotentes pueden ser positivas para la expresión de uno o más marcadores y pueden comprender OCT-4, fosfatasa alcalina, Sox2, TDGF-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y/o TRA-1-81. Dichas células pluripotentes pueden ser células pluripotentes humanas que pueden cultivarse en una población multicapa o en cuerpos embrioides durante un tiempo suficiente para que aparezcan células epiteliales pigmentadas en dicho cultivo. Dicho tiempo suficiente para que aparezcan células epiteliales pigmentadas en dicho cultivo puede comprender por lo menos aproximadamente 1 semana, por lo menos 2 semanas, por lo menos aproximadamente 3 semanas, por lo menos aproximadamente 4 semanas, por lo menos aproximadamente 5 semanas, por lo menos aproximadamente 6 semanas, por lo menos aproximadamente 7 semanas, o por lo menos aproximadamente 8 semanas. Dicha población multicapa o cuerpo embrioide puede cultivarse en un medio que puede comprender DMEM. Dicho medio puede comprender, consistir esencialmente o consistir en EB-DM. Dichas células epiteliales pigmentarias pueden aislarse o cultivarse, produciendo de esta manera una población de células de EPR. Dicho aislamiento puede comprender la disociación de las células o agregados de células a partir del cultivo enzimática, química o físicamente, y la selección de las células epiteliales pigmentarias o agregados de células que pueden comprender células epiteliales pigmentarias. Dicho cuerpo embrioide puede cultivarse en suspensión y/o en forma de un cultivo adherente (p. ej., en suspensión, seguido del cultivo adherente). Dicho cuerpo embrioide cultivo como un cultivo adherente puede producir uno o más crecimientos que comprenden células epiteliales pigmentarias. Dichas células madre pluripotentes pueden presentar una complejidad reducida de antígenos HLA. Antes de la formación de EPR, dichas células pluripotentes pueden cultivarse sobre una matriz que puede seleccionarse del grupo que consiste en laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, heparán sulfato, Matrigel(TM) (una preparación soluble de células de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón), CellStart, un extracto de membrana basal humana, y cualquier combinación de los mismos. Dicha matriz puede comprender Matrigel(TM) (una preparación soluble de células de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón).

La composición farmacéutica puede comprender células que carecen de expresión sustancial de uno o más marcadores de célula madre embrionaria. Dicho marcador o marcadores de célula madre embrionaria puede comprender OCT-4, NANOG, Rex-1, fosfatasa alcalina, Sox2, TDGF-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y/o TRA-1-81.

Dichas células de EPR pueden ser positivas para la expresión de uno o más marcadores celulares de EPR. Dicho marcador o marcadores celulares de EPR puede comprender RPE65, CRALBP, PEDF, bestrofina, MITF, Otx2, PAX2, PAX6, ZO-1 y/o tirosinasa.

Dichas células de EPR pueden producirse mediante un método que comprende mantener las células de EPR como células quiescentes durante un tiempo suficiente para conseguir dicho contenido medio de melanina. Dichas células de EPR pueden producirse mediante un método que comprende mantener las células de EPR como células quiescentes durante un tiempo suficiente para establecer la expresión de bestrofina en por lo menos 50 % de dichas células de EPR.

Dicha composición farmacéutica puede encontrarse sustancialmente libre de células nodriza embrionarias de ratón (CNE) y células madre embrionarias humanas (MEh).

Las células de EPR pueden cumplir por lo menos uno de los criterios indicados en la Tabla 1 y/o fabricarse de acuerdo con buenas prácticas de fabricación (BPF).

Dichas células epiteliales pigmentarias retinianas (EPR) o progenitores de fotorreceptores crioconservados pueden proporcionarse en forma de una composición crioconservada.

Dichas células de EPR pueden mostrar una tasa de fagocitosis en segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que puede ser por lo menos 50 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de los SEF para un número equivalente de células de EPR de ojos adultos aislados, o por lo menos 75, 100, 150 o 200 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de células de EPR de ojos adultos aislados, o una tasa de fagocitos de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que puede ser por lo menos 20 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas, o por lo menos 25, 30, 25, 40 o 50 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas. Dichos progenitores de fotorreceptor pueden mostrar una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que puede ser por lo menos 50 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de progenitores de fotorreceptor de ojos adultos aislados, o por lo menos 75, 100, 150 o 200 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de progenitores de fotorreceptor de ojos adultos aislados, o una tasa de fagocitosis

de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que puede ser por lo menos 20 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas, o por lo menos 25, 30, 25, 40 o 50 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas. La tasa y grado de fagocitosis puede depender del tiempo de incubación y de la madurez de las células. Las tasas de unión e internalización de los SEF pueden ser diferentes según la madurez y pigmentación de las células. El porcentaje de células capaces de fagocitosis puede ser diferente dependiendo de la madurez de los cultivos celulares.

Mediante el marcaje de los segmentos externos de fotorreceptor con un tinte que no es fluorescente o es débilmente fluorescente a pH neutro pero que se vuelve más fluorescente con la acidificación, es posible una medición más sensible de los SEF internalizados en células de EPR o progenitores de fotorreceptor en un ensayo de fagocitosis. La mayoría de los métodos cuantitativos utilizados para la evaluación de la fagocitosis (lector de placas de fluorescencia de FACS) no discriminan entre las partículas fluorescentes internalizadas y unidas en superficie. Además, la fluorescencia de FITC es sensible al pH y se reduce significativamente a un pH inferior a 6, mientras que el pH de los lisosomas y fagosomas fusionados con lisosomas es inferior a 5. De esta manera, la fluorescencia de los SE marcados con FITC en algunos casos no es representativa de la cantidad real de SE internalizados. Según su fabricante (Life Technologies, Molecular Probes), el tinte rojo pHrodo® basado en rodamina sensible al pH es no fluorescente a pH neutro y con la acidificación se torna de color rojo brillante. El tinte es tanto fluorogénico como sensible al pH y, por lo tanto, puede utilizarse como un sensor específico de sucesos fagocíticos, en donde la acidificación del fagosoma tras la fagocitosis es indicada por la fluorescencia roja.

La utilización de un pigmento que es no fluorescente o débilmente fluorescente a pH neutro pero que se vuelve más fluorescente con la acidificación, tal como rojo pHrodo® y CypHer5E, que también es máximamente fluorescente en un medio ácido, el tinte LysoSensor de Life Technologies, para marcar segmentos externos de fotorreceptor es una mejora significativa respecto a los métodos y reactivos de la técnica anterior. Los presentes inventores utilizaron dicho tinte rojo pHrodo® basado en rodamina sensible al pH para marcar SE bovinos a fin de medir específicamente las partículas internalizadas.

En comparación con los segmentos externos de fotorreceptor marcados con FITC, las biopartículas pHrodo® y los segmentos externos de fotorreceptor marcados con pHrodo® mostraron todos un incremento significativo de la fluorescencia (FIG. 1A-C) en el ensayo de fagocitosis a 37 °C en comparación con a 4 °C. Sin embargo, el análisis cuantitativo mostró que solo aproximadamente la mitad de la población celular de EPR a 37 °C en el ensayo de fagocitosis mostraba un incremento de la fluorescencia respecto al control a 4 °C al incubarla con partículas marcadas con FITC (FIG. 1A), y en el control a 4 °C, aproximadamente la mitad de la población celular de EPR también mostró un incremento significativo de la fluorescencia, posiblemente indicando la presencia de partículas unidas pero no internalizadas, sobre la superficie celular. Dichas partículas sobre la superficie celular podrían representar la unión tanto específica como no específica. Además, la interpretación de los datos de FACS de segmentos externos de fotorreceptor marcados con FITC no es muy exacta debido a que parte de la fluorescencia de FITC podría perderse a pH bajo (FIG. 2), ya que una vez se han internalizado las partículas y los fagosomas se han fusionado con lisosomas, al pH final bajo (4,5 a 5,5), se pierde parte de la fluorescencia del FITC. De esta manera, la fluorescencia tal como se mide incluye la pérdida de parte de la señal de las partículas internalizadas y señal adicional de partículas unidas no específicamente en la superficie. Tanto las biopartículas marcadas con pHrodo® como los segmentos externos de fotorreceptor marcados con pHrodo® no mostraron ningún incremento de fluorescencia a 4 °C (FIGS. 1B y 1C), pero mostraron un incremento a 37 °C; de esta manera, permiten la medición específica de solo las partículas internalizadas fusionadas con lisosomas.

