(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 947 826**

(51) Int. CI.:

C12N 5/079 (2010.01)
A61K 35/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 35/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2017 PCT/JP2017/005386**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017 WO17141926**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2017 E 17709487 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2023 EP 3416658**

(54) Título: **Célula endotelial corneal funcional humana y aplicación de la misma**

(30) Prioridad:

15.02.2016 JP 2016026423
15.02.2016 JP 2016026424
15.02.2016 JP 2016026425
15.02.2016 JP 2016026426
07.04.2016 JP 2016077450

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.08.2023

(73) Titular/es:

KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION (100.0%)
465 Kajii-cho Kawaramachi-dori, Hirokoji-agaru
Kamigyo-ku Kyoto-shi
Kyoto 602-8566, JP

(72) Inventor/es:

KINOSHITA, SHIGERU;
HAMURO, JUNJI;
SOTOZONO, CHIE y
UENO, MORIO

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Célula endotelial corneal funcional humana y aplicación de la misma

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano, y a un medicamento que comprende la célula. También se da a conocer un método de fabricación de la misma, y la aplicación de la misma en el control de calidad de la célula fabricada y los procesos de fabricación o similares.

[Antecedentes de la técnica]

Actualmente, el único método terapéutico para trastornos endoteliales de la córnea, incluida queratopatía ampollosa, es la cirugía de trasplante de córnea usando una córnea de donante, aunque el resultado clínico a largo plazo de esta cirugía es malo. Además, la agudeza visual después del trasplante de córnea no es suficiente debido al astigmatismo irregular corneal inducido. Aproximadamente el 60 % o más de los pacientes con trasplante de córnea padecen disfunción endotelial de la córnea (queratopatía ampollosa). Las causas principales de la queratopatía ampollosa son los trastornos endoteliales de la córnea debido a cirugía oftálmica tal como cirugía de cataratas, cirugía de glaucoma, cirugía vítreorretiniana o iridotomía láser, traumatismo corneal, síndrome de pseudoexfoliación y distrofia corneal endotelial de Fuchs. La tasa de prevalencia potencial de la distrofia corneal endotelial de Fuchs que implica un factor genético en Europa y EE.UU. es, según se informa, de aproximadamente el 5 % o más. La cirugía de trasplante de córnea requiere un donante de córnea para tratar un ojo enfermo, de modo que la cirugía de trasplante no puede ser un medio para solucionar la escasez sostenida de donantes. En vista del gran número de pacientes latentes, existe una intensa demanda mundial, como problema urgente a resolver, para la provisión de un tratamiento médico versátil innovador que pueda aplicarse en una amplia gama de instituciones médicas en comparación con las técnicas de trasplante de córnea. Además, la terapia de infusión celular reproduce la forma normal de la córnea sin distorsión, dando como resultado la recuperación de una buena función visual.

[Sumario de la invención]

[Solución al problema]

Los inventores han logrado la presente invención innovadora mediante primeros hallazgos en el mundo de que la célula endotelial corneal humana cultivada está compuesta por múltiples subpoblaciones debido a la transición del estado celular (fibrosis, transición epitelial-mesenquimatosa, senescencia, desdiferenciación o similares) en cultivo; e ideando una técnica para propagar selectivamente en cultivos una subpoblación, que permite la confirmación de una subpoblación específica, es decir, una célula funcional (en el presente documento también denominada célula efectora) que se comparte suficientemente con una función o funciones de una célula endotelial corneal humana diferenciada madura, es una célula endotelial diferenciada madura, y es óptima para la terapia de infusión celular, y también forma una forma de adoquín hexagonal pequeño y utiliza un sistema de metabolización de energía principalmente por una función mitocondrial.

Los inventores tuvieron éxito en el desarrollo de una técnica de cultivo *in vitro* de una célula endotelial corneal humana funcional, lo que durante mucho tiempo se había considerado imposible con técnicas de cultivo convencionales, y estableció los métodos para infundir un grado de alta calidad de células endoteliales corneales humanas cultivadas funcionales fabricadas mediante esta técnica en la cámara anterior de un ojo humano. El concepto de regeneración de endotelios corneales por infusión dentro de la cámara anterior es (1) mínimamente invasivo, (2) no usa material artificial como sustratos y (3) permite el uso de una célula endotelial corneal humana cultivada funcional de alta calidad de un donante joven con poca senescencia como célula maestra.

Por lo tanto, la presente invención proporciona la materia objeto como se define en las reivindicaciones adjuntas.

(Invención de célula)

Más específicamente, la presente invención proporciona una célula endotelial corneal funcional humana cultivada capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de ojos humanos, en donde la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo, y CD26 negativo.

En una realización, la célula comprende además propiedades de expresión que consisten en CD90 negativo a débilmente positivo, LGR5 negativo, SSEA3 negativo, MHC1 débilmente positivo, MHC2 negativo, ZO1 positivo y Na+/K+ ATPasa positiva,

en donde la célula tiene una propiedad funcional que consiste en alta producción de PDGF-BB, en donde la célula no

induce un rechazo alogénico tras la infusión en una cámara anterior,

opcionalmente, la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD105, CD90, CD26, CD24 y HLA-DR/DP/DQ negativos y HLA-ABC positivo.

En una realización, la célula se cultiva en presencia continua de un inhibidor de ROCK, y sin inhibición de la señalización de TGF-beta.

En una realización, la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo, CD105 negativo, CD24 negativo y CD26 negativo.

Además, la presente invención también proporciona una población celular que comprende la célula cultivada, como se definió anteriormente.

En una realización de la población celular, la densidad celular media a partir del cultivo celular saturado (confluencia del cultivo) de la población celular es de al menos 1500 células/mm^2 o más,

opcionalmente, en donde la densidad celular media de células integradas en una superficie endotelial corneal humana después de infundir la población celular es de al menos 1000 células/mm^2 o más,

opcionalmente, en donde la densidad celular media de células integradas en una superficie endotelial corneal humana después de infundir la población celular es de al menos 2000 células/mm^2 o más,

opcionalmente, la población celular no induce un rechazo alogénico tras la infusión en una cámara anterior,

opcionalmente, la población celular no provoca sustancialmente una respuesta biológica no deseada que no esté asociada con la reconstrucción del tejido endotelial de la córnea humana, tal como una mayor cantidad de citocinas inflamatorias en suero después de la administración *in vivo*.

En una realización, la población celular tiene uno o una pluralidad de los siguientes:

(1) prueba de pureza por ELISA de sobrenadante de cultivo

TIMP-1: 500 ng/ml o menos

IL-8: 500 pg/ml o menos

PDGF-BB: 30 pg/ml o más

MCP-1: 3000 pg/ml o menos

(2) prueba de pureza por FACS celular

CD166 = 95 % o más

CD133 = 5 % o menos

CD105 bajo positivo = 95 % o más

CD44 bajo positivo = 70 % o más

CD44 alto positivo = 15 % o menos

CD24 = 10 % o menos

CD26 positivo = 5 % o menos

CD200 = 5 % o menos

(3) función de barrera (ZO-1) positiva

(4) función de bombeo (Na+/K+ ATPasa) positiva

(5) Supervivencia celular

70 % o más con tinción de azul de tripano

(6) forma celular

no pueden encontrarse células transformadas mediante inspección visual.

(7) Claudina10 positiva

(8) célula efectora (razón E) > 50 %

(9) Célula no prevista

célula A no prevista (célula CD44 fuertemente positiva) < 15 %, célula B no prevista (célula CD26 positiva) <5 %, célula C no prevista (célula CD24 positiva) < 10 % (10) de anomalía de cariotipo negativa.

En una realización de la población celular, al menos el 70 % de las células en la población celular comprenden la célula cultivada, como se definió anteriormente.

Además, la presente invención también proporciona un producto que comprende la célula cultivada, como se definió anteriormente, o la población celular, como se definió anteriormente.

Además, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano, en donde la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo y CD26 negativo.

En una realización, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento de una disfunción o enfermedad endotelial de córnea,

opcionalmente, en donde la disfunción o enfermedad endotelial de córnea comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en trastorno endotelial de la córnea de grado 3 y trastorno endotelial de la córnea de grado 4 (queratopatía ampollosa) (por ejemplo, distrofia corneal endotelial de Fuchs, PEX-BK (queratopatía ampollosa por pseudoexfoliación; queratopatía ampollosa que implica síndrome de pseudoexfoliación), queratopatía ampollosa posterior a iridotomía láser, queratopatía ampollosa posterior a cirugía de cataratas (incluyendo queratopatía ampollosa pseudofáquica o afáquica), queratopatía ampollosa posterior a cirugía de glaucoma y queratopatía ampollosa posterior a un traumatismo, queratopatía ampollosa de causa desconocida después de múltiples cirugías, fracaso del injerto posterior a trasplante de córnea, distrofia endotelial corneal congénita y síndrome de hipoplasia congénita del ángulo de cámara anterior,

opcionalmente, en donde la célula se administra en una cámara anterior,

opcionalmente, en donde la célula se administra junto con un agente adicional, en donde el agente adicional comprende un inhibidor de ROCK,

opcionalmente, en donde la composición farmacéutica comprende la célula a una densidad de 5 X 10^4 células/300 microlitros a 2 X 10^6 células/300 microlitros,

opcionalmente, en donde la composición farmacéutica comprende además un vehículo de infusión celular,

opcionalmente, en donde el vehículo de infusión celular comprende al menos uno de inhibidor de ROCK, albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico,

opcionalmente, en donde el vehículo de infusión celular comprende albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico,

opcionalmente en donde el vehículo de infusión celular comprende todos del inhibidor de ROCK, albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico,

opcionalmente, en donde el vehículo de infusión celular comprende OPEGUARD-MA(R),

opcionalmente, en donde el antígeno de superficie celular comprende además propiedades de expresión que consisten en CD90 negativo a débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo, CD26 negativo, LGR5 negativo, SSEA3 negativo, MHC1 débilmente positivo, MHC2 negativo, ZO1 positivo y Na+/K+ ATPasa positiva,

en donde la célula tiene una propiedad funcional que consiste en alta producción de PDGFBB en donde la célula no induce un rechazo alogénico tras la infusión en una cámara anterior,

opcionalmente, en donde la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD105, CD90, CD26, CD24 y HLA-DR/DP/DQ negativos y HLA-ABC positivo.

Además, la presente invención se refiere a un medicamento que comprende la población celular, como se definió anteriormente.

En una realización, la composición farmacéutica comprende células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano, en donde al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de las células comprenden un perfil de antígenos de superficie celular CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo y CD26 negativo.

En una realización del medicamento, al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de las células en la población comprenden un perfil de antígenos de superficie celular CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo y CD26 negativo.

La presente invención proporciona lo siguiente.

(Punto 1) Una célula endotelial corneal funcional humana cultivada capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de ojos humanos; en donde la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo y CD26 negativo.

(Punto 2) La célula del punto 1, que comprende además al menos una propiedad de expresión seleccionada del grupo que consiste en CD90 negativo a débilmente positivo, LGR5 negativo, SSEA3 negativo, MHC1 débilmente positivo, MHC2 negativo, PDL1 positivo, ZO1 positivo, Na^+/K^+ ATPasa positiva y un antígeno de superficie celular descrito en la siguiente tabla:

[Tabla 1-1A]

Marcador de superficie celular	Célula funcional
CD59	**Fuertemente positivo**
CD147	**Fuertemente positivo**
CD81	**Fuertemente positivo**
CD73	**Fuertemente positivo**
CD49c	**Fuertemente positivo**
CD166	**Fuertemente positivo**
CD56	**Intermediamente positivo**
CD54	**Intermediamente positivo**
B2-uGlob	**Intermediamente positivo**
CD47	**Intermediamente positivo**
CD46	**Intermediamente positivo**
CD141	**Intermediamente positivo**
CD151	**Intermediamente positivo**
CD98	**Débilmente positivo**
CD165	**Débilmente positivo**
CD340 (Her2)	**Débilmente positivo**
CD58	**Débilmente positivo**
CD201	**Débilmente positivo**
CD140b	**Débilmente positivo**
EGF-r	**Débilmente positivo**
CD63	**Débilmente positivo**
CD9	**Negativo**
CD49b	**Negativo**
CD227	**Negativo**
CD90	**Negativo**
CD44	**Negativo**

(Punto 3) La célula de uno cualquiera de los puntos 1-2, en donde la célula tiene al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en alta producción de PDGF-BB, baja producción de IL-8, baja producción de MCP-1, alta producción de TNF-alfa, alta producción de IFNgamma y alta producción de antagonista de IL-1R.

(Punto 4) La célula de uno cualquiera de los puntos 1-3, en donde la célula tiene al menos un miARN con una propiedad celular de la célula endotelial corneal funcional diferenciada madura a5, en donde una propiedad de un antígeno de superficie celular de a5 es CD44 negativo a débilmente positivo y CD24 negativo CD26 negativo.

(Punto 5) La célula del punto 4, en donde la propiedad de dicho miARN comprende al menos un miARN seleccionado del grupo que consiste en:

(A) célula endotelial corneal diferenciada madura funcional (a5): célula endotelial corneal intermediamente diferenciada (a1): célula no funcional endotelial corneal (a2) presenta alta expresión: alta expresión: baja expresión:

(intracelular) miR23a-3p, miR23b-3p, miR23c, miR27a-3p, miR27b-3p, miR181a-5p, miR181b-5p, miR181c-5p, miR181d-5p

(secretado por células) miR24-3p, miR1273e;

(B) a5:a1:a2 presenta alta expresión: expresión intermedia: baja expresión:

(intracelular) miR30a-3p, miR30a-5p, miR30b-5p, miR30c-5p, miR30e-3p, miR30e-5p, miR130a-3p, miR130b-3p, miR378a-3p, miR378c, miR378d, miR378e, miR378f, miR378h, miR378i, miR184, miR148a-3p

(secretado por células) miR184;

(C) a5:a1:a2 presenta alta expresión: baja expresión: baja expresión:

(intracelular) miR34a-5p, miR34b-5p

(secretado por células) miR4419b, miR371b-5p, miR135a-3p, miR3131, miR296-3p, miR920, miR6501-3p;

(D) a5:a1:a2 presenta baja expresión: baja expresión: expresión intermedia a alta:

(intracelular) miR29a-3p, miR29b-3p, miR199a-3p, miR199a-5p, miR199b-5p, miR143-3p

(secretado por células) miR1915-3p, miR3130-3p, miR92a-2-5p, miR1260a;

(E) a5:a1:a2 presenta baja expresión: expresión intermedia: alta expresión:

(intracelular) miR31-3p, miR31-5p, miR193a-3p, miR193b-3p, miR138-5p

(F) a5:a1:a2 presenta alta expresión: baja expresión: alta expresión:

(secretado por células) miR92b-5p; y

(G) a5:a1:a2 presenta baja expresión: alta expresión: baja expresión:

(secretado por células) miR1246, miR4732-5p, miR23b-3p, miR23a-3p, miR1285-3p, miR5096;

en donde un nivel de expresión es la intensidad relativa entre 3 tipos de células, siendo la expresión de un antígeno de superficie celular de a1 CD44 intermediamente positivo CD24 negativo CD26 negativo, y siendo la expresión de un antígeno de superficie celular de a2 CD44 fuertemente positivo CD24 negativo CD26 positivo.

(Punto 6) La célula del punto 5, en donde el marcador de miARN comprende al menos uno seleccionado de (B) o (C).

(Punto 7) La célula de cualquiera de los puntos 1-6, en el que un área celular media de la célula es de 250 microm^2 o menos. Como se usa en el presente documento, “micro” representa una letra griega y significa 10^{-6}.

(Punto 8) La célula de uno cualquiera de los puntos 1-7 que tiene una propiedad de función celular homóloga a a5 en al menos un indicador celular seleccionado del grupo que consiste en: un marcador de superficie celular; un producto proteínico o un material biológico relacionado del producto; una proteína relacionada con SASP; miARN; un exosoma; un metabolito celular que comprende un aminoácido y un material biológico relacionado del metabolito; tamaño celular; densidad celular y la presencia de una célula reactiva con autoanticuerpos.

(Punto 9) La célula de uno cualquiera de los puntos 1-8, en donde la célula no tiene una anomalía de cariotipo.

(Punto 10) Una población celular que comprende la célula de uno cualquiera de los puntos 1-9.

(Punto 11) La población celular del punto 10, en donde una densidad celular media a partir del cultivo celular saturado (confluencia del cultivo) de la población celular es de al menos 1500 células/mm^2 o más.

(Punto 12) La población celular del punto 10 u 11, en donde una densidad celular media a partir del cultivo celular

saturado (confluencia del cultivo) de la población celular es de al menos 2000 células/mm^2 o más.

(Punto 13) La población celular de uno cualquiera de los puntos 10-12, en donde una densidad celular media de células integradas en una superficie endotelial de la córnea humana después de infundir la población celular es de al menos 1000 células/mm^2 o más.

(Punto 14) La población celular de uno cualquiera de los puntos 10-13, en donde una densidad celular media de células integradas en una superficie endotelial de la córnea humana después de infundir la población celular es de al menos 2000 células/mm^2 o más.

(Punto 15) La población celular de uno cualquiera de los puntos A10-A14, en donde al menos el 70 % de las células en la población celular tienen la característica del punto A2 o A3.

(Punto 16) La población celular de uno cualquiera de los puntos A10-A15, en donde al menos el 90 % de las células en la población celular tienen la característica del punto A2 o A3.

(Punto 17) La población celular de uno cualquiera de los puntos 10-16, en donde al menos el 40 % de las células en la población celular tienen la característica del punto 1.

(Punto 18) La población celular de cualquiera de los puntos 10-17, en donde al menos el 70 % de las células en la población celular tienen la característica del punto 1.

(Punto 19) La población celular de uno cualquiera de los puntos 10-18, en donde al menos el 80 % de las células en la población celular tienen la característica del punto 1.

(Punto 20) La célula de uno cualquiera de los puntos 1-9 o la población celular de uno cualquiera de los puntos 10-19, que no induce un rechazo alogénico tras la infusión en una cámara anterior.

(Punto 21) La célula de uno cualquiera de los puntos 1-9 o la población celular de uno cualquiera de los puntos 10-20, en donde la célula o la población celular no provoca sustancialmente una respuesta biológica no deseada que no esté asociada con la reconstrucción del tejido endotelial de la córnea humana, tal como una mayor cantidad de citocinas inflamatorias séricas después de la administración *in vivo* en un perfil de citocinas séricas.

(Punto 22) Un producto que comprende la célula de uno cualquiera de los puntos 1-9 o la población celular de uno cualquiera de los puntos 10-21.

(Punto 23) Un método para conservar una célula o una población celular para mantener y conservar una propiedad de función celular intercambiando un medio de la célula de uno cualquiera de los puntos 1-9 o la población celular de uno cualquiera de los puntos 10-21.

(Punto 24) Un método de administración de la célula de uno cualquiera de los puntos 1-9 o la población celular de uno cualquiera de los puntos 10-21, que comprende implementar el método de conservación de una célula o una población celular.

(Medicamentos y productos farmacéuticos)

(Punto A1) Un medicamento que comprende una célula endotelial corneal funcional humana, como se define en las reivindicaciones adjuntas, siendo dicha célula capaz de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano.

(Punto A2) El medicamento del punto A1, en donde el medicamento es para tratar una disfunción o enfermedad endotelial de córnea.

(Punto A3) El medicamento del punto A2, en donde la disfunción o enfermedad endotelial de córnea comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en trastorno endotelial de la córnea de grado 3 y trastorno endotelial de la córnea de grado 4 (queratopatía ampollosa) (por ejemplo, distrofia corneal endotelial de Fuchs, PEX-BK (queratopatía ampollosa por pseudoexfoliación; queratopatía ampollosa que implica síndrome de pseudoexfoliación), queratopatía ampollosa posterior a iridotomía láser, queratopatía ampollosa posterior a cirugía de cataratas (incluyendo queratopatía ampollosa pseudofáquica o afáquica), queratopatía ampollosa posterior a cirugía de glaucoma y queratopatía ampollosa posterior a traumatismo, queratopatía ampollosa de causa desconocida después de múltiples cirugías, fracaso del injerto posterior a trasplante de córnea, distrofia endotelial corneal congénita y síndrome de hipoplasia congénita del ángulo de cámara anterior. El sistema de clasificación usado en el presente documento se basa en la clasificación de gravedad de trastornos endoteliales de la córnea, que se basa en Japanese Journal of Ophthalmology 118: 81-83, 2014.

(Punto A4) El medicamento de uno cualquiera de los puntos A1-A3, en donde la célula se administra en una cámara

anterior.

(Punto A5) El medicamento de uno cualquiera de los puntos A1-A4, en donde la célula se administra junto con un agente adicional.

(Punto A6) El medicamento del punto A5, en donde el agente adicional comprende al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente esteroide, un antimicrobiano y un AINE.

(Punto A7) El medicamento del punto A5 o A6, en donde el agente adicional comprende un inhibidor de ROCK.

(Punto A8) El medicamento de uno cualquiera de los puntos A5-A7, en donde el agente adicional está contenido en el medicamento.

(Punto A9) El medicamento de uno cualquiera de los puntos A1-A8, en donde el medicamento comprende la célula a una densidad de 5 X 10^4 células/300 microlitros a 2 x 10^6 células/300 microlitros.

(Punto A10) El medicamento de uno cualquiera de los puntos A1-A9, en donde el medicamento comprende además un vehículo de infusión celular.

(Punto A11) El medicamento del punto A10, en donde el vehículo de infusión celular comprende además al menos uno de inhibidor de ROCK, albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico.

(Punto A12) El medicamento del punto A10 o A11, en donde el vehículo de infusión celular comprende además albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico.

(Punto A13) El medicamento de uno cualquiera de los puntos A10-A12, en donde el vehículo de infusión celular comprende además todo del inhibidor de ROCK, albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico.

(Punto A14) El medicamento de uno cualquiera de los puntos A10-A13, en donde el vehículo de infusión celular comprende OPEGUARD-MA(R).

(Punto A15) Un medicamento, en donde una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano, tiene propiedades de expresión de CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 y CD26 negativo, y además, opcionalmente, puede tener una o más de las siguientes características (A15-6) a (A15-13):

(A15-6) el antígeno de superficie celular comprende además al menos una propiedad de expresión seleccionada del grupo que consiste en CD90 negativo a débilmente positivo, LGR5 negativo, SSEA3 negativo, MHC1 débilmente positivo, MHC2 negativo, PDL1 positivo, ZO1 positivo, Na^+/K^+ ATPasa positiva y un antígeno de superficie celular descrito en la siguiente tabla:

[Tabla 1-1B]

Marcador de superficie celular	Célula funcional
CD59	**Fuertemente positivo**
CD147	**Fuertemente positivo**
CD81	**Fuertemente positivo**
CD73	**Fuertemente positivo**
CD49c	**Fuertemente positivo**
CD166	**Fuertemente positivo**
CD56	**Intermediamente positivo**
CD54	**Intermediamente positivo**
B2-uGlob	**Intermediamente positivo**
CD47	**Intermediamente positivo**
CD46	**Intermediamente positivo**
CD141	**Intermediamente positivo**
CD151	**Intermediamente positivo**
CD98	**Débilmente positivo**
CD165	**Débilmente positivo**
CD340 (Her2)	**Débilmente positivo**
CD58	**Débilmente positivo**
CD201	**Débilmente positivo**
CD140b	**Débilmente positivo**
EGF-r	**Débilmente positivo**
CD63	**Débilmente positivo**

CD9	**Negativo**
CD49b	**Negativo**
CD227	**Negativo**
CD90	**Negativo**
CD44	**Negativo**

;

(A15-7) la célula tiene al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en alta producción de PDGF-BB, baja producción de IL-8, baja producción de MCP-1, alta producción de TNF-alfa, alta producción de IFNgamma y alta producción de antagonista de IL-1R;

(A15-8) la célula tiene al menos un miARN con una propiedad celular de la célula endotelial corneal funcional diferenciada madura a5, en donde una propiedad de un antígeno de superficie celular de a5 es CD44 negativo a débilmente positivo y CD24 negativo CD26 negativo;

(A15-9) la célula de (A15-8), en donde la propiedad de dicho miARN comprende al menos un miARN seleccionado del grupo que consiste en:

(A) célula endotelial corneal diferenciada madura funcional (a5): célula endotelial corneal intermediamente diferenciada (a1): célula no funcional endotelial corneal (a2) presenta alta expresión: alta expresión: baja expresión:

(intracelular) miR23a-3p, miR23b-3p, miR23c, miR27a-3p, miR27b-3p, miR181a-5p, miR181b-5p, miR181c-5p, miR181d-5p

(secretado por células) miR24-3p, miR1273e;

(B) a5:a1:a2 presenta alta expresión: expresión intermedia: baja expresión:

(intracelular) miR30a-3p, miR30a-5p, miR30b-5p, miR30c-5p, miR30e-3p, miR30e-5p, miR130a-3p, miR130b-3p, miR378a-3p, miR378c, miR378d, miR378e, miR378f, miR378h, miR378i, miR184, miR148a-3p

(secretado por células) miR184;

(C) a5:a1:a2 presenta alta expresión: baja expresión: baja expresión:

(intracelular) miR34a-5p, miR34b-5p

(secretado por células) miR4419b, miR371b-5p, miR135a-3p, miR3131, miR296-3p, miR920, miR6501-3p;

(D) a5:a1:a2 presenta baja expresión: baja expresión: expresión intermedia a alta:

(intracelular) miR29a-3p, miR29b-3p, miR199a-3p, miR199a-5p, miR199b-5p, miR143-3p

(secretado por células) miR1915-3p, miR3130-3p, miR92a-2-5p, miR1260a;

(E) a5:a1:a2 presenta baja expresión: expresión intermedia: alta expresión:

(intracelular) miR31-3p, miR31-5p, miR193a-3p, miR193b-3p, miR138-5p

(F) a5:a1:a2 presenta alta expresión: baja expresión: alta expresión:

(secretado por células) miR92b-5p; y

(G) a5:a1:a2 presenta baja expresión: alta expresión: baja expresión:

(secretado por células) miR1246, miR4732-5p, miR23b-3p, miR23a-3p, miR1285-3p, miR5096;

en donde un nivel de expresión es la intensidad relativa entre 3 tipos de células, siendo la expresión de un antígeno de superficie celular de a1 CD44 intermediamente positivo CD24 negativo CD26 negativo, y siendo la expresión de un antígeno de superficie celular de a2 CD44 fuertemente positivo CD24 negativo CD26 positivo;

(A15-10) el marcador de miARN comprende al menos uno seleccionado de (B) o (C);

(A 15-11) un área celular media de la célula es de 250 microm^2 o menos;

(A15-12) la célula tiene una propiedad de función celular homóloga a a5 en al menos un indicador celular seleccionado del grupo que consiste en: un marcador de superficie celular; un producto proteínico o un material biológico relacionado

del producto; una proteína relacionada con SASP; miARN; un exosoma; un metabolito celular que comprende un aminoácido y un material biológico relacionado del metabolito; tamaño celular; densidad celular y la presencia de una célula reactiva con autoanticuerpos;

(A15-13) la célula no tiene una anomalía de cariotipo;

o es una población celular, en donde la población celular es

(A15-14) una población celular que comprende la célula de uno cualquiera de (A15-2) a A15-13);

(A15-15) la población celular de A15-14, en donde una densidad celular media a partir del cultivo celular saturado (confluencia del cultivo) de la población celular es de al menos 1500 células/mm^2 o más;

(A15-16) la población celular de (A15-14) a (A15-15), en donde una densidad celular media a partir del cultivo celular saturado (confluencia del cultivo) de la población celular es de al menos 2000 células/mm^2 o más;

(A15-17) la población celular de (A15-14) a (A15-16), en donde una densidad celular media de células integradas en una superficie endotelial de la córnea humana después de infundir la población celular es de al menos 1000 células/mm^2 o más;

(A15-18) la población celular de (A15-14) a (A15-17), en donde una densidad celular media de células integradas en una superficie endotelial de la córnea humana después de infundir la población celular es de al menos 2000 células/mm^2 o más;

(A15-19) la población celular de (A15-14) a (A15-18), en donde al menos el 70 % de las células en la población celular tienen la característica de (A15);

(A15-20) la población celular de (A15-14) a (A15-19), en donde al menos el 90 % de las células en la población celular tienen la característica de (A15);

(A15-21) la población celular de (A15-14) a (A15-20), en donde al menos el 40 % de las células en la población celular tienen la característica de (A15);

(A15-22) la población celular de (A15-14) a (A15-21), en donde al menos el 70 % de las células en la población celular tienen la característica de (A15);

(A15-23) la población celular de uno cualquiera de (A15-14) a (A15-22), en donde al menos el 80 % de las células en la población celular tienen la característica de (A15);

(A15-24) la célula de uno cualquiera de (A15) a (A15-13) o la población celular de uno cualquiera de los puntos (A15-14) a (A15-22), que no induce un rechazo alogénico tras la infusión en una cámara anterior;

(A15-25) la célula de uno cualquiera de (A15) a (A15-13) o la población celular de uno cualquiera de (A15-14) a (A15-24), en donde la célula o la población celular no provoca sustancialmente una respuesta biológica no deseada que no esté asociada con la reconstrucción del tejido endotelial de la córnea humana, tal como una mayor cantidad de citocinas inflamatorias séricas después de la administración *in vivo* en un perfil de citocinas séricas.

[Efectos ventajosos de la invención]

El presente método terapéutico da lugar a un cambio de paradigma en la medicina regenerativa del endotelio de la córnea, que tiene el potencial de ampliar la aplicación a más de un millón de pacientes en todo el mundo como un medicamento de despliegue internacional y versátil. Con respecto a la siguiente Breve descripción de los dibujos, como se usa en el presente documento, -, +, ++ y +++, con respecto a la intensidad de expresión de un marcador de superficie celular, indican negativo, débilmente positivo, intermediamente positivo y fuertemente positivo, respectivamente. +/- está abarcado por - (negativo) en el presente documento. Neg, bajo, med y alto indican negativo, débilmente positivo (en el presente documento también denominado bajo), intermediamente positivo (también denominado en el presente documento medio) y fuertemente positiva (también denominado en el presente documento alto), respectivamente. Débilmente positivo, intermediamente positivo y fuertemente positivo se determinan de la siguiente manera: se usa un anticuerpo anti-CD44 humano conjugado con PE-Cy7 (BD Biosciences), y el factor de escalado de área del láser azul de FACS Canto II se establece en 0,75 y el voltaje de PE-Cy7 se establece en 495; bajo estos ajustes, el intervalo de intensidad de fluorescencia débil es inferior a aproximadamente 3800, el intervalo de intensidad de fluorescencia media es de aproximadamente 3800 o más a menos de 27500 y el intervalo de intensidad de fluorescencia fuerte es de aproximadamente 27500 o más. Se determina que es negativo si el control negativo (control de isotipo) tiene el mismo patrón de intensidad de tinción, y positivo si el patrón se desplaza incluso en una pequeña cantidad. La intensidad de fluorescencia media del control negativo (control de isotipo) con el ajuste descrito anteriormente es de aproximadamente 50 (intervalo de 55 +/- 25). Se usó el siguiente ajuste para otros

colorantes fluorescentes: para el factor de escalado de área, FSC = 0,5, láser azul = 0,75, y láser rojo = 0,8; para el voltaje, FSC = 270, SSC = 400, FITC = 290, PE = 290, PerCP-Cy5.5 = 410, PE-Cy 7 = 495 y APC = 430. La fuga de cada fluorescencia a otra fluorescencia se corrige con BD comp Beads (BD Biosciences) y FACS DiVa soft. La intensidad de fluorescencia media del control negativo (control de isotipo) en este momento es la siguiente: aproximadamente 130 para FITC, aproximadamente 120 para PE, aproximadamente 120 para PerCP-Cy5.5, aproximadamente 50 para PE-Cy7, y aproximadamente 110 para APC. Para la detección usando un experimento de Lyoplate (véase, por ejemplo, la tabla 2), se usa un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 647 (adjunto al kit) para la medición. En tal caso, el valor de la mediana de la intensidad de fluorescencia de cada marcador/mediana de la intensidad de fluorescencia del control negativo (tinción por anticuerpo de control de isotipo) de menos de 5, 5 o más y menos de 10, 10 o más y menos de 30, y 30 o más se definen como -, +, ++ y +++, respectivamente.

[Breve descripción de los dibujos]

[Figura 1-A]

La figura 1-A muestra el cambio en las composiciones de las subpoblaciones (SP) dependiendo del número de pases. Se muestran los resultados de las imágenes de microscopio de contraste de fase y el análisis FACS para el cultivo primario y el pase primero-tercero de HCEC del n.° 82. El eje vertical del gráfico indica el porcentaje del número de células propagadas selectivamente en cultivos en cada compuerta con respecto al número total de células. Las condiciones de compuerta son las siguientes: compuerta 1: CD24-CD44- a +CD105+CD166+, compuerta 2: CD24-CD44++CD105+CD166+, compuerta 3: CD24-CD44+++CD105++CD166+, compuerta 4: CD24+CD44+ a ++CD105+CD166+ y compuerta 5: CD24+CD44+++CD105++CD166+.