Tal como se describe en la presente memoria, los SEB marcados con pHrodo® se vuelven fluorescentes a pH bajo, por lo que un cambio observado en la fluorescencia indica que partículas que han sido internalizadas. La utilización de FITC u otros SEB marcados con tinte no sensible al pH tiende a mostrar partículas unidas no específicamente sobre la superficie celular, SEF unidos específicamente pero no internalizados, y/o SEF que han sido internalizados pero no se han fusionado con lisosomas. El marcaje de segmentos externos de fotorreceptor con pHrodo® u otro tinte sensible al pH, en lugar del utilizado convencionalmente FITC, que emite fluorescencia, presenta una correlación inversa con la acidez, o la utilización de SEF marcados con pHrodo® en combinación con otro tinte sensible al pH y/o no sensible es una mejora en cuanto a la exactitud del ensayo de fagocitosis, ya que permite la medición de la fagocitosis de la diana fisiológicamente relevante y permite la disección de los mecanismos de la fagocitosis.

En algunas realizaciones, los SEF se fragmentan antes del uso con las células de interés. Los SEF pueden fragmentarse utilizando, por ejemplo, la sonicación, o cizalla, u otros métodos de la técnica. Se ha encontrado, en algunos casos, que los SEF fragmentados resultan en lecturas de fagocitosis más altas de las células. Lo anterior podría resultar útil para distinguir la actividad positiva de la actividad de control.

Los ensayos de fagocitosis pueden llevarse a cabo utilizando una suspensión de células individuales o pueden llevarse a cabo utilizando una monocapa de células. De esta manera, las células pueden proporcionarse en forma de suspensiones celulares o pueden proporcionarse en forma de una monocapa, incluyendo una monocapa en cultivo. Esta última realización resulta útil, particularmente si las células crecen normalmente en forma de una monocapa, ya que permite determinar la actividad de fagocitosis de las células en la forma en que existirían normalmente tales células. Las células pueden incubarse con los SEF marcados en forma de una capa adherente, tal como una

monocapa, y después pueden digerirse con enzima (p. ej., digerirse con tripsina) con el fin de convertirlas en una población de células individuales que seguidamente puede analizarse utilizando, por ejemplo, la citometría de flujo.

En algunas realizaciones, las células se incuban con los SEF a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C, o a 37 °C. La actividad de fagocitosis de ensayo puede medirse a estas temperaturas. Las células pueden proporcionarse en forma de una monocapa, incluyendo una monocapa en cultivo.

El control negativo puede corresponder a células incubadas con SEF a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, entre 11 °C y 16 °C o entre 12 °C y 16 °C. El control negativo puede corresponder a células incubadas con SEF a una temperatura comprendida entre 10 °C y 15 °C, entre 11 °C y 15 °C o entre 12 °C y 15 °C. Las células pueden proporcionarse en forma de una monocapa, incluyendo una monocapa en cultivo.

En algunos casos, las células han sido previamente crioconservadas y se descongelan y cultivan brevemente con el fin de establecer una monocapa. Una vez en la monocapa, la actividad de fagocitosis de las células puede someterse a ensayo tal como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, las células pueden exponerse a SEF no marcados, durante un periodo de tiempo, y después exponerse a SEF marcados fluorescentemente para medir la fagocitosis para estos últimos SEF. De esta manera, las células pueden prepararse previamente a la introducción de los SEF marcados.

Definiciones

Con el fin de que la invención descrita en la presente memoria se entienda completamente, se proporciona la descripción detallada siguiente. Se describen en detalle diversas realizaciones de la invención y pueden ilustrarse adicionalmente mediante los ejemplos proporcionados.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto habitual en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen posteriormente los métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Se proporcionan en la presente memoria los términos y definiciones siguientes.

Tal como se utiliza en la descripción en la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones siguientes, el significado de «un» o «una» y «el» o «la» incluye los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se utiliza en la descripción en la presente memoria, el significado de «en» incluye «dentro de» y «sobre», a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

A lo largo de la presente especificación, el término "comprende" o variaciones tales como "comprendiendo" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un entero o grupos de enteros establecidos, aunque sin excluir ningún otro entero o grupo de enteros.

La expresión «células madre embrionarias» (células ME), tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere en términos generales a células derivadas de la masa celular interna de blastocitos no humanos o mórula no humana que se han subcultivado en serie como líneas celulares.

Las células ME pueden derivarse de la fertilización de un óvulo no humano con espermatozoides no humanos o mediante transferencia nuclear no humana, partenogénesis o medios para generar células ME con homocigosidad en la región HLA. Las células ME también pueden referirse a células derivadas de un cigoto no humano, blastómeros o un embrión de mamífero en estadio de blastocito no humano, producido mediante la fusión de un espermatozoides no humano y un óvulo no humano, transferencia nuclear no humana, partenogénesis o la reprogramación de la cromatina y posterior incorporación de la cromatina reprogramada en una membrana plasmática para producir una célula. Las células madre embrionarias, con independencia de su origen o el método particular utilizado para producirlas, pueden identificarse basándose en: (i) la capacidad de diferenciarse en células de la totalidad de las tres capas germinales, (ii) la expresión de por lo menos Oct-4 y fosfatasa alcalina, y (iii) la capacidad de producir teratomas al trasplantarlas en animales inmunocomprometidos. El término incluye, además, células aisladas a partir de uno o más blastómeros de un embrión, sin destruir el resto del embrión (ver, p. ej., Chung et al., Cell Stem Cell. 7 de febrero de 2008;2(2):113-7)

El término incluye, además, las células producidas por transferencia nuclear de células somáticas no humanas, incluso en el caso de que se utilicen células no embrionarias en el procedimiento. Las células ME pueden derivarse de la fertilización de un óvulo no humano con espermatozoides no humanos o ADN no humano o mediante transferencia nuclear no humana, partenogénesis o medios para generar células ME con homocigosidad en la región HLA. Las células ME también son células derivadas de un cigoto no humano o de un embrión de mamífero en estadio de blastocito no humano, producido mediante la fusión de un espermatozoides no humano y un óvulo no humano, transferencia nuclear no humana, partenogénesis o la reprogramación de la cromatina y posterior incorporación de la cromatina reprogramada en una membrana plasmática para producir una célula. Entre las células madre embrionarias humanas de la presente exposición,

mencionadas en la presente memoria únicamente a título de referencia, se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las células madre embrionarias MA01, MA09, ACT-4, No. 3, H1, H7, H9, H14 y ACT30. En determinadas realizaciones, las células ME humanas utilizadas para producir células de EPR se derivan y mantienen de acuerdo con estándares de BPF.

La expresión «degeneración macular», tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere en términos generales a enfermedades caracterizadas por una pérdida progresiva de la visión central asociada a anomalías de la membrana de Bruch, la retina neural y el epitelio pigmentario retiniano. Entre las enfermedades de degeneración macular se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, degeneración macular asociada a la edad, distrofia macular de Carolina del Norte, distrofia del fondo ocular de Sorsby, enfermedad de Stargardt, distrofia de patrón, enfermedad de Best, *malattia leventinese*, coroiditis en panal de abeja de Dooyne, drusas dominantes y drusas radiales

La expresión «célula madre pluripotente», tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere en términos generales a una célula capaz de proliferación prolongada o virtualmente indefinida *in vitro*, conservando simultáneamente su estado no diferenciado, mostrando un cariotipo estable (preferentemente normal) y que posee la capacidad de diferenciarse en la totalidad de las tres capas germinales (es decir, ectodermo, mesodermo y endodermo) bajo las condiciones apropiadas.