[Figura 1-B]

La figura 1-B muestra el cambio en las composiciones de las subpoblaciones (SP) dependiendo del número de pases. Se muestran los resultados de las imágenes de microscopio de contraste de fase y el análisis FACS para el cultivo primario y el pase primero-tercero de HCEC del n.° 88. El eje vertical del gráfico indica el porcentaje del número de células propagadas selectivamente en cultivos en cada compuerta con respecto al número total de células. Las condiciones de compuerta son las mismas que en la figura 1-A.

[Figura 1-C]

La figura 1-C muestra el cambio en las composiciones de subpoblaciones (SP) dependiendo del número de pases. Se muestran los resultados de las imágenes de microscopio de contraste de fase y el análisis FACS para el cultivo primario y el pase primero-tercero de HCEC del n.° 83. El eje vertical del gráfico indica el porcentaje del número de células propagadas selectivamente en cultivos en cada compuerta con respecto al número total de células. Las condiciones de compuerta son las mismas que en la figura 1-A.

[Figura 1-D]

La figura 1-D muestra el cambio en las composiciones de subpoblaciones (SP) dependiendo del número de pases. Se muestran los resultados de las imágenes de microscopio de contraste de fase y el análisis FACS para el cultivo primario y el pase primero-tercero de HCEC del n.° 84. El eje vertical del gráfico indica el porcentaje del número de células propagadas selectivamente en cultivos en cada compuerta con respecto al número total de células. Las condiciones de compuerta son las mismas que en la figura 1-A.

[Figura 2-A]

La figura 2-A muestra un análisis FACS típico que muestra el cambio en las composiciones de subpoblaciones dependiendo del número de pases. Se muestran los resultados del análisis FACS para la expresión de CD44, CD166, CD24 y CD105 con respecto al cultivo primario y el pase primero-tercero de HCEC del n.° 82.

[Figura 2-B]

La figura 2-B muestra un análisis FACS típico que muestra el cambio en las composiciones de subpoblaciones dependiendo del número de pases. Se muestran los resultados del análisis FACS para la expresión de CD44, CD166, CD24 y CD105 con respecto al cultivo primario y el pase primero-tercero de HCEC del n.° 83.

[Figura 3]

La figura 3 muestra la expresión de marcadores y la morfología de subpoblaciones caracterizadas por la expresión de CD44 y CD24. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina. La figura 3 muestra, desde la parte superior, imágenes de observación de campo brillante para Na^+/K^+ ATPasa (emisión de color por 3,3'-diaminobencidina [DAB], marrón oscuro), imágenes de observación de campo brillante para ZO-1 (emisión de color por 3,3'-diaminobencidina [DAB], marrón oscuro) e imágenes de microscopio de contraste de fase, y desde la izquierda, segundo pase de C19 que es

CD24-CD44- a +, tercer pase de C16 que es CD24-CD44++, tercer pase de C17 que es CD24+CD44++ y segundo pase de C18 que es CD24+CD44+++.

[Figura 4]

La figura 4 muestra el análisis FACS para la expresión de CD200 y CD44 de cada cultivo. En los gráficos de puntos para cada cultivo, el eje horizontal indica el valor logarítmico de la intensidad de expresión de CD44 humano, y el eje vertical indica el valor logarítmico de la intensidad de expresión de CD200. Para los ejes vertical y horizontal, se muestra un diagrama de puntos que representa el valor logarítmico de la intensidad de expresión de IgG de ratón como control. En los histogramas para cada cultivo, el eje horizontal indica el valor logarítmico de la intensidad de expresión de CD200 o CD44 con la intensidad de expresión de IgG de ratón (control, gris), mientras que el eje vertical representa el recuento de células correspondiente.

[Figura 5]

La figura 5 muestra los resultados del análisis FACS que indican que la expresión del antígeno HLA de clase I de superficie disminuye con la disminución en la expresión de CD26 y CD44 de cada cultivo. La figura 5 investiga qué subpoblación es deseable para la infusión en pacientes en vista de la expresión de moléculas relacionadas con el rechazo inmunitario. En los gráficos de puntos para cada cultivo, el eje horizontal indica el valor logarítmico de la intensidad de expresión de CD44 humano, y el eje vertical indica el valor logarítmico de la intensidad de expresión de CD26. En los histogramas para cada cultivo, el eje horizontal indica el valor logarítmico de la intensidad de expresión de antígenos HLA de clase I y el eje vertical representa el recuento de células correspondiente. Los colores corresponden a las células mostradas en los gráficos de puntos para CD26 y CD44. Los valores numéricos dentro de los histogramas representan la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada histograma. Las flechas indican que el $CD44^{neg\text{-}bajo}$ tiene una expresión menor que $CD44^{alto}$.

[Figura 6-A]

La figura 6-A muestra los resultados del análisis FACS para la expresión de CD44, CD166, CD24 y CD105 en un tejido corneal (de un donante de 71 años) inmediatamente después de la escisión de los tejidos y la preparación de una suspensión de células individuales.

[Figura 6-B]

La figura 6-B muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica que indica la expresión de los marcadores en un tejido corneal (de un donante de 65 años) manipulado como en la figura 6-B. La figura 6-B muestra la tinción, en la fila superior desde la izquierda, para LGR5, CD24 y CD26, y, en la fila inferior desde la izquierda, para CD166, CD44, y control (control de isotipo), superpuesta con la tinción con DAPI. La barra de escala es de 100 microm.

[Figura 7]

La figura 7 muestra que las cHCEC de subpoblaciones con distinta intensidad de expresión de CD44 presentan diferente morfología. La parte superior izquierda muestra una imagen de microscopio de contraste de fase de células cultivadas antes de la selección por FACS. La porción superior derecha muestra el análisis FACS en CD44 y CD24 de las células cultivadas. La compuerta A contenía el 12,8 % de las células y la compuerta B contenía el 61,1 % de las células. La parte inferior muestra imágenes de microscopio de contraste de fase e imágenes de microscopio de fluorescencia de células cultivadas de cada compuerta. La fila superior muestra células cultivadas con un grado medio a alto de expresión de CD44 obtenidas de la compuerta A, y la fila inferior muestra aquellas con bajo grado de expresión de CD44 obtenidas de la compuerta B. La parte inferior muestra, desde la izquierda, una imagen de microscopio de contraste de fase en el día 3, día 10 y día 17, y una imagen de observación de campo brillante de la tinción con DAPI y anti-Na^+/K^+ ATPasa.

[Figura 8]

La figura 8 muestra los resultados de la comparación de la expresión génica en células endoteliales cultivadas de dos subpoblaciones separadas que han experimentado o bien CST o bien diferenciación en células efectoras. Se usó agrupamiento jerárquico para comparar las firmas génicas. Esto se muestra como un mapa de calor. El rojo indica una expresión relativamente alta y el verde indica una expresión relativamente baja.

[Figura 9]

La figura 9 ilustra resultados parciales de la expresión de marcadores de superficie celular de subpoblaciones celulares que son diferentes entre las cHCEC mediante análisis FACS. La figura 9 muestra histogramas que representan la intensidad de expresión de cada marcador para dos subpoblaciones seleccionadas por FACS (CD166+CD105-CD24-CD44- a + (azul) y CD166+CD105-CD24+CD44+++ (rojo)) del n.º 154 (primer pase, parte superior) y el n.º 127D (sexto pase, parte inferior). El eje horizontal indica el valor logarítmico de la intensidad de expresión de CD73, CD13, CD147

o CD200 con la intensidad de expresión del control negativo (marcador por anticuerpo de control de isotipo, gris). El eje vertical indica el recuento de células correspondiente.

[Figura 10-A]

La figura 10-A muestra la correlación entre las proporciones de células efectoras (razón E) y otros parámetros del donante. En cada gráfico, cada gráfico representa un donante de tejido distinto, y el eje vertical representa la razón E en el cultivo de primer pase. En la fila superior, el eje horizontal indica la densidad de células endoteliales de un donante, donde el coeficiente de correlación para la razón E y la densidad de células endoteliales de un donante es 0,4107. En la fila central, el eje horizontal indica la edad de un donante, donde el coeficiente de correlación para la razón E y la edad de un donante es 0,7333. En la fila inferior, el eje horizontal indica la muerte celular durante el período de conservación, donde el coeficiente de correlación para la razón E con la muerte celular durante el período de conservación es 0,0015.

[Figura 10-B]

La figura 10-B muestra los resultados del análisis FACS para tres tipos de moléculas asociadas al rechazo inmunitario de cinco lotes diferentes de células HCE cultivadas. La figura 10-B investiga qué subpoblación es adecuada para la infusión en pacientes en vista de la expresión de moléculas inmunológicas asociadas. El eje horizontal representa la intensidad de expresión de cada molécula asociada al rechazo inmunitario y el eje vertical representa el recuento de células correspondiente. La figura 10-B muestra, desde la izquierda, células endoteliales corneales humanas cultivadas de C18, C19, C16, C17 y n.º 118, y muestra, desde la parte superior, la expresión de HLAI, HLAII y PDL1 con un histograma rojo. MFI representa la intensidad de fluorescencia media para estas moléculas. El control se muestra con un histograma gris. HLAI y PDL1 son positivos para cada célula endotelial corneal humana cultivada, pero HLAII fue principalmente negativo.

[Figura 10-C]

La figura 10-C muestra imágenes de microscopio de fluorescencia e imágenes de microscopio de contraste de fase de células cultivadas de tejidos endoteliales de la córnea humana que comprenden células que han experimentado una transición de estado celular. El lado izquierdo de la fila superior muestra una imagen de microscopio de fluorescencia de células marcadas con anticuerpos IgG humanos que se han hecho reaccionar con suero de un individuo sano, el centro de la fila superior muestra una imagen de microscopio de fluorescencia de células marcadas con anticuerpos anti-IgM humana que se han hecho reaccionar con suero de un individuo sano, y el lado derecho de la fila superior muestra una imagen de microscopio de fluorescencia de células marcadas con DAPI que se han hecho reaccionar con suero de un individuo sano, el lado izquierdo de la fila inferior fusiona las tres imágenes de microscopio de fluorescencia en la fila superior, y el lado derecho de la fila inferior muestra una imagen de microscopio de contraste de fase. Dado que IgG e IgM se unen parcialmente a células cultivadas de tejido endotelial de la córnea humana que han experimentado una transición de fase, esto demuestra la presencia de un anticuerpo natural en el suero humano contra una célula que ha experimentado una transición de estado celular, no adecuado para la terapia de infusión.

[Figura 11-A]

La figura 11-A muestra que la expresión de CD44 disminuye gradualmente cuando se extiende el cultivo primario. La figura 11-A muestra el análisis FACS para CD166, CD24, CD105 y CD44 de cultivos recogidos en, desde la izquierda, la semana 1, semana 2 y semana 3 de cultivo.

[Figura 11-B]

La figura 11-B muestra el efecto debido a la presencia o ausencia de adición de diclorhidrato de [(R)-(+)-trans-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-ciclohexanocarboxamida monohidratado] (Y-27632) por imágenes de microscopio de contraste de fase y análisis FACS para CD166, CD24, CD105 y CD44. Y(+) indica la adición de Y-27632 e Y(-) indica que no hay adición de Y-27632. La barra de escala indica 200 microm.

[Figura 12-A]

La figura 12-A muestra que las subpoblaciones celulares con un área celular más pequeña se enriquecen añadiendo Y-27632 durante el cultivo. En las imágenes de microscopio de contraste de fase, el lado izquierdo muestra un caso en el que no se añadió Y-27632, y el lado derecho muestra un caso en el que se añadió Y-27632. La fila superior muestra imágenes de contraste de fase de cultivos en el día 47 de cultivo después de lavar con PBS. La fila inferior muestra la identificación de regiones celulares en las imágenes de la fila superior con el software de recuento de células híbridas BZ-H3C.

[Figura 12-B]

La figura 12-B muestra histogramas que demuestran que las subpoblaciones celulares con un área celular más

pequeña se enriquecen añadiendo Y-27632 durante el cultivo. -Y representa un caso en el que no se añadió Y-27632 y +Y representa un caso en el que se añadió Y-27632. El eje vertical indica el recuento de células y el eje horizontal indica el área celular.

[Figura 13]

La figura 13 muestra un ejemplo de aneuploidía de cariotipo. La parte superior izquierda muestra un cariotipo normal. La parte superior derecha muestra la pérdida del cromosoma Y. La parte inferior muestra trisomía en el cromosoma 20. Cuando se examina la preparación en la imagen superior izquierda, el número de cromosomas para 30 de las 30 células contadas fue 46. El cariotipado detallado dio como resultado 20 células con el número de cromosomas de 46 y XX. Cuando se examinó la preparación en la imagen superior derecha, el número de cromosomas para 50 de las 50 células contadas fue 45. El cariotipado detallado dio como resultado 20 células con el número de cromosomas de 45, X y -Y. Cuando se examinó la preparación en la imagen inferior, el número de cromosomas para 33 de las 50 células contadas fue 46 y el número de cromosomas para 17 células fue 45. El cariotipado detallado dio como resultado 8 de 20 células con el número de cromosomas de 47 y XX, y 12 células con el número de cromosomas de 46 y XX.

[Figura 14]

La figura 14 muestra un ejemplo típico de cariotipado. Se muestran el cariotipo detallado e imágenes de microscopio de contraste de fase de cada célula cultivada. a es una cHCEC de tercer pase de una mujer de 58 años, b es cHCEC de segundo pase de un hombre de 23 años, c es cHCEC de segundo pase de un hombre de 23 años de edad y d es cHCEC de tercer pase de una mujer de 15 años de edad.

[Figura 15]

La figura 15 muestra imágenes de microscopio de contraste de fase para diferentes cHCEC. La fila superior es el segundo pase de un donante masculino de 29 años. Las células presentan una morfología hexagonal sin signos de CST. La fila central es un tercer pase de una mujer de 22 años con morfología similar a CST anómala. La fila inferior es un quinto pase de un niño de 9 años con morfología similar a CST anómala. ECD significa la densidad celular en cultivos (células/microm^2)

[Figura 16]

La figura 16 muestra el análisis FACS para diferentes cHCEC. Los resultados del análisis FACS para a, b y c corresponden a las células cultivadas mostradas en las imágenes de microscopio de contraste de fase de a, b y c en la figura 15, respectivamente. La fila superior incluye la mayor parte de la subpoblación con CD44-. La fila central demuestra una subpoblación con principalmente CD44+++, un cultivo que contiene células con expresión intensa de CD24. La fila inferior es un cultivo que implica células con expresión intensa de CD26.

[Figura 17]

La figura 17 muestra imágenes de microscopio de contraste de fase e imágenes de observación cromosómica que muestran la aneuploidía de cariotipo observada cuando se cultiva una subpoblación específica. A muestra que las subpoblaciones de $CD44^{+++}$, $CD166^{+}$, $CD24^{-}$ y $CD26^{+}$ han perdido los cromosomas sexuales. B muestra que las subpoblaciones de $CD44^{+++}$, $CD166^{+}$, $CD24^{+}$ y $CD26^{-}$ (G3) presentan trisomía a una alta frecuencia en los cromosomas 6, 7 y 8. C muestra que las subpoblaciones $CD44^{-}$, $CD166^{+}$, $CD105^{-}$, $CD24^{-}$ y $CD26^{-}$ (G1) no presentan aneuploidía.

[Figura 18]

La figura 18 muestra imágenes de microscopio de contraste de fase para 4 tipos de cHCEC (C01, n.º 87, C03 y n.º C04) que caracterizan cHCEC de diferentes donantes.

[Figura 19]

La figura 19 muestra los resultados del análisis FACS para CD44, CD166, CD24, CD26 y CD105 de 2 tipos de cHCEC (el n.° 2 es de un donante de 57 años de edad, el n.º 4 es de un donante de 58 años) que caracterizan cHCEC de diferentes donantes.

[Figura 20]

La figura 20 muestra imágenes de microscopio de campo brillante (coloración por DAB) después de la inmunotinción para 2 tipos de cHCEC (el n.° 2 es de un donante de 57 años de edad, el n.º 4 es de un donante de 58 años) que caracterizan cHCEC de diferentes donantes, mostrando la tinción con anticuerpos para Na^{+}/K^{+} ATPasa, ZO1, Claudina10 y CD26. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina.

[Figura 21]

La figura 21 muestra la distribución de subpoblaciones en cultivo con o sin Y-27632.

[Figura 22-A]

La figura 22-A muestra que los cultivos sin un inhibidor de TGF-beta, SB431542, no inducen cambios morfológicos (CST) en células cultivadas. La figura 22A muestra imágenes de microscopio de contraste de fase para casos con o sin adición de SB431542, y resultados de análisis FACS para CD44, CD166, CD24, CD26 y CD105. SB4(+) representa la adición de SB431542 y SB4(-) representa la ausencia de adición de SB431542.

[Figura 22-B]

La figura 22-B muestra imágenes de microscopio de contraste de fase y los resultados de la selección por FACS de cHCEC de dos donantes diferentes (ambos de 22 años). Para cada cHCEC, se muestra una imagen de microscopio de contraste de fase a la izquierda y los resultados de la separación por FACS a la derecha. El cultivo se realizó sin Y-27632. La barra de escala indica 100 microm.

[Figura 22-C]

La figura 22-C muestra los resultados del cultivo de células recogidas de un sujeto de 71 años añadiendo continuamente Y-27632 durante todo el periodo de cultivo como en la figura 1. 22-B. Se muestra una imagen de células a la izquierda y los resultados de la selección por FACS para CD44, CD166, CD24, CD26 y CD105 se muestran a la derecha. La barra de escala indica 100 microm.

[Figura 22-D]

Figura 22-D muestra imágenes de microscopio representativas de cHCEC tratadas con dos tipos de agentes. En el diagrama superior, se muestran imágenes de microscopio de fluorescencia de cHCEC tratadas con tricostatina A (TSA) en la fila superior y las de cHCEC tratadas con Y-27632 se muestran en la fila inferior. La figura 22-D muestra, desde la izquierda, imágenes de fluorescencia de ZO-1, fluorescencia de Na+/K+ ATPasa, fluorescencia de DAPI e imágenes fusionadas de los mismos. La barra indica 100 microm. El diagrama inferior muestra imágenes de microscopio de contraste de fase de cHCEC tratadas con tricostatina A (TSA) o Y-27632, respectivamente.

[Figura 23]

La figura 23a muestra células con transición fenotípica positivas para c-Myc. El lado izquierdo muestra una imagen de contraste de fase, la parte central muestra la fluorescencia correspondiente a c-Myc y el lado derecho muestra la fluorescencia de DAPI. Las imágenes en la fila superior y la fila inferior muestran imágenes de microscopio de diferentes porciones. La evaluación inmunocitoquímica de la expresión de c-Myc de cHCEC cultivadas a granel confirmó la fluorescencia, indicando expresión de c-Myc en los sitios de formas similares a células transformadas morfológicamente en un microscopio de contraste de fase. La figura 23b es un diagrama que muestra la captación de glucosa de cHCEC cultivadas a granel mediante análisis de citometría de flujo. Las cHCEC desprendidas se incubaron con 2NBDG 600 microM durante 5, 10, 30 minutos a 37 grados C. Después de reemplazar el medio de cultivo por medio fresco con glucosa eliminada durante 15 minutos, las células se lavaron dos veces con tampón FACS frío (PBS que contenía BSA al 1 %), se resuspendió en tampón FACS enfriado con hielo y se sometió a citometría de flujo. Las muestras se analizaron usando BD FACS Canto II (BD Biosciences) en el intervalo de FITC (filtro paso banda de excitación 490 nm, emisión 525 nm). Las intensidades medias de fluorescencia de diferentes grupos se analizaron mediante el software BD FACS Diva y se corrigieron para la autofluorescencia de células no marcadas. Se presentó un único pico de captación de 2-NBDG en todos los tiempos de incubación. La figura 23b muestra, desde la izquierda, el grupo sin incubación, el grupo incubado durante 5 minutos, el grupo incubado durante 10 minutos y el grupo incubado durante 30 minutos.

[Figura 24-A]

La figura 24-A muestra los cambios morfológicos detectados por un microscopio de contraste de fase en cultivos de cHCEC en DMEM desprovisto de glucosa sin FBS en presencia de lactato. Después del pase a P3 en condiciones normales de cultivo, las células cultivadas se incubaron durante 72 horas con DMEM que contenía 10 mM de lactato y libre de glucosa. Las cHCEC resultantes se cultivaron adicionalmente en los tres pases de dilución distintos (1:3, 1:9, 1:30) en condiciones normales durante 4 semanas.

[Figura 24-B]

La figura 24-B muestra el filtrado inmunohistoquímico de Na^+/K^+-ATPasa antes y después de la privación de glucosa para evaluar la eliminación parcial de una subpoblación de cHCEC en cultivo a granel. Se usó Na^+/K^+-ATPasa como marcador relacionado con la función de HCEC. La eficacia de recuperación del efecto de la deleción dependía

claramente de la concentración del lactato añadido.

[Figura 25-A]

La figura 25-A es una imagen que muestra un cambio morfológico de cHCEC (n.° 55) antes y después del tratamiento con Lac. Izquierda: antes del tratamiento con Lac. Derecha: después del tratamiento con Lac.

[Figura 25-B]

La figura 25-B muestra los resultados del análisis del cambio en la expresión de un gen asociado con CST tal como EMT, senescencia celular y fibrosis en cHCEC (n.° 55) antes y después del tratamiento con Lac por PCR cuantitativa en tiempo real. La intensidad de expresión se muestra como una intensidad de expresión relativa mientras se asume la intensidad de expresión de cada gen antes del tratamiento como 1.

[Figura 25-C]

La figura 25-C muestra los resultados del análisis del cambio en la expresión de un gen asociado con CST tal como EMT, senescencia celular y fibrosis en cHCEC (n.° 55) antes y después del tratamiento con Lac por PCR cuantitativa en tiempo real. La intensidad de expresión se muestra como una intensidad de expresión relativa mientras se asume la intensidad de expresión de cada gen antes del tratamiento como 1.

[Figura 25-D]

La figura 25-D es un diagrama que muestra un cambio morfológico de cHCEC (n.° 72) antes y después del tratamiento con Lac. Izquierda: antes del tratamiento con Lac. Derecha: después del tratamiento con Lac.

[Figura 25-E]

La figura 25-E muestra los resultados del análisis del cambio en la expresión de un gen asociado con CST tal como EMT, senescencia celular y fibrosis en cHCEC (n.° 72) antes y después del tratamiento con Lac por PCR cuantitativa en tiempo real. La intensidad de expresión se muestra como una intensidad de expresión relativa mientras se asume la intensidad de expresión de cada gen antes del tratamiento como 1.

[Figura 25-F]

La figura 25-F muestra los resultados del análisis del cambio en la expresión de un gen asociado con CST tal como EMT, senescencia celular y fibrosis en cHCEC (n.° 72) antes y después del tratamiento con Lac por PCR cuantitativa en tiempo real. La intensidad de expresión se muestra como una intensidad de expresión relativa mientras se asume la intensidad de expresión de cada gen antes del tratamiento como 1.

[Figura 25-G]

La figura 25-G muestra los resultados del análisis del cambio en la expresión de un gen asociado con CST tal como EMT, senescencia celular y fibrosis en cHCEC (n.° 72) antes y después del tratamiento con Lac por PCR cuantitativa en tiempo real. La intensidad de expresión se muestra como una intensidad de expresión relativa mientras se asume la intensidad de expresión de cada gen antes del tratamiento como 1.

[Figura 25-H]

La figura 25-H muestra los resultados del análisis del cambio en la expresión de un gen asociado con CST tal como EMT, senescencia celular y fibrosis en cHCEC (n.° 72) antes y después del tratamiento con Lac por PCR cuantitativa en tiempo real. La intensidad de expresión se muestra como una intensidad de expresión relativa mientras se asume la intensidad de expresión de cada gen antes del tratamiento como 1.

[Figura 26-A]

La figura 26-A muestra las posiciones relativas de señalización de metabolitos intracelulares en tres lotes de cHCEC (164P1, C16P6 y C21P3; célula efectora, célula 1 con transición de estado celular y célula 2 con transición de estado celular, respectivamente) como análisis de PCA.

[Figura 26-B]

La figura 26-B muestra metabolitos típicos en un componente PC1 de una señal de metabolitos intracelulares en tres lotes de cHCEC (164P1, C16P6 y C21P3; célula efectora, célula 1 con transición de estado celular y célula 2 con transición de estado celular, respectivamente).

[Figura 26-C]

La figura 26-C muestra metabolitos típicos en un componente PC2 de una señal de metabolitos intracelulares en tres lotes de cHCEC (164P1, C16P6 y C21P3; célula efectora, célula 1 con transición de estado celular y célula 2 con transición de estado celular, respectivamente).

[Figura 26-D]

La figura 26-D es un diagrama que muestra un agrupamiento jerárquico (HCA) usando la intensidad estandarizada de cada metabolito en dos muestras cada una de cada lote. La alta intensidad estandarizada de cada metabolito se muestra en rojo y la baja intensidad estandarizada de cada metabolito se muestra en verde.

[Figura 26-E]

Las figuras 26-E, 26-F y 26-G son diagramas que muestran diferencias morfológicas en tres lotes de cHCEC con análisis de citometría de flujo. El análisis FACS de cada cHCEC se muestra en la fila inferior. Además, se muestra la composición de subpoblaciones de cada lote con expresión de antígenos de superficie celular clasificada por el mismo estándar que la figura 1.

[Figura 26-F]

Las figuras 26-E, 26-F y 26-G son diagramas que muestran diferencias morfológicas en tres lotes de cHCEC con análisis de citometría de flujo. El análisis FACS de cada cHCEC se muestra en la fila inferior. Además, se muestra la composición de subpoblaciones de cada lote con expresión de antígenos de superficie celular clasificada por el mismo estándar que la figura 1.

[Figura 26-G]

Las figuras 26-E, 26-F y 26-G son diagramas que muestran diferencias morfológicas en tres lotes de cHCEC con análisis de citometría de flujo. El análisis FACS de cada cHCEC se muestra en la fila inferior. Además, se muestra la composición de subpoblaciones de cada lote con expresión de antígenos de superficie celular clasificada por el mismo estándar que la figura 1.

[Figura 26-H]

La figura 26-H es un gráfico que muestra las cantidades de metabolitos que regulan las funciones fisiológicas intracelularmente relevantes y la razón de lactato/piruvato en cada lote de cHCEC. Los ejemplos de marcadores incluyen GSH/GSSG, glutatión total, NADP+, NADPH y NADPH/NADP.

[Figura 27-A]

La figura 27-A muestra una evaluación característica de un cambio de metabolito en diferentes lotes de cHCEC cultivadas en medio acondicionado. La figura 27-A muestra el agrupamiento jerárquico del perfil metabolómico. Se identificó un grupo de metabolitos que se correlacionaban con la presencia de CST. La alta intensidad de cada metabolito se muestra en rojo y la baja intensidad se muestra en verde. El grupo se dividió en al menos 4 subconjuntos de metabolitos: desde la parte superior, el metabolito aumentado en todas las cHCEC (n.° 66, n.º 72 y n.º 55), el metabolito aumentó principalmente en el n.º 72 y n.º 55 pero no en el n.º 66, metabolito que disminuyó más notablemente en el n.º 66 y metabolito que generalmente está presente en los tres grupos.

[Figura 27-B]

La figura 27-B es un gráfico que muestra que la razón de lactato/piruvato es mayor en células 1 y 2 con transición de estado celular que en células efectoras.

[Figura 27-C]

Figura 27-C proporciona imágenes de microscopio que muestran la morfología del n.° 66, n.º 72 y n.º 55.

[Figura 28-A]

Las figuras 28-A y 28-B muestran los resultados del análisis FACS en cHCEC sin células CD44+++, células CD24+ o células CD26+ como cuatro cHCEC distintas con diferentes composiciones de subpoblaciones producidas en la condición GMP. Los valores basales de la intensidad de expresión de CD166, CD24, CD26, CD44 y CD105 fueron como se describieron anteriormente. La figura 28-A muestra la composición de cada una de las células efectoras, células intermediamente diferenciadas, células no previstas en cada lote basándose en su expresión de CD de superficie.

[Figura 28-B]

Las figuras 28-A y 28-B muestran los resultados del análisis FACS en cHCEC sin células CD44+++, células CD24+ o células CD26+ como cuatro cHCEC distintas con diferentes composiciones de subpoblaciones producidas en la condición GMP. Los valores basales de la intensidad de expresión de CD166, CD24, CD26, CD44 y CD105 fueron como se describieron anteriormente. La figura 28-B muestra la composición de cada una de las células efectoras, células intermediamente diferenciadas, células no previstas en cada lote basándose en su expresión de CD de superficie.

[Figura 28-C]

Las figuras 28-C y 28-D muestran los resultados del análisis FACS en cHCEC sin células CD44+++, células CD24+ o células CD26+ como cuatro cHCEC distintas con diferentes composiciones de subpoblaciones producidas en la condición GMP. Los valores basales de la intensidad de expresión de CD166, CD24, CD26, CD44 y CD105 fueron como se describieron anteriormente. La figura 28C muestra la composición de cada una de las células efectoras, células intermediamente diferenciadas, células no previstas en cada lote basándose en su expresión de CD de superficie.

[Figura 28-D]

Las figuras 28-C y 28-D muestran los resultados del análisis FACS en cHCEC sin células CD44+++, células CD24+ o células CD26+ como cuatro cHCEC distintas con diferentes composiciones de subpoblaciones producidas en la condición GMP. Los valores basales de la intensidad de expresión de CD166, CD24, CD26, CD44 y CD105 fueron como se describieron anteriormente. La figura 28-D muestra la composición de cada una de las células efectoras, células intermediamente diferenciadas, células no previstas en cada lote basándose en su expresión de CD de superficie.

[Figura 28-E]

La figura 28-E muestra el agrupamiento jerárquico para cuatro cHCEC y medios acondicionados con diferentes composiciones de subpoblaciones. La alta intensidad de cada metabolito se muestra en rojo y la baja intensidad estandarizada de cada metabolito se muestra en verde. El grupo se dividió en cuatro subgrupos de metabolitos.

[Figura 28-F]

La figura 28-F muestra el análisis de PCA para cuatro cHCEC y medios acondicionados con diferente composición de subpoblaciones.

[Figura 28-G]

La figura 28-G muestra metabolitos principales que se correlacionan con PC1 y PC2 en análisis de PCA para cuatro cHCEC con diferentes composiciones de subpoblaciones.

[Figura 28-H]

La figura 28-H muestra, en la fila superior, la diferencia en la razón de citrato/lactato entre C21, C22, C23 y C24, que son diferentes solo en la proporción de CD44- con respecto a CD44+ frente a CD44++, y muestra, en la fila inferior, la diferencia en la razón de citrato/lactato entre el n.º 66, n.º 55 y n.º 72, que son diferentes en el contenido de la subpoblación CD44+++.

[Figura 29-A]

La figura 29-A muestra imágenes de microscopio de 665C (célula efectora), 3411 (lote de cultivo con subpoblación de células de cultivo constituyentes desconocida), 675A (lote de cultivo compuesto por una subpoblación de células de cultivo con transición de estado celular reconocida morfológicamente) y C1121 (célula con transición de estado que comprende una agrupación de isla (que se supone que es una célula senescente)).

[Figura 29-B]

La figura 29-B es un gráfico de dispersión de las cantidades relativas de diversos miR intracelulares para comparar perfiles de miR intracelulares detectados usando 3D gene (Toray) entre células efectoras (n.° 66 P5) y cHCEC con subpoblación de células constituyentes desconocida (2911, 3411 y 3511). El eje horizontal es la cantidad relativa de miR en las células efectoras. El eje vertical es la cantidad relativa de miR en el lote de cultivo con subpoblación constituyente desconocida.

[Figura 29-C]

La figura 29-C es un gráfico de dispersión de las cantidades relativas de diversos perfiles de miR intracelulares detectados usando 3D gene (Toray) entre células efectoras (n.° 66 P5) y cHCEC compuestas por una subpoblación de células de cultivo con transición de estado celular reconocida morfológicamente (675A1-A3). El eje horizontal es la cantidad relativa de miR en las células efectoras. El eje vertical es la cantidad relativa de miR en el lote de cultivo compuesto por una subpoblación de cHCEC con transición de estado celular reconocida morfológicamente.

[Figura 29-D]

La figura 29-D es un gráfico de dispersión de las cantidades relativas de diversos perfiles de miR intracelulares detectados usando 3D gene (Toray) entre células efectoras (n.º 66 P5) y células con transición de estado celular que comprenden un grupo de islas (C1121 y C1122). El eje horizontal es la cantidad relativa de miR en las células efectoras. El eje vertical es la cantidad relativa de miR en las células con transición de estado celular que comprenden un grupo de islas.

[Figura 30-A]

La figura 30-A muestra una composición de subpoblaciones basada en la expresión de CD medida por FACS de a5 sometido a análisis de 3D gene. La imagen en la fila superior muestra la morfología de a5, y las imágenes en la fila inferior muestran la expresión de CD medida por FACS. Los valores basales de la intensidad de expresión de CD166, CD24, CD26, CD44 y CD105 fueron como se describieron anteriormente. a5 contiene una subpoblación compuesta principalmente por CD44-CD24-CD26-.

[Figura 30-B]

La figura 30-B muestra una composición de subpoblaciones basada en la expresión de CD medida por FACS de a1 sometido a análisis de 3D gene. La imagen en la fila superior muestra la morfología de a1, y las imágenes en la fila inferior muestran la expresión de CD medida por FACS. Los valores basales de la intensidad de expresión de CD166, CD24, CD26, CD44 y CD105 fueron como se describieron anteriormente. a1 contiene una subpoblación compuesta principalmente por CD44++CD24-CD26-.

[Figura 30-C]

La figura 30-C muestra una composición de subpoblaciones basada en la expresión de CD medida por FACS de a2 sometido a análisis de 3D gene. La imagen en la fila superior muestra la morfología de a2, y las imágenes en la fila inferior muestran la expresión de CD medida por FACS. Los valores basales de la intensidad de expresión de CD166, CD24, CD26, CD44 y CD105 fueron como se describieron anteriormente. a2 contiene una subpoblación compuesta principalmente por CD44+++CD24-CD26++.

[Figura 31-A]

La figura 31-A es una tabla que resume la intensidad de expresión relativa de diversos miR intracelulares de la familia miR378 en células a5, a1 y a2.

[Figura 31-B]

La figura 31-B muestra la clasificación de miARN intracelular en cinco clases por el cambio en la intensidad de expresión entre cada célula. La expresión de cada miR intracelular se clasifica como se muestra debajo de cada gráfico.

[Figura 32-A]

La figura 32-A es una imagen que muestra la morfología del n.º 66 P4 (célula efectora, cuarto pase), n.º 66 P5 (célula efectora, quinto pase), C11 P2 (segundo pase), C09 P2 (segundo pase), n.º 55 P5 (quinto pase) y n.º 73 P2 (segundo pase).

[Figura 32-B]

La figura 32-B es un diagrama que muestra la intensidad de expresión relativa de miR en el sobrenadante de cultivo de cada célula del n.º 66 P4 (célula efectora, cuarto pase), n.º 66 P5 (célula efectora, quinto pase), C11 P2 (segundo pase), C09 P2 (segundo pase), n.º 55 P5 (quinto pase) y n.º 73 P2 (segundo pase). El miR secretado muestra un patrón de cambio en la expresión que es característico para cada célula. La intensidad de expresión relativa se representa con la intensidad de expresión en el n.º 66 P4 (célula efectora, cuarto pase) como 1.

[Figura 33-A]

Las figuras 33-A a 33-B muestran un patrón de varios miR secretados que tienen una clara tendencia de expresión para cada célula. La figura 33-A muestra un resumen de un cambio en un patrón de expresión de miR secretado.

[Figura 33-B]

Las figuras 33-A a 33-B muestran un patrón de varios miR secretados que tienen una clara tendencia de expresión para cada célula. La figura 33-B muestra un gráfico que indica la intensidad de expresión específica para cada célula de miR secretado que pertenece a cada patrón.

[Figura 34-A]

La figura 34-A muestra una comparación de perfiles de miR en tejidos endoteliales corneales frescos. La figura 34-A es un gráfico de dispersión que muestra una comparación de perfiles de miR de tejidos con niveles intermedios de ECD con gutatta y tejidos con niveles bajos de ECD (ECD 378) con gutatta.

[Figura 34-B]

La figura 34-B muestra una comparación de perfiles de miR en tejidos endoteliales corneales frescos. La figura 34-B es un gráfico de dispersión que muestra una comparación de perfiles de miR de tejidos con bajo nivel de ECD (ECD 378) con gutatta y tejidos normales.

[Figura 34-C]

La figura 34-C es un gráfico que muestra la expresión de miR-378a-5p para tejidos del epitelio corneal, tejidos del endotelio corneal de un neonato, individuo joven, adulto y tejidos de endotelio corneal adulto con un nivel de ECD diferente con gutatta. El miR de la familia 378 regulado por incremento en los tejidos del endotelio corneal con respecto a tejidos del epitelio se redujo drásticamente en el tejido del endotelio con menor ECD con gutatta.

[Figura 34-D]

La figura 34-D es un gráfico que muestra la expresión de miR-378f para tejidos del epitelio corneal, tejidos del endotelio corneal de un neonato, individuo joven, adulto y endotelios corneales adultos con un nivel de ECD diferente con gutatta. El miR de la familia 378 regulado por incremento en los tejidos del endotelio corneal con respecto a los tejidos del epitelio se redujo drásticamente en el tejido del endotelio con tejido de menor ECD que con gutatta.

[Figura 34-E]

La figura 34-E es un gráfico que muestra la expresión de miR-146b-5p para tejidos del epitelio corneal, tejidos del endotelio corneal de un neonato, individuo joven, adulto y tejidos de endotelio corneal adulto con un nivel de ECD diferente con gutatta.

[Figura 34-F]

La figura 34-F es un gráfico que muestra la expresión de miR-146b-3p para tejidos del epitelio corneal, tejidos del endotelio corneal de un neonato, individuo joven, adulto y tejidos de endotelio corneal adulto con un nivel de ECD diferente con gutatta.

[Figura 34-G]

La figura 34-G proporciona imágenes que muestran la morfología de las células con ECD378, ECD1552 y ECD2457 en la columna izquierda. La columna derecha de la figura 34-G muestra los resultados de Q-RT-PCR para la familia miR378 (a-3p, e y f) en tejido normal, tejido con ECD795 y tejido con ECD1410. La intensidad de expresión se muestra en cantidades relativas mientras se asume la intensidad de expresión en tejido normal como 1.

[Figura 35-A]

La figura 35-A es una imagen que muestra la morfología de 66P5 (célula efectora, quinto pase) y 67P5 (célula con CST claramente reconocida, quinto pase).

[Figura 35-B]

La figura 35-B es un gráfico de dispersión que muestra la diferencia en la intensidad de expresión de diversos genes entre 66P5 (células efectoras, quinto pase) y 67P5 (célula con CST claramente reconocida, quinto pase).

[Figura 35-C]

La figura 35-C es un diagrama que muestra los resultados de la transfección preliminar de miméticos de miR378a-3p o 5f en la subpoblación de cHCEC CD44+++ que no se detectaron para la expresión de miR378a-3p o 5f. La figura 35-C muestra mapas de calor de firmas génicas después de la transfección de dos miméticos de miR, que se sometieron a ensayo con una matriz de PCR de senescencia, EMT, fibrosis, p53 y EMA. Las células transfectadas muestran una regulación por incremento de numerosas firmas génicas tales como colágeno, ITG, y familias de MMP y CD44. Para cada célula y gen, el rojo indica una expresión relativamente alta y el verde indica una expresión relativamente baja.

[Figura 35-D]

La figura 35-D muestra patrones de expresión clasificados de miR secretados diferentes en cada subpoblación (efector, intermediamente diferenciada, CD44+++). El miR en el sobrenadante de cultivo para cada subpoblación se clasifica en seis patrones como se muestra en la figura 35-D.

[Figura 35-E]

La fila superior de la figura 35-E muestra las imágenes morfológicas y el contenido de subpoblaciones con un nivel distinto de expresión de marcadores de CD en diferentes lotes de cultivo de cHCEC, a1, a2 y a5. La fila inferior de la figura 35-E es un gráfico de volcán que compara los perfiles de expresión de miR entre el sobrenadante de cultivo de los cultivos, a1, a2 y a3 que se muestran en A.

[Figura 36]

La figura 36 muestra un diagrama esquemático del ensayo de adhesión celular por centrifugación para someter a prueba la capacidad de unión de HCEC. Se añadieron HCEC cultivadas a placas de 96 pocillos con fondo en U previamente recubiertas con colágenos, lamininas o proteoglicanos. Las placas se centrifugaron después. Las células adherentes se evaluaron bajo un microscopio de contraste de fase.

[Figura 37]

La figura 37 muestra HCEC cultivadas unidas a laminina en un ensayo de centrifugación. La fila superior muestra los resultados de la unión a una placa recubierta a una concentración de 2 nM, y la fila inferior muestra los resultados de la unión a una placa recubierta a una concentración de 5 nM. La figura 37 muestra, desde la izquierda, laminina-521, laminina-511, laminina-411, laminina 332 y BSA.

[Figura 38]

La figura 38 muestra la unión de HCEC cultivadas a laminina 521 y laminina 511 de una manera dependiente de la concentración en un ensayo de centrifugación. La fila superior muestra la unión de HCEC cultivadas a laminina-521, y la fila inferior muestra la unión de HCEC cultivadas a laminina-511. La figura 38 muestra, desde la izquierda, la concentración de recubrimiento de laminina, 500 pM, 100 pM, 20 pM, 4 pM, 0,8 pM y 0 pM.

[Figura 39]

La figura 39 muestra la unión de HCEC cultivadas a colágeno de tipo IV de una manera dependiente de la concentración en un ensayo de centrifugación. La figura 39 muestra, desde la izquierda, la concentración de recubrimiento de colágeno de tipo IV, 4000 ng/ml, 1000 ng/ml, 250 ng/ml, 62,5 ng/ml y 0 ng/ml.

[Figura 40]

La figura 40 muestra la unión de HCEC cultivadas a diversos proteoglicanos y glicoproteínas en un ensayo de centrifugación. La figura 40 muestra, desde la izquierda, el recubrimiento con agrina, nidógeno-1, fibulina 5, TSP-1, perlecano y BSA (todos con una concentración de recubrimiento de 400 nM).

[Figura 41]

La figura 41 muestra la unión de HCEC cultivadas en diferentes medios a laminina-411. La figura 41 muestra, desde la izquierda, Opti-MEM, Opeguard-MA y BSS. Se usaron concentraciones de laminina 411 de 5 nM, 1,25 nM y 0 nM.

[Figura 42]

La figura 42 muestra un cambio en la afinidad de unión de HCEC cultivadas a laminina-511 en presencia o ausencia de adición de albúmina sérica humana (HSA), ácido ascórbico, lactato (un constituyente del humor acuoso). Se usaron concentraciones de laminina-511 de 0,8 nM, 0,2 nM y 0,05 nM.

[Figura 43]

La figura 43 muestra un cambio en la afinidad de unión de HCEC cultivadas a laminina-411 en presencia o ausencia de adición de albúmina sérica humana (HSA), ácido ascórbico, lactato (un constituyente del humor acuoso). Se usaron concentraciones de laminina-411 de 5 nM, 1,25 nM y 0 nM.

[Figura 44]

La figura 44 muestra una subpoblación de cHCEC con una forma hexagonal sin signos de CST que se preparó mediante clasificación de células con perlas magnéticas (MACS). El panel izquierdo muestra una imagen de microscopio de contraste de fase de subpoblaciones de cHCEC sin signos de CST. La barra de escala en la fila superior indica 500 microm y la barra de escala en la fila inferior indica 100 microm. El panel derecho muestra los resultados de la citometría de flujo para medir la pureza de la subpoblación de cHCEC proporcionada para el análisis.

[Figura 45]

La figura 45 muestra imágenes representativas de microscopio de fluorescencia de dos subpoblaciones. La fila superior muestra la subpoblación de la figura 44, y la fila inferior muestra la subpoblación de la figura 46. La figura 45 muestra, desde la izquierda, la fluorescencia de ZO-1, fluorescencia de Na^+/K^+ATPasa, fluorescencia de DAPI y una imagen fusionada de los mismos. La barra indica 50 microm.

[Figura 46]

La figura 46 muestra una subpoblación con un fenotipo EMT preparada por clasificación de células con perlas magnéticas (MACS). El lado izquierdo muestra una imagen de microscopio de contraste de fase de una subpoblación con un fenotipo EMT. La barra de escala en la fila superior indica 500 microm y la barra de escala en la fila inferior indica 100 microm. El panel derecho muestra los resultados de la citometría de flujo para medir la pureza de una subpoblación proporcionada para el análisis.

[Figura 47]

La figura 47 muestra una comparación de la capacidad de unión de las subpoblaciones de HCEC con un constituyente de la membrana de Descemet. Panel superior: cada subpoblación usada se examinó mediante preparación controlando las condiciones de cultivo o mediante clasificación magnética de células y tinción de células con un marcador de superficie celular. Posteriormente, se realizó un ensayo de adhesión de celular por centrifugación. Se usaron una subpoblación de HCEC madura y una subpoblación de fenotipo EMT. Panel inferior: La capacidad de unión de las subpoblaciones de HCEC a laminina y colágeno de tipo IV se comparó mediante un ensayo de adhesión celular por centrifugación. El índice de unión se calculó de la siguiente manera. Índice de unión = (.delta.base (laminina o colágeno)-.delta.BSA)/.delta.BSA. .delta.(letra griega) indica área.

[Figura 48]

La figura 48 muestra la expresión de subunidades de integrina alfa en una subpoblación de HCEC. La fila superior muestra la expresión de integrina alfa2, la fila central muestra la expresión de integrina alfa3 y la fila inferior muestra la expresión de integrina alfa6. La columna izquierda indica fenotipo maduro y la columna derecha indica fenotipo EMT.

[Figura 49-A]

Figura 49-A muestra la expresión de marcadores de superficie celular e imágenes de microscopio de contraste de fase de cHCEC usadas en el ejemplo 7. El análisis FACS se realizó de la siguiente manera. Las células se desprendieron de la placa de cultivo para analizar la expresión de CD166, CD24, CD44, CD105 y CD26 por FACS.

[Figura 49-B]

La figura 49-B muestra la expresión de marcadores de superficie celular e imágenes de microscopio de contraste de fase de cHCEC usadas en el ejemplo 7. El análisis FACS se realizó de la siguiente manera. Las células se desprendieron de la placa de cultivo para analizar la expresión de CD166, CD24, CD44, CD105 y CD26 por FACS.

[Figura 50]

La figura 50 muestra la célula unida a los núcleos del endotelio, la claridad corneal y el grosor corneal central en la superficie endotelial después del daño por congelación por criotratamiento en el endotelio. Las córneas montadas horizontalmente 24-72 horas después del daño por congelación se tiñeron con DAPI para observar la pérdida y recuperación de células endoteliales de ratón. (A) Las líneas de puntos blancas indican la región donde se pierde el endotelio (a, d y g). La línea de puntos y los cuadrados de línea continua (a, d y g) de tejido montado horizontalmente

indican las regiones en la figura 50 (b), (e) y (h), y la figura 50 (c), (f) e (i), respectivamente. Las flechas indican el borde periférico entre los endotelios normales y los endotelios perdidos. (B) muestra la apariencia clínica después de la inyección de 0-2,0 X 10^4 HCEC en un ojo con daño por congelación (24 horas, 48 horas y 72 horas). (C) muestra el grosor corneal antes y después de la inyección (24 horas, 48 horas y 72 horas) (*p < 0,05).

[Figura 51]

La figura 51(A) muestra la claridad corneal 48 horas después de la infusión de cHCEC en diferentes vehículos de suspensión celular. Los ojos de BALB/c se dañaron por congelación, se suspendieron 2,0 x 10^4 HCEC en Opti-MEM (a) y Opeguard MA (b) y se inyectaron en la cámara anterior. Como control, solo se inyectó Opeguard MA libre de células (c) en la cámara anterior (para cada caso, N=3). La figura 51(B) realizó un experimento similar a (A) suspendiendo células en Opti-MEM (a) y Opeguard F (b). Como control, solo se inyectó Opeguard F libre de células (c) en la cámara anterior (para cada caso, N=3).

[Figura 52]

La figura 52(A) muestra el grosor corneal después de la infusión de cHCEC en diferentes vehículos de suspensión celular. Los ojos de BALB/c se dañaron por congelación, se suspendieron 2,0 x 10^4 HCEC en Opti-MEM (a) y Opeguard MA (b) y se inyectaron en la cámara anterior. Como control, solo se inyectó Opeguard MA libre de células (c) en la cámara anterior (para cada caso, N=3). La figura 52(B) realizó un experimento similar al de la figura 52(A) suspendiendo células en Opti-MEM (a) y Opeguard F (b). Como control, solo se inyectó Opeguard F libre de células (c) en la cámara anterior (para cada caso, N=3). Se evaluó el grosor corneal antes de la inyección, después de 24 horas y después de 48 horas. * indica una diferencia estadística significativa (p < 0,05).

[Figura 53]

La figura 53(A) proporciona imágenes de microscopio de fluorescencia que muestran la adhesión de HCEC infundidas en la cámara anterior en diferentes vehículos de suspensión celular. Los ojos de BALB/c se dañaron por congelación, se suspendieron 2,0 X 10^4 HCEC en Opti-MEM (a) y Opeguard MA (b) y se inyectaron en la cámara anterior. Como control, solo se inyectó Opeguard MA libre de células (c) en la cámara anterior (para cada caso, N=3). La figura 53(B) realizó un experimento similar a 53(A) suspendiendo células en Opti-MEM (a) y Opeguard F (b). Como control, solo se inyectó Opeguard F libre de células (c) en la cámara anterior (para cada caso, N=3). Inmediatamente después de evaluar la claridad corneal y el grosor corneal después de 48 horas, estas córneas se tiñeron con anticuerpo nuclear anti-humano (identificación de HCEC inyectadas y distinción de CEC derivadas del huésped) y DAPI. Los círculos de línea de puntos indican regiones con daño por congelación. DAPI (rojo), anticuerpo nuclear anti-humano (verde) y la imagen fusionada muestra diagramas expandidos de gran aumento de regiones cuadradas blancas en la imagen de DAPI (azul).

[Figura 54-A(a)]

La figura 54-A(a) a 54-A(b) muestra los resultados del análisis de las firmas de ARNm y miARN del tejido de endotelio (Endo)/epitelio (EP) corneal humano y cHCEC mediante 3D-Gene. El análisis se realizó con Human_25K_Ver 2.1 y Human_miRNA_Ver 17. La figura 54-A(a) muestra los coeficientes de correlación de ARNm (parte superior izquierda) y miARN (parte superior derecha) entre cada uno de los seis tejidos endoteliales de la córnea humana y cinco tejidos epiteliales de la córnea humana, y los coeficientes de correlación de las firmas de ARNm (parte inferior izquierda) y miARN (parte inferior derecha) entre cada uno de los tejidos frescos de siete donantes.

[Figura 54-A(b)]

La figura 54-A(a) a 54-A(b) muestra los resultados del análisis de las firmas de ARNm y miARN del tejido de endotelio (Endo)/epitelio (EP) corneal humano y cHCEC mediante 3D-Gene. El análisis se realizó con Human_25K_Ver 2.1 y Human_miRNA_Ver 17. La figura 54-A(b) muestra los coeficientes de correlación de las firmas de ARNm (izquierda) y miARN (derecha) entre cada uno de los seis tejidos frescos, tres cHCEC normales y tres cHCEC que han experimentado una transición de estado celular.

[Figura 54-B]

La figura 54-B muestra los resultados del análisis de las firmas de ARNm y miARN de tejido de endotelio (Endo)/epitelio (EP) corneal humano y cHCEC mediante 3D-Gene. El análisis se realizó con Human_25K_Ver 2.1 y Human_miRNA_Ver 17. La figura 54-B muestra gráficos de dispersión de genes Endo, EP y cHCEC y perfiles de expresión de miR. Los valores son valores promedio después de la normalización global. Se muestran líneas rectas que representan un cambio de 2 veces y un cambio de 1/2 vez en los diagramas de dispersión.

[Figura 55-A]

La figura 55-A a 55-B muestra la comparación de firmas génicas entre cHCEC sin CST (n.° 14, n.º 18 y n.º 19) y con

CST (n.º 29, n.º 34 y n.º 35) y tejidos frescos (tejido endo de 8 y 9 de 20Y y 12 de 12Y) usando una matriz de PCR de RT2 profiler para senescencia, EMT y fibrosis. En la figura 55-A, (1) muestra imágenes de microscopio de contraste de fase de, desde la izquierda, n.º 14 tercer pase, n.º 18 tercer pase y n.º 19 tercer pase. (2) muestra imágenes de microscopio de contraste de fase de, desde la izquierda, n.º 29 primer pase, n.º 34 primer pase y n.º 35 primer pase.

[Figura 55-B]

La figura 55-A a 55-B muestra la comparación de firmas génicas entre cHCEC sin CST (n.° 14, n.º 18 y n.º 19) y con CST (n.º 29, n.º 34 y n.º 35) y tejidos frescos (tejido endo de 8 y 9 de 20Y y 12 de 12Y) usando una matriz de PCR de RT2 profiler para senescencia, EMT y fibrosis. En la figura 55-B, ARNm extraído de cHCEC sin CST y con CST, y se usaron tejidos Endo frescos para analizar la senescencia, EMT y fibrosis mediante una micromatriz. Se usó agrupamiento jerárquico para comparar firmas génicas, que se muestran como mapas de calor. El rojo indica una intensidad de expresión relativamente alta y el verde indica una intensidad de expresión relativamente baja.

[Figura 56-A]

La figura 56-A muestra los resultados de comparar la expresión de cada ARNm en las dos cHCEC (n.° 66 quinto pase (célula efectora) y n.° 67 quinto pase con CST) mediante qRT-PCR. a muestra imágenes de microscopio de contraste de fase del n.º 66 quinto pase y n.º 67 quinto pase. Estos dos cultivos eran morfológicamente diferentes. b es el resultado de medir y comparar la intensidad de expresión del ARNm para algunos de los 50 genes candidatos mediante qRT-PCR. En cada gráfico de barras, la columna izquierda representa el n.º 66 quinto pase y la barra derecha representa el n.º 67 quinto pase. El eje vertical representa la intensidad de expresión relativa del ARNm mientras se asume la intensidad de expresión del n.° 66 quinto pase como 1.

[Figura 56-B]

La figura 56-B es una tabla que resume genes con diferente intensidad de expresión de ARNm entre el n.º 66 y n.º 67.

[Figura 57-A]

La figura 57-A muestra imágenes de cultivos proporcionados para el análisis de genes seleccionados mediante qRT-PCR. En la figura 57-A, las imágenes de microscopio de contraste de fase de cada cultivo se muestran con el número de donante, el número de pases y los puntos asignados para la clasificación morfológica de cHCEC. Un punto más alto significa una mayor calidad de cHCEC.

[Figura 57-B]

La figura 57-B muestra gráficos de la intensidad de expresión de genes seleccionados mediante qRT-PCR entre cHCEC clasificados morfológicamente. En la figura 57-B, el eje vertical muestra la intensidad relativa de la expresión génica mientras se asume la intensidad de expresión del n.° 66 quinto pase como 1 para cada gen, y el eje horizontal muestra el tipo de cultivo del que se extrajo el ARNm. Los cultivos con 10 puntos se muestran con una columna clara y los cultivos con 0-8 puntos se muestran con una columna oscura.

[Figura 58-A]

La figura 58-A muestra imágenes de cultivos proporcionados para el análisis de células seleccionadas mediante qRT-PCR entre las cHCEC fabricadas en un centro de procesamiento celular bajo GMP. a muestra imágenes de microscopio de contraste de fase del n.º 66 quinto pase, C09 (de un donante de 16 años) tercer pase y C11 (de un donante de 26 años) tercer pase. Los niveles de expresión de miR se evaluaron mediante qRT-PCR. Para cada columna para cada gen, las columnas representan, desde la izquierda, pocillo de cultivo A para el n.º 66 quinto pase, pocillo de cultivo C para el n.º 66 quinto pase, C09 (de un donante de 16 años) tercer pase y C11 (de un donante de 26 años) tercer pase. El eje vertical representa la intensidad relativa de la expresión génica mientras se asume la intensidad de expresión del pocillo de cultivo A del n.º 66 quinto pase como 1.

[Figura 58-B]

La figura 58-B es una tabla que resume genes con alta expresión en cada cultivo como resultado del análisis de cHCEC mediante qRT-PCR entre cHCEC fabricadas en un centro de procesamiento celular bajo GMP.

[Figura 59-A]

La figura 59-A muestra los resultados del análisis de la cantidad de citocinas en el sobrenadante de HCEC cultivadas n.° 82 (P0-P3, donante de 72 años de edad, ECD = 3192/3409), n.º 84 (P0-3, donante de 75 años de edad, ECD = 2598) y n.º 88 (P0-3, donante de 10 años de edad, ECD = 3879) por Bio-Plex. A, B, C, D, E muestran resultados cuantitativos para IL-6, IFN-gamma, MCP-1, PDGF-bb y MIP-1b, respectivamente.

[Figura 59-B]

Las figuras 59-B a 59-C muestran un ensayo ELISA en sobrenadante de cultivo para evaluar la calidad de las cHCEC. La cuantificación se repitió tres veces mediante ELISA. Los gráficos muestran la cantidad de IL8, PDGFbb o MCP1 secretada en el cultivo de C17, C18, C23 o C24. P1 indica el primer pase, P2 indica el segundo pase y P3 indica el tercer pase. La cuantificación se realizó en cultivos con diversos días de cultivo.

[Figura 59-C]

Las figuras 59-B a 59-C muestran un ensayo ELISA en sobrenadante de cultivo para evaluar la calidad de las cHCEC. La cuantificación se repitió tres veces mediante ELISA. Los gráficos muestran la cantidad de IL8, PDGFbb o MCP1 secretada en el cultivo de C17, C18, C23 o C24. P1 indica el primer pase, P2 indica el segundo pase y P3 indica el tercer pase. La cuantificación se realizó en cultivos con diversos días de cultivo.

[Figura 60-A]

Las figuras 60-A a 60-B muestran un ensayo ELISA de sobrenadante de cultivo para evaluar la calidad de las cHCEC. La cuantificación se repitió tres veces. Los gráficos muestran la cantidad de TIMP1, IL8, PDGFbb o MCP1 secretada en cada cultivo. Las figuras 60-A a 60-B muestran, desde la parte superior, la semana 4 de C14 tercer pase, la semana 4 de C15 tercer pase, el día 27 de C24 tercer pase, el día 31 de C23 segundo pase y el día 45 de C32 segundo pase.

[Figura 60-B]

Las figuras 60-A a 60-B muestran un ensayo ELISA de sobrenadante de cultivo para evaluar la calidad de las cHCEC. La cuantificación se repitió tres veces. Los gráficos muestran la cantidad de TIMP1, IL8, PDGFbb o MCP1 secretada en cada cultivo. Las figuras 60-A a 60-B muestran, desde la parte superior, la semana 4 de C14 tercer pase, la semana 4 de C15 tercer pase, el día 27 de C24 tercer pase, el día 31 de C23 segundo pase y el día 45 de C32 segundo pase.

[Figura 61-A]

La figura 61-A muestra diagramas de perfiles de citocinas. La figura 61-A muestra perfiles de niveles de citocinas de suero de pacientes infundidos con una cHCEC de baja calidad. La figura 61-A muestra una comparación de perfiles de antes de la infusión de cHCEC, 2 días después de la cirugía, 1 semana después de la cirugía y 1 mes después de la cirugía. La cantidad de citocinas en el suero de los pacientes en cada momento está representada por un valor relativo. La figura 61A muestra que células de baja calidad provocan una respuesta biológica no deseada.

[Figura 61-B]

La figura 61-B muestra diagramas de perfiles de citocinas. La figura 61-B muestra perfiles de niveles de citocinas de suero de pacientes infundidos con una cHCEC de baja calidad. La figura 61-B muestra un ejemplo de cirugía que es diferente de la de la figura 61-A. La figura 61-B muestra una comparación de los perfiles de citocinas en suero antes de la cirugía de infusión de cHCEC, 2 días después de la cirugía, 1 semana después de la cirugía y 1 mes después de la cirugía. La cantidad de citocinas en el suero de los pacientes en cada momento está representada por un valor relativo. La figura 61-B muestra que una célula de baja calidad provoca una respuesta biológica no deseada.

[Figura 62]

Las figuras 62 y 63 muestran diagramas de perfiles de citocinas. Las figuras 62 a 63 muestran perfiles de niveles de citocinas de suero de pacientes infundidos con cHCEC de alta calidad. Las figuras 62 a 63 muestran una comparación de perfiles de antes de la cirugía de infusión de cHCEC, 2 días después de la cirugía y 1 semana después de la cirugía. La cantidad de citocinas en el suero de los pacientes en cada momento está representada por un valor relativo. Las figuras 62 a 63 muestran que una célula de alta calidad tiende a no provocar una respuesta biológica no deseada.

[Figura 63]

La figura 63 muestra diagramas de perfiles de citocinas. La figura 63 muestra perfiles de niveles de citocinas de suero de pacientes infundidos con cHCEC de alta calidad. La figura 63 muestra un ejemplo de cirugía que es diferente de la de la figura 62. La figura 63 muestra una comparación de perfiles antes de la cirugía de infusión de cHCEC, 2 días después de la cirugía y 1 semana después de la cirugía. La cantidad de citocinas en el suero de los pacientes en cada momento está representada por un valor relativo. La figura 63 muestra que una célula de alta calidad tiende a no provocar una respuesta biológica no deseada.

[Figura 64-A]

La figura 64-A es un diagrama que muestra los resultados de la inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos anti-CD63 y anti-CD9 para detectar los exosomas secretados en sobrenadantes de cultivo de cHCEC con

o sin CST.

[Figura 64-B]

La figura 64-B describe imágenes de microscopio de contraste de fase que muestran la morfología de las células del n.° 66 (cuarto pase), n.º 77 (segundo pase) y C11 (segundo pase) en la fila superior. La figura 64-B es un gráfico que muestra la cantidad de exosoma detectado por ExoScreen usando CD9 y/o CD63 en cada medio de cultivo celular en la fila inferior.

[Figura 65]

La figura 65 proporciona resultados del análisis FACS que muestran un cambio en la composición de la población celular mediante el uso de clasificación de células con perlas magnéticas (MACS) con perlas magnéticas de CD44. Se sometieron cHCEC C23 (segundo pase) al análisis. Los gráficos de puntos con selección muestran, desde la izquierda, sin tratar con MACS, la fracción no unida de MACS y la fracción unida de MACS. La figura 65 muestra el análisis sobre la expresión de CD105 y CD44 después de seleccionar la expresión de CD166 y CD24. Los gráficos de puntos para la expresión de CD26 y CD44 en el lado derecho muestran, desde la parte superior, sin tratar con MACS, la fracción no unida de MACS y la fracción unida de MACS.

[Figura 66]

La figura 66 proporciona resultados del análisis FACS que muestran un cambio en la composición de la población celular mediante el uso de clasificación de células con perlas magnéticas (MACS) con perlas magnéticas de CD44. Se sometieron cHCEC de cuarto pase C23 al análisis. El lado izquierdo muestra un caso que no se trató con MACS y el lado derecho muestra una fracción no unida de MACS. La figura 66 muestra el análisis sobre la expresión de CD105 y CD44 y el análisis sobre la expresión de CD26 y CD44 después de seleccionar la expresión de CD166 y CD24.

[Figura 67]

La figura 67 proporciona resultados del análisis FACS que muestran un cambio en la composición de la población celular mediante el uso de clasificación de células con perlas magnéticas (MACS) con perlas magnéticas de CD44. Se sometieron cHCEC de segundo pase C27 al análisis. El lado izquierdo muestra un caso que no se trató con MACS y el lado derecho muestra una fracción no unida de MACS. La figura 67 muestra el análisis sobre la expresión de CD105 y CD44 y el análisis sobre la expresión de CD26 y CD44 después de seleccionar la expresión de CD166 y CD24.

[Figura 68]

La figura 68 es un diagrama que muestra el método para estimar el contenido de efector (razón E) en una población de células cultivadas mediante análisis FACS. La compuerta se establece como sigue en las mediciones usando anticuerpos anti-CD44 humano marcados con PE-Cy7 (BD Biosciences) y estableciendo el factor de escalado de área del láser azul de FACS Canto II a 0,75 y el voltaje de PE-Cy7 a 495. En primer lugar, se establecen las fracciones A, B, C y D en el gráfico de puntos (fila superior izquierda) donde el eje X es CD24 y el eje Y es CD166. En este momento, la fracción A es CD24 negativa y CD166 positiva, la fracción B es CD24 positiva y CD166 positiva, la fracción C es CD24 negativa y CD166 negativa y la fracción D es CD24 positiva y CD166 negativa. La proporción de la fracción B cuando las células diana para el análisis son el 100 % se considera el contenido de la célula C no prevista [célula CD24 positiva]. Las fracciones 1, 2 y 3 se establecen adicionalmente como en el diagrama en la fila inferior a la izquierda en un gráfico de puntos donde el eje X es CD44 y el eje Y es CD105 para la fracción B. La proporción de la fracción 1 en este momento es la razón E, el valor total de la proporción de las fracciones 1 y 2 es el contenido de “célula efectora + célula progenitora” y la proporción de la fracción 3 es el contenido de célula A no prevista [célula CD44 fuertemente positiva]. Además, se crea un gráfico de puntos separado donde el eje X es CD44 y el eje Y es CD26 y las fracciones a’, b’, c’ y d’ se establecen como en el diagrama en el lado derecho de la fila superior. La proporción de la fracción B cuando las células diana del análisis son el 100 % es el contenido de la célula B no prevista [célula CD26 positiva].