Las expresiones «células de EPR», «célula de EPR no diferenciada», «célula de EPR derivada de ME» tal como se utiliza en la presente memoria pueden utilizarse intercambiablemente para referirse en términos generales a una célula de EPR diferenciada a partir de una célula madre pluripotente, p. ej., utilizando métodos descritos en la presente memoria. Las expresiones se utilizan genéricamente para referirse a células de EPR diferenciadas, con independencia del nivel de madurez de las células, y de esta manera pueden comprender células de EPR de diversos niveles de madurez. Las células de EPR pueden reconocerse visualmente por su morfología de adoquín y la aparición inicial de pigmento. Las células de EPR también pueden identificarse molecularmente basándose en la ausencia sustancial de marcadores de célula madre embrionaria, tales como Oct-4 y NANOG, así como basándose en la expresión de marcadores de EPR, tales como RPE65, PEDF, CRALBP y bestrofina. Por ejemplo, puede contarse una célula como positiva para un marcador dado en el caso de que se observe el patrón de tinción esperado, p. ej., PAX6 localizado en los núcleos, bestrofina localizada en la membrana plasmática en un patrón poligonal (que muestra la tinción de bestrofina localizada en líneas agudas en la periferia de la célula), tinción de ZO-1 presente en uniones estrechas que definen las células en un patrón poligonal y tinción de MITF detectada confinada al núcleo. A menos que se especifique lo contrario, las células de EPR, tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a células de EPR diferenciadas *in vitro* a partir de células madre pluripotentes.

Las expresiones «célula de EPR madura» y «célula de EPR diferenciada madura», tal como se utilizan en la presente memoria, pueden utilizarse intercambiablemente en toda la memoria para referirse en términos generales a cambios que ocurren después de la diferenciación inicial de las células de EPR. Específicamente, aunque las células de EPR pueden reconocerse, en parte, basándose en la aparición inicial de pigmento, tras la diferenciación pueden reconocerse las células de EPR maduras basándose en una pigmentación potenciada.

El término «pigmentada» tal como se utiliza en la presente memoria se refiere en términos generales a cualquier nivel de pigmentación, por ejemplo la pigmentación que ocurre inicialmente cuando las células de EPR se diferencian a partir de células ME. La pigmentación puede variar con la densidad celular y la madurez de las células de EPR diferenciadas. La pigmentación de una célula de EPR puede ser igual a la de una célula de EPR media después de la diferenciación terminal de la célula de EPR. La pigmentación de una célula de EPR puede ser superior a la de una célula de EPR media después de la diferenciación terminal de la célula de EPR. La pigmentación de una célula de EPR puede ser inferior a la de una célula de EPR media después de la diferenciación terminal.

La expresión «progenitor de fotorreceptor» se refiere a células de la retina neural que pueden diferenciarse a partir de células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas y que expresan el marcador PAX6 mientras que no expresan el marcador CHX10 (es decir, son CHX10(-)). Estas células expresan transitoriamente CHX10 en el estadio de progenitor neural retiniano, pero la expresión de CHX10 está apagada cuando las células se diferencian en el estado de progenitor de fotorreceptor. Entre otros marcadores expresados por los progenitores de fotorreceptor pueden incluirse: Pax6, Nr2e3, Trβ2, Mash1, RORβ y NRL. Además, el término «fotorreceptor» puede referirse a células postmitóticas diferenciadas a partir de células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas y que expresan el marcador celular rodopsina o cualquiera de las tres opsinas de los conos, y opcionalmente expresan la GMPc fosfodiesterasa de bastón o cono. Los fotorreceptores pueden expresar, además, el marcador recoverina, que se encuentra en los fotorreceptores. Los fotorreceptores pueden bastones y/o conos.

Marcadores celulares: Entre los marcadores celulares de ejemplo que pueden evaluarse para la expresión se incluyen los siguientes: PAX6, RX1, SIX3, SIX6, LHX2, TBX3, SOX2, CHX10, nestina, TRβ2, NR2E3, NRL, MASH1, RORβ, recoverina, opsina, rodopsina, GMPc fosfodiesterasa de bastón y cono, los cuales pueden evaluarse al nivel de proteínas y/o de ARNm (ver Fischer AJ, Reh TA, Dev Neurosci. 2001;23(4-5):268-76; Baumer et al., Development. julio de 2003;130(13):2903-15, Swaroop et al., Nat. Rev. Neurosci., agosto de 2010;11(8):563-76, Agathocleous y Harris, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2009. 25:45-69). Dichos identificadores de marcador se utilizan generalmente tal como en la literatura y en la técnica, particularmente en los campos de la técnica relacionados con los contextos en

los que se indican dichos identificadores génicos en la presente memoria, que pueden incluir la literatura relacionada con fotorreceptores, bastones, conos, la diferenciación de los fotorreceptores, los progenitores de fotorreceptores, la diferenciación neural, las células madre neurales, las células madre pluripotentes y otros campos, tal como indica el contexto. Además, los marcadores son generalmente humanos, p. ej., excepto en donde el contexto indica lo contrario.

Los marcadores celulares pueden identificarse utilizando métodos inmunocitoquímicos convencionales o métodos de PCR convencionales, que son técnicas que son bien conocidas por el experto habitual en la materia.

Los «signos» de enfermedad, tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren en términos generales a cualquier anomalía indicativa de enfermedad, que puede identificarse en la exploración del paciente; una indicación objetiva de enfermedad, en contraste con un síntoma, que es una indicación subjetiva de enfermedad.

Los «síntomas» de enfermedad tal como se utilizan en la presente memoria se refieren en términos generales a cualquier fenómeno mórbido o discrepancia respecto de la normalidad en la estructura, función o sensación experimentada por el paciente e indicativa de enfermedad.

Los términos «terapia», «terapéutico», «tratando», «tratar» y «tratamiento», tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren en términos generales a tratar una enfermedad, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos, y/o aliviar la enfermedad, causando la regresión de la misma o sus síntomas clínicos. La terapia comprende la profilaxis, prevención, tratamiento, curación, remedio, reducción, alivio y/o proporcionar alivio de una enfermedad, signos y/o síntomas de una enfermedad. La terapia comprende un alivio de los signos y/o síntomas en pacientes con signos y/o síntomas en curso de la enfermedad (p. ej., ceguera o deterioro retiniano). La terapia también comprende la «profilaxis» y la «prevención». La profilaxis incluye prevenir que ocurra la enfermedad después del tratamiento de una enfermedad en un paciente, o reducir la incidencia o la gravedad de la enfermedad en un paciente. El término «reducido», para los fines de la terapia, se refiere en términos generales a la reducción significativa clínica de los signos y/o síntomas. La terapia incluye tratar las recaídas o signos y/o síntomas recurrentes (p. ej., la degeneración retiniana y la pérdida de visión). La terapia comprende, aunque sin limitación, impedir la aparición de síntomas y/o síntomas en cualquier momento, así como reducir los signos y/o síntomas existentes y eliminar los signos y/o síntomas existentes. La terapia incluye el tratamiento de la enfermedad crónica («el mantenimiento») y la enfermedad aguda. Por ejemplo, el tratamiento incluye tratar o prevenir caídas o la recurrencia de signos y/o síntomas (p. ej., ceguera y degeneración retiniana).

Las células de EPR o progenitoras de fotorreceptores de la preparación pueden presentar una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que es por lo menos 50 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de células de EPR aisladas de ojos adultos (es decir, pacientes adultos humanos de edades comprendidas entre 25 y 80 años, más preferentemente de adultos de entre 50 y 80 años), y más preferentemente que es por lo menos 75, 100, 150 o incluso 200 por ciento superior. Los progenitores de fotorreceptores de la preparación pueden presentar una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que es por lo menos 50 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de SEF para un número equivalente de células de EPR aisladas de ojos adultos (es decir, pacientes adultos humanos de edades comprendidas entre 25 y 80 años, más preferentemente de adultos de entre 50 y 80 años), y más preferentemente que es por lo menos 75, 100, 150 o incluso 200 por ciento superior.

Las células de EPR o progenitoras de fotorreceptores de la preparación pueden presentar una tasa de fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptor (SEF) que es por lo menos 20 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas, y más preferentemente que es por lo menos 25, 30, 35, 40 o incluso 50 por ciento de la concentración total de SEF tras 24 horas. La fagocitosis de SEF puede medirse, como un ejemplo ilustrativo y no limitativo, utilizando los protocolos descritos en Bergmann et al., FASEB Journal, marzo de 2004, vol. 18, páginas 562 a 564, con la variación de los SEF no marcados con FITC descrita en la presente memoria.