[Figura 69]

La figura 69 muestra que el grosor corneal después de la cirugía depende de la calidad celular (razón E) infundida y proporciona gráficos que muestran los resultados de la medición del grosor corneal antes de la infusión celular, después de 1 mes, después de 3 meses y después de 6 meses (después de 4 semanas, después de 12 semanas y después de 24 semanas, respectivamente), y después de 1 año y después de 2 años para pacientes con A-N a los que se les inyectó una población celular que tenía una razón E de menos del 90 % y pacientes con I-O a los que se les infundió una población celular que tenía una razón E del 90 % o mayor. El eje horizontal es el tiempo (antes de la cirugía, después de 1 mes, después de 3 meses y después de 6 meses (después de 4 semanas, después de 12 semanas y después de 24 semanas, respectivamente), y después de 1 año y después de 2 años), y el eje vertical es el grosor corneal. Puede entenderse que el adelgazamiento se logra extremadamente mejor en una etapa temprana

por las células funcionales que tienen una razón E del 90 % o mayor.

[Figura 70]

La figura 70 muestra una comparación del resultado clínico con cHCEC distintas en su razón E. La fila superior muestra los resultados de la cirugía de infusión de cHCEC por C15 (pase 3) con una razón E muy baja. La fila central muestra los resultados de la cirugía de infusión de cHCEC por C23 (pase 3) (razón E < 90 %) según la presente invención. La fila inferior muestra los resultados de la cirugía de infusión de cHCEC por C32 (pase 2) (razón E >= 90 %) de acuerdo con la presente invención. En cada fila, la figura 70 muestra, desde la izquierda, los resultados de una imagen de microscopio de contraste de fase, el análisis FACS basado en CD24, CD26 y CD44 de células infundidas y una imagen de microscopía especular después de la cirugía de infusión en el lado derecho, así como el valor numérico de ECD en el tejido del endotelio (células/mm^2). Cuando se infundió una población celular con baja razón E (<10 %), no pudieron detectarse células unidas al tejido del endotelio después de 1 mes o 3 meses debido a la opacidad. Solo después de 6 meses pudieron detectarse células unidas al tejido del endotelio. Cuando se usó la cirugía de infusión (con selección de subpoblación, razón E < 90 %) según la presente invención, no pudieron detectarse células después de un mes debido a la opacidad, pero este estado mejoró después de 3 meses de modo que pudieron detectarse células. Como se muestra en la fila inferior, cuando se usó la cirugía de trasplante (con selección de subpoblación, razón E >= 90 %) de acuerdo con la presente invención, la opacidad ya mejoró después de 1 mes, de modo que pudieron detectarse células. Se reveló que las células preparadas por la tecnología desarrollada por primera vez en la presente invención ejercen un efecto notablemente más temprano en comparación con la infusión de cHCEC con baja razón E.

[Figura 71]

La figura 71 muestra los resultados posteriores a la cirugía en la infusión de células endoteliales cultivadas de la presente invención (fila superior), DSAEK (método convencional; fila central) y PKO (trasplante de córnea, método convencional; fila inferior). El lado izquierdo muestra una imagen de un globo ocular después de cada cirugía y el centro de la fila superior muestra la distribución del grosor corneal. El lado derecho muestra imágenes en sección transversal horizontal. Aunque la inyección endotelial de la presente invención dio como resultado reconstitución corneal sin distorsión, dando como resultado la recuperación de un buen QAV, DSAEK dio como resultado una superficie con distorsión y una superficie debido al método quirúrgico. PKP da como resultado una distorsión notable.

[Descripción de realizaciones]

La realización de la presente invención se describe a continuación en el presente documento. Para evitar complicar la divulgación repitiendo el mismo contenido, la explicación se omite adecuadamente. A lo largo de toda la memoria descriptiva, debe entenderse que una expresión singular abarca el concepto de la misma en la forma plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, artículos singulares (por ejemplo, “un”, “una”, “el/la” y similares en el caso del inglés) también debe entenderse que abarcan el concepto de los mismos en la forma plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Además, debe entenderse que los términos usados en el presente documento se usan en el significado que se usa comúnmente en la técnica, a menos que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, a menos que se defina lo contrario, todas las terminologías y términos técnicos científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendimiento general de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de contradicción, la presente memoria descriptiva (incluidas las definiciones) tiene prioridad.

En primer lugar, se explican los términos y técnicas comunes utilizados en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, “endotelio corneal” y “endotelio corneal humano” se usan en el significado que se usa comúnmente en la técnica. La córnea es uno de los tejidos lamelares que constituyen un ojo. Una córnea es transparente y está situada en una parte más cercana al entorno externo. En seres humanos, se entiende que la córnea está compuesta por cinco capas, en orden desde el exterior (superficie corporal), de epitelio corneal, membrana de Bowman (límite externo), lámina propia, membrana de Descemet (límite interno) y endotelio corneal. A menos que se indique específicamente lo contrario, partes distintas del epitelio y el endotelio pueden denominarse colectivamente “estroma corneal”, que también se denomina como tal en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, una célula deseada del tejido endotelial de la córnea se denomina “célula derivada del tejido endotelial de la córnea”. Además, una célula que se convierte en una célula endotelial corneal por diferenciación se denomina “célula progenitora endotelial de la córnea”.

Como se usa en el presente documento, “célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano” se refiere a “célula con funcionalidad de un endotelio corneal, que tiene la capacidad de expresar una propiedad funcional endotelial corneal (denominada “propiedad funcional endotelial corneal humana” cuando se refiere a seres humanos, o simplemente denominada a continuación en el presente documento, aunque no especialmente limitante, “propiedad funcional endotelial cornal”) cuando se infunde en la cámara anterior de un ojo humano. Esto también se denomina la “célula

funcional que posee una propiedad endotelial corneal" especialmente por abreviatura. Cuando se usa para una célula humana, esto se denomina "célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano". Dado que la presente invención se refiere principalmente a células corneales humanas, se entiende que se hace referencia a una célula humana a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en el presente documento, las células funcionales que posee una propiedad endotelial corneal de la invención abarcan una "célula endotelial corneal diferenciada madura funcional" que tiene una propiedad funcional endotelial corneal como tal sin procesos adicionales y "célula endotelial corneal intermediamente diferenciada", que carece de algunas de las funciones, pero se usa de manera similar o ejerce la misma función que una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional después de la infusión.

Como se usa en el presente documento, "propiedad funcional endotelial corneal" se refiere a una propiedad funcional que una córnea diferenciada madura tiene en un estado normal.

Como se usa en el presente documento, "célula endotelial corneal diferenciada madura funcional" se refiere a un endotelio corneal diferenciado maduro y cualquier célula que tenga su función (por ejemplo, la propiedad funcional endotelial corneal descrita anteriormente). Esto se conoce como una célula endotelial corneal humana diferenciada madura funcional para células humanas. En particular, puede confirmarse una propiedad funcional endotelial corneal a partir de la formación de una forma de adoquín hexagonal pequeño y el uso de un sistema de metabolismo energético por función mitocondrial. Es posible determinar si la propiedad puede tener un efecto terapéutico cuando se infunde (por ejemplo, en la cámara anterior de un ojo humano). Sin embargo, esto no se limita a ello. Una propiedad funcional endotelial corneal puede juzgarse o determinarse usando un marcador sustituto como indicador. El juicio puede realizarse mediante cualquiera de los 8 tipos de tales marcadores sustitutos o una combinación de los mismos, incluidos (1) retención de funciones de bombeo/barrera endotelial (incluyendo expresión de claudina), (2) adhesión/unión a una laminina específica, (3) perfil de citocinas secretadas, (4) perfil de micro ARN producidos (miARN), (5) perfil de metabolitos producidos, (6) densidad celular saturada tras el cultivo *in vitro* (7) tamaño espacial y distribución de células obtenidas en cultivo y (8) retención celular en caso de infusión celular después del daño por congelación por criotratamiento con nitrógeno líquido en una córnea de ratón.

(1) La retención de las funciones de bombeo/barrera endotelial puede juzgarse mediante el uso de un método de medición de la función de bombeo o un método de medición de la función de barrera comúnmente usado para endotelios corneales. Los ejemplos de tal juicio incluyen técnicas de aplicación de los métodos descritos en Wigham C, Hodson S.: Current Eye Research, 1, 37-41, 1981, Hodson S, Wigham C.: J Physiol., 342:409-419, 1983, Hatou S., Yamada M., Akune Y., Mochizuki H., Shiraishi A., Joko T., Nishida T., Tsubota K.: Investigative Ophthalmology & Visual Science, 51, 3935-3942, 2010 mediante el uso de una cámara de Ussing utilizada en el caso de una forma de lámina. La expresión de claudina puede confirmarse usando un enfoque conocido en la técnica tal como un enfoque inmunológico. Puede usarse cualquier enfoque inmunológico conocido en la técnica para confirmar la expresión de claudina. Sin embargo, se espera que las células de la presente invención se infundan en una suspensión. En tal caso, por lo tanto, es preferible evaluar una función endotelial de la córnea aplicando la expresión de claudina, o uno cualquiera de (2)-(8) o una combinación de los mismos.

(2) La adhesión/unión a una laminina específica puede juzgarse usando adhesión a laminina 511 (compuesta de cadena alfa5, cadena beta1 y cadena gamma1), laminina 521 (compuesta de cadena alfa5, cadena beta2 y cadena gamma1), o un fragmento funcional de la misma (por ejemplo, fragmento de laminina 511-E8) y/o aumento de la expresión de integrina (por ejemplo, alfa3beta1, alfa6beta1 o similares) con respecto a la misma como indicador. Tal enfoque puede implementarse mediante un ensayo de adhesión celular ilustrado en el ejemplo 6.

A este respecto, se comentan las cadenas alfa de laminina. "Cadena alfa5" (LAMA5) es una subunidad de una proteína-laminina de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMA5, KIAA1907, o similares. Para LAMA5 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM_005560 y NP_005551, respectivamente. OMIM se identifica mediante el número de registro 601033. Se comentan las cadenas beta de laminina. "Cadena beta1" (LAMB1) es una subunidad de una proteína (laminina) de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMB1, CLM, LIS5, o similares. Para LAMB1 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM_002291 y NP_002282, respectivamente. OMIM se identifica mediante el número de registro 150240. "Cadena beta2" (LAMB2) (laminina S) es una subunidad de una proteína (laminina) de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMB2, LAMS, NPHS5, o similares. Para LAMB2 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM_002292 y NP_002283, respectivamente. OMIM se identifica mediante el número de registro 150325. Se comentan las cadenas gamma de laminina. "Cadena gamma1" (LAMC1) es una subunidad de una proteína (laminina) de una molécula de adhesión celular en una matriz extracelular, y se denomina LAMC1, LAMB2, o similares. Para LAMC1 humana, las secuencias del gen y la proteína se registran como números de registro NCBI NM_002293 y NP_002284, respectivamente. OMIM se identifica mediante el número de registro 150290.

(3) Los perfiles de citocinas secretadas pueden juzgarse midiendo el nivel de producción de los perfiles de citocinas en "suero" o "humor acuoso anterior" explicado en otra parte del presente documento. Tales citocinas incluyen, pero no se limitan a, RANTES, PDGF-BB, IP-10, MIP-1b, VEGF, EOTAXINA, IL-1ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-0, IL-10, IL-12 (p70),

IL-13, IL-17, FGFbásico, G-CSF, GM-CSI, IFN-gamma, MCP-1, MIP-1a, TNF-alfa, y similares. Específicamente, el análisis puede realizarse usando un kit de medición de citocinas y un sistema de análisis tal como Bio-Plex para el análisis integrado de citocinas. El enfoque del mismo se ejemplifica en el ejemplo 9.

(4) El perfil de microARN (miARN) producido puede juzgarse mediante medición usando el enfoque analítico para el "perfil de miARN" explicado en otra parte del presente documento. Por ejemplo, el juicio puede materializarse usando un método para analizar un perfil de expresión de microARN descrito en el ejemplo 5 o 9. Por ejemplo, puede usarse el oligochip de miARN humano "3D-Gene" de Toray (miRBase versión 17) para la implementación del mismo. Se preparan ARN totales obtenidos de muestras tanto de tejido como de células, que se marca con miARN total obtenido del sobrenadante y los marcados con un marcador tal como Hy5 usando un kit tal como los kits de marcaje de potencia de microARN miRCURY LNA(R) (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). El microARN marcado se hibrida por separado con la superficie de un chip de microARN y se incuba en condiciones adecuadas (por ejemplo, 32 grados C durante 16 horas). Después de que este chip de microARN se lave y se seque en un entorno libre de ozono, puede usarse un escáner tal como el escáner 3D-Gene 3000 (Toray Industries Inc., Tokio, JAPÓN) para el escaneo, y puede usarse el software 3D-Gene Extraction (Toray) para el análisis.

(5) Puede juzgarse el perfil de metabolitos producido, por ejemplo, mediante el método descrito en el ejemplo 4. El extracto metabólico de un metabolito intracelular se prepara a partir de un recipiente de cultivo de cHCEC que tiene metanol que contiene un reactivo de patrón interno tal como disolución de patrón interno (Human Metabolome Technologies; HMT, Inc., Tsuruoka, Japón). El medio se reemplaza y el extracto celular se trata (la condición de tratamiento se ejemplifica en el ejemplo 4). Se realiza previamente análisis de CE-MS para analizar el metabolito. El análisis del metaboloma puede medirse de acuerdo con el método desarrollado por Soga, *et al.* (Soga, D. *et al.*, T. Soga, *et al.*, Anal. Chem. 2002; 74: 2233-2239 Anal. Chem. 2000; 72: 1236-1241; T. Soga, *et al.*, J. Proteome Res. 2003; 2: 488-494) y se usa apropiadamente software de integración automática (MasterHands, Universidad de Keio, Tsuruoka, Japón (M. Sugimoto, *et al.*, Metabolomics, 2009; 6: 78-95) y MassHunter Quantitative Analysis B.04.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) para el análisis. De la base de datos de metabolitos de HMT, se anota el pico por un metabolito hipotético, se estandariza y se calcula en base al valor m/z medido por MT y TOFMS en CE. Pueden realizarse análisis de grupos jerárquicos (HCA) y análisis de componentes principales (PCA) para la medición del metaboloma.

(6) La densidad celular saturada durante el cultivo *in vitro* puede juzgarse midiendo la densidad celular usando las condiciones de cultivo apropiadas descritas en el presente documento. Esto puede medirse en paralelo con el tamaño celular. Se toman imágenes de microscopio de contraste de fase de toma de fotografías usando un equipo que comprende un sistema de captura de imágenes tal como un sistema de microscopio BZ X-700 (Keyence, Osaka, Japón) mediante un sistema de microscopio invertido (CKX41, Olympus, Tokio, Japón). La densidad puede cuantificarse usando un software de recuento de células (por ejemplo, software de recuento de células híbridas BZ-H3C (Keyence)). La densidad celular saturada preferida en la presente invención se describe en otra parte del presente documento.

(7) El tamaño espacial y la distribución de las células obtenidas en cultivo pueden juzgarse tomando imágenes de las células y tomando mediciones con cualquier software o similar o midiendo el tamaño especial y la distribución de las células usando las condiciones de cultivo apropiadas descritas en el presente documento. Esto puede materializarse usando un software de procesamiento de imágenes sin procesar tal como el software de recuento de células híbridas BZ-H3C Hybrid (Keyence). La densidad celular saturada preferida en la presente invención se describe en otra parte del presente documento.

(8) La retención celular en caso de infusión celular después del daño por congelación con criotratamiento con nitrógeno líquido en la córnea de ratón puede juzgarse haciendo un modelo de ratón ejemplificado en el ejemplo 7. Específicamente, la región central (por ejemplo, 2 mm) de una córnea de un ratón adecuado (por ejemplo, BALB/c) se trata previamente mediante daño a baja temperatura para eliminar una célula endotelial para hacer un modelo. La célula que va a juzgarse se inyecta en la cámara anterior ocular del modelo. Las características de la claridad corneal se observan clínicamente. El grosor corneal se evalúa mediante un paquímetro. La adhesión de las HCEC se somete a prueba histopatológicamente mediante tinción nuclear humana y se examina si las células tienen una función. Estos enfoques se ejemplifican en el ejemplo 8.

Una célula que no se deriva del endotelio corneal (por ejemplo, células producidas por haber inducido a células madre pluripotentes (célula iPS), células madre embrionarias (célula ES) o similares a diferenciarse en endotelios corneales), aunque no está claro si es completamente idéntica a una célula endotelial corneal en un organismo vivo, está dentro del alcance de la célula endotelial corneal funcional o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal cuando se infunde en la cámara anterior de un ojo humano de la presente invención, siempre que tenga una propiedad funcional endotelial corneal. En la explicación o experimento expuesto en el presente documento, la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional humana de la presente invención también se denomina "células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales humanas", "célula endotelial corneal humana diferenciada madura funcional" o similares. Aunque dicha célula también puede denominarse célula "a5", "células de interés", "célula calificada", simplemente como "célula efectora" o similar, todos se usan como sinónimos. Además, "célula endotelial corneal diferenciada madura funcional" con funcionalidad

potenciada puede denominarse célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de “alta calidad”. Tal célula de alta calidad puede proporcionarse propagando selectivamente las que son CD44 negativas. Aunque no se desea limitarse a ninguna teoría, se entiende que una colección de solo células endoteliales corneales funcionales diferenciadas maduras que son negativas tiene una mayor calidad y una mayor identidad con las células diferenciadas maduras en un tejido vivo.

Como se usa en el presente documento, “célula endotelial corneal intermediamente diferenciada” se refiere a una célula que puede ejercer una propiedad funcional endotelial corneal (propiedad funcional endotelial corneal humana para células humanas) de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional pero que no tiene una propiedad funcional endotelial corneal completa como en las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales y ejerce al menos una parte de las funciones de las mismas. Tal célula, cuando se usa para células humanas, se denomina “células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas” o “célula endotelial corneal intermediamente diferenciada humana”. Mientras tanto, cabe señalar que la presente invención se dirige principalmente a seres humanos. Dado que la “célula endotelial corneal intermediamente diferenciada” tiene una capacidad que podría funcionar como una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional después de la infusión en la cámara anterior ocular, pueden usarse en la presente invención. La “célula endotelial corneal intermediamente diferenciada”, hasta un cierto nivel, ejerce un efecto cuando se mezcla y se usa en terapia de infusión o al menos no inhibiría el efecto terapéutico. Tal célula endotelial corneal intermediamente diferenciada puede madurar en, diferenciarse en y funcionar como una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional en un organismo vivo después de la infusión (por ejemplo, después de la infusión en la cámara anterior de un ojo humano). En la explicación o el experimento expuesto en el presente documento, tal célula también se denomina célula “a1”, simplemente “célula semifuncional endotelial corneal”, “célula semifuncional”, “célula efectora intermediamente diferenciada”, “célula de interés secundario” y similares, que son sinónimos.

Como se usa en el presente documento, la “célula no funcional endotelial corneal” es una célula distinta de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención (es decir, “célula endotelial corneal diferenciada madura funcional” y “células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas”). Tal célula puede denominarse “célula no prevista”, “célula no calificada”, “célula no deseada”, “célula no funcional”, o similares. Tal célula incluye la fracción “a2”.

Como se usa en el presente documento, “indicador celular” se refiere a cualquier indicador que indica que una determinada célula es la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención (por ejemplo, células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales o células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas). Dado que un indicador celular es una propiedad de los endotelios corneales humanos diferenciados maduros y cualquier célula con la función de los mismos, también se denomina “indicador celular funcional”. La propiedad específica también se denomina “propiedad funcional de la célula”. Por ejemplo, un caso en el que una célula aplicable tiene una propiedad funcional de la célula que es homóloga a la de una célula a5 se refiere a la célula aplicable que tiene un valor que corresponde al intervalo de cada valor del indicador celular presentado por a5.

Como se usa en el presente documento, “transformar” se refiere a un rasgo de una célula que cambia a un estado no normal, incluida una célula normal que experimenta división celular no restringida, es decir, oncogénesis, y especialmente metaplasia dinámica (desdiferenciación para ser una célula madre o cambios más allá del ámbito de la forma básica de tejido). Los ejemplos de transformación incluyen transición de estado celular (CST) tal como EMT, fibrosis, transición epitelial-mesenquimatosa, senescencia, desdiferenciación y similares. Una célula endotelial corneal a menudo experimenta transformación tal como transición epitelial-mesenquimatosa de modo que ya no es una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional en muchos casos. El método de fabricación divulgado en el presente documento, pero que no forma parte de la presente invención, abarca métodos de fabricación que pueden convertir tal célula que ha experimentado transición epitelial-mesenquimatosa en una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional permitiendo que tal célula madure y se diferencie después de la desdiferenciación.

Como se usa en el presente documento, “transición epitelial-mesenquimatosa” (EMT; también denominada transformación epitelial-mesenquimatosa) se refiere a un proceso de una célula epitelial que pierde polaridad celular de la misma y la capacidad de adherirse a una célula circundante y que adquiere la capacidad de migrar e infiltrarse para cambiar a una célula de tipo mesenquimatoso.

A este respecto, las células de partida en diversas muestras y métodos de fabricación que pueden usarse en el presente documento pueden ser células endoteliales corneales maduras funcionales diferenciadas, células de interés o una muestra que se considera que comprende una sustancia derivada de las mismas que permite la expresión génica. Por ejemplo, puede usarse una célula aislada directamente de un endotelio corneal (también denominadas células derivadas de tejido endotelial corneal) o una célula que ha adquirido una función similar al endotelio corneal a partir de la diferenciación. Puede obtenerse una célula derivada de tejido endotelial de la córnea mediante un método conocido (Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S., Experimental Eye Research. 2012; 95: 60-7). Preferiblemente, una célula y similares obtenidas de un donante de endotelio corneal pueden usarse como muestra celular. Además, células cultivadas que comprenden las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales, que se diferenciaron e indujeron *in vitro*, pueden usarse como muestra. Las células pueden diferenciarse e inducirse *in vitro* en las células funcionales que poseen la

propiedad endotelial corneal de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales mediante procesamiento con un método conocido tal como el método AMED o similar <Ueno M, Matsumura M, Watanabe K, Nakamura T, Osakada F, Takahashi M, Kawasaki H, Kinoshita S, Sasai Y:, Proc Natl Acad Sci USA. 103(25): 9554-9559, 2006.> mientras se usa una célula conocida tal como una célula ES, célula iPS o célula estromal de médula ósea como material de partida.

En la presente invención, “miARN” es una abreviatura de microARN y se refiere a ARN que está codificado en el genoma y generado a través de un proceso de generación de múltiples etapas. Se han descubierto diversos tipos de miARN. Generalmente, el ARN tiene una longitud de 20-25 bases, pero la longitud no está limitada a las mismas. Los miARN conocidos se registran en la base de datos de microARN, miRBase (hGp://www.mirbase.org/) o similares. El miARN se designa generalmente como “mir” para progenitores y “miR” para formas maduras. Aunque se adjunta un número de registro después de miR (mir), se adjunta un alfabeto en minúsculas en caso de similitud. Cuando se define adjuntando el origen del proceso de generación, se adjunta 5p para una cadena en el lado del extremo 5’ y se adjunta 3p a una cadena en el lado del extremo 3’. Para distinguir especies, se adjunta hsa para el ser humano. Se vincularán con un guion para indicar, por ejemplo, como “hsa-miR-15a-5p” o similares. Dado que los seres humanos son el objetivo principal en el presente documento, se entiende que están previstos los seres humanos incluso sin adjuntar específicamente hsa. Cuando se usa con distinción específica en la presente invención, es posible diferenciar miARN “intracelular” y miARN “secretado”. Una de las características de la presente invención es que se descubrió, por primera vez en todo el mundo, que puede usarse miARN para identificar una subpoblación de células, incluido el descubrimiento de que el tipo o subpoblación celular puede identificarse con miARN “secretado” secretado en el sobrenadante celular, que puede usarse en el control de calidad en la terapia de infusión celular.

Como se usa en el presente documento, miARN “intracelular” se refiere a cualquier miARN que esté presente en una célula.

Como se usa en el presente documento, miARN “secretado” se refiere a cualquier miARN que se secreta y puede detectarse en el sobrenadante de cultivo. Aunque tal miARN también puede denominarse miARN “secretado por células”, miARN “en sobrenadante de cultivo”, miARN “sobrenadante celular” o miARN “sobrenadante celular/cultivado” en la técnica, se refieren al mismo miARN. El miARN secretado se puede detectar sin destruir una célula.

Como se usa en el presente documento, “alta expresión”, “expresión intermedia” y “baja expresión” de miARN o similar se usa para describir la intensidad de expresión relativa de miARN y se refiere a la intensidad relativa en comparación con un patrón. Para “alta expresión”, “expresión intermedia” y “baja expresión”, la intensidad de expresión es alta expresión > expresión intermedia > baja expresión. En el presente documento es posible usar un valor corregido para tener una mediana de intensidad de expresión idéntica de todos los genes detectados suponiendo que el número total de copias de genes entre muestras no es notablemente diferente después de determinar genes cuya intensidad de fluorescencia se ha medido como cantidad de expresión de miR (intensidad de expresión). “Alta expresión” y “baja intensidad” tienen una diferencia estadísticamente significativa (razón relativa de 2 o mayor, valor p de 0,05 o menos) en términos de intensidad de expresión. La expresión intermedia puede incluirse según sea necesario. Cuando se encuentra una tercera intensidad de expresión que es diferente de la más fuerte y débil en tres o más grupos de células, la evaluación puede incluir la expresión intermedia. Además, “alta expresión” y “expresión intermedia”, así como “baja expresión” y “expresión intermedia” también pueden tener diferencias estadísticamente significativas.

Para su uso en el presente documento, cuando se especifica la propiedad de expresión de una célula a5 como CD44 negativo a débilmente positivo CD24 negativo CD26 negativo, la propiedad de expresión de a1 como CD44 intermediamente positivo CD24 negativo CD26 negativo, y la propiedad de expresión de a2 como CD44 fuertemente positivo CD24 negativo CD26 positivo como ejemplo representativo, se usan “alta expresión”, “expresión intermedia” y “baja expresión” de miARN para expresar relativamente la intensidad de expresión de la célula a5: célula a1: célula a2. Cabe señalar que cada célula puede identificarse por “alta expresión” y “baja expresión” en casos sin “expresión intermedia”.

Como se usa en el presente documento, “tamaño celular” es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención, que se mide mediante técnicas que se usan comúnmente en la técnica. Se expresa el tamaño celular, por ejemplo, por el área celular. Como se usa en el presente documento, “área celular” es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención. El área celular puede medirse con cualquier software o similar tomando una imagen de una célula. Los ejemplos de un enfoque de medición de este tipo incluyen un método que utiliza software de procesamiento de imágenes tal como el software de recuento de células híbridas BZ-H3C (Keyence). El valor medio del mismo se denomina “área celular media”. Generalmente se usa la media aritmética.

Como se usa en el presente documento, “densidad celular” o “densidad celular (media)” es un indicador de una célula expresada por el número de células presentes en un área determinada. La densidad celular se mide mediante cualquier técnica que se use comúnmente en la técnica. La densidad media de una población celular es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Generalmente se usa la media aritmética como media. La densidad

celular puede medirse en paralelo con el tamaño celular y cuantificarse tomando imágenes de microscopio de contraste de fase de toma de fotografías usando un equipo que comprende un sistema de captura de imágenes tal como un sistema de microscopio BZ X-700 (Keyence, Osaka, Japón) mediante un sistema de microscopio invertido (CKX41, Olympus, Tokio, Japón) y usando un software de recuento de células (por ejemplo, software de recuento de células híbridas BZ-H3C (Keyence)) o similares. La densidad celular a partir del cultivo celular saturado (también denominada confluencia (de cultivo); cultivo celular saturado y confluencia (de cultivo) como se usan en el presente documento tienen el mismo significado) se usa como indicador. Además, la densidad a partir de la siembra también se usa como punto de referencia en el método de fabricación divulgado en el presente documento, pero no forma parte de la presente invención. Además, la densidad celular puede usarse como indicador de un resultado terapéutico después de la infusión.

Como se usa en el presente documento, “anomalía de cariotipo” se refiere a cualquier cariotipo con una anomalía. Para seres humanos, las anomalías de cariotipo pueden medirse de acuerdo con el Sistema Internacional Estándar para la Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (1995) y definiciones del mismo.

Como se usa en el presente documento, “propiedad inmunológica”, para una determinada célula, se refiere a una respuesta inmunológica presentada entre la célula y la célula derivada del huésped y es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Los ejemplos de la misma incluyen la ausencia de rechazo inmunológico mientras se trata de una infusión alo (alogénica).

Como se usa en el presente documento, “propiedad génica”, para una determinada célula, se refiere a una propiedad tal como la expresión de un gen relacionado con la célula. Una propiedad génica es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal funcional diferenciada madura.

Como se usa en el presente documento, “perfil de citocinas en suero” es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional y se refiere a un perfil que muestra al menos una cantidad, nivel y similares de citocina en el suero. Normalmente, el perfil puede visualizarse mediante un método de centroide circular ejemplificado en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, “marcador de superficie celular” se refiere a cualquier material biológico expresado en una superficie celular. Esto también se denomina antígeno de superficie celular, antígeno de superficie o marcador de superficie. Un marcador de superficie celular puede identificarse como un antígeno que se une a un anticuerpo monoclonal. También se abarcan marcadores de superficie celular que se denominan marcador de CD o antígeno de CD en la técnica. Un rasgo representado por un marcador de superficie celular también se denomina rasgo de superficie celular, que puede usarse en el presente documento teniendo el mismo significado.

Como se usa en el presente documento, “producto proteínico” se refiere a cualquier producto proteínico producido por una célula. “Material biológico relacionado de un producto proteínico (el producto)” se refiere a cualquier material biológico relacionado con el producto proteínico celular (por ejemplo, gen que codifica el producto proteínico (ADN), ARNm, precursor de proteínas, y similares), que es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Normalmente, un producto proteínico es un gen o un producto del mismo. En la presente invención, los ejemplos de los mismos incluyen aquellos con (A) expresión elevada en la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal (incluyendo una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) de la presente invención (tal como COL4A1, COL4A2, COL8A1, COL8A2, CDH2 y TGF-beta2) y (B) disminución de la expresión en la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal (incluyendo la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) de la presente invención (tal como MMP1, MMP2, TIMP1, BMP2, IL13RA2, TGF-beta1, CD44, COL3A1, IL6, IL8, HGF, THBS2 e IGFBP3).

Como se usa en el presente documento, “proteína relacionada con SASP”, “factor SASP” y “mediador de SASP” se usan indistintamente y se refieren a cualquier proteína relacionada con SASP (abreviatura de fenotipo secretor asociado a senescencia, *Senescence Associated Secretory Phenotype*), que es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal, célula endotelial corneal diferenciada madura funcional o célula no prevista de la presente invención. Esto también se denomina secreción relacionada con la senescencia celular. SASP es un fenómeno relacionado con la senescencia celular en el que diversas proteínas secretoras que presentan una acción para inducir una reacción inflamatoria u oncogénesis se expresan altamente. Los ejemplos de tales proteínas relacionadas con SASP incluyen citocinas inflamatorias (IL-6), quimiocinas inflamatorias (IL-8, MCP-1, y similares), proteasa (MMP y similares), PAI-1, GRO-alfa y VEGF.

Como se usa en el presente documento, “exosoma” también se denomina complejo de exosoma. Un exosoma es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Los ejemplos de los mismos incluyen CD63, CD9, CD81, HSP70, y similares.

Como se usa en el presente documento, “metabolito celular” se refiere a cualquier metabolito producido por una célula. “Material biológico relacionado del metabolito celular (el metabolito)” se refiere a cualquier material biológico relacionado con un metabolito celular (por ejemplo, enzima que sintetiza el metabolito, enzima metabolizante, proteína asociada con una ruta de señalización, o similares), que es uno de los indicadores celulares de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Los ejemplos de metabolitos incluyen cualquier producto relacionado con productos del sistema de metabolismo energético en un sistema mitocondrial, producto del sistema metabólico de glutatión, producto del ciclo metabólico de metionina, metabolito lipídico, producto de la ruta de pentosas fosfato, metabolito del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), metabolito del sistema glucolítico y similares. El metabolito del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y el metabolito del sistema glucolítico son especialmente importantes. Los ejemplos de metabolitos celulares y material biológico relacionado del metabolito incluyen ácido succínico (succinato), Pro, Gly, glicerol 3-fosfato, Glu, ácido láctico (lactato), ácido arginosuccínico (arginosuccinato), xantina, ácido N-carbamoilaspártico (aspartato de N-carbamoílo), ácido isocítrico (isocitrato), ácido cis-aconítico (cis-aconitato), ácido cítrico (citrato), Ala, ácido 3-fosfoglicérico (3-fosfoglicerato), hidroxiprolina, ácido málico (malato), ácido úrico (urato), betaína, ácido fólico (folato), Gln, ácido 2-oxoisovalérico (2-oxoisovalerato), ácido pirúvico (piruvato), Ser, hipoxantina, Asn, Trp, Lys, colina, Tyr, urea, Phe, Met, carnosina, Asp, ornitina, Arg, creatina, ácido 2-hidroxiglutamínico (2-hidroxiglutamato), beta-Ala, citrulina, Thr, Ile, Leu, Val, creatinina, His y N,N-dimetilglicina.

Como se usa en el presente documento, “célula reactiva con autoanticuerpos” se refiere a cualquier célula que reacciona con un autoanticuerpo. Este es uno de los indicadores celulares para seleccionar la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Puede detectarse una célula reactiva con autoanticuerpos mediante cualquier técnica conocida en la técnica. Una subpoblación celular no deseada a menudo es reactiva con un autoanticuerpo. Por lo tanto, puede evaluarse la reactividad con un autoanticuerpo para definir una célula de interés.

La detección, identificación, el control de calidad y similares de la célula de la presente invención pueden materializarse usando una molécula o sustancia interactiva que se une a una sustancia usada como marcador. En el contexto de la presente invención, “molécula interactiva” o “sustancia que se une a” una sustancia usada como marcador es una molécula o sustancia que se une al menos temporalmente a una molécula tal como una sustancia que va a usarse como marcador (por ejemplo, CD44) y preferiblemente es capaz de indicar que la molécula o sustancia está unida (por ejemplo, marcada o capaz de marcarse). Una sustancia que se une a una molécula tal como CD44 puede ser un ligando de una molécula tal como CD44. Los ejemplos de los mismos incluyen anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, ARNip, moléculas de bajo peso molecular (LMW), péptidos de unión, aptámeros, ribozimas, peptidomiméticos y similares, incluidas proteínas de unión o péptido de unión dirigido a moléculas tales como CD44 y ácidos nucleicos dirigidos a un gen de una molécula tal como CD44. Como se usa en el presente documento, “proteína de unión” o “péptido de unión” para una molécula tal como CD44 se refiere a tipos de proteínas o péptidos que se unen a una molécula tal como CD44, incluidos, pero sin limitarse a, anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales dirigidos a una molécula tal como CD44, fragmentos de anticuerpo y estructuras principales de proteínas.

Como se usa en el presente documento, “proteína”, “polipéptido”, “oligopéptido” y “péptido” se usan en el presente documento para tener el mismo significado y se refieren a un polímero de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal, ramificado o cíclico. Un aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural, de origen no natural o alterado, pero un aminoácido es de origen natural cuando se dirige a los contenidos en una célula.

Como se usa en el presente documento, “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “ácido nucleico” se usan en el presente documento para tener el mismo significado, y se refieren a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud. Los términos también abarcan “derivado de oligonucleótido” y “derivado de polinucleótido”. “Derivado de oligonucleótido” y “derivado de polinucleótido” se refieren a un oligonucleótido o polinucleótido que comprende un derivado de nucleótido o tiene un enlace entre nucleótidos que es diferente de lo normal. Los términos se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” se usa indistintamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido. Como se usa en el presente documento, “nucleótido” puede ser de origen natural o de origen no natural, pero aquellos en las células son de origen natural. Los ácidos nucleicos o nucleótidos usados como medios de detección pueden considerarse artificiales.

Como se usa en el presente documento, “gen” se refiere a un agente que define un rasgo genético. Los genes generalmente están dispuestos en un cierto orden en un cromosoma. Un gen que define la estructura primaria de una proteína se denomina gen estructural, y un gen que afecta a la expresión del mismo se denomina gen regulador. Como se usa en el presente documento, “gen” puede referirse a “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “ácido nucleico”. “Producto génico” es una sustancia producida basándose en un gen y se refiere a proteínas, ARNm o similares.

Los aminoácidos pueden mencionarse en el presente documento o bien por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o bien por sus símbolos de un carácter recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. De manera similar, los nucleótidos pueden mencionarse por sus códigos de un carácter comúnmente reconocidos. La comparación de similitud, identidad y homología de una secuencia de aminoácidos y una secuencia

de bases se calcula en el presente documento usando un parámetro por defecto usando una herramienta de análisis de secuencias, BLAST. Por ejemplo, la identidad puede buscarse usando BLAST 2.2.28 (publicado el 2 de abril de 2013) del NCBI. En el presente documento, los valores para la identidad generalmente se refieren a un valor cuando se logra la alineación en la condición por defecto usando el BLAST descrito anteriormente. Sin embargo, cuando se obtiene un valor más alto cambiando un parámetro, el valor más alto se considera el valor de identidad. Cuando la identidad se logra en una pluralidad de regiones, el valor más alto entre ellos se considera el valor de identidad. La similitud es un valor calculado teniendo en cuenta un aminoácido similar además de la identidad.

Una sustancia o agente biológico “aislado” (por ejemplo, ácido nucleico, proteína, o similares) como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia o agente biológico sin ningún agente que acompañe de manera natural a la sustancia o agente biológico. Mientras tanto, como se usa en el presente documento, una sustancia o agente biológico “purificado” (por ejemplo, ácido nucleico, proteína o similar) se refiere a una sustancia o un agente biológico del que se ha eliminado al menos parcialmente un agente que acompaña de manera natural a la sustancia o agente biológico. Por lo tanto, la pureza de un agente biológico en un agente biológico purificado es generalmente mayor que la pureza en el estado normal del agente biológico (es decir, concentrado). Los términos “aislado” y “purificado”, como se usan en el presente documento, se refieren a la presencia de preferiblemente al menos aproximadamente el 75 % en peso, más preferiblemente al menos aproximadamente el 85 % en peso, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 95 % en peso y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 98 % en peso de un agente biológico del mismo tipo. La sustancia usada en la presente invención es preferiblemente una sustancia “aislada” o “purificada”.

Como se usa en el presente documento, “marcador (sustancia, proteína o gen (ácido nucleico)” se refiere a una sustancia que puede ser un indicador para rastrear si una diana está en o corre el riesgo de estar en una determinada condición (por ejemplo, funcionalidad, estado de transformación, estado patológico, estado de trastorno, capacidad de crecimiento, nivel o presencia de estado diferenciado o similar). Los ejemplos de tal marcador incluyen genes (ácido nucleico = nivel de ADN), ARNm de productos genéticos, proteína y similares), metabolitos, enzimas y similares. En la presente invención, la detección, diagnóstico, detección preliminar, predicción o prediagnóstico de un determinado estado (por ejemplo, enfermedad tal como trastorno de diferenciación) puede materializarse usando un agente o medios específicos para un marcador asociado con tal estado, o una composición, kit o sistema que comprende el mismo o similares. Como se usa en el presente documento, “producto génico” se refiere a una proteína o ARNm codificado por un gen. Se encuentra en la presente memoria descriptiva que un producto génico (es decir, molécula tal como CD44 o similares), que no presenta asociación con una célula ocular, especialmente una célula endotelial corneal, puede usarse como indicador de si la célula tiene la funcionalidad de una célula endotelial corneal (transformada o no).

La “detección” o “cuantificación” de la expresión de polinucleótidos o polipéptidos puede lograrse en el presente documento usando un método adecuado que incluye, por ejemplo, un método de medición inmunológica y medición de ARNm, incluido un enlace o interacción con un agente de detección, agente de inspección o agente de diagnóstico. Los ejemplos de un método de medición biológica molecular incluyen transferencia de tipo Northern, transferencia puntual, PCR y similares. Los ejemplos de un método de medición inmunológica incluyen ELISA usando una placa de microtitulación, RIA, método de anticuerpos fluorescentes, inmunoensayo de luminiscencia (LIA), inmunoprecipitación (IP), inmunodifusión radial (SRID), inmunoensayo turbidimétrico (TIA), inmunotransferencia de tipo Western, tinción inmunohistoquímica y similares. Además, los ejemplos de un método de cuantificación incluyen ELISA, RIA y similares. La cuantificación también puede realizarse mediante un método de análisis de genes usando una matriz (por ejemplo, matriz de ADN, matriz de proteínas). Las matrices de ADN se resumen ampliamente en (Ed. por Shujunsha, Saibo Kogaku Bessatsu “DNA Maikuroarei to Saishin PCR ho” [Cellular engineering, Extra issue, “DNA Microarrays and Latest PCR Methods”]. Las matrices de proteínas se analizan en detalle en Nat Genet. Diciembre de 2002; 32 Suppl: 526-532. Los ejemplos de un método para analizar la expresión génica incluyen, pero no se limitan a, RT-PCR, RACE, SSCP, inmunoprecipitación, sistema de dos híbridos, traducción *in vitro*, FACS (clasificación de células activada por fluorescencia) y similares, además de los métodos comentados anteriormente. Tales métodos de análisis adicionales se describen en, por ejemplo, Genomu Kaiseki Jikkenho Nakamura Yusuke Labo Manyaru [Genome análisis experimental method Yusuke Nakamura Lab Manual], Ed. por Yusuke Nakamura, Yodosha (2002) y similares. La citometría de flujo usada en FACS es un enfoque para dispersar partículas finas en un fluido y permitir que fluyan pequeñas cantidades del fluido para analizar ópticamente partículas individuales. Un enfoque que aplica esto es FACS (clasificación de células activada por fluorescencia). FACS es una técnica que puede medir cuantitativamente la cantidad de expresión de antígeno en una superficie celular haciendo fluir una célula teñida con un anticuerpo fluorescente en un flujo líquido y permitiendo que la célula pase por un punto focal de un haz láser para medir la fluorescencia emitida por células individuales.

Como se usa en el presente documento, “intensidad de expresión” se refiere a la cantidad de polipéptido, ARNm o similar expresado en una célula, tejido o similar de interés. Los ejemplos de tal intensidad de expresión incluyen la intensidad de expresión del polipéptido de la presente invención a un nivel de proteína evaluado por cualquier método adecuado incluido un método de medición inmunológica tal como ELISA, RIA, método de anticuerpos fluorescentes, inmunotransferencia de tipo Western y tinción inmunohistoquímica usando el anticuerpo de la presente invención, y la intensidad de expresión del polipéptido usado en la presente invención a un nivel de ARNm evaluado por cualquier método adecuado incluido un método de medición biológica molecular tal como transferencia de tipo Northern,

transferencia puntual y PCR. “Cambio en la intensidad de expresión” se refiere a un aumento o una disminución en la intensidad de expresión del polipéptido usado en la presente invención a un nivel de proteína o nivel de ARNm evaluado por cualquier método adecuado incluido el método de medición inmunológica o método de medición biológica molecular descrito anteriormente. Puede realizarse una variedad de detección o diagnóstico basado en un marcador midiendo la intensidad de expresión de un determinado marcador.

Como se usa en el presente documento, “disminución” o “supresión” de la actividad o el producto de expresión (por ejemplo, proteína, transcrito (ARN o similares)) o sinónimos de los mismos se refiere a: una disminución en la cantidad, calidad o efecto de una actividad, transcrito o proteína específica; o actividad que disminuye la misma. Entre las disminuciones, “eliminación” se refiere a la actividad, siendo el producto de expresión o similar menor que el límite de detección y especialmente denominado “eliminación”. Como se usa en el presente documento, “eliminación” está abarcada por “disminución” o “supresión”.

Como se usa en el presente documento, “aumento” o “activación” de la actividad o el producto de expresión (por ejemplo, proteína, transcrito (ARN o similares)) o sinónimos de los mismos se refiere a: un aumento en la cantidad, calidad o efecto de una actividad, transcrito o proteína específica; o actividad que aumenta la misma.

Como se usa en el presente documento, un “anticuerpo” incluye, en un sentido amplio, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotipo, y fragmentos de los mismos tales como fragmentos Fv, fragmentos Fab’, $F(ab')_2$ y fragmentos Fab, así como otros conjugados o equivalentes funcionales producidos por recombinación (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos multifuncionales, anticuerpos biespecíficos u oligoespecíficos, anticuerpos de cadena sencilla, scFV, diacuerpos, $sc(Fv)_2$ (cadena sencilla $(Fv)_2$) y scFv-Fc). Además, tal anticuerpo puede fusionarse, mediante un enlace covalente o recombinación, con una enzima tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, o alfa galactosidasa. Los anticuerpos contra CD44 o similares usados en la presente invención son suficientes si se unen a sus proteínas tales como CD44, independientemente del origen, tipo, forma o similar de las mismas. Específicamente, pueden usarse anticuerpos conocidos tales como un anticuerpo animal no humano (por ejemplo, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de rata o un anticuerpo de camello), un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En la presente invención, puede utilizarse un anticuerpo monoclonal o policlonal como anticuerpo, pero es preferible un anticuerpo monoclonal. Es preferible que los anticuerpos se unan específicamente a sus proteínas tales como CD44.

Como se usa en el presente documento, “medios” se refiere a cualquier cosa que pueda ser una herramienta para lograr un objetivo (por ejemplo, detección, diagnóstico, terapia). Como se usa en el presente documento, “medios de reconocimiento selectivo” en particular se refiere a medios capaces de reconocer (detectar) un determinado sujeto de manera diferente a otros.

El agente de detección o agente de diagnóstico como se divulga en el presente documento, pero que no forma parte de la presente invención u otros medicamentos, puede estar en forma de una sonda o un cebador. Las sondas y cebadores de la presente invención pueden hibridarse específicamente con una molécula tal como CD44. Como se describe en el presente documento, la expresión de una molécula tal como CD44 es un indicador de si es una célula normal o transformada en una célula endotelial corneal. Además, tal expresión es útil como indicador del nivel de transformación. Por lo tanto, las sondas y cebadores de acuerdo con la presente invención pueden usarse para identificar una célula endotelial corneal como una célula normal o transformada y/o el grado de transformación. En una realización, las sondas y cebadores de la presente invención solo necesitan poder detectar la expresión de una molécula tal como CD44 y se refieren a un polímero que consiste en bases o pares de bases tales como múltiples ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN). Se sabe que puede usarse ADNc bicatenario en la hibridación *in situ* de tejidos. Las sondas y cebadores de la presente invención también incluyen tal ADNc bicatenario. Los ejemplos de sondas y cebadores especialmente preferidos en la detección de ARN en un tejido incluyen sondas de ARN (ribosondas).

Como se usa en el presente documento, “cebador (de ácido nucleico)” se refiere a una sustancia requerida para iniciar una reacción de un compuesto polimérico que va a sintetizarse en una reacción enzimática de síntesis de polímero. Una reacción de síntesis de una molécula de ácido nucleico puede usar una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN o similar) complementaria a una porción de una secuencia de un compuesto polimérico que va a sintetizarse. Puede usarse un cebador en el presente documento como medio de detección del marcador.

Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico generalmente usadas como cebador incluyen aquellas con una secuencia de ácido nucleico con una longitud de al menos 8 nucleótidos contiguos, que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de un gen de interés (por ejemplo, marcadores de la presente invención). Tal secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de ácido nucleico preferiblemente con una longitud de al menos 9 nucleótidos contiguos, más preferiblemente con una longitud de al menos 10 nucleótidos contiguos, y todavía más preferiblemente con una longitud de al menos aproximadamente 11 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 12 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 13 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 14 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 16 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos

aproximadamente 17 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 18 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 19 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 25 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 30 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 40 nucleótidos contiguos o una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos. Tales secuencias de ácido nucleico usadas como cebador incluyen secuencias de ácido nucleico que son al menos el 70 % homólogas, más preferiblemente al menos el 80 % homólogas, todavía más preferiblemente al menos el 90 % homólogas o al menos el 95 % homólogas a las secuencias mencionadas anteriormente. Si bien una secuencia que es adecuada como cebador puede variar dependiendo de la naturaleza de la secuencia que va a sintetizarse (amplificarse), los expertos en la técnica pueden diseñar adecuadamente un cebador de acuerdo con una secuencia prevista. Los diseños de tales cebadores se conocen bien en la técnica. Pueden diseñarse cebadores manualmente o mediante el uso de un programa informático (por ejemplo, LASERGENE, PrimerSelect, DNAStar).

Los cebadores de acuerdo con la presente invención también pueden usarse como un conjunto de cebadores que consiste en dos o más tipos de tales cebadores.

Los cebadores y conjuntos de cebadores de acuerdo con la presente invención pueden usarse como un cebador y un conjunto de cebadores de acuerdo con un método convencional en un método conocido para detectar un gen de interés usando un método de amplificación de ácidos nucleicos tal como PCR, RT-PCR, PCR en tiempo real, PCR *in situ* o LAMP.

Los conjuntos de cebadores de acuerdo con la presente invención pueden seleccionarse de modo que la secuencia de nucleótidos de una proteína de interés de una molécula tal como CD44 o similar pueda amplificarse mediante un método de amplificación de ácido nucleico tal como PCR. Los métodos de amplificación de ácido nucleico se conocen bien, y la selección de un par de cebadores en un método de amplificación de ácido nucleico es evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden seleccionarse cebadores en la PCR de modo que uno de los dos cebadores (par de cebadores) se conjuga con una cadena positiva de un ADN bicatenario de una proteína de interés de una molécula tal como CD44 y el otro cebador se conjuga con la cadena negativa del ADN bicatenario, y uno de los cebadores se conjuga con una cadena extendida que extiende el otro cebador. Para el método LAMP (documento WO 00/28082), se definen tres regiones F3c, F2c y F1c desde el extremo 3' terminal y se definen tres regiones B1, B2 y B3 desde el extremo 5' terminal en el gen diana, y estas 6 regiones pueden usarse para diseñar cuatro tipos de cebadores. Los cebadores de la presente invención pueden sintetizarse químicamente basándose en las secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento. La preparación de cebadores se conoce bien y puede prepararse de acuerdo con, por ejemplo, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2ª ed." (1994).(Cold Spring Harbor Press (1989)), "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons (1987-1997)).

Como se usa en el presente documento, "sonda" se refiere a una sustancia que puede ser un medio de búsqueda, que se usa en un experimento biológico tal como cribado *in vitro* y/o *in vivo*. Los ejemplos de la misma incluyen, pero no se limitan a, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de bases específica, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos específica, un anticuerpo específico, un fragmento del mismo y similares. En el presente documento se usa una sonda como medio para la detección de marcadores.

Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico generalmente usadas como sonda incluyen aquellas con una secuencia de ácido nucleico con una longitud de al menos aproximadamente 8 nucleótidos contiguos, que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de un gen de interés. Tal secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de ácido nucleico preferiblemente con una longitud de al menos aproximadamente 9 nucleótidos contiguos, más preferiblemente con una longitud de al menos 10 nucleótidos contiguos, y todavía más preferiblemente con una longitud de al menos aproximadamente 11 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 12 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 13 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 14 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 25 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 30 nucleótidos contiguos, una longitud de al menos aproximadamente 40 nucleótidos contiguos o una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos. Tales secuencias de ácido nucleico usadas como sonda incluyen secuencias de ácido nucleico que son al menos aproximadamente el 70 % homólogas, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80 % homólogas, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 % homólogas o al menos aproximadamente el 95 % homólogas a las secuencias mencionadas anteriormente.

En un aspecto, el agente de detección como se divulga en el presente documento, pero que no forma parte de la presente invención, puede estar marcado. Alternativamente, el agente de detección puede estar acoplado a una etiqueta.

Como se usa en el presente documento, "etiqueta" se refiere a una entidad (por ejemplo, sustancia, energía, onda electromagnética o similar) para distinguir una molécula o sustancia de interés de otras. Tal método de marcaje incluye el método de RI (radioisótopo), método de fluorescencia, método de biotina, método quimioluminiscente y similares. Cuando una pluralidad de marcadores de la presente invención o agentes o medios para capturar los mismos se

marcan mediante un método de fluorescencia, el marcaje se realiza con sustancias fluorescentes que tienen diferentes longitudes de onda máximas de emisión fluorescente. Es preferible que la diferencia en las longitudes de onda máximas de emisión fluorescente sea de 10 nm o mayor. Cuando se marca un ligando, puede usarse cualquier marcador que no afecte a la función. Los ejemplos de marcadores realmente usados en FACS incluyen FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, Alexa™Fluor™488 y Alexa™Fluor647. En un ejemplo típico de inmunotinción, pueden combinarse Alexa™Fluor488, Alexa™Fluor555 o Alexa™Fluor594 y Alexa™Fluor647 para su uso. Alexa™Fluor es un colorante fluorescente soluble en agua obtenido modificando la cumarina, rodamina, fluoresceína, cianina o similares. Esta es una serie compatible con una amplia gama de longitudes de onda de fluorescencia. En relación con otros colorantes fluorescentes para la longitud de onda correspondiente, Alexa™Fluor es muy estable, brillante y tiene un bajo nivel de sensibilidad al pH. Las combinaciones de colorantes fluorescentes con una longitud de onda máxima de fluorescencia de 10 nm o mayor incluyen una combinación de Alexa™555 y Alexa™633, combinación de Alexa™488 y Alexa™555 y similares. Cuando se marca un ácido nucleico, puede usarse cualquier marcador que pueda unirse a una porción de base del mismo, pero puede usarse un colorante de cianina (por ejemplo, Cy3, Cy5 o similar de la serie CyDye™), reactivo de rodamina 6G, N-acetioxi-N2-acetilaminofluoreno (AAF), AAIF (derivado de yodo de AAF) o similares. Los ejemplos de marcadores en uso real incluyen DAPI y Hoechst 33342. Los ejemplos de una sustancia fluorescente con una diferencia en las longitudes de onda máximas de emisión fluorescente de 10 nm o más incluyen una combinación de Cy5 y un reactivo de rodamina 6G, una combinación de Cy3 y fluoresceína, una combinación de un reactivo de rodamina 6G y fluoresceína y similares. La presente invención puede utilizar un marcador de este tipo para alterar un sujeto de interés para que sea detectable por los medios de detección que van a usarse. Tal alteración se conoce en la técnica. Los expertos en la técnica pueden llevar a cabo de manera apropiada tal método de acuerdo con el marcador y el sujeto de interés.

De acuerdo con una realización de detección en la presente invención, puede detectarse una molécula tal como CD44 en una muestra celular o la expresión de un gen de la molécula hibridando la sonda de acuerdo con la presente invención con una muestra de ácido nucleico (ARNm o un producto de transcripción del mismo) y detectando directa o indirectamente un complejo de hibridación, es decir, una doble cadena de nucleótidos. Para un procedimiento detallado de métodos de hibridación, puede hacerse referencia a lo siguiente: “Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2ª ed.” (1994).(Cold Spring Harbor Press (1989), especialmente la Sección 9.47-9.58), “Current Protocols in Molecular Biology” (John Wiley & Sons (1987-1997), especialmente la Sección 6.3-6.4), “ADN Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2ª ed.” (Universidad de Oxford (1995), para condiciones, especialmente la Sección 2.10).

La detección de la expresión de una molécula tal como CD44 o genes de estas moléculas utilizando un método de hibridación puede implementarse mediante, por ejemplo, (a) poniendo en contacto un polinucleótido derivado de una muestra de prueba con la sonda de acuerdo con la presente invención; y (b) detectando un complejo de hibridación. En la etapa (a), el ARNm preparado a partir de una muestra de prueba de interés o ADN complementario (ADNc) transcrito a partir del ARNm puede ponerse en contacto con la sonda como el polinucleótido derivado de una muestra de célula de prueba. En un método de detección usando una sonda, la sonda puede marcarse para su uso. Los ejemplos del marcador incluyen marcadores que utilizan radiactividad (por ejemplo, ^{32}P, ^{14}C y ^{35}S), fluorescencia (por ejemplo, FITC y europio) y una reacción enzimática tal como quimioluminiscencia (por ejemplo, peroxidasa y fosfatasa alcalina) o similares. Puede detectarse un producto de hibridación usando un método bien conocido tal como hibridación de tipo Northern, hibridación de tipo Southern, hibridación de colonias, o similares. Dado que una célula a partir de la cual se detecta un complejo de hibridación es una célula que expresa una molécula tal como CD44, puede determinarse que la célula tiene una alta capacidad de proliferación (una célula indiferenciada, una célula progenitora, una célula madre o similar) y/o una alta capacidad de diferenciación.

De acuerdo con otra realización de detección de acuerdo con la presente invención, la expresión de moléculas tales como CD44 o genes de estas moléculas en una muestra puede detectarse amplificando una muestra de ácido nucleico (ARNm o un producto de transcripción del mismo) mediante un método de amplificación de ácidos nucleicos usando el cebador o el conjunto de cebadores de acuerdo con la presente invención y detectando el producto de amplificación.

Puede implementarse la detección de la expresión de moléculas tales como CD44 o genes de estas moléculas utilizando un método de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, (i) realizando un método de amplificación de ácido nucleico usando el cebador o el conjunto de cebadores de acuerdo con la presente invención mientras se usa un polinucleótido derivado de una muestra de prueba como molde; y (ii) detectando el producto de amplificación formado.

En la etapa (i), el ARNm preparado a partir de una muestra de prueba de interés o ADN complementario (ADNc) transcrito a partir del ARNm puede usarse como molde. Puede detectarse un producto de amplificación usando un método de amplificación de ácido nucleico tal como PCR, RT-PCR, PCR en tiempo real o un método de LAMP. Una célula a partir de la cual se detecta un producto de amplificación es altamente probable una célula endotelial corneal normal para un marcador de células endoteliales corneales normal y altamente probable una célula endotelial corneal transformada para un marcador de células endoteliales corneales transformadas. Por lo tanto, puede determinarse que la célula es una célula normal o transformada.

Como método inmunológico, puede aplicarse un método conocido tal como un método de tinción inmunohistológica, un ensayo inmunométrico enzimático, un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método de aglutinación,

un método de competición o un método de tipo sándwich a una muestra obtenida sometiendo una muestra celular a un tratamiento apropiado según sea necesario, tal como separación de una célula o una operación de extracción. Puede realizarse el método de tinción inmunohistológica, por ejemplo, mediante un método directo usando un anticuerpo marcado, un método indirecto que usa un anticuerpo marcado frente al anticuerpo anterior, o similares. Como agente de marcaje, puede usarse una sustancia de marcaje conocida tal como una sustancia fluorescente, una sustancia radiactiva, una enzima, un metal o un colorante.

En la presente invención, “Rho quinasa” se refiere a serina/treonina quinasa que se activa con la activación de Rho. Los ejemplos de la misma incluyen ROKalfa (ROCK-II: Leung, T. *et al.*, J. Biol. Chem., 270, 29051-29054, 1995), p160ROCK (ROKbeta, ROCK-I: Ishizaki, T. *et al.*, The EMBO J., 15(8), 1885-1893, 1996) y otras proteínas que tienen actividad serina/treonina quinasa.

Los ejemplos de inhibidores de Rho quinasa incluyen compuestos dados a conocer en los siguientes documentos: patente estadounidense n.º 4678783, patente japonesa n.º 3421217, publicación internacional n.º WO 95/28387, publicación internacional n.º WO 99/20620, publicación internacional n.º WO 99/61403, publicación internacional n.º WO 02/076976, publicación internacional n.º WO 02/076977, publicación internacional n.º WO 2002/083175, publicación internacional n.º WO 02/100833, publicación internacional n.º WO 03/059913, publicación internacional n.º WO 03/062227, publicación internacional n.º WO 2004/009555, publicación internacional n.º WO 2004/022541, publicación internacional n.º WO 2004/108724, publicación internacional n.º WO 2005/003101, publicación internacional n.º WO 2005/039564, publicación internacional n.º WO 2005/034866, publicación internacional n.º WO 2005/037197, publicación internacional n.º WO 2005/037198, publicación internacional n.º WO 2005/035501, publicación internacional n.º WO 2005/035503, publicación internacional n.º WO 2005/035506, publicación internacional n.º WO 2005/080394, publicación internacional n.º WO 2005/103050, publicación internacional n.º WO 2006/057270, publicación internacional n.º WO 2007/026664 y similares. Tales compuestos pueden fabricarse mediante los métodos descritos en los respectivos documentos en los que se describen los compuestos. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen 1-(5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina o una sal de la misma (por ejemplo, fasudil o clorhidrato de fasudil), (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano((R)-(+)-trans-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-ciclohexanocarboxamida) o una sal de la misma (por ejemplo, Y-27632 (diclorhidrato de (R)-(+)-trans-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-ciclohexanocarboxamida monohidratado) y similares) y similares. Para estos compuestos, también puede usarse preferiblemente un producto disponible comercialmente (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Asahi Kasei Pharma Corporation y similares).

Como se usa en el presente documento, “diagnóstico” se refiere a la identificación de diversos parámetros asociados con una enfermedad, trastorno, afección (por ejemplo, queratopatía ampollosa, disfunción endotelial de Fuchs) o similares en un sujeto para determinar el estado actual o futuro de tal enfermedad, trastorno o afección. La afección en el cuerpo puede investigarse usando el método, un aparato o sistema divulgado en el presente documento, pero no forman parte de la presente invención. Tal información puede usarse para seleccionar y determinar diversos parámetros de una formulación o método para el tratamiento o la prevención que va a administrarse, enfermedad, trastorno o afección en un sujeto o similar. Como se usa en el presente documento, “diagnóstico” cuando se define de manera estrecha se refiere al diagnóstico del estado actual, pero cuando se define ampliamente incluye “diagnóstico temprano”, “diagnóstico predictivo”, “prediagnóstico” y similares. Puesto que el método de diagnóstico como se divulga en el presente documento, pero no que no forma parte de la presente invención, en principio, puede utilizar lo que sale de un cuerpo y puede llevarse a cabo lejos de un profesional sanitario tal como un médico, la presente invención es industrialmente útil. Con el fin de aclarar que el método puede llevarse a cabo lejos de un profesional sanitario tal como un médico, el término como se usa en el presente documento puede denominarse particularmente “diagnóstico predictivo, prediagnóstico o diagnóstico” “de ayuda”.

Como se usa en el presente documento, “terapia” se refiere a la prevención de la exacerbación, preferiblemente mantenimiento de la afección actual, más preferiblemente alivio y todavía más preferiblemente la desaparición de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, queratopatía ampollosa, disfunción endotelial de Fuchs) en caso de tal afección, incluyendo ser capaz de ejercer un efecto profiláctico o un efecto de mejora de una enfermedad de un paciente o uno o más síntomas que acompañan a la enfermedad. El diagnóstico preliminar con una terapia adecuada puede denominarse “terapia complementaria” y un agente de diagnóstico para el mismo puede denominarse “agente de diagnóstico complementario”.

Como se usa en el presente documento, “uso combinado” de un determinado principio farmacéutico (por ejemplo, medicamento celular de la presente invención o similar) con otro principio farmacéutico (por ejemplo, agente combinado tal como inhibidor de ROCK o similar) pretende abarcar (co)administración concomitante y administración continua. Se pretende que la administración continua abarque la administración de un medicamento (uno o más tipos) con un medicamento de la presente invención (uno o más tipos) o similares a un sujeto en diversos órdenes. Un agente para el “uso combinado” y la administración de un cierto principio farmacéutico (por ejemplo, medicamento celular de la presente invención o similar) con otro principio farmacéutico (por ejemplo, inhibidor de ROCK o similar) también puede denominarse “agente combinado” o “fármaco combinado”.

El término “pronóstico”, como se usa en el presente documento, se refiere a la predicción de la posibilidad de progresión o muerte debido a una enfermedad tal como queratopatía ampollosa o disfunción endotelial de Fuchs. Un

agente de pronóstico es una variable relacionada con el curso natural de una enfermedad, que afecta a la tasa de recurrencia del resultado de un paciente que ha experimentado la enfermedad. Los ejemplos de indicadores clínicos asociados con la exacerbación del pronóstico incluyen cualquier indicador celular usado en la presente invención. Un agente de pronóstico se usa a menudo para clasificar a los pacientes en subgrupos con diferentes afecciones patológicas.

Como se usa en el presente documento, “fármaco (agente) de detección” o “fármaco (agente) de inspección” se refiere en general a todos los agentes capaces de detectar o inspeccionar una diana de interés.

Como se usa en el presente documento, “fármaco (agente) de diagnóstico” se refiere en general a todos los agentes capaces de diagnosticar una afección de interés (por ejemplo, enfermedad tal como enfermedad endotelial de córnea).