Las poblaciones de células de EPR o progenitoras de fotorreceptor pueden incluir células de EPR diferenciadas de niveles variables de madurez, o pueden ser sustancialmente puras con respecto a las células de EPR diferenciadas de un nivel particular de madurez. Las células de EPR pueden ser una preparación sustancialmente purificada que comprende células de EPR de niveles variables de madurez/pigmentación.

Preparaciones criopreservadas de células de EPR.

Las células de EPR o progenitoras de fotorreceptores pueden almacenarse mediante cualquier método apropiado conocido de la técnica (p. ej., congelarse criogénicamente) y pueden congelarse a cualquier temperatura apropiada para el almacenamiento de las células. Antes del uso de estas células, pueden someterse a ensayo en un ensayo de la invención para determinar la actividad de fagocitosis y/o la potencia de las células.

Las células de EPR o las células progenitoras de fotorreceptores que muestren potencia en el ensayo de fagocitosis de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades de degeneración retiniana debido a desprendimiento retiniano, displasia retiniana, estrías angioides, degeneración macular miópica o atrofia retiniana, o asociadas a varias afecciones que alteran la visión que resultan del daño a fotorreceptores y ceguera, tales como

coroideremia, retinopatía diabética, degeneración macular (p. ej., degeneración macular asociada a la edad), retinitis pigmentosa y enfermedad de Stargardt (*fundus flavimaculatus*).

Las células de EPR o las células progenitoras de fotorreceptores descritas en la presente memoria pueden ser células de EPR o células progenitoras de fotorreceptores humanas. Sin embargo, cabe señalar que las células humanas pueden utilizarse en pacientes humanos, así como en modelos animales o en pacientes animales. Por ejemplo, las células humanas pueden someterse a ensayo en modelos de degeneración retiniana de ratón, rata, gato, perro, o de primate no humano. Además, las células humanas pueden utilizarse terapéuticamente para tratar animales que lo necesitan, tales como la medicina veterinaria.

Ensayos de cribado

Aunque no forma parte de la invención, la exposición describe un método para identificar agentes que modulan la actividad fagocítica de las células de EPR o las células progenitoras de fotorreceptores.

Ejemplos

La invención que se describe de manera general a continuación, se entenderá más fácilmente en referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen meramente con fines ilustrativos de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención.

Las células de EPR se obtuvieron a partir de células madre embrionarias humanas (CMEh) tal como se ha descrito con anterioridad (Klimanskaya et al., 2004) y se utilizaron en los pases 2 a 5 después del aislamiento del cultivo de diferenciación de agregados pigmentados. Las células se cultivaron en medio EGM-2 (Lonza) hasta alcanzar la confluencia y en medio de mantenimiento de EPR (Klimanskaya et al., 2004) posteriormente. Las células utilizadas en los experimentos establecieron un fenotipo de EPR diferenciado que se caracterizaba por morfología hexagonal, diversos niveles de pigmento marrón, apariencia celular cuboide, polarización y uniones estrechas. Alternativamente, se utilizaron células en los experimentos antes de madurar por completo, aunque todavía después de llegar a la confluencia.

Los segmentos externos de bastones bovinos (n.º de catálogo 98740) se obtuvieron de: In Vision Bioresources. El isómero I de FITC (n.º de catálogo F1906) se obtuvo de Life Technologies. El kit de marcaje de partículas de fagocitosis de rojo pHrodo® (n.º de catálogo A10026) se obtuvo de Life Technologies.

Marcaje de SEF con FITC (solo referencia).

Se resuspendió 1 vial de 10 mg de isómero I de FITC a 2 mg/ml en tampón de carbonato sódico 0,1 M, pH 9,5. Se peletizó a 3000 g durante 10 minutos para eliminar las partículas no diluidas y solo se utilizó el sobrenadante para el marcaje de los SEF bovinos. Se descongelaron los SEF obtenidos de 25 globos oculares bovinos y se resuspendieron en 5 ml de tampón de lavado (sacarosa al 10 % en tampón de fosfato 20 mM con taurina 5 mM, pH 7,2). Se añadieron 1,5 ml de sobrenadante de FITC 2 mg/ml a los SEF resuspendieron y se dejaron bajo incubación en la oscuridad bajo agitación por balanceo durante 1 h a TA. Tras la incubación, los segmentos SEF-FITC se peletizaron a 3000 g y se resuspendieron en 10 ml de tampón de lavado. Se repitió esta etapa de lavado un total de 2 veces. Tras el lavado, se resuspendieron en 10 ml de sacarosa al 2,5 % en DMEM (Gibco n.º 11960) y se peletizaron nuevamente a 3000g durante 10 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en 10 ml de sacarosa al 2,5 % en DMEM, se contaron las partículas de SEF-FITC utilizando un hemocitómetro, se ajustó la concentración a 1×10^8 partículas/ml en sacarosa al 2,5 % en DMEM y se congelaron las partículas a -80 °C.

Marcaje de SEF con pHrodo®.

Se introdujeron SEF resuspendidos de 25 ojos bovinos en 4,165 ml de tampón de bicarbonato sódico 0,1 M del kit de marcaje de partículas de fagocitosis de rojo pHrodo®. Se dividieron los SEF en alícuotas de 4,750 µl en tubos de microcentrífuga. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 minuto y después se resuspendieron en 750 µl de tampón de bicarbonato sódico 0,1 M nuevamente. El tinte pHrodo® resuspendido a una concentración final de 10 mM en DMSO. El tinte pHrodo® se añadió a los SEF en tampón de bicarbonato sódico hasta una concentración final de 0,5 mM y se incubaron en la oscuridad durante 45 minutos. Tras 45 minutos, se añadieron 500 µl de «componente C» (del kit) y se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante aspirado y resuspendido en 1 ml de metanol al 100 %. Los tubos se sometieron a agitación con vórtex durante 30 segundos y se peletizaron a 10000 rpm durante 1 minuto. Se aspiró el metanol y se resuspendió en 1 ml de «componente C» (tampón de lavado del kit) y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 1 minuto. Se repitió esta etapa de lavado un total de 2 veces. Se resuspendieron todas las partículas en un total de 20 ml de «tampón B» (del kit). Se peletizaron los SEF-pHrodo® a 3000 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron los SEF-pHrodo® en sacarosa al 2,5 %, se ajustó la concentración a 1×10^8 partículas/ml en sacarosa al 2,5 % en DMEM, y se congelaron las partículas a -80 °C.

Las células de EPR se incubaron con biopartículas conjugadas con pHrodo® o con segmentos externos bovinos marcados con FITC o con pHrodo® durante diversos tiempos entre 2 y 24 h a 37 °C. Después, las células se lavaron,

se recolectaron con tripsina/tampón de disociación 1:1, se centrifugaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Como control negativo, se incubaron las células durante el mismo periodo de tiempo a 4 °C.

Además, la interpretación de los datos de SEF-FACS marcados con FITC no es muy exacta debido a que parte de la fluorescencia de FITC podría perderse a pH bajo (FIGS. 2A y B), ya que una vez se han internalizado las partículas y los fagosomas se han fusionado con lisosomas, al pH final bajo (4,5 a 5,5), se pierde parte de la fluorescencia del FITC. De esta manera, la fluorescencia tal como se mide incluye la pérdida de parte de la señal de las partículas internalizadas y señal adicional de partículas unidas no específicamente en la superficie.

pHrodo® es un tinte fluorescente sensible al pH y tanto las biopartículas como los SEF marcados con pHrodo® no mostraron ningún incremento de fluorescencia a 4 °C (FIGS. 1B y 1C), permitiendo de esta manera medir específicamente solo las partículas internalizadas fusionadas con lisosomas.

El marcaje de los SEF con pHrodo® es una mejora de la exactitud del ensayo de fagocitosis y puede utilizarse en lugar de o complementariamente a los SEF marcados con FITC para diseccionar los complejos mecanismos de la fagocitosis.

Marcaje con biopartículas fluorescentes de E. coli con pHrodo®.

Se evaluó la fagocitosis mediante un ensayo basado en FACS utilizando biopartículas fluorescentes de *E. coli* con pHrodo® (Invitrogen), que emiten fluorescencia al ser internalizadas en el medio de pH reducido de los fagosomas intracelulares. Se prepararon biopartículas siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron EPR confluentes con 50 a 200 µl de biopartículas por pocillo de una placa de 4 pocillos en medio independiente de CO₂ (Invitrogen) durante 16 a 20 horas a 37 °C. Se incubaron las placas de control negativo a 4 °C. Se examinaron las células bajo el microscopio, se recolectaron con tripsina y se analizaron mediante recuento con FACS de 10.000 sucesos en un citómetro de flujo C6.