Como se usa en el presente documento, “fármaco (agente) terapéutico” se refiere en general a todos los agentes capaces de tratar una afección de interés (por ejemplo, enfermedades tales como enfermedad endotelial de córnea). En una realización de la presente invención, “fármaco terapéutico” puede ser una composición farmacéutica que comprende un principio eficaz y uno o más portadores farmacológicamente aceptables. Puede fabricarse una composición farmacéutica, por ejemplo, mezclando un principio eficaz y los portadores descritos anteriormente mediante cualquier método conocido en el campo técnico de los productos farmacéuticos. Además, el modo de uso de un fármaco terapéutico no está limitado, siempre que se use para terapia. Un fármaco terapéutico puede ser un principio eficaz solo o una mezcla de un principio eficaz y cualquier principio. Además, la forma de los portadores descritos anteriormente no está particularmente limitada. Por ejemplo, el portador puede ser un sólido o líquido (por ejemplo, disolución tampón). Cabe señalar que un medicamento incluye fármacos (fármaco profiláctico) para la prevención y medicamentos (fármacos terapéuticos) para mejorar el estado de una enfermedad endotelial de córnea.

Como se usa en el presente documento, “prevención” se refiere a la acción de tomar una medida contra una enfermedad o trastorno (por ejemplo, enfermedad endotelial de córnea) por estar en tal condición antes de estar en tal condición. Por ejemplo, es posible usar el agente de la presente invención para realizar el diagnóstico, y opcionalmente usar el agente de la presente invención para prevenir o tomar medidas para prevenir la enfermedad o similares.

Como se usa en el presente documento, “fármaco (agente) profiláctico” se refiere en general a todos los agentes capaces de prevenir una afección de interés (por ejemplo, enfermedad endotelial de córnea o similar).

La composición, medicamento, agente (agente terapéutico, agente profiláctico) y similares de la presente invención comprenden generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de medicamento o principio eficaz y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, “farmacéuticamente aceptable” significa aquella sustancia aprobada por una agencia reguladora gubernamental o enumerada en la farmacopea u otra farmacopea comúnmente reconocida para su uso en animales y más específicamente en seres humanos. Como se usa en el presente documento, “portador” se refiere a un cultivo, vehículo de infusión, disolución de irrigación, diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo administrado junto con un medicamento. El medicamento celular de la presente invención comprende una célula como componente principal. Por lo tanto, el portador es preferiblemente capaz de mantener una célula tal como cultivo, vehículo de infusión o disolución de irrigación. Además del medicamento celular, la presente invención puede usar otros medicamentos en combinación, tales como un agente esteroide, antimicrobiano o inhibidor de ROCK. Tal medicamento puede tener la misma forma de dosificación que los medicamentos comunes. Tal portador puede ser un líquido aséptico tal como agua o aceite, incluidos, pero sin limitarse a, líquidos derivados del petróleo, animal, planta o síntesis, así como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Cuando se administra un medicamento (composición) por vía intravenosa, solución salina y dextrosa acuosa son portadores preferidos. Preferiblemente, se usan solución salina acuosa y la solución acuosa de dextrosa y glicerol como portador líquido de una disolución inyectable. Para la administración oral de un medicamento, el agua es el portador preferido. Los excipientes adecuados incluyen ácido silícico anhidro ligero, celulosa cristalina, manitol, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina de trigo, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerilo, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, carmelosa de calcio, carmelosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, acetato de polivinilacetaldietilamino, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 60, sacarosa, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, sal inorgánica y similares. Cuando se desee, la composición puede contener una pequeña cantidad de agente humectante o emulsionante o tampón de pH. Estas composiciones pueden estar en forma de disolución, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, polvo, mezcla de liberación sostenida o similar. También es posible usar agentes aglutinantes y portadores tradicionales, tales como triglicérido, preparar una composición como supositorio. La preparación oral también puede comprender un portador convencional tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa o carbonato de magnesio de calidad medicinal. Se describen ejemplos de un portador adecuado en E. W. Martin, Remington’s Pharmaceutical Sciences (Mark Publishing Company, Easton, U.S.A). Tal composición contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de agente terapéutico y preferiblemente en una forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador, de manera que la composición se proporciona en una forma adecuada para su administración a un paciente. Una preparación debe ser adecuada para el formato de administración. Además, la composición puede comprender, por ejemplo, un tensioactivo, excipiente, agente colorante, agente aromatizante,

conservante, estabilizador, tampón, suspensión, agente isotonizante, agente aglutinante, disgregante, lubricante, agente mejorador de la fluidez, corrector o similar.

Cuando la presente invención se administra como un medicamento, se conocen diversos sistemas de administración, y tales sistemas pueden usarse para administrar el medicamento de la presente invención a un sitio adecuado (por ejemplo, cámara anterior ocular). Una forma de dosificación típica del medicamento celular de la presente invención es la inyección en la cámara anterior. En tal caso, puede suspenderse una célula en un vehículo de infusión e inyectarse con una aguja (por ejemplo, aguja 26G) en la cámara anterior. Otros fármacos de uso combinado pueden usar la misma forma de dosificación que los medicamentos comunes. Los ejemplos de tal sistema incluyen liposomas, micropartículas, encapsulación en una microcápsula y similares. Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a, vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y orales. Un medicamento puede administrarse por cualquier vía adecuada, tal como mediante inyección, inyección en bolo o absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, cavidad oral, recto, mucosa intestinal o similar). Además, puede usarse un inhalador o nebulizador usando un agente aerosolizante según sea necesario. Además, las células también pueden administrarse juntas. La administración puede ser sistémica o local o tópica.

En una realización preferida, puede prepararse una composición como una composición farmacéutica adaptada a la administración a seres humanos de acuerdo con un método conocido. Tal composición puede administrarse mediante inyección o infusión. Cuando una composición va a administrarse por inyección, la composición puede distribuirse usando una botella de inyección que contiene disolución de infusión celular, agua de calidad de agente aséptico o solución salina.

El medicamento de bajo contenido en molécula o polímero tal como un fármaco combinado (por ejemplo, antibiótico o inhibidor de ROCK) de la presente invención puede prepararse como una forma neutra o de sal u otros profármacos (por ejemplo, éster o similar). Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales formadas con un grupo carboxilo libre, derivado de ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico o similares, sales formadas con un grupo amina libre, derivado de isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína o similares, y sales derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxido férrico o similares.

La cantidad (recuento de células, número de administración o similar) del medicamento de la presente invención que es eficaz en la terapia de un trastorno o afección específico puede variar dependiendo de las propiedades del trastorno o afección. Sin embargo, una cantidad de este tipo pueden determinarla los expertos en la técnica mediante una técnica clínica convencional basándose en las descripciones en el presente documento. Además, puede usarse un ensayo *in vitro* en algunos casos para ayudar a la identificación del intervalo de dosificación óptimo. La dosis precisa que va a usarse en una preparación también puede variar dependiendo de la vía de administración o la gravedad de la enfermedad o trastorno. Por lo tanto, la dosis debe determinarse de acuerdo con el criterio del médico encargado o el estado de cada paciente. La dosificación no está particularmente limitada, pero puede usarse cualquier densidad celular y cantidad descrita en el presente documento o dentro de un intervalo entre dos valores cualesquiera de los mismos, tal como 1,5 X 10^6 células. El intervalo de dosificación no está particularmente limitado, pero puede ser, por ejemplo, una sola administración o 1 o 2 administraciones cada 1, 7, 14, 21 o 28 días o 1 o 2 administraciones en el intervalo de periodo entre dos valores cualesquiera descritos anteriormente. La dosificación, el intervalo de dosificación y el método de dosificación pueden seleccionarse adecuadamente dependiendo de la edad o el peso del paciente, los síntomas, la enfermedad diana o similares. Además, es preferible que un fármaco terapéutico contenga una cantidad terapéuticamente eficaz, o una cantidad eficaz para ejercer un efecto deseado, de ingredientes eficaces. Cuando un marcador que indica una afección patológica disminuye significativamente después de la administración, puede reconocerse la presencia de un efecto terapéutico. La dosis eficaz puede estimarse a partir de una curva de reacción a la dosis obtenida de un sistema de prueba *in vitro* o de modelos animales.

“Paciente” en una realización de la presente invención supone principalmente seres humanos, pero pueden ser mamíferos distintos de seres humanos cuando sea aplicable.

(Realizaciones preferidas)

Se describen realizaciones preferidas de la presente invención a continuación en el presente documento. Las realizaciones se proporcionan a continuación para una mejor comprensión de la presente invención. Se entiende que el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas y no debe limitarse a las siguientes descripciones. Por lo tanto, es evidente que los expertos en la técnica pueden hacer modificaciones apropiadamente dentro del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones, haciendo referencia a las descripciones en el presente documento. Se entiende que las siguientes realizaciones de la presente invención pueden usarse solas o en combinación.

(Células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano)

En un aspecto, la presente invención, como se define en las reivindicaciones, proporciona una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una

cámara anterior de un ojo humano (también denominada célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención). Dado que la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la presente invención tiene una propiedad funcional endotelial corneal de un endotelio corneal diferenciado maduro y ejerce un efecto en la terapia de infusión celular (por ejemplo, capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano), tal célula puede denominarse normalmente célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano. La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención puede incluir células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales, así como células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas. La célula endotelial corneal madura funcional diferenciada de la presente invención es una célula diferenciada madura que ejerce una función endotelial de la córnea. Una célula efectora, que es la subpoblación óptima para la infusión, forma una forma de adoquín hexagonal pequeño, y utiliza un sistema de metabolismo energético mediante una función mitocondrial.

Se han notificado células denominadas “células endoteliales corneales cultivadas” o “células endoteliales corneales humanas cultivadas”. Sin embargo, no se sabía que tales células están compuestas de múltiples subpoblaciones, o que hay una subpoblación entre ellas que es particularmente óptima para la terapia de infusión celular. Por lo tanto, la importancia de la presente invención que ha revelado esto es considerable. En particular, antes de la divulgación de la presente invención, el problema relacionado con la heterogeneidad de las células asociadas con la medicina regenerativa no se reconocía claramente para las células endoteliales corneales humana. La importancia de descubrir y solucionar tal problema es considerable. Esto se debe a que, aunque las células endoteliales corneales humanas (HCEC) no pueden experimentar división celular *in vivo*, de modo que el ciclo celular se detiene en la fase G1, la capacidad de proliferar todavía se conserva y se entiende que es muy difícil cultivar una HCEC durante un largo período de tiempo en vista de estudios recientes.

Un ejemplo de aplicación de la presente invención es notable especialmente en términos de usar una célula endotelial corneal humana diferenciada madura “alo” funcional, que es de alta calidad, libre de anomalía de cariotipo y que no provoca rechazo inmunológico, como suspensión para permitir la regeneración de una función endotelial de la córnea mediante infusión en la cámara anterior. La técnica médica que usa la célula de la presente invención permite la terapia donde una célula endotelial corneal de donantes especialmente jóvenes se cultiva, se expande y se amplifica *ex vivo*, y luego se infunde una suspensión celular en la cámara anterior de un paciente con queratopatía ampollosa. La presente invención ha demostrado/establecido la seguridad y POC (prueba de concepto) clínica en aplicaciones humanas en estudios clínicos basados en las directrices para estudios clínicos usando una célula madre humana.

Una de las razones por las que las células de la presente invención pudieron proporcionarse es el descubrimiento de que las células usadas en la terapia de infusión son mezclas de subpoblaciones de células heterogéneas y solo algunas de ellas son “células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano” que pueden usarse en terapia.

La presente invención reveló que se producen anomalías de cariotipo de una manera selectiva de subpoblación y hay autoanticuerpos que reaccionan selectivamente en la subpoblación en células endoteliales corneales. Se reveló que la célula funcional que posee la propiedad endotelial de la córnea de la invención, especialmente células endoteliales corneales maduras diferenciadas funcionales, no tiene tal anomalía, y en relación con otras subpoblaciones, la expresión del antígeno HLA de clase I asociado con el rechazo inmunológico es relativamente baja, y la expresión del antígeno CD200, que hasta ahora se había especulado que era un marcador celular, fue negativa. También se reveló que la producción de citocinas (proteína relacionada con SASP) asociada con la senescencia celular es alta en una célula no prevista.

Antes de la divulgación de la presente invención, los medios de cultivo reproducibles fueron limitados. Los intentos de cultivar una célula endotelial corneal humana cultivada sin transición de estado celular (CST) tal como fibrosis, senescencia celular o transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) o anomalía de cariotipo *in vitro* fue notablemente difícil debido a la falta completa de conocimiento relacionado con las propiedades celulares de la misma y el conocimiento/notificación relacionado con si una población celular está compuesta por múltiples subpoblaciones o una población celular producida de acuerdo con las condiciones de cultivo presenta una composición estable, de modo que el análisis desde tales puntos de vista ni siquiera se realizó.

Las HCEC cultivadas tienden a experimentar CST para tener fenotipo senescente, EMT y morfología fibroblástica. Los inventores identificaron un marcador de superficie celular claro que identifica dichas HCEC para permitir que se definan las poblaciones de HCEC que pueden aplicarse a la reconstrucción del tejido endotelial corneal humano disfuncional.

Se seleccionaron varios marcadores de CD para definir una SP mientras se consideraba el informe sobre la aneuploidía de cariotipo en cHCEC y la plasticidad de un perfil metabólico de cHCEC. Los marcadores seleccionados fueron CD166, CD44, CD49e, CD73, CD105, CD90, CD133, CD26 y CD24, que estaban implicados de alguna manera en células madre mesenquimatosas (MSC), células madre cancerosas (CSC) o transformación durante CST (Davies S, Beckenkamp A, Buffon A. Biomed Pharmacother. 2015; 71:135-8; Roberta Pang, *et al.*, Stem Cell, 6, 2010, 603-615; Krawczyk N, *et al.*, Biomed Res Int. 2014; 2014: 415721. Epub 8 de mayo de 2014; Irrolo E, Pirozzi G. Am J

Transl Res. 2013 Sep 25; 5:563-81; Williams K, *et al.*, Exp Biol Med (Maywood). 2013; 38:324-38; Zhe Shi, *et al.*, Mol Cell Biochem (2015) 401: 155-164). Aunque esta selección parecía apropiada, esto se debió a que una célula madre normal es una célula que sobrevive más tiempo en el tejido y es muy probable que acumule mutaciones debido al paso del tiempo, de modo que una CSC puede surgir de una célula amplificadora de tránsito (B. Immunol.J. Huntly Cancer Cell, 6 (2004), 587-596; C.H. Jamieson *et al.*, N. Engl. J. Med., 351 (2004), págs. 657-667).

Antes de la divulgación de la presente invención, no se conocía un marcador (grupo) de superficie celular específico de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional humana en su verdadero sentido. Se propusieron glipicano-4 y CD200 como marcadores de HCEC para distinguir las HCEC de los fibroblastos del estroma corneal (Cheong YK *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54: 4538-4547). Sin embargo, se descubrió que los problemas prácticos con el cultivo de HCEC están en la coexistencia de una célula endotelial corneal humana cultivada vulnerable que ha experimentado transformación. Esto se superó mediante el método de fabricación proporcionado por la presente invención.

El análisis de citometría de flujo muestra la presencia de varios tipos de subpoblaciones en células endoteliales corneales humanas cultivadas, y un tipo de subpoblación de células endoteliales corneales humana cultivadas específicas con expresión de superficie de CD166 positivo, CD105 negativo, CD44 negativo, CD24 negativo y CD26 negativo es una subpoblación representativa sin CST. Este es un nuevo hallazgo que permite la aplicación de esta subpoblación al uso clínico. La combinación de marcadores de CD definidos en el presente documento es adecuada para el control de calidad para garantizar la característica funcional de una célula endotelial corneal humana cultivada para aplicaciones clínicas. Los inventores continuaron con la investigación para descubrir un indicador celular que refleje más adecuadamente una propiedad funcional endotelial corneal de una célula endotelial corneal diferenciada madurada funcional.

En una realización, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene una propiedad de expresión corneal del indicador celular definido en el presente documento.

Los indicadores celulares que la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención puede tener incluyen marcadores de superficie celular (marcadores de CD y similares), propiedad del producto celular, indicador de morfología celular, propiedad genética de una célula y similares. Los ejemplos específicos de indicadores celulares pueden incluir marcadores de superficie celular (marcadores de CD y similares); propiedad del producto proteínico y material biológico relacionado del producto; propiedad de expresión de la proteína relacionada con SASP; expresión de miARN (por ejemplo, miARN intracelular, miARN secretado o similar); propiedad del exosoma; propiedad de expresión del metabolito celular y material biológico relacionado del metabolito; tamaño celular; densidad celular y presencia de células reactivas con autoanticuerpo. La célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención tiene tales indicadores celulares que presentan una propiedad funcional celular en un intervalo o nivel específico o una combinación de los mismos. Por lo tanto, es posible determinar si una célula es la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención definiendo un intervalo o nivel específico de propiedad funcional celular o una combinación de los mismos para un indicador celular específico. El intervalo o nivel específico de la propiedad funcional celular o una combinación de los mismos únicos para la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención se identificó por primera vez en la presente invención, por lo que se identifican diversas subpoblaciones celulares para permitir el control y la calidad de las pruebas y, por lo tanto, lograr una terapia altamente eficaz. Tal indicador celular y el intervalo o nivel específico de propiedad funcional celular o una combinación de los mismos se comentan específicamente con más detalle a continuación.

La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene una propiedad funcional celular que comprende CD166 positivo y CD133 negativo. La propiedad funcional celular importante adicional que es importante incluye la propiedad de expresar CD44. La intensidad de expresión del mismo es CD44 negativo a débilmente positivo, y preferiblemente CD44 negativo. La presente invención ha descubierto que puede confirmarse que una célula endotelial corneal o célula diferenciada en forma similar al endotelio corneal es funcional confirmando que la célula es CD166 positivo y CD133 negativo. Además, es posible averiguar si una célula es funcional con alta precisión confirmando, además de lo anterior, que la expresión de CD44 es baja (CD44 negativo a intermediamente positivo, preferiblemente CD44 negativo a débilmente positivo).

Por lo tanto, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene una propiedad funcional celular, como se define en las reivindicaciones y que comprende CD166 positivo, CD133 negativo y CD44 negativo a débilmente positivo. Aunque no se desea estar sujeto a ninguna teoría, se confirmó que una célula endotelial corneal o célula diferenciada en forma similar al endotelio de la córnea era una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional con alta calidad funcional al tener tres de tales marcadores celulares. Tal funcionalidad se demuestra en los resultados de investigaciones clínicas que logra un alto nivel de efecto terapéutico en un corto período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente un mes) en términos de valores en una prueba de claridad de células endoteliales corneales (especular), es decir, nivel superior a aproximadamente 1000 (células/mm^2), nivel superior a aproximadamente 2000 (células/mm^2), preferiblemente un nivel superior a aproximadamente 2300 (células/mm^2), más preferiblemente un nivel superior a aproximadamente 2500 (células/mm^2) o en algunos casos un nivel superior a aproximadamente 3000 (células/mm^2).

Más preferiblemente, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene una propiedad funcional celular que comprende CD166 positivo, CD133 negativo y CD44 negativo. Aunque no se desea estar sujeto a ninguna teoría, una célula de alta calidad con capacidad de proliferación altamente garantizada o similar (también denominada célula endotelial corneal madura funcional de “alta calidad” en el presente documento) puede proporcionarse más adecuadamente con una limitación adicional a células negativas para CD44. Una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de “alta calidad” tiene más estabilidad y propiedades funcionales endoteliales corneales mejoradas.

En otra realización, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene una propiedad funcional celular que comprende CD166 positivo, CD133 negativo y CD200 negativo. Para CD200, se ha considerado que CD200 positivo es una propiedad de una célula endotelial corneal. Mientras tanto, la presente invención examinó cada subpoblación en detalle para descubrir que una célula positiva para CD200 es una célula grande con CST que no es adecuada para la infusión, y CD200 negativo es una propiedad de una célula endotelial corneal funcional capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano. Tal propiedad fue inesperada a partir del conocimiento convencional y se considera un resultado de un análisis cuidadoso de subpoblaciones en la presente invención.

En otra realización, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene una propiedad funcional celular que comprende CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo y CD90 negativo a débilmente positivo. Esto puede garantizar adicionalmente la homogeneidad de las células. Alternativamente, los antígenos de superficie celular comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo y CD44 negativo a intermediamente positivo y CD90 negativo. En otra realización, los antígenos de superficie celular comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo y CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, o alternativamente, la célula expresa un antígeno de superficie celular que comprende fenotipo CD44 negativo a CD44 débilmente positivo.

La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención puede tener además una propiedad funcional celular adicional. Tal propiedad funcional celular puede incluir, pero no se limita a, una o más propiedades de expresión entre las siguientes propiedades de expresión: CD90 negativo (CD90 negativo a débilmente positivo), CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo, CD26 negativo, LGR5 negativo, SSEA3 negativo, MHC1 débilmente positivo (de manera especial débilmente positivo en relación con una célula con transición de estado), MHC2 negativo, PDL1 positivo, ZO-1 positivo, Na^+/K^+ ATPasa positiva, claudina 10 positiva y la siguiente tabla 1A:

[Tabla 1A]

Marcador de superficie celular	Célula funcional
CD59	**Fuertemente positivo**
CD147	**Fuertemente positivo**
CD81	**Fuertemente positivo**
CD73	**Fuertemente positivo**
CD49c	**Fuertemente positivo**
CD166	**Fuertemente positivo**
CD56	**Intermediamente positivo**
CD54	**Intermediamente positivo**
B2-uGlob	**Intermediamente positivo**
CD47	**Intermediamente positivo**
CD46	**Intermediamente positivo**
CD141	**Intermediamente positivo**
CD151	**Intermediamente positivo**
CD98	**Débilmente positivo**
CD165	**Débilmente positivo**
CD340 (Her2)	**Débilmente positivo**
CD58	**Débilmente positivo**
CD201	**Débilmente positivo**
CD140b	**débilmente positivo**
EGF-r	**Débilmente positivo**
CD63	**Débilmente positivo**
CD9	**Negativo**
CD49b	**Negativo**
CD227	**Negativo**
CD90	**Negativo**
CD44	**Negativo**

(en donde el valor de la mediana de intensidad de fluorescencia de cada marcador/control negativo (tinción por anticuerpo de control de isotipo) es

30 o más: fuertemente positivo

10 o más y menos de 30: intermediamente positivo

5 o más y menos de 10: débilmente positivo

(debe indicarse que débilmente positivo, intermediamente positivo y fuertemente positivo se denominan colectivamente “positivo”), y

menos de 5: negativo). Alternativamente, el grupo puede ser el grupo que consiste en CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo, CD26 negativo, LGR5 negativo, SSEA3 negativo, MHC1 débilmente positivo, MHC2 negativo, ZO-1 positivo, Na^+/K^+ ATPasa positiva.

Varios genes usados en la presente invención se identifican mediante los siguientes números de registro.

[Tabla 1B-1]

Nombre del gen NCBI	Registro de secuencia de aminoácidos	Registro de secuencia de ácido nucleico
MMP2	**NM_001127891.2** **NM_001302508.1** **NM_001302509.1** **NM_001302510.1** **NM_004530.5**	**NP_001121363.1** **NP_001289437.1** **NP_001289438.1** **NP_001289439.1** **NP_004521.17**
ILF3 (Otro nombre para MMP4)	**NM_001137673.1** **NM_004516.3** **NM_012218.3** **NM_017620.2** **NM_153464.2**	**NP_001131145.1** **NP_004507.2** **NP_036350.2** **NP_060090.2** **NP_703194.1**
MMP9	**NM_004994.2**	**NP_004985.2**
SPP1	**NM_000582.2** **NM_001040058.1** **NM_001040060.1** **NM_001251829.1** **NM_001251830.1**	**NP_000573.1** **NP_001035147.1** **NP_001035149.1** **NP_001238758.1** **NP_001238759.1**
TIMP1	**NM_003254.2**	**NP_003245.1**
BMP2	**NM_001200.3**	**NP_001191.1**
STEAP1	**NM_012449.2**	**NP_036581.1**
SPARC	**NM_001309443.1** **NM_001309444.1** **NM_003118.3**	**NP_001296372.1** **NP_001296373.1** **NP_003109.1**
IL13RA2	**NM_000640.2**	**NP_000631.1**
TGF β1	**NM_000660.5**	**NP_000651.3**
TGF β2	**NM_001135599.2** **NM_003238.3**	**NP_001129071.1** **NP_003229.1**
EGFR	**NM_005228.3** **NM_201282.1** **NM_201283.1** **NM_201284.1**	**NP_005219.2** **NP_958439.1** **NP_958440.1** **NP_958441.1**
FN1	**NM_001306129.1** **NM_001306130.1**	**NP_001293058.1** **NP_001293059.1**

[Tabla 1B-2]

	NM_001306131.1 **NM_001306132.1** **NM_002026.2** **NM_054034.2** **NM_212474.1** **NM_212476.1** **NM_212478.1** **NM_212482.1**	**NP_001293060.1** **NP_001293061.1** **NP_002017.1** **NP_473375.2** **NP_997639.1** **NP_997641.1** **NP_997643.1** **NP_997647.1**
EGR1	**NM_001964.2**	**NP_001955.1**

SERPINB2	**NM_001143818.1 NM_002575.2**	**NP_001137290.1 NP_002566.1**
C044	**NM_000610.3 NM_001001389.1 NM_001001390.1 NM_001001391.1 NM_001001392.1 NM_001202555.1 NM_001202556.1 NM_001202557.1**	**NP_000601.3 NP_001001389.1 NP_001001390.1 NP_001001391.1 NP_001001392.1 NP_001189484.1 NP_001189485.1 NP_001189486.1**
ALCAM (Otro nombre para CD166)	**NM_001243280.1 NM_001243281.1 NM_001243283.1 NM_001627.3**	**NP_001230209.1 NP_001230210.1 NP_001230212.1 NP_001618.2**
ENG (Otro nombre para CD105)	**NM_000118.3 NM_001114753.2 NM_001278138.1**	**NP_000109.1 NP_001108225.1 NP_001265067.1**
CD24	**NM_001291737.1 NM_001291738.1 NM_001291739.1 NM_013230.3**	**NP_001278666.1 NP_001218667.1 NP_001278668.1 NP_037362.1**
COL1A2	**NM_000089.3**	**NP_000080.2**
COL3A1	**NM_000090.3**	**NP_000081.1**
COL4A1	**NM_001303110.1.**	**NP_001290039.1.**
COL4A2	**NM_001846.2.**	**NP_001837.2.**

[Tabla 1B-3]

COL5A1	**NM_000093.4.**	**NP_000084.3.**
COL8A)	**NM_001850.4**	**NP_001841.2**
	NM_020351.3	**NP_065084.2**
COL8A2	**NM_005202.3 NM_001294347.1**	**NP_005193.1 NP_001281278.1**
IL6	**XM_011515390.1 XM_005249745.3 XM_011515391.1**	**XP_011513692.1 XP_005249802.1 XP_011513693.1**
CXCL8 (Otro nombre para IL8)	**NM_000584.3**	**NP_000575.1**
1L10	**NM_000572.2**	**NP_000563.1**
IL18	**NM_001243211.1 NM_001562.3**	**NP_001230140.1 NP_001553.1**
IL33	**NM_001199640.1 NM_001199641.1 NM_001314044.1 NM_001314045.1 NM_001314046.1 NM_001314047.1 NM_001314048.1 NM_033439.3**	**NP_001186569.1 NP_001186570.1 NP_001300973.1 NP_001300974.1 NP_001300975.1 NP_001300976.1 NP_001300977.1 NP_254274.1**
TSLP	**NM_033035.4 NM_138551.4**	**NP_149024.1 NP_612561.2**
CDH1	**NM_001317184.1 NM_001317185.1 NM_001317186.1 NM_004360.4**	**NP_001304113.1 NP_001304114.1 NP_001304115.1 NP_004351.1**
CDH2	**NM_001308176.1 NM_001792.4**	**NP_001295105.1 NP_001783.2**
VIM	**NM_003380.3**	**NP_003371.2**
CDKN1B	**NM_004064.4**	**NP_004055.1**
CDKN1C	**NM_000076.2 NM_001122630.1**	**NP_000067.1 NP_001116102.1**

[Tabla 1B-4]

	NM_001122631.1	NP_001116103.1
CDKN2C	NM_001262.2 NM_078626.2	NP_001253.1 NP_523240.1
NOX4	NM_001143836.2 NM_001143837.1 NM_001291926.1 NM_001291927.1 NM_001291929.1 NM_001300995.1 NM_016931.4	NP_001137308.1 NP_001137309.1 NP_001278855.1 NP_001278856.1 NP_001278858.1 NP_001287924.1 NP_058627.1
HGF	NM_000601.4 NM_001010931.2 NM_001010932.1 NM_001010933.2 NM_001010934.2	NP_000592.3 NP_001010931.1 NP_001010932.1 NP_001010933.1 NP_001010934.1
THBS2	NM_003247.3	NP_003238.2
LGR5	NM_001277226.1 NM_001277227.1 NM_003667.3	NP_001264155.1 NP_001264156.1 NP_003658.1
IGFBP3	NM_000598.4 NM_001013398.1	NP_000589.2 NP_001013416.1
IGFBP4	NM_001552.2	NP_001543.2
IGFBP7	NM_001253835.1 NM_001553.2	NP_001240764.1 NP_001544.1
ITGB1	NM_002211.3 NM_033668.2 NM_133376.2	NP_002202.2 NP_391988.1 NP_596867.1
WNT5A	NM_001256105.1 NM_003392.4	NP_001243034.1 NP_003383.2
SNAIL1	NM_005985.3	NP_005976.2
SNAIL2	NM_003068.4	NP_003059.1
IGFBP5	NM_000599.3	NP_000590.1

[Tabla 1B-5]

MAP1B	NM_005909.3	NP_005900.2
Serpine1	NM_000602.4	NP_000593.1
ZE82	NM_001171653.1 NM_014795.3	NP_001165124.1 NP_055610.1
TGFbR2	NM_001024847.2	NP_001020018.1
ITGA3	NM_002204.3	NP_002195.1
ITGA5	NM_002205.3	NP_002196.3

Lo mismo se aplica a todas las demás proteínas mencionadas en la presente invención. Por lo tanto, se entiende que los nombres de proteínas o ácidos nucleicos existentes no solo se refieren a proteínas o ácidos nucleicos mostrados en el listado de secuencias, sino que también incluyen derivados funcionalmente activos.

Como se usa en el presente documento, la intensidad de expresión de un marcador indicador celular tal como un marcador de CD se indica como negativa (puede indicarse como -; cuando se distinguen - y +/-, ambos están abarcados) para sustancialmente sin expresión. Como se usa en el presente documento, negativo abarcaba positivo apagado. No negativo, es decir, la expresión observada significativamente se indica como positiva (es decir, puede indicarse como + cuando se indica en dos categorías de + y -). Cuando los niveles de expresión se distinguen especialmente, la intensidad de la misma se clasifica en tres niveles y se identifica por débilmente positiva, intermediamente positiva y fuertemente positiva. En el contexto del gráfico mostrado de resultados de la medición de FACS o similares, pueden indicarse mediante el número de +s. Débilmente positivo, intermediamente positivo y fuertemente positivo puede indicarse como +, ++ y +++, respectivamente, que son sinónimos. En un caso de este tipo, pueden hacerse distinciones como “débilmente positivo”, “intermediamente positivo” y “fuertemente positivo”. Esto puede denominarse simplemente positivo cuando no se hace distinción. La intensidad que no llega a ser débilmente positiva se denomina generalmente negativa. Tales niveles de intensidad se usan de una manera comúnmente usada en la técnica. Estos niveles son relativos y se definen a continuación. Por ejemplo, “-” se refiere a expresión que sustancialmente no se observa. La expresión que se observa se clasifica en tres niveles, débilmente positiva, intermediamente positiva y fuertemente positiva. Las señales pueden clasificarse en negativas, débilmente positivas, intermediamente positivas y fuertemente positivas para la separación por FACS.

Los niveles específicos indicados como negativo, positivo apagado, débilmente positivo, intermediamente positivo y fuertemente positivo para indicar la intensidad de señal en FACS pueden identificarse usando la intensidad de señal de fluorescencia media (MFI). La distribución celular puede visualizarse como un histograma y mostrarse como negativa, positiva apagada, débilmente positiva, intermediamente positiva y fuertemente positiva después de la comparación relativa. Se explica la base de juicio para un valor de medición más específico. Específicamente, los siguientes niveles son ejemplos de los mismos.