Tabla 1. Caracterización de células de EPR y ensayos de seguridad.

Ensayo	Especificación	Lote de ensayo
Esterilidad	Negativo	Negativo
Mycoplasma	Negativo	Negativo
Densidad celular	1-2 millones de células viables/ml (postdilución)	2x10 ⁶ células viables/ml
Viabilidad celular	Recolección final: >85 %	99 %
	Postcongelación: >70 %	95 %
Morfología	confluentes, epitelio en adoquín, pigmentación intermedia	Pase
Cariotipo	46, XX, normal	46, XX, normal
Perfilado de ADN	Cumple con MCB de CMEh	Cumple
ARNm de EPRh para <i>BEST-1</i> <i>RPE-65</i> <i>PAX6</i> <i>MITF</i>	Regulado positivamente un mínimo de 1 log ₁₀ en comparación con las CMEh	RPE-6 1,32 PAX6 2,80 MITF 2,89 BEST-1 3,81
ARNm de CMEh para: <i>OCT-4</i> <i>NANOG</i> <i>SOX-2</i>	Regulado negativamente en comparación con CMEh (log ₁₀): <i>OCT-4</i> ≤-2,13 <i>NANOG</i> ≤-1,95 <i>SOX-2</i> ≤-0,63	OCT-4 -3,18 NANOG -2,49 SOX-2 -2,07
Madurez por tinción de bestrofina	>70 % de tinción	71 %
Pureza mediante inmunotinción	>95 % de PAX6 y/o MITF	100 %
	>95 % de PAX6 y/o bestrofina	100 %
	>95 % de ZO-1	100 %
marcadores proteicos de CMEh	tinción <2 células con OCT-4 y AP en 9 millones de células examinadas	0
ADN murino residual	Negativo	Negativo
Virus murinos según MAP	Negativo	Negativo
Retrovirus mediante cocultivo con <i>Mus dunni</i>	Negativo	Negativo
Virus murinos ecotrópicos	Negativo	Negativo
Endotoxina	<0,50 UE/ml	0,312 UE/ml
Potencia según fagocitosis	Positivo	Positivo

Fagocitosis de SEF marcadas con rojo pHrodo® por células de EPR.

Se cultivaron células de EPR y ARPE-19 derivadas de CMEh en medio de cultivo de EPR (RPE-GM, por sus siglas en inglés) que consistía en medio de cultivo de células endoteliales (Lonza, n.º de cat. CC-3162, CC-3156).

Para el ensayo de fagocitosis, se sembraron células de EPR en placas de cultivo de 96 pocillos (Becton-Dickinson) a una 5×10^5 células/cm² y se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C con 5 % de CO₂. Para unas lecturas de ensayo óptimas, las células de EPR se cultivaron durante 3 a 5 días en RPE-GM antes de la evaluación de la capacidad de fagocitosis. En el caso de que las células se cultivasen más de 5 días, se cambió el medio RPE-GM por medio de mantenimiento de EPR (RPE-MM, por sus siglas en inglés) que consistía en DMEM suplementado con suero de feto bovino al 10 %, GlutaMax y normocina. El medio se cambió cada 2-3 días para proporcionar suficiente nutrición. Para la determinación de las actividades fagocíticas de las células de EPR, se utilizaron segmentos externos de bastón marcados con rojo pHrodo® basado en rodamina sensible al pH (Invision Bioresources, n.º de cat. 98740). El marcaje de los SEF con el kit de marcaje a microscala de rojo pHrodo® (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. P35363) ha sido descrito anteriormente. Se inoculó cada pocillo con células de EPR confluyentes con 0,1 ml de medio DMEM que contenía FBS al 10 % y normocina y 0,1 ml de SEF marcados, y se reconstituyeron en DMEM suplementado con FBS al 10 % y normocina. Con el fin de evaluar la capacidad fagocítica óptima de las células de EPR, se sometieron a ensayo diferentes concentraciones de SEF, de $1,5 \times 10^6$, 3×10^6 , $3,75 \times 10^6$, 5×10^6 , 6×10^6 , $7,5 \times 10^6$, 10×10^6 y $13,5 \times 10^6$ SEF/pocillo de una placa de 96 pocillos. Para reducir los agregados de SEF e incrementar la eficiencia de la fagocitosis, se introdujo una etapa de sonicación de pulso directo durante la reconstitución de los segmentos externos de bastón. Las células de EPR y SEF se incubaron durante 20 a 28 horas a 37 °C en el caso de las muestras de ensayo y a 12-15 °C el control negativo en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de aire. Al día siguiente, tras 20 a 28 horas de incubación de los SEF con monocapa de células de EPR, se aspiró el medio de cultivo y se lavó cada pocillo 3x con 0,2 ml de PBS sin Ca/Mg (Gibco/Invitrogen, n.º 14190-250). Se añadieron 0,2 ml de tripsina al 0,25 %/EDTA (Sigma, n.º de cat. T4049) más tampón de disociación celular (Gibco/Invitrogen, n.º de cat. 13151) a cada pocillo en una proporción 1:1 y se incubaron a temperatura ambiente hasta que era visible una suspensión de células individuales (10 a 20 minutos). La suspensión celular de cada muestra se transfirió a tubos de poliestireno de fondo redondo apropiadamente etiquetados que contenían 2 ml de DMEM más FBS al 10 % para neutralizar la reacción y se centrifugaron a 160 g durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante dejando ~0,2 a 0,25 ml de líquido. Los tubos de muestra se sometieron a agitación con vórtex y se evaluó la incorporación de SEF por las células de EPR utilizando un citómetro de flujo BD Accuri C6, tal como se ha descrito anteriormente.

Con el fin de incrementar adicionalmente la capacidad fagocítica, las células de EPR no expuestas en monocapa pueden convertirse en «competentes» mediante exposición a SEF no marcados durante periodos de tiempo definidos con o sin etapas de recuperación antes de realizar la fagocitosis de SEF marcados con rojo pHrodo® siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

REFERENCIAS

- Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012 Feb 25;379(9817):713-20. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60028-2. Epub 2012 Jan 24. PubMed PMID: 22281388.
- Klimanskaya I. Retinal pigment epithelium. *Methods Enzymol*. 2006;418:169-94. PubMed PMID: 17141036.
- Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, Holmes T, Ramos-Kelsey R, Lu B, Girman S, Bischoff N, Sauvé Y, Lanza R. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells*. 2006 Fall;8(3):189-99. PubMed PMID: 17009895.
- Klimanskaya I, Hipp J, Rezai KA, West M, Atala A, Lanza R. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(3):217-45. PubMed PMID: 15671670.
- Mao Y, Finnemann SC. Analysis of photoreceptor outer segment phagocytosis by RPE cells in culture. *Methods Mol Biol*. 2013;935:285-95. doi: 10.1007/978-1-62703-080-9_20. PubMed PMID: 23150376; PubMed Central PMCID: PMC3590840.
- Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Nov 25;94(24):12932-7. PubMed PMID: 9371778; PubMed Central PMCID: PMC24241.
- Miksa M, Komura H, Wu R, Shah KG, Wang P. A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J Immunol Methods*. 2009 Mar 15;342(1-2):71-7. doi: 10.1016/j.jim.2008.11.019. Epub 2009 Jan 9. PubMed PMID: 19135446; PubMed Central PMCID: PMC2675277.
- Lu B, Malcuit C, Wang S, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 2009; 21, 2125-2135.

Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 2010; 10, 802-823.

5 Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85, 845-881.

REIVINDICACIONES

1. Método para la medición de la actividad de fagocitosis, que comprende:

(1) medir la fluorescencia de ensayo en una primera alícuota de células incubadas con segmentos externos de fotorreceptor (SEF) marcados con rojo pHrodo@ y/o fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo@, a una temperatura comprendida entre 25 °C y 40 °C, o entre 34 °C y 40 °C, o a 37 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de ensayo, y

(2) medir la fluorescencia de control en una segunda alícuota de las células incubadas con SEF marcados con rojo pHrodo@ y/o fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo@, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 16 °C, o entre 12 °C y 15 °C, con el fin de obtener una fluorescencia de control,

en donde una fluorescencia de ensayo que es superior a la fluorescencia de control indica actividad de fagocitosis de las células,

en donde las células son células de EPR humanas o células progenitoras de fotorreceptores humanos.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la primera y segunda alícuota de células se incuban con SEF marcados con rojo pHrodo@.