La intensidad de expresión de un marcador indicador celular tal como un marcador de CD es normalmente diferente en términos de intensidad de fluorescencia debido al tipo de fluorescencia de un marcador o ajuste del equipo. En el presente documento, el intervalo de intensidad de fluorescencia débil es de aproximadamente menos de 3800, el intervalo de intensidad de fluorescencia intermedia es de aproximadamente 3800 o más y menos de 27500, y el intervalo de intensidad fluorescente fuerte es de aproximadamente 27500 o más en las siguientes condiciones: Se usa anticuerpo anti-CD44 humano marcado con PE-Cy7 (BD Biosciences) y el factor de escalado de área de láser azul de FACS Canto II se establece en 0,75 y el voltaje de PE-Cy7 se establece en 495. En los ejemplos de la presente memoria descriptiva, la intensidad de fluorescencia media del control negativo (control de isotipo) en este ajuste fue de aproximadamente 50 (intervalo de 55 +/- 25; mientras que puede haber una pequeña desviación incluso bajo el mismo ajuste dependiendo del lote de células, los expertos en la técnica pueden llevar a cabo la prueba mientras entienden tales desviaciones). Por lo tanto, en vista de que “el intervalo de intensidad de fluorescencia débil es aproximadamente inferior a 3800, el intervalo de intensidad de fluorescencia intermedia es de aproximadamente 3800 o más y menos de 27500, y el intervalo de intensidades fluorescentes fuertes es de aproximadamente 27500 o más”, la intensidad de fluorescencia media del control negativo (control de isotipo) PE-Cy7: aproximadamente 50 [aproximadamente 33-80]. Por lo tanto, débil: < 76 veces, intermedia: 76 a 550 veces y fuerte > 550 veces. Se determina que un patrón de intensidad de tinción que es el mismo que el control negativo (control de isotipo) es negativo, y positivo cuando el patrón cambia incluso ligeramente.

Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, los ejemplos de otros ajustes incluyen los siguientes.

*Factor de escalado de área: FSC=0,5, láser azul = 0,75, láser rojo = 0,8

*voltaje: FSC=270, SSC=400, FITC=290, PE=290, PerCP-Cy5.5=410, PE-Cy7=495, APC=430

* Los ejemplos de intensidad de fluorescencia media del control negativo (control de isotipo) incluyen los siguientes.

FITC: aproximadamente 130 [aproximadamente 65-225]

PE: aproximadamente 120 [aproximadamente 73-204]

PerCP-Cy5.5: aproximadamente 120 [aproximadamente 74-191]

PE-Cy7: aproximadamente 50 [aproximadamente 33-80]

APC: aproximadamente 110 [aproximadamente 67-196]

En otra realización, para la detección en caso de usar un experimento de Lyoplate (ejemplos, tabla 2), se usa un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 647 (adjunto al kit) para la medición. En tal caso, débilmente positivo, intermediamente positivo y fuertemente positivo pueden definirse de la siguiente manera. Específicamente, el valor de la mediana de intensidad de fluorescencia de cada marcador/control negativo (tinción por anticuerpo de control de isotipo) a la izquierda conduce a la categoría de la derecha.

30 o más: fuertemente positivo

10 o más y menos de 30: intermediamente positivo

5 o más y menos de 10: débilmente positivo

(debe indicarse que débilmente positivo, intermediamente positivo y fuertemente positivo se denominan colectivamente “positivo”), y

menos de 5: negativo

Tal intensidad de un marcador celular puede evaluarse fácilmente mediante técnicas tales como clasificación celular activada por fluorescencia, técnica inmunohistoquímica o similar (no limitado a las mismas). Para los marcadores descritos anteriormente y los niveles de expresión de los mismos, “negativo” se refiere a la falta de expresión de los marcadores o niveles notablemente bajos de los mismos y “positivo” se refiere a una expresión notable. La transición de un marcador celular de “negativo” a “positivo” indica un cambio de falta de expresión o bajo nivel de expresión a

alto nivel o nivel notable de expresión. El término " débilmente positivo" se refiere a expresión débil, es decir, bajo nivel de expresión y también se denota como "baja expresión". Dado que "intermediamente positivo" se refiere a un nivel de expresión intermedio fácilmente detectable, también se denota como "expresión intermedia". "Fuertemente positivo" se refiere a una expresión notable que es una expresión fuerte muy fácilmente detectable, es decir, alto nivel de expresión, y también se denota como "alta expresión". A este respecto, la transición de expresión "débilmente positiva" a "intermediamente positiva", "intermediamente positiva" a "fuertemente positiva" o "fuertemente positiva" a "intermediamente positiva", o la "intermediamente positiva" a "débilmente positiva" puede confirmarse fácilmente. Por ejemplo, una célula no prevista muestra CD44 fuertemente positivo, la célula progenitora presenta CD44 intermediamente positivo y la célula endotelial corneal funcional diferenciada madura de la presente invención presenta CD44 negativo o CD44 débilmente positivo. Como se muestra, por ejemplo, en los Ejemplos, pueden usarse dos o más marcadores de superficie celular o similares para clasificar una célula en una subpoblación o similar.

Los indicadores celulares adicionales usados en la presente invención incluyen intensidades de expresión de MHC-1 y MHC-2, que están ambos asociados con la falta de rechazo inmunológico. Dado que la presente invención se usa clínicamente en terapia de infusión celular, se prefiere un rechazo inmunológico nulo o bajo.

Los indicadores celulares adicionales usados en la presente invención incluyen ZO-1 y Na^+/K^+ ATPasa. Son propiedades que están estrechamente relacionadas con la expresión de la funcionalidad de una célula endotelial corneal humana. Por lo tanto, se prefiere que ambos se expresen claramente (+) de manera regular.

La presente invención también puede usar un producto proteínico o material biológico relacionado del producto como indicador celular. En la presente invención, los ejemplos de los mismos incluyen aquellos con (A) expresión elevada en la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención (incluyendo la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) y (B) expresión disminuida en la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención (incluyendo la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) tal como CD44. El producto proteínico o material biológico relacionado de la presente invención puede determinar si una célula diana es la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención (célula endotelial corneal diferenciada madura funcional o célula endotelial corneal intermediamente diferenciada) mediante uno o una combinación o más indicadores celulares. En una determinada realización, múltiples productos proteínicos o materiales biológicos relacionados del producto pueden seleccionarse y combinarse de (A), seleccionarse y combinarse de (B), o pueden combinarse y usarse productos proteínicos o materiales biológicos relacionados del producto de (A) y (B). Aunque no se desea estar sujeto a ninguna teoría, esto se debe a que estos genes tienen una expresión relativamente alta y una célula adecuada para terapia y una célula que no puede clasificarse claramente. Para (A), se entiende que una célula endotelial corneal intermediamente diferenciada también presenta una tendencia similar a una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional.

Además, uno o más de los siguientes pueden usarse en una realización preferida (pueden solaparse parcialmente con los descritos anteriormente).

[Tabla 1C]

MMP1	TGFβ1	COL1A2	IL6	CDH1	NOX4	IGFBP3
MMP2	TGFβ2	COL3A1	IL8	CDH2	HGF	IGFBP4
MMP4	EGFR	COL4A1	IL10	VIM	THBS2	IGFBP7
MMP9	FN1	COL4A2	IL18	CDKN1B	LGR5	ITGB1
SPP1	EGR1	COL5A1	IL33	CDKN1C		WNT5A
TIMP1	SERPINB2	COL8A1	TSLP	CDKN2C		SNAIL1
BMP2	CD44	COL8A2				SNAIL2
STEAP1	CD166					
SPARK	CD105					
IL13RA2	CD24					

Visto en base morfológica, se sabe que tiene las siguientes propiedades, y tal información puede usarse para usar un marcador apropiado. Es decir, ya que MMP9, SPP1, STEAP1, IL33, TSLP y CDH1 tienen baja intensidad de expresión, es necesario ser creativo para experimentos cuantitativos. COL4A1, COL4A2, COL8A1, COL8A2, CDH2 y TGF-beta2 tienen una expresión elevada en la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. MMP1, MMP2, TIMP1, BMP2, IL13RA2, TGF-beta1, CD44, COL3A1, IL6, IL8, HGF, THBS2 e IGFBP3 tienen una expresión elevada en una célula no funcional. MMP4, CD105 y CD24 tienen una intensidad de expresión distinta entre la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional y una célula no funcional. También pueden usarse CD166 e IGFBP7.

Aunque la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal proporcionada por la presente invención permite un método terapéutico revolucionario en aplicaciones clínicas, es necesario el control de calidad. Por lo tanto, se requiere un método altamente fiable para ello. La presente invención reveló que puede usarse una diversidad de genes

para la identificación y el control de calidad de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional que no experimenta transición de estado celular (CST) o anomalía de cariotipo (aneuploidía). Las características morfológicas de las células endoteliales corneales difieren mucho entre los cultivos incluso cuando se usa el mismo protocolo de cultivo. Uno de los mayores obstáculos para aplicar una célula endotelial corneal a la terapia de infusión celular es cómo verificar que una célula endotelial corneal cumple con la calidad celular como célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Mientras tanto, la presente invención puede solucionar este obstáculo utilizando la diversidad genética.

En una realización, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención puede tener una propiedad específica de la funcionalidad de una citocina específica o una sustancia relacionada de la misma. Los ejemplos de tal propiedad incluyen, pero no se limitan a, alta producción de PDGF-BB, baja producción de IL-8, baja producción de MCP-1, alta producción de TNF-alfa, alta producción de IFNgamma, alta producción de antagonistas de IL-IR, baja producción de VEGF y similares. Los niveles de citocinas que reflejan un estado de unión a otras tales como una célula inflamatoria no son preferibles como indicador. Se prefieren los niveles de citocinas que reflejan un estado normal.

Como se usa en el presente documento, “alta producción” y “baja producción” son relativos y se determinan como altas o bajas en comparación con un nivel generalmente observado para cada citocina o similar. Por ejemplo, cuando se usa en la presente invención, tal como cultivo con el método de cultivo ejemplificado en el ejemplo 4 (usando un medio basal preparado con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml, ácido ascórbico 20 microg/ml, cloruro de calcio 200 mg/l, sulfato de condroitina al 0,08 % y gentamicina 50 microg/ml, y medio de acondicionamiento apropiado (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009)), normalmente es preferible que PDGF-BB sea de aproximadamente 30 pg/ml o más e IL-8 sea de aproximadamente 500 pg/ml. Además, MCP-1 es preferiblemente de aproximadamente 3000 pg/ml o menos. TNF-alfa es preferiblemente de aproximadamente 10 pg/ml o más, e IFNgamma es preferiblemente de aproximadamente 30 pg/ml o más. Los antagonistas de IL-1 R son preferiblemente de aproximadamente 40 pg/ml o más, y VEGF es preferiblemente de aproximadamente 200-500 pg/ml o menos.

Las ventajas de la presente invención también son proporcionar un indicador celular para evaluar la calidad más allá de la inspección visual del producto final, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Esto se debe a que se reveló en el proceso de investigación de la presente invención que la calidad del producto definida por la especificación del molde o el producto secretado proteínico no se corresponde con los efectos farmacológicos en entornos clínicos. Aunque se confirmó que se satisfacían todas las especificaciones aplicadas en estudios clínicos de células madre humanas, se encontró que la proporción constituida por células no previstas y la cantidad de producción del producto proteico MCP-1 no están en un intervalo deseado. Por lo tanto, el indicador de MCP-1 también es preferiblemente de baja producción en una realización preferida.

Las células de la presente invención preferiblemente satisfacen los siguientes estándares en una prueba de calidad antes de su uso.

La inspección visual en este momento incluye confirmar la presencia de una forma de adoquín hexagonal y la falta de fibrosis.

[Tabla 1D]

Entrada	Valor de referencia
Inspección visual	
ZO-1	**Positivo**
Na-K ATPasa	**Positivo**
Claudina10	**Positivo**
TIMP-1	< 500 ng/ml
IL-8	< 500 pg/ml
PDGF-bb	> 30 pg/ml
MCP-1	< 3000 pg/ml
Células efectoras (razón E)	> 50 %
Células A no previstas	< 15 %
Células B no previstas	< 5 %
Células C no previstas	< 10 %
Anormalidad del cariotipo	**Negativo**

El método de cálculo de las razones E y el método de cálculo de las células no previstas A, B y C son los siguientes.

Método de cálculo de la razón E: Normalmente, las intensidades de fluorescencia difieren dependiendo del tipo de fluorescencia de un marcador o ajuste del equipo. En una medición en las siguientes condiciones: Se usa anticuerpo

anti-CD44 humano marcado con PE-Cy7 (BD Biosciences) y el factor de escalado de área de láser azul de FACS Canto II se establece en 0,75 y el voltaje de PE-Cy 7 se establece en 495, las compuertas se establecen de la siguiente manera: En primer lugar, se establecen las fracciones A, B, C y D en un gráfico de puntos (figura 68, lado izquierdo de la fila superior) con el eje X como CD24 y el eje Y como CD166. En este momento, la fracción A es CD24 negativa y CD166 positiva, la fracción B es CD24 positiva y CD166 positiva, la fracción C es CD24 negativa y CD166 negativa, y la fracción D es CD24 positiva y CD166 negativa. La proporción de la fracción B, cuando las células diana para el análisis son el 100 %, se considera el contenido de célula C no prevista [célula CD24 positiva]. Las fracciones 1, 2 y 3 se establecen adicionalmente como en el diagrama en la fila inferior en el lado izquierdo de la figura 68 en un diagrama de puntos donde el eje X es CD44 y el eje Y es CD105 para la fracción B. La proporción de la fracción 1 en este momento es la razón E, el valor total de la proporción de las fracciones 1 y 2 es el contenido de “células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales + células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas”, y la proporción de la fracción 3 es el contenido de célula A no prevista [célula CD44 fuertemente positivo]. Además, se crea un gráfico de puntos separado donde el eje X es CD44 y el eje Y es CD26 y las fracciones a’, b’, c’ y d’ se establecen como en el diagrama en el lado derecho de la fila superior de la figura 68. La proporción de la fracción B, cuando la célula diana de análisis es el 100 %, es el contenido de célula B no prevista [célula CD26 positiva] (véase la figura 68).

También se divulga, pero no forma parte de la presente invención, una célula con un miARN específico, especialmente una célula endotelial corneal, basándose en el descubrimiento por primera vez de que la funcionalidad de la célula puede identificarse con miARN. Tal divulgación proporciona por primera vez la capacidad de usar la diferencia en el tipo de miARN para identificar la funcionalidad de la célula con la expresión del mismo. El microARN (miARN o miR) es un ARN de molécula pequeña no codificante que funciona como regulador endógeno de la expresión génica. La desregulación de la misma está asociada con factores patógenos de diversas enfermedades. Hay cada vez más pruebas que sugieren que el miARN desempeña un papel importante en diversos procesos biológicos, incluido el crecimiento, desarrollo y diferenciación celulares (Bartel DP. Cell. 2004; 116:281-297; Croce CM, Cell. 2005; 122:6-7). La expresión de miARN es esencial en la regulación de muchos procesos celulares, incluida la formación, el mantenimiento y la reconstrucción de la matriz extracelular (ECM) (Rutnam ZJ, Wight TN, Yang BB. Matrix Biol. 2013; 32:74-85), y tiene una estrecha conexión con CST en cHCEC. Actualmente no hay información sobre la expresión de miARN relacionada con el endotelio corneal que pueda identificar una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. La presente invención, en este contexto, ha descubierto miARN que puede usarse en la identificación de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Con tal miARN, se encontraron diversos tipos de patrones de expresión de miARN mediante estudios comparativos sobre células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales con diferentes fenotipos mediante una plataforma de micromatrices de miARN 3D-Gene (comercializado, por ejemplo, por Toray, Kamakura, Japón) y agrupamiento jerárquico. Se encontraron patrones de expresión de miARN únicos que comprenden grupos de miARN regulados por incremento y regulados por disminución en células cultivadas y el correspondiente sobrenadante de cultivo. Los miARN en sobrenadante de cultivo, es decir, miARN secretados, pueden funcionar como una herramienta para identificar de manera no invasiva una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional adecuada para la terapia celular mediante inyección en la cámara anterior.

En una realización representativa con una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional (a5), una célula endotelial corneal intermediamente diferenciada (a1) y una célula no funcional endotelial corneal (a2), cuando la propiedad de expresión de la célula a5 se define como CD44 negativo a débilmente positivo CD24 negativo CD26 negativo, la propiedad de expresión de a1 como CD44 intermediamente positivo CD24 negativo CD26 negativo, y la propiedad de expresión de a2 como CD44 fuertemente positivo CD24 negativo CD26 positivo, al menos un miARN tiene la propiedad a5 para la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención.

Los siguientes se proporcionan como los marcadores de miARN usados en el presente documento. Específicamente, la propiedad de dicho miARN comprende al menos un miARN seleccionado del grupo que consiste en aquellos cuyo patrón son:

(A) célula endotelial corneal diferenciada madura funcional (a5): célula endotelial corneal intermediamente diferenciada (a1): célula no funcional endotelial corneal (a2) presenta alta expresión: alta expresión: baja expresión:

(intracelular) miR23a-3p, miR23b-3p, miR23c, miR27a-3p, miR27b-3p, miR181a-5p, miR181b-5p, miR181c-5p, miR181d-5p

(secretado por células) miR24-3p, miR1273e;

(B) a5:a1:a2 presenta alta expresión: expresión intermedia: baja expresión:

(intracelular) miR30a-3p, miR30a-5p, miR30b-5p, miR30c-5p, miR30e-3p, miR30e-5p, miR130a-3p, miR130b-3p, miR378a-3p, miR378c, miR378d, miR378e, miR378f, miR378h, miR378i, miR184, miR148a-3p

(secretado por células) miR184;

(C) a5:a1:a2 presenta alta expresión: baja expresión: baja expresión:

(intracelular) miR34a-5p, miR34b-5p

(secretado por células) miR4419b, miR371b-5p, miR135a-3p, miR3131, miR296-3p, miR920, miR6501-3p;

(D) a5:a1:a2 presenta baja expresión: baja expresión: expresión intermedia a alta:

(intracelular) miR29a-3p, miR29b-3p, miR199a-3p, miR199a-5p, miR199b-5p, miR143-3p

(secretado por células) miR1915-3p, miR3130-3p, miR92a-2-5p, miR1260a;

(E) a5:a1:a2 presenta baja expresión: expresión intermedia: alta expresión:

(intracelular) miR31-3p, miR31-5p, miR193a-3p, miR193b-3p, miR138-5p

(F) a5:a1:a2 presenta alta expresión: baja expresión: alta expresión:

(secretado por células) miR92b-5p; y

(G) a5:a1:a2 presenta baja expresión: alta expresión: baja expresión:

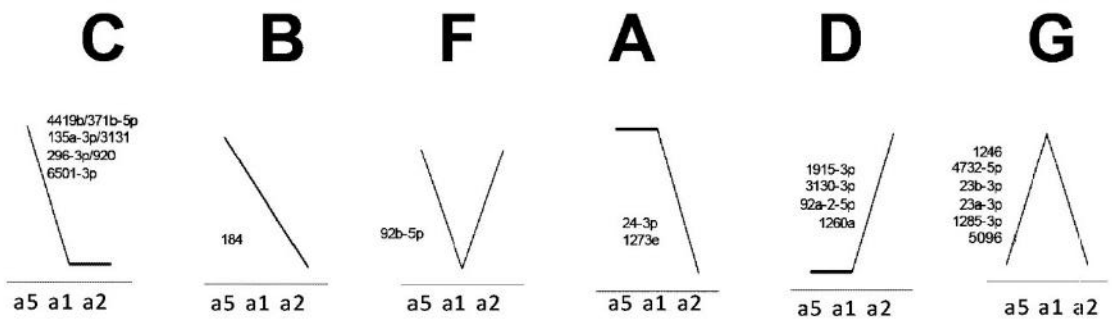
(secretado por células) miR1246, miR4732-5p, miR23b-3p, miR23a-3p, miR1285-3p, miR5096;

en donde una propiedad de un antígeno de superficie celular de a5 es CD44- a débilmente positivo, CD24 negativo CD26 negativo, un nivel de expresión es la intensidad relativa entre 3 tipos de células, expresión de un antígeno de superficie celular de a1 que es CD44 intermediamente positivo CD24 negativo CD26 negativo, y la expresión de un antígeno de superficie celular de a2 que es CD44 fuertemente positivo CD24 negativo CD26 positivo.

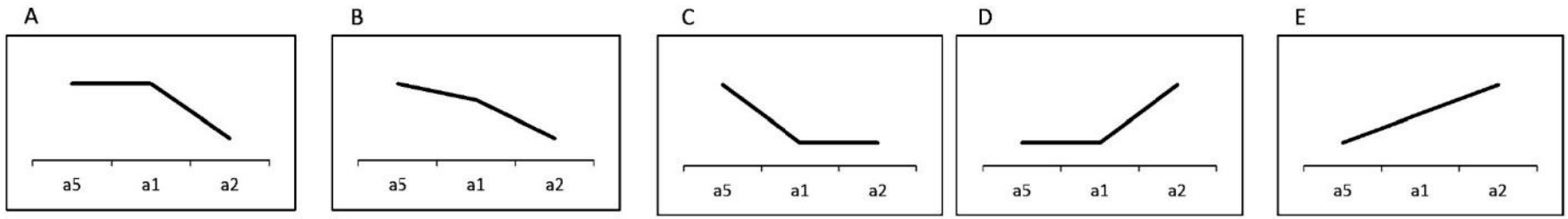
Las intensidades de expresión son expresión fuerte > expresión intermedia > expresión baja, y la fuerte expresión y la baja expresión tienen una diferencia estadísticamente significativa. Lo siguiente representa esquemáticamente lo anterior.

[Quím. 1]

Secretado por células



Intracelular



23a-3p/23b-3p/23c
27a-3p/27b-3p
181a-5p/181b-
5p/181c-5p/181d-5p

30a-3p/30a-5p/30b-5p
30c-5p/30e-3p/30e-5p
130a-3p/130b-3p
378a-3p/378c/378d/378e
378f/378h/378i
184/148a-3p

34a-5p/34b-5p

29a-3p/29b-3p
199a-3p/199a-5p/199b-5p
143-3p

31-3p/31-5p
193a-3p/193b-3p
138-5p

La expresión fuerte, expresión intermedia y expresión débil, aunque los niveles absolutos varían dependiendo de cada miARN, pueden determinarse adecuadamente tras la medición real. Normalmente, la cantidad de expresión de miR (intensidad de expresión) es un valor comparativo corregido para tener una mediana del valor de intensidad de expresión idéntico de todos los genes detectados suponiendo que el número total de copias del gen entre las muestras no es notablemente diferente después de determinar genes cuya intensidad de fluorescencia se ha medido. La alta expresión y la baja expresión tienen una diferencia significativa (razón relativa de 2 o más, valor p de 0,05 o menos). La expresión intermedia puede incluirse según sea necesario. Cuando una tercera intensidad de expresión que es diferente de la más fuerte y débil se encuentra en tres o más grupos de células, la evaluación puede incluir la expresión intermedia.

Diversos miARN usados en el presente documento se especifican mediante los siguientes números. Cuando se usan en la presente invención, las intensidades relativas pueden medirse basándose en la información sobre formas maduradas (MiRBase), pero no se limita a los mismos. Se entiende que los expertos en la técnica pueden medir de manera similar las intensidades relativas usando información de tallo-bucle y procesando adecuadamente la información.

[Tabla 1E-1]

miR	Tallo bucle	Registro de miRBase	Notas
hsa-miR-23a-3p	MI0000079	MIMAT0000078	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-23a de *Homo sapiens*
hsa-miR-23b-3p	MI0000439	MIMAT0000418	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-23b de *Homo sapiens*
hsa-miR-23c	MI0016010	MIMAT0018000	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-23c de *Homo sapiens*
hsa-miR-27a-3p	MI0000085	MIMAT0000084	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-27a de *Homo sapiens*
hsa-miR-27b-3p	MI0000440	MIMAT0000419	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-27b de *Homo sapiens*
hsa-miR-181a-5p	MI0000289	MIMAT0000256	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-181a-1 de *Homo sapiens*
	MI0000269		Inmaduro: Tallo-bucle de miR-181a-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-181b-5p	MI0000270	MIMAT0000257	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-181b-1 de *Homo sapiens*
	MI0000683		Inmaduro: Tallo-bucle de miR-181b-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-181c-5p	MI0000271	MIMAT0000258	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-181c de *Homo sapiens*
hsa-miR-181d-5p	MI0003139	MIMAT0002821	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-181d de *Homo sapiens*
hsa-miR-24-3p	MI0000080	MIMAT0000080	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-24-1 de *Homo sapiens*
	MI0000081		Inmaduro: tallo-bucle de miR-24-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-1273e	MI0016059	MIMAT0018079	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-1273e de *Homo sapiens*
hsa-miR-30a-3p	MI0000088	MIMAT0000088	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-30a de *Homo sapiens*
hsa-miR-30a-5p		MIMAT0000087	
hsa-miR-30b-5p	MI0000441	MIMAT0000420	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-30b de *Homo sapiens*

[Tabla 1E-2]

hsa-miR-30c-5p	MI0000736	MIMAT0000244	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-30c-1 de *Homo sapiens*
	MI0000254		Inmaduro: Tallo-bucle de miR-30c-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-30e-3p	MI0000749	MIMAT0000693	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-30e de *Homo sapiens*
hsa-miR-30e-5p		MIMAT0000692	
hsa-miR-130a-3p	MI0000448	MIMAT0000425	Inmaduro: tallo-bucle de miR-130a de *Homo sapiens*
hsa-miR-130b-3p	MI0000748	MIMAT0000691	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-130b de *Homo sapiens*
hsa-miR-378a-3p	MI0000786	MIMAT0000732	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-378a de *Homo sapiens*
hsa-miR-378c	MI0015825	MIMAT0016847	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-378c de *Homo sapiens*

hsa-miR-378d	MI0016749	MIMAT0018926	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-378d-1 de *Homo sapiens*
	MI0003840		Inmaduro: Tallo-bucle de miR-378d-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-378e	MI0016750	MIMAT0018927	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-378e de *Homo sapiens*
hsa-miR-378f	MI0016756	MIMAT0018932	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-378f de *Homo sapiens*
hsa-miR-378h	MI0016808	MIMAT0018984	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-378h de *Homo sapiens*
hsa-miR-378i	MI0016902	MIMAT0019074	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-378i de *Homo sapiens*
hsa-miR-184	MI0000481	MIMAT0000454	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-184 de *Homo sapiens*
hsa-miR-148a-3p	MI0000253	MIMAT0000243	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-148a de *Homo sapiens*
hsa-miR-34a-5p	MI0000268	MIMAT0000255	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-34a de *Homo sapiens*
hsa-miR-34b-5p	MI0000742	MIMAT0000685	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-34b de *Homo sapiens*

[Tabla 1E-3]

hsa-miR-4419b	MI0016861	MIMAT0019034	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-4419b de *Homo sapiens*
has-miR371b-5p	MI0017393	MIMAT0019892	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-371b de *Homo sapiens*
hsa-miR-135a-3p	MI0000452	MIMAT0004595	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-135a-1 de *Homo sapiens*
hsa-miR-3131	MI0014151	MIMAT0014996	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-3131 de *Homo sapiens*
hsa-miR-296-3p	MI0000747	MIMAT0004679	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-296 de *Homo sapiens*
hsa-miR-920	MI0005712	MIMAT0004970	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-920 de *Homo sapiens*
hsa-miR-6501-3p	MI0022213	MIMAT0025459	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-6501 de *Homo sapiens*
hsa-miR-29a-3p	MI0000087	MIMAT0000086	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-29a de *Homo sapiens*
hsa-miR-29b-3p	MI0000105	MIMAT0000100	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-29b-1 de *Homo sapiens*
	MI0000107		Inmaduro: Tallo-bucle de miR-29b-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-199a-3p	MI0000242	MIMAT0000232	Inmaduro: tallo-bucle de miR-199a-1 de *Homo sapiens* o tallo-bucle de miR-199a-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-199a-5p	MI0000281	MIMAT0000231	
hsa-miR-199b-5p	MI0000282	MIMAT0000263	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-199b de *Homo sapiens*
hsa-miR-143-3p	MI0000459	MIMAT0000435	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-143 de *Homo sapiens*
hsa-miR-1915-3p	MI0008336	MIMAT0007892	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-1915 de *Homo sapiens*
hsa-miR-3130-3p	MI0014147	MIMAT0014994	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-3130-1 de *Homo sapiens*
	MI0014148		Inmaduro: Tallo-bucle de miR-3130-2 de *Homo sapiens*

[Tabla 1E-4]

hsa-miR-92a-2-5p	MI0000094	MIMAT0004508	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-92a-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-1260a	MI0006394	MIMAT0005911	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-1260a de *Homo sapiens*
hsa-miR-31-3p	MI0000089	MIMAT0004504	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-31 de *Homo sapiens*
hsa-miR-31-5p		MIMAT0000089	
hsa-miR-193a-3p	MI0000487	MIMAT0000459	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-193a de *Homo sapiens*
hsa-miR-193b-3p	MI0003137	MIMAT0002819	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-193b de *Homo sapiens*
hsa-miR-138-5p	MI0000476	MIMAT0000430	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-138-1 de *Homo sapiens*
	MI0000455		Inmaduro: Tallo-bucle de miR-138-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-92b-5p	MI0003560	MIMAT0004792	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-92b de *Homo sapiens*
hsa-miR-1246	MI0006381	MIMAT0005898	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-1246 de *Homo sapiens*
hsa-miR-4732-5p	MI0017369	MIMAT0019855	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-4732 de *Homo sapiens*
hsa-miR-1285-3p	MI0006346	MIMAT0005876	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-1285-1 de *Homo sapiens*
	MI0006347		Inmaduro: Tallo-bucle de miR-1285-2 de *Homo sapiens*
hsa-miR-5096	MI0018004	MIMAT0020603	Inmaduro: Tallo-bucle de miR-5096 de *Homo sapiens*

El marcador de miARN usado en el presente documento comprende al menos uno seleccionado de (B) o (C) en las categorías descritas anteriormente. Esto se debe a que cuando se usan miARN que tienen patrones de (B) y (C), la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención (a5 + a1) puede identificarse midiendo solo un marcador. Cuando se identifica una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional (a5) y una célula endotelial corneal intermediamente diferenciada (a1) a partir de una célula no prevista (a2), la identificación es posible con un marcador si, por ejemplo, se usa un patrón de (A), (B), (D) o (E). Pueden usarse múltiples marcadores de miARN tales como una combinación de (A) y (C) o el uso de (B) o (E) cuando es deseable identificar tres tipos. Pueden identificarse miARN, por ejemplo, extrayendo ARN con un enfoque conocido y usando análisis de micromatrices con un enfoque descrito en los Ejemplos para determinar el nivel. Por ejemplo, puede usarse un chip disponible comercialmente tal como el chip de microARN humano 3D-Gene™ de Toray. Los datos resultantes pueden procesarse como una imagen con un escáner (por ejemplo, escáner de 3D-Gene 3000 (Toray Industries Inc., Tokio, JAPÓN)) y

se procesaron con un software de procesamiento (por ejemplo, software de extracción de 3D-Gene (Toray)). La señal fluorescente digitalizada resultante puede estandarizarse adicionalmente como datos sin procesar. Por ejemplo, la mediana del valor de intensidad de fluorescencia puede corregirse a 25. Alternativamente, el nivel estandarizado puede corregirse para que coincida con el valor 100 de la clasificación más alta.

Se usa preferiblemente miARN secretado. Esto se debe a que los miARN secretados son capaces de la denominada identificación no destructiva que no destruye una célula.

A diferencia de un enfoque de identificación de una célula tal como CD166 positivo, CD133 negativo, CD105 negativo, CD44 negativo, CD24 negativo, CD26 negativo y CD200 negativo con un marcador de superficie celular (marcador de CD), la identificación de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención usando un miARN es ventajosa porque puede proporcionar un método no invasivo.

En una realización, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención preferiblemente no tiene un exosoma que presente un valor anómalo. Los exosomas son vesículas de membrana secretadas en una célula con un diámetro de aproximadamente 40 nm-150 nm. Pueden usarse marcadores relacionados para investigar tal valor anómalo que comprenden muchas proteínas con actividad ribonucleasa. Los ejemplos de tal marcador incluyen CD63, CD9, CD81, HSP70, y similares. La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene preferiblemente baja expresión de tales marcadores asociados con exosomas. Los niveles específicos pueden ejemplificarse mediante el siguiente experimento. Es decir, normalmente es posible medir si un marcador está presente en una proteína del exosoma en el sobrenadante del cultivo usando Exoscreen. En lugar de Exoscreen, puede detectarse una proteína del exosoma mediante inmunotransferencia de tipo Western. El tamaño de la banda de detección de Western también puede determinarse visualmente.