3. Método según la reivindicación 1, en el que la primera y segunda alícuota de células se incuban con fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo@.

4. Método según la reivindicación 1, en el que los fragmentos bacterianos marcados con rojo pHrodo@ son biopartículas de *E. coli* marcadas con rojo pHrodo@.

5. Método según la reivindicación 1, en el que las células son células de EPR humanas.

6. Método según la reivindicación 1, en el que las células son células progenitoras de fotorreceptores humanos.

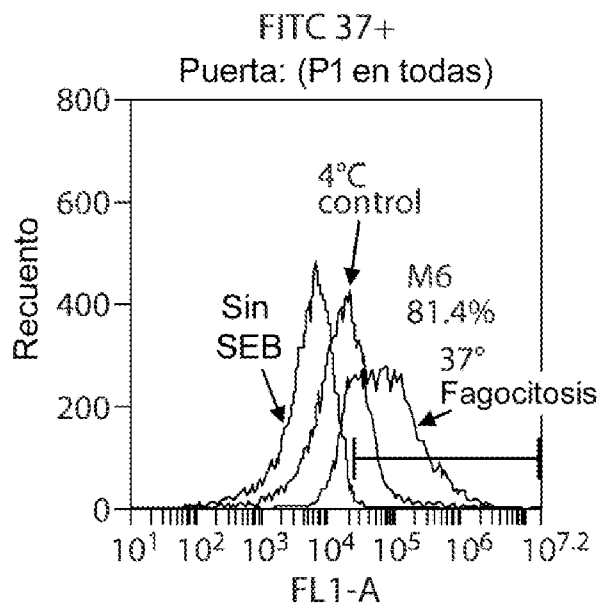


Fig. 1A

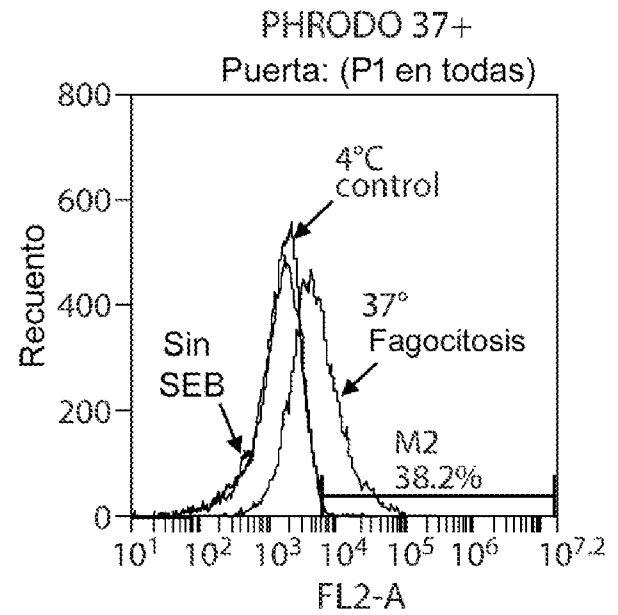


Fig. 1B

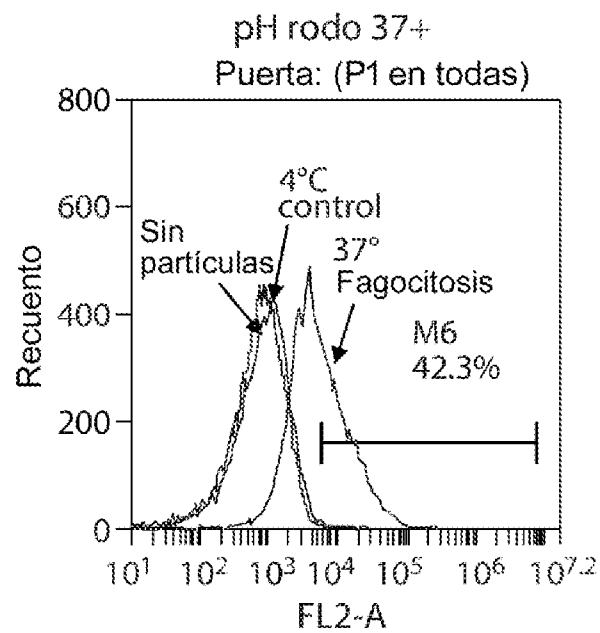


Fig. 1C

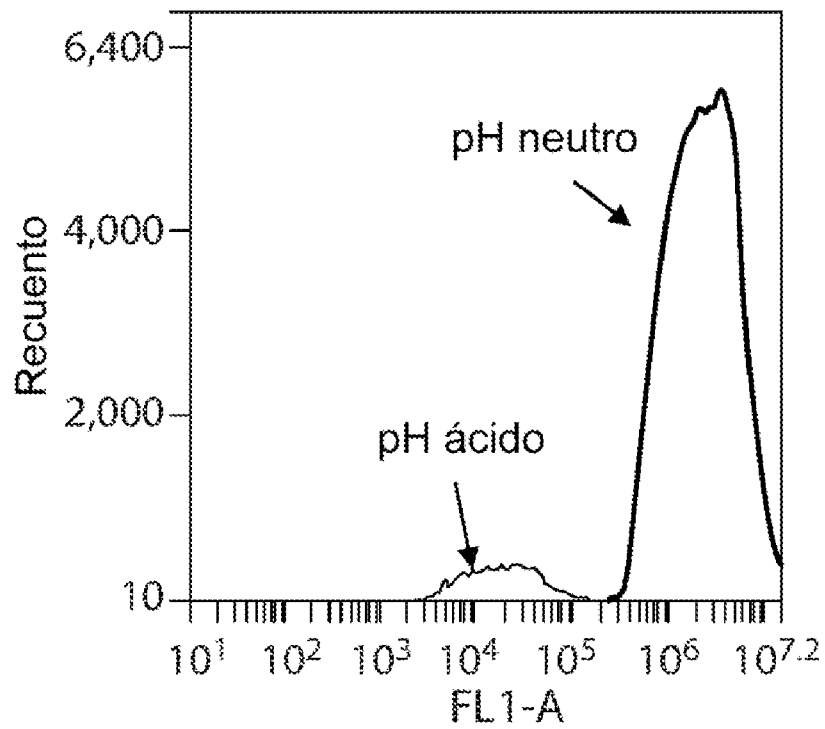


Fig. 2A

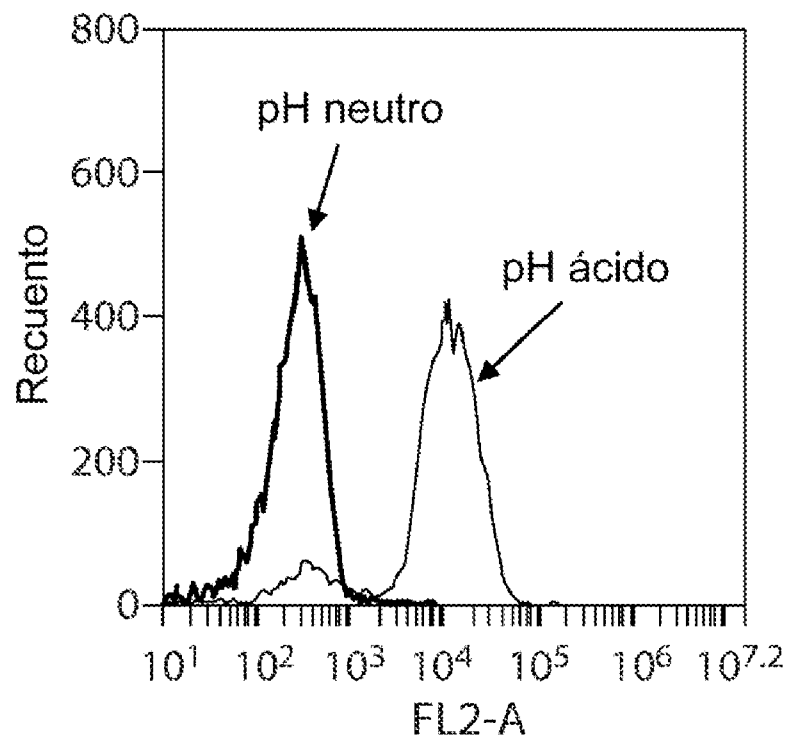


Fig. 2B

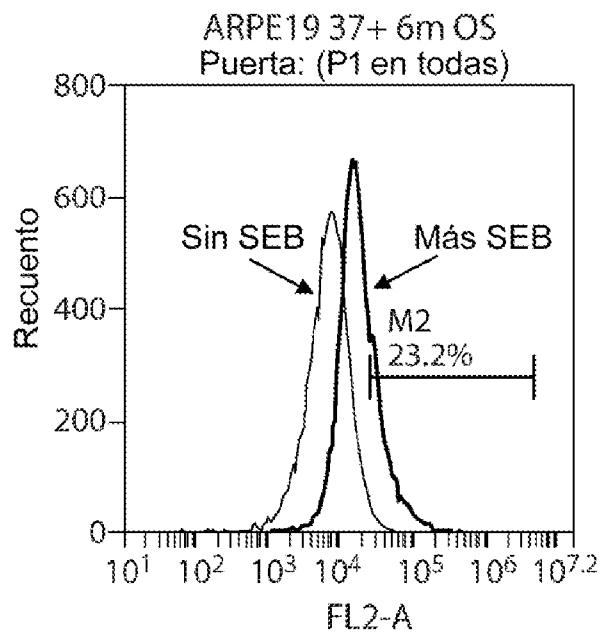


Fig. 3A

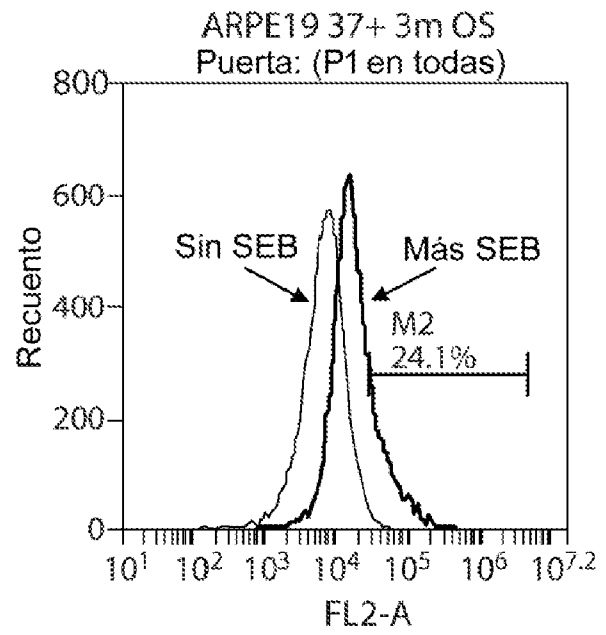


Fig. 3B

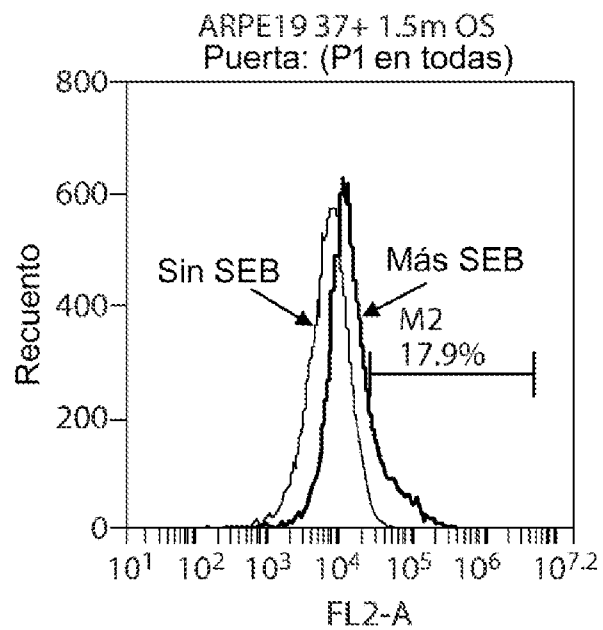


Fig. 3C

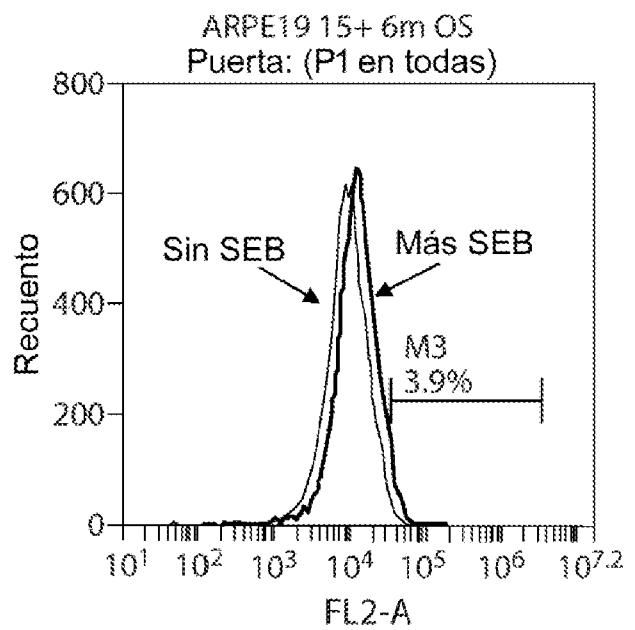
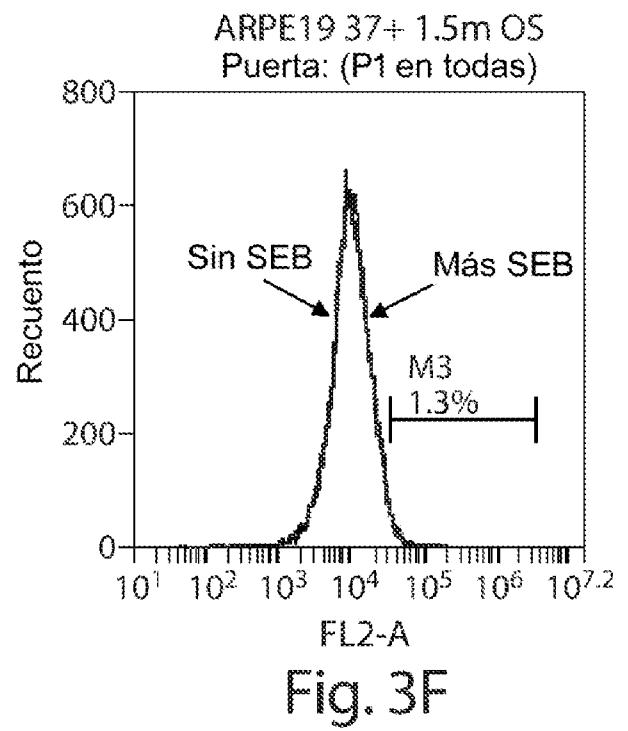
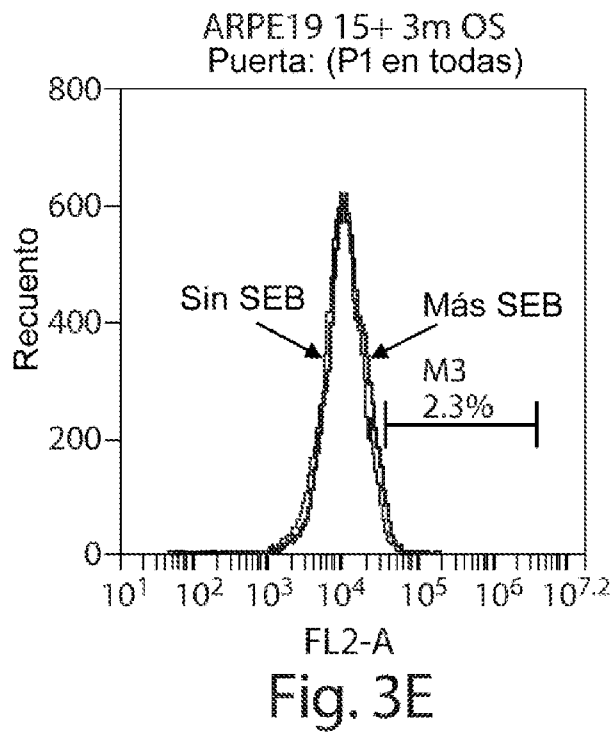


Fig. 3D



ç

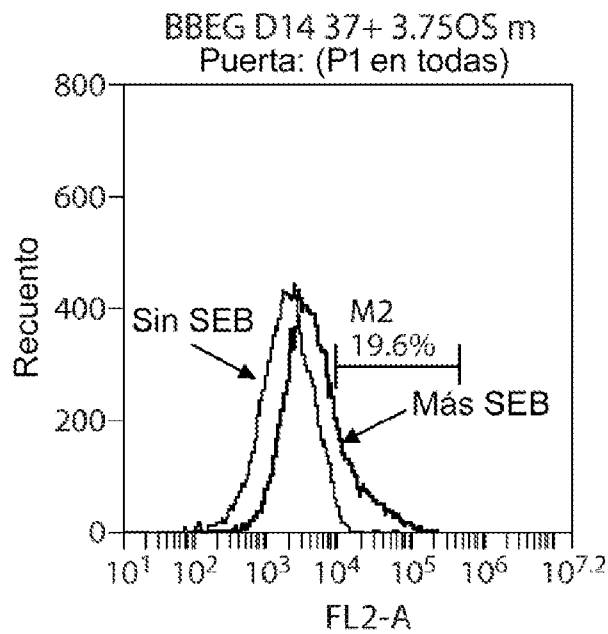


Fig. 4A

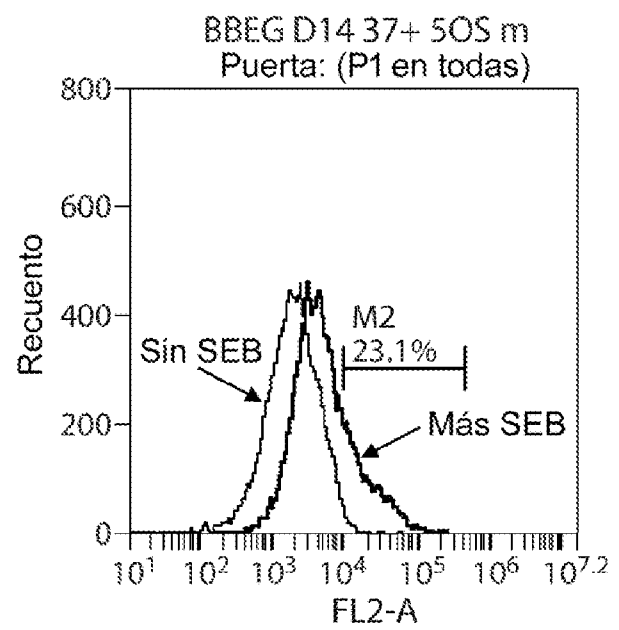


Fig. 4B

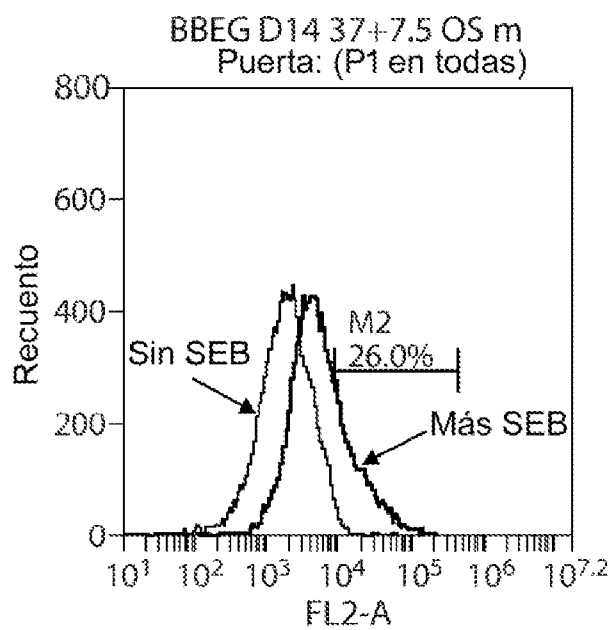


Fig. 4C

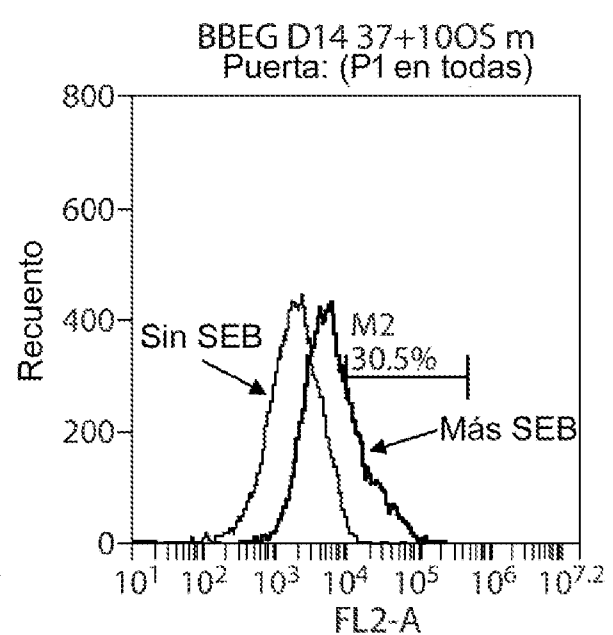


Fig. 4D

Q

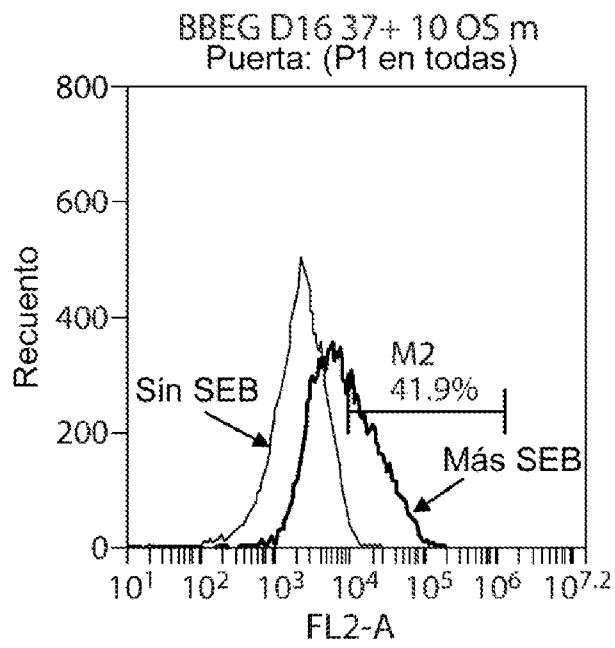


Fig. 4E

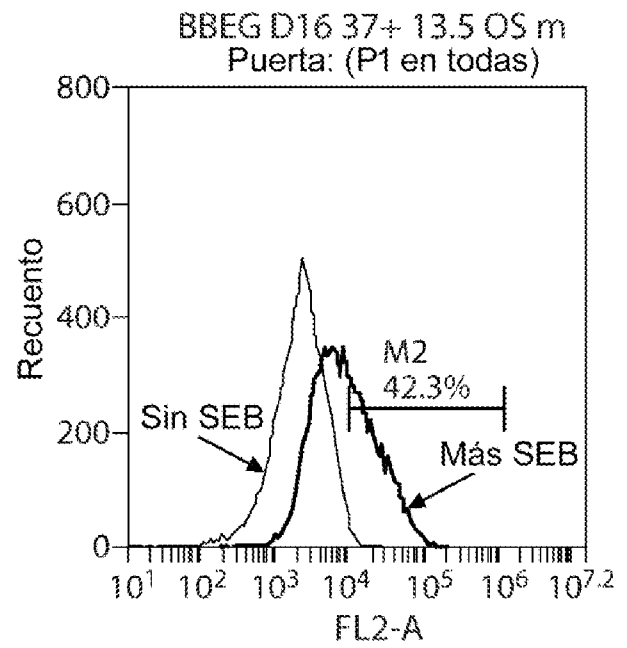


Fig. 4F