La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene preferiblemente un área celular pequeña, es decir, es una célula pequeña. En la presente invención, un área celular se evalúa generalmente con células tratadas con PBS en condiciones de captura de imagen. Es decir, un valor de medición del recuento de células híbridas se mide con el área mientras que tiene espacios entre las células porque se toma una imagen de las células tratadas con PBS. Es decir, el área celular se mide a un valor menor que en un estado maduro y diferenciado con formación de uniones estrechas en cultivo celular saturado (confluente) en cultivo. La presente invención ha revelado que una célula funcional tiene alta calidad al tener un área pequeña por célula para tener la densidad celular más alta en cultivo. Esto se reconoce como el mismo o mayor nivel de área celular y densidad celular que las células endoteliales del tejido endotelial corneal normal. Los ejemplos de área celular preferida de células tratadas con PBS tras cultivo celular saturado (confluencia) incluyen aproximadamente 250 microm^2 o menos para la media de la población celular o células individuales, y de manera más preferible aproximadamente 245 microm^2 o menos, aproximadamente 240 microm^2 o menos, aproximadamente 235 microm^2 o menos, aproximadamente 230 microm^2 o menos, aproximadamente 225 microm^2 o menos, aproximadamente 220 microm^2 o menos, aproximadamente 215 microm^2 o menos, aproximadamente 210 microm^2 o menos, aproximadamente 205 microm^2 o menos, aproximadamente 200 microm^2 o menos y similares. Mientras tanto, los ejemplos de valores logrados como un área celular preferida de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 150 microm^2 o más, aproximadamente 155 microm^2 o más, aproximadamente 160 microm^2 o más, aproximadamente 165 microm^2 o más, aproximadamente 170 microm^2 o más, aproximadamente 175 microm^2 o más, aproximadamente 180 microm^2 o más, y similares. El área celular puede medirse mediante cualquier enfoque conocido en la técnica. Un ejemplo típico es un método de medición que usa imágenes de microscopio de contraste de fase. Las imágenes pueden tomarse en el presente documento usando un sistema disponible comercialmente tal como un sistema de microscopio invertido (CKX41, Olympus, Tokio, Japón). Para medir la distribución del área, puede pretratarse una célula diana para facilitar la medición lavando con PBS(-) tres veces o similar y puede obtenerse una imagen de microscopio de contraste de fase usando un sistema disponible comercialmente tal como el sistema de microscopio BZ X-700, por ejemplo (Keyence, Osaka, Japón). Además, la distribución del área puede cuantificarse usando un software disponible comercialmente tal como software de recuento de células híbridas BZ-H3C (Keyence).

Por lo tanto, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene ventajosamente el valor preferido descrito anteriormente en al menos uno de los indicadores celulares seleccionados del grupo que consiste en tamaño celular, densidad celular y presencia de una célula reactiva con autoanticuerpos.

La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención tiene preferiblemente una propiedad funcional celular homóloga a la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención (es decir, incluida la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional y la célula endotelial corneal intermediamente diferenciada), preferiblemente una propiedad funcional celular homóloga a una célula endotelial diferenciada madura funcional a5, para al menos un indicador celular seleccionado del grupo que consiste en: un marcador de superficie celular; un producto proteínico y un material biológico relacionado del producto; una proteína relacionada con SASP; miARN intracelular y secretado; un exosoma; un metabolito celular que comprende un aminoácido y un material biológico relacionado del metabolito; tamaño celular; densidad celular y la presencia de una célula reactiva con autoanticuerpos explicada en el presente documento. Por ejemplo, se usa cualquier valor numérico específico, intervalo o nivel descrito en la explicación con respecto a cada indicador de la presente memoria descriptiva o puede

usarse una combinación de los mismos como indicador celular preferido en la presente invención. Cuando una determinada célula candidata tiene un valor de tales indicadores celulares que la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención definida en el presente documento, preferiblemente células endoteliales corneales maduras diferenciadas funcionales, deben tener, se determina que la célula candidata es una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional o una célula endotelial corneal intermediamente diferenciada que expresa una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en la cámara anterior de un ojo humano. También puede hacerse referencia a los siguientes indicadores además de, o en paralelo con, la determinación con los indicadores celulares mencionados anteriormente. En particular, una función de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención puede confirmarse mediante la formación de una forma de adoquín hexagonal pequeño y el uso de un sistema de metabolismo energético por función mitocondrial, y determinarse si puede ser terapéuticamente eficaz tras la infusión (por ejemplo, en la cámara anterior del ojo). Los indicadores no están limitados a los mismos, de modo que indicadores sustitutos similares a marcadores también son eficaces. Como tal indicador, puede usarse uno cualquiera de los ocho tipos siguientes de marcadores sustitutos o una combinación de los mismos: (1) retención de las funciones de bombeo/barrera endotelial (incluyendo la expresión de claudina), (2) alta adhesión/unión a la laminina 511 o un fragmento E8 de la misma, (3) perfil de citocinas secretadas; la producción de PDGFbb, TNFalfa, IFNgamma o antagonista del receptor de IL-1 está en o por encima del valor de referencia, (4) estipulación por el perfil de micro ARN (miARN) producido, (5) estipulación por el perfil de metabolito producido, (6), densidad celular saturada durante el cultivo *in vitro*, (7) tamaño o distribución espacial de células obtenidas en cultivo; y (8) adhesión a la superficie endotelial de la córnea en caso de infusión celular después del daño por congelación por criotratamiento con nitrógeno líquido en una córnea de ratón. En particular, aunque sin desear limitarse a ninguna teoría, esto se debe a que un producto proteínico o un material biológico relacionado del producto puede determinar principalmente si las células son células CST, y el miARN puede eliminar parte o la totalidad de las células no previstas, y el metabolito celular o un material biológico relacionado del metabolito puede distinguir una célula endotelial corneal intermediamente diferenciada de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional, de modo que una célula endotelial corneal funcional de mayor calidad puede propagarse selectivamente en los cultivos.

En una realización preferida, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención, especialmente células endoteliales corneales diferenciadas maduras, no tiene una anomalía de cariotipo. El mayor obstáculo en la aplicación de cHCEC a la medicina regenerativa de inyección celular es que las cHCEC en muchos casos presentan aneuploidía durante el cultivo con varios pases, como lo demuestran Miyai *et al* (Miyai T, *et al.*, Mol Vis. 2008; 14:942-50). La aneuploidía observada en las cHCEC se induce en cultivo debido a la división celular. A este respecto, los inventores proporcionan un nuevo hallazgo, es decir, la presencia o ausencia de aneuploidía en las cHCEC está estrechamente asociada con una subpoblación celular específica que es dominante entre las cHCEC. Los inventores han descubierto que aparece una subpoblación celular específica sin aneuploidía junto con un patrón específico de fenotipo de superficie con una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional presente en el tejido corneal. Se establecieron con éxito condiciones de cultivo refinadas para el crecimiento selectivo de una subpoblación celular compuesta principalmente por células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales sin anomalía de cariotipo de modo que pueda proporcionarse un medicamento regenerativo seguro y estable infundiendo una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional en la cámara anterior en forma de suspensión celular para tratar un trastorno endotelial de la córnea tal como queratopatía ampollosa. De esta manera, la presente invención descubrió que se produce una anomalía de cariotipo en una subpoblación selectivamente, lo que no se conocía hasta este momento. Además, el uso de la técnica en la presente invención permite la selección de una subpoblación que está sustancialmente libre de anomalías de cariotipo.

La presente invención también reveló que se observa selectivamente de la población un fenómeno en el que están sustancialmente ausentes autoanticuerpos en la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención. En la presente invención, puede seleccionarse una subpoblación específica para seleccionar una subpoblación que esté sustancialmente libre de un autoanticuerpo. Los autoanticuerpos pueden medirse mediante un enfoque conocido en la técnica. Por ejemplo, se ejemplifica el siguiente procedimiento. En primer lugar, se fijan HCEC con metanol y se lavan dos veces con PBS. Las HCEC se permeabilizan con PBS-Tx-100 al 0,2 % (temperatura ambiente, 15 minutos) y se bloquearon con BSA/PBS al 1% (1 hora o más a temperatura ambiente). Posteriormente, se añaden 250 microlitros de suero de un individuo sano diluido 5 o 25 veces con BSA/PBS al 1% a los pocillos y se incuba durante la noche a 4 grados C. Las HCEC se lavan 4 veces con PBS-Tx-100 al 0,2 %, luego se añade (250 microlitros/pocillo) BSA/PBS al 1% que comprende anticuerpo anti-IgG humana marcado con Alexa Fluor 488 (5 microg/ml) y anticuerpo anti-IgM humana marcado con Alexa Fluor 647 (5 microg/ml). Las HCEC se incuban después durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavan dos veces con PBS-Tx-100 al 0,2 % y se lavan una vez con PBS. Los núcleos se tiñen con DAPI (5 microg/ml) (a temperatura ambiente durante 15 minutos), se lavan con PBS y se examinan con un microscopio de fluorescencia invertido (BZ-9000) (véase la figura 10-C).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una población celular que comprende células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención, especialmente células endoteliales corneales maduras diferenciadas funcionales.

La población celular de la presente invención tiene preferiblemente una densidad celular media en cultivo celular saturado (confluencia) de al menos aproximadamente 1500 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 1600

células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 1700 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 1800 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 1900 células/mm^2 o más, o al menos aproximadamente 2000 células/mm^2 o más. Dado que una población celular que comprende las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención tiene un tamaño celular pequeño, se entiende que las células se proporcionan a una densidad correspondientemente alta. La densidad celular es una característica encontrada con propiedades endoteliales corneales de alta calidad, o, por el contrario, la medición de dicha densidad celular puede usarse como un indicador para seleccionar células endoteliales corneales funcionales diferenciadas maduras de alta calidad. Dado que la densidad celular es un valor numérico que está directamente relacionado con el área celular, la densidad celular puede calcularse de manera similar midiendo el área celular mediante cualquier enfoque conocido en la técnica. Como se comentó anteriormente, un ejemplo típico del mismo incluye un método de medición que usa una imagen de microscopio de contraste de fase, en donde la imagen puede tomarse con un sistema disponible comercialmente tal como un sistema de microscopio invertido (CKX41, Olympus, Tokio, Japón). Para medir la distribución del área, las células diana pueden pretratarse para facilitar la medición lavando con PBS(-) tres veces o similar y puede obtenerse una imagen de microscopio de contraste de fase, por ejemplo, usando un sistema disponible comercialmente tal como el sistema de microscopio BZ X-700 (Keyence, Osaka, Japón). Además, la distribución del área puede cuantificarse usando software disponible comercialmente tal como el software de recuento de células híbridas BZ-H3C (Keyence).

En una realización preferida, la densidad celular media de la población celular de la presente invención es de al menos aproximadamente 2100 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 2200 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 2300 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 2400 células/mm^2 o más, o al menos aproximadamente 2500 células/mm^2 o más, pero la densidad celular media no está limitada a la misma. El límite superior puede ser cualquier valor materializable. Los ejemplos del límite superior materializable incluyen aproximadamente 3000 células/mm^2 o más, aproximadamente 3100 células/mm^2 o más, aproximadamente 3200 células/mm^2 o más, aproximadamente 3300 células/mm^2 o más, aproximadamente 3400 células/mm^2 o más, aproximadamente 3500 células/mm^2 o más, aproximadamente 3600 células/mm^2 o más, aproximadamente 3700 células/mm^2 o más, aproximadamente 3800 células/mm^2 o más, aproximadamente 3900 células/mm^2 o más, aproximadamente 4000 células/mm^2 o más, y similares. Se entiende que cualquier combinación de tal límite superior y límite inferior se usa como intervalo preferido de densidad celular de la población celular de la presente invención.

La característica de tal densidad celular o área celular puede aplicarse a la evaluación de la idoneidad de la aplicación clínica de un producto celular final cultivado con la técnica de cuantificación de contraste de fase de células cultivadas mediante recuento de células híbridas. Se revela que las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales de la presente invención tienen un área pequeña por célula y la densidad celular más alta en cultivo. Las células endoteliales corneales humana cultivadas preparadas mediante el método de fabricación de la presente invención presentan el mismo nivel de área celular y densidad celular que las células endoteliales del tejido endotelial corneal normal, es decir, área celular de 216 microm^2 y densidad celular de 2582 células/mm^2, como se ejemplifica en los ejemplos.

En una realización, la población celular de la presente invención se caracteriza por la presencia de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención en una razón que es mayor que una razón de origen natural. Esto se debe a que puede proporcionarse una terapia que es más eficaz usando una población de células endoteliales corneales disponible de manera natural proporcionando a una población celular con una razón de células capaces de provocar una propiedad funcional endotelial corneal que es mayor que la razón de origen natural. La razón de tales células capaces de provocar una propiedad funcional endotelial corneal puede aumentarse porque se proporciona una técnica que puede identificar y seleccionar numerosas subpoblaciones de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención (por ejemplo, células endoteliales corneales maduras funcionales diferenciadas o células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas).

En una realización preferida, es ventajoso que al menos el 5 % o más, aproximadamente el 10 % o más, aproximadamente el 15 % o más, aproximadamente el 20 % o más, aproximadamente el 25 % o más, aproximadamente el 30 % o más, aproximadamente el 35 % o más, aproximadamente el 40 % o más, aproximadamente el 45 % o más, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 55 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 65 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, aproximadamente el 95 % o más, aproximadamente el 98 % o más, o aproximadamente el 99 % o más de las células en la subpoblación de la presente invención sean las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. A este respecto, tales células comprendidas en una población celular pueden tener una propiedad funcional celular que pertenece a la denominada a5 o a1. Por ejemplo, como células contenidas en una población celular, se seleccionan células que comprenden una propiedad funcional celular que incluye CD166 positivo y CD133 negativo y, según sea necesario, CD44 negativo a intermediamente positivo. Aunque no se desea estar sujeto a ninguna teoría, el motivo por el que la población celular de la presente invención logra un efecto es porque se presenta un excelente efecto terapéutico o efecto profiláctico tras la infusión de la población celular en un sujeto al comprender un cierto nivel de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. En una realización preferida, es ventajoso que aproximadamente el 70 % o más de las células en la población celular de la presente invención sean las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. Esto es porque, en este nivel, puede lograrse una densidad celular (por

ejemplo, aproximadamente 2300 células/mm^2) que se considera un punto de referencia para la terapia exitosa de infusión de células corneales mediante la presencia de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. En una realización más preferida, es ventajoso que aproximadamente el 90 % o más de las células en la población celular de la presente invención sean las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. Esto se debe a que la razón de la presencia de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención a este nivel no puede lograrse accidentalmente, de modo que es necesario establecer una técnica e información que pueda identificar y separar de manera precisa y fiable una población celular, mientras que esto era más o menos imposible con las técnicas convencionales. La densidad celular que se considera un punto de referencia de la terapia exitosa de infusión de células corneales puede calcularse midiendo la densidad celular media de las células integradas en la superficie endotelial de la córnea humana después de la infusión de una población celular. Tal densidad celular puede ser de al menos aproximadamente 1000 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1100 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1200 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1300 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1400 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1500 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1600 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1700 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1800 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 1900 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2000 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2200 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2300 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2400 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2500 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2600 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2700 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2800 células/mm^2 o más, preferiblemente al menos aproximadamente 2900 células/mm^2 o más, y preferiblemente al menos aproximadamente 3000 células/mm^2 o más.

En una realización más preferida, la población celular de la presente invención se caracteriza por la razón de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales que está presente en una razón más alta que la razón de origen natural. Las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales expresan una propiedad funcional endotelial corneal humana tras la infusión directa en la cámara anterior del ojo. Esto se debe a que puede proporcionarse una terapia que es más eficaz que el uso de una población de células endoteliales corneales disponible de manera natural proporcionando una población de células con una razón de células de alta calidad que es mayor que la razón de origen natural. La relación de tales células dada la funcionalidad de alta calidad puede aumentarse, debido a que se proporciona una técnica que puede identificar y seleccionar numerosas subpoblaciones de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales.

En una realización preferida, es ventajoso que al menos el 5 % o más, aproximadamente el 10 % o más, aproximadamente el 15 % o más, aproximadamente el 20 % o más, aproximadamente el 25 % o más, aproximadamente el 30 % o más, aproximadamente el 35 % o más, aproximadamente el 40 % o más, aproximadamente el 45 % o más, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 55 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 65 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, aproximadamente el 95 % o más, aproximadamente el 98 % o más, o aproximadamente el 99 % o más de las células en la población celular de la presente invención sean células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. La razón de tales células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales puede denotarse en el presente documento como “razón E”. El método de cálculo de la razón E se describe en otra parte del presente documento. A este respecto, tales células comprendidas en una población celular pueden tener una propiedad funcional que pertenece al denominado a5. Por ejemplo, como células comprendidas en una población celular, se seleccionan células con CD166 positivo, CD133 negativo y CD44 negativo a débilmente positivo (preferiblemente CD44 negativo). Alternativamente, pueden seleccionarse células con CD166 positivo, CD133 negativo y CD200 negativo. Aunque no se desea estar sujeto a ninguna teoría, el motivo por el que la población celular de la presente invención con calidad potenciada logra un efecto es porque presenta además un excelente efecto terapéutico o efecto profiláctico tras la infusión de la población celular en un sujeto al comprender un cierto nivel de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. En una realización preferida, es ventajoso que aproximadamente el 40 % o más de las células en la población celular de la presente invención sean células endoteliales corneales funcionales diferenciadas maduras. Esto se debe a que una densidad celular de alta calidad (por ejemplo, aproximadamente 1000 células/mm^2 o más, de manera preferible aproximadamente 2000 células/mm^2 y en general aproximadamente 2300 células/mm^2 para células integradas en la superficie endotelial de la córnea) que se considera un punto de referencia para una terapia de infusión exitosa de células corneales puede lograrse de manera más fiable mediante la presencia de las células funcionales a este nivel. En una realización más preferida, es ventajoso que al menos aproximadamente el 70 % o más, más preferiblemente al menos el 80 % o más, todavía más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90 % o más de las células en la población celular de la presente invención sean células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. Esto se debe a que la razón de la presencia de células funcionales en este nivel no puede lograrse accidentalmente, de modo que es necesario establecer una técnica e información que puedan identificar y separar de manera precisa y fiable una población celular; esto era más o menos imposible con las técnicas convencionales. La razón de células endoteliales corneales maduras funcionales diferenciadas puede potenciarse adicionalmente usando la técnica de la invención. Por ejemplo, es posible proporcionar una población celular en la que al menos aproximadamente el 95 % o más, al

menos aproximadamente el 96 % o más, al menos aproximadamente el 97 % o más, al menos aproximadamente el 98 % o más o al menos aproximadamente el 99 % o más de las células son células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. Además, se demuestra que puede lograrse un resultado terapéutico que excede de aproximadamente 2300 células/mm^2 (por ejemplo, aproximadamente 3000 células/mm^2) en menos de un mes después de la infusión proporcionando tal población celular que comprende células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. Por lo tanto, se proporciona una técnica terapéutica rápida y de alta calidad que estaba disponible convencionalmente.

En una realización, las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal (incluyendo células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales) o la población celular de la presente invención se caracteriza por una menor expresión de antígenos asociados a la degeneración celular o antígenos de HLA de clase I asociados con el rechazo inmunológico en relación con otras subpoblaciones. La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención, especialmente células endoteliales corneales maduras diferenciadas funcionales, no tiene autoanticuerpos observados en otras subpoblaciones. Por lo tanto, dicha célula se reconoce como una célula inmunológicamente estable.

En una realización, los metabolitos celulares y materiales biológicos relacionados del metabolito usado en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido succínico (succinato), Pro, Gly, glicerol 3-fosfato, Glu, ácido láctico (lactato), ácido argininosuccínico (argininosuccinato), xantina, ácido N-carbamoilaspártico (aspartato), ácido isocítrico (isocitrato), ácido cis-aconítico (cis-aconitato), ácido cítrico (citrato), Ala, ácido 3-fosfoglicérico (3-fosfoglicerato), hidroxiprolina, ácido málico (malato), ácido úrico (urato), betaína, ácido fólico (folato), Gln, ácido 2-oxoisovalérico (2-oxoisovalerato), ácido pirúvico (piruvato), Ser, hipoxantina, Asn, Trp, Lys, colina, Tyr, urea, Phe, Met, carnosina, Asp, ornitina, Arg, creatina, ácido 2-hidroxiglutamínico (2-hidroxiglutamato), beta-Ala, citrulina, Thr, Ile, Leu, Val, creatinina, His, N,N-dimetilglicina, o una combinación o razón relativa de los mismos. Alternativamente, los metabolitos celulares de la presente invención incluyen los siguientes.

Grupo de sustancias que se reducen por cultivo (grupo de sustancias absorbidas por una célula): Arg, creatina, aminoácidos totales, Tyr, carnosina, Asp, aminoácidos esenciales totales, aminoácidos cetogénicos totales, Trp, Val, aminoácidos relacionados con oxaloacetato totales, aminoácidos relacionados con glutamato totales, aminoácidos relacionados con acetil CoA totales, aminoácidos relacionados con succinil CoA totales, citrulina, BCAA total, razón de Fischer, hipoxantina, Leu, Asn, Ile, ácido 2-hidroxiglutárico, ácido pirúvico, Ser, razón de citrulina/ornitina, ácido úrico y beta-alanina

Grupo de sustancias que aumentan por cultivo (grupo de sustancias excretadas por una célula): sarcosina, sedoheptulosa 7-fosfato, espermidina, espermina, ácido adenílico total (adenilato), glutatión total, ácido guanílico total (guanilato), UDP-glucosa, XMP, xilulosa 5-fosfato, ácido cis-aconítico (cis-aconitato), ácido cítrico (citrato), betaína, glucosa 6-fosfato, ácido láctico (lactato) / ácido pirúvico (piruvato), glicerol 3-fosfato, Ala, ácido láctico (lactato), ácido 2-oxoisovalérico (2-oxoisovalerato), ácido arginosuccínico (arginosuccinato), Glu, hidroxiprolina, xantina, ornitina, aminoácido relacionado con ácido pirúvico total (piruvato), Pro, Gly, N,N-dimetilglicina, colina, urea, ácido fólico (folato), His, creatinina, Met, Lys, Thr, ácido succínico (succinato), ácido gamma-aminobutírico (gamma-aminobutirato), Phe, aminoácidos no esenciales totales, aminoácidos relacionados con ácido fumárico totales (fumarato), aminoácidos aromáticos totales y aminoácidos glucogenogénicos totales.

En particular, la presente invención puede controlar la calidad de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención usando una elevación de serina, alanina, prolina, glutamina o razón de ácido cítrico (citrato)/ácido láctico (lactato), especialmente la razón de ácido cítrico (citrato)/ácido láctico (lactato) en el sobrenadante de cultivo.

Una propiedad celular puede identificarse de manera no invasiva al poder usar un metabolito. Se encontró, mediante el análisis del metaboloma que se realizó como parte de la presente invención, que una propiedad de metabolización de la energía es drásticamente diferente de cada subpoblación de “células endoteliales corneales humana cultivadas” como la denominada “población heterogénea” que se ha usado convencionalmente. Se reveló que el sistema de metabolismo energético glucolítico progresa en el sobrenadante del cultivo celular en una subpoblación celular (célula transformada) que ha experimentado una transición de estado y el sistema de metabolismo energético de las mitocondrias progresa en la subpoblación de células efectoras (células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales) sin anomalía de cariotipo. Las mitocondrias son responsables de regular la producción de energía celular en la mayoría de las células somáticas, y todos los tipos de células en un estado específico pueden tener diferentes propiedades metabólicas. Mientras que una célula proliferativa, tal como una célula madre, tiende a preferir la glucólisis, se considera que las células diferenciadas maduras tales como las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales de la presente invención están bajo más regulación de fosforilación oxidativa (OXPHOS). En vista de tal conocimiento, la calidad de las células de la presente invención puede aumentarse haciendo referencia a información relacionada con un perfil metabólico con una mayor dependencia de la actividad de OXPHOS durante la diferenciación o el cambio al metabolismo glucolítico durante la proliferación celular, de manera que esto contribuye a la optimización de las condiciones de cultivo y fabricación de la célula de la presente invención. Las “células endoteliales corneales humana cultivadas” como “población heterogénea” tienen tendencia hacia fenotipo senescente, transición mesenquimatosa endotelial (EMT) y transición de estado celular (CST) a una morfología celular

similar a fibroblastos transformados. Los inventores han descubierto un método de uso del sobrenadante de cultivo para distinguir subpoblaciones en cHCEC en términos de los metabolitos secretados de los mismos. Las subpoblaciones con CST presentan tendencia hacia la glucólisis anaerobia en lugar de OXPHOS dependiente de mitocondrias. Pueden proporcionarse productos para una medicina regenerativa segura y estable usando una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional definida metabólicamente en forma de suspensión celular.

En la presente invención, por ejemplo, puede adquirirse un analizador de flujo extracelular y metabolitos, puede rastrearse de manera continua el consumo de oxígeno en el cultivo, además de los productos proteínicos y los miARN secretados, para proporcionar un método de control del proceso durante la producción de productos. Se muestra que un sistema de metabolismo energético en un sistema de mitocondrias progresa más en la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención. La presente invención puede utilizar ácido láctico (lactato), ácido pirúvico (piruvato), ácido láctico (lactato)/ácido pirúvico (piruvato), ácido cítrico (citrato)/ácido láctico (lactato), Ser, Pro/Ser, Leu, Ile (aminoácidos de cadena ramificada) y Gln en cultivo y práctica e investigar la utilidad como método de evaluación que debe aplicarse en ensayos y fabricación.

En otras realizaciones, las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales o poblaciones celulares de la presente invención tienen una forma genética específica excelente en relación con otras subpoblaciones. Los ejemplos de “propiedad genética” incluyen genes correspondientes a cualquier propiedad funcional celular presentada por la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención (por ejemplo, célula endotelial corneal diferenciada madura funcional o célula endotelial corneal intermediamente diferenciada) en cualquier producto génico descrito en la sección de productos proteínicos descrita anteriormente.

En otra realización, las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales o la población celular de la presente invención se caracterizan por no provocar sustancialmente una respuesta biológica no deseada después de la administración en un organismo vivo, incluido el perfil de citocinas del suero. Para una célula convencional de baja calidad, se demuestra que no se provoca aún una citocina inflamatoria 2 días después de la infusión, lo que conduce a un resultado como se muestra en las figuras 61-A a 61-B.

Por otro lado, se entiende que las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención, células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales o la población celular no provocan una anomalía o citocina inflamatoria después de dos días, después de una semana, o posteriormente como se muestra en las figuras 62 y 63.

Los ejemplos de perfiles de citocinas “no deseados” usados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, RANTES, PDGF-BB, IP-10, MIP-1b, VEGF, EOTAXINA, IL-1ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-0, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, FGFbásico, G-CSF, GMCSI, IFN-gamma, MCP-1, MIP-1a, TNF-alfa, y similares. El “perfil de citocinas no deseado” es un perfil que indica que una célula no es la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o “no deseado” cuando la producción de la misma se detecta por encima de lo normal.

Como se usa en el presente documento, “respuesta biológica no deseada” se refiere a provocar al menos uno de los perfiles de citocinas “no deseados” descritos anteriormente a un nivel más allá del nivel generalmente provocado.

En un aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un banco de células que comprende las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal o población celular de la presente invención. Un banco de células se refiere a una organización o sistema para contener “células” (generalmente células cultivadas) que se crean o se recogen a través de investigación o similares y proporcionar las células a otros investigadores o empresas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto que comprende las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención o población celular. Tal producto puede estar en cualquier forma tal como productos procesados celulares y similares preparados para su administración a seres humanos y similares, pero el producto no está limitado a los mismos. Es deseable que tal producto celular preferiblemente no haya experimentado una transformación no deseada, tenga poco o ningún efecto de sustancias fisiológicamente activas producidas por células/tejidos, tenga poco o ningún efecto sobre una célula o tejido normal, tenga poca o ninguna posibilidad de formar un tejido heterotópico, tenga poca o ninguna posibilidad de inducir una reacción inmunitaria no deseada, tenga poca o ninguna posibilidad de tumorigénesis u oncogénesis, se haya sometido a evaluación de seguridad como se define en las directrices del producto de terapia génica en caso de que se haya realizado transferencia génica y haya pasado la prueba de toxicidad general o similar.

En otro aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método de conservación de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención, células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales o población celular que comprende realizar pases de las células o la población celular intercambiando un medio. A este respecto, se descubrió que se mantiene y se conserva una propiedad funcional celular mediante tal intercambio de un medio. Puede usarse cualquier medio para el medio usado en el presente documento, mientras que es ventajoso usar, preferiblemente, un ingrediente o medio usado en el método de fabricación de células explicado en el presente documento.

En otro aspecto, también se divulga, pero que no forma parte de la presente invención, un método para administrar las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención, células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales o población celular, que comprende implementar el método de conservación de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención, células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales o población celular.

La clasificación es un procedimiento típico para seleccionar la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Los ejemplos de otros métodos que pueden usarse incluyen métodos que implican inducción selectiva de apoptosis (cambio de miARN) o inducción de necrosis (privación de glucosa o similares) en una célula no prevista utilizando la diferencia en las propiedades celulares de una célula de interés y una célula no prevista. Sin embargo, la presente invención generalmente potencia la pureza de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales.

(Método de fabricación de células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano)

En un aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para fabricar una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención) o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional, que comprende una etapa de madurar y diferenciar una célula derivada de tejido endotelial de la córnea o una célula progenitora endotelial de la córnea. Este método puede realizarse después de una etapa de desdiferenciación además de la etapa de maduración y diferenciación. La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención, como se describe en otra parte del presente documento, abarca una “célula endotelial corneal diferenciada madura funcional” que tiene una propiedad funcional endotelial corneal como tal sin procesos adicionales y una “célula endotelial corneal diferenciada madura funcional”, que carece de algunas de las funciones, pero que se usa de manera similar o ejerce la misma función que una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional después de la infusión celular.

En otro aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para fabricar una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención) o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional, que comprende una etapa de cultivar una célula derivada de tejido endotelial de la córnea o una célula progenitora endotelial de la córnea en condiciones de despolimerización de actina. La maduración y diferenciación se logran cultivando con una etapa que comprende despolimerización de actina, dando como resultado que la célula pueda expresar una propiedad funcional corneal cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano.

Como se usa en el presente documento, “maduración y diferenciación” pueden ser estrictamente diferentes del significado que se usa comúnmente en la técnica. Es decir, “maduración y diferenciación”, como se usan en el presente documento, se refiere a convertirse en una célula que se ha confirmado que se diferencia para ejercer una función endotelial de la córnea, que forma una forma de adoquín hexagonal pequeño que es más adecuada para la infusión celular y usa un sistema de metabolismo energético por función mitocondrial en el contexto del endotelio corneal.

Se descubrió que una célula endotelial corneal o célula diferenciada como tal o célula progenitora de la misma, cuando se expone a condiciones inductoras de despolimerización de actina, madura y se diferencia en el sentido estricto descrito anteriormente.

La despolimerización de actina o condiciones que logran la despolimerización de actina usadas se logran mediante al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de ROCK, inhibidor de HDAC, inhibidor de la despolimerización de actina, inhibidor de PPARgamma, inhibidor de MMP2, activador de p53 y miARN.

Los ejemplos del inhibidor de la despolimerización de actina usado en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, latrunculina A, swinholida A, y similares. A este respecto, puede usarse latrunculina A, por ejemplo, a aproximadamente 0,4 microM, y puede usarse swinholida A a aproximadamente 0,1 microM.

Los ejemplos del inhibidor de HDAC incluyen tricostatina A (TSA), vorinostat y similares. La tricostatina A puede usarse a aproximadamente 0,5 microM. Los ejemplos de inhibidor de PPARgamma incluyen rosiglitazona, pioglitazona, y similares. Los ejemplos de inhibidor de MMP2 incluyen resveratrol y similares. Los ejemplos de activador de p53 incluyen los usados en investigación del cáncer. Los ejemplos de miARN incluyen, pero no se limitan a, los asociados con la activación en una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano en el presente documento, tal como miARN 34, 1246, 1273 y 4732.

En otro ejemplo específico, un agente usado en la despolimerización de actina o condición para lograr la

despolimerización de actina está presente en un medio en la etapa mencionada anteriormente a una concentración eficaz para lograr la despolimerización de actina. Los ejemplos de tal concentración incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 1-30 microM para el inhibidor de ROCK Y-27632 tal como aproximadamente 10 microM, y aproximadamente 100-2000 nM tal como 500 nM para el inhibidor de HDAC tricostatina A. Los expertos en la técnica pueden cambiar adecuadamente la concentración midiendo la función celular de una célula resultante (por ejemplo, usando un marcador sustituto) o examinando un indicador celular.

En un aspecto adicional que tampoco forma parte de la presente invención, el método de fabricación de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional comprende además una etapa de cultivo de la célula derivada del tejido endotelial de la córnea o la célula progenitora endotelial de la córnea en etapas en las que una célula entra en la transformación de tipo transición epitelial-mesenquimatosa, proliferación, maduración y diferenciación.

Tal condición en la que una célula que ha experimentado una transformación de tipo transición epitelial-mesenquimal crece, madura y se diferencia puede lograrse, por ejemplo, mediante el cultivo en ausencia de un inhibidor de la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) (por ejemplo, 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida] (SB431542)). Se sabe que una célula derivada de tejido endotelial de la córnea cultivada tiende hacia la transición del estado celular (CST) al fenotipo senescente, EMT y morfología fibroblástica, y se demostró claramente que el bloqueo de las señales de TGF-beta induce un cambio morfológico en una célula derivada de tejido endotelial de la córnea cultivada. Se determina que CD44, CD24, IL-8 e IGFBP3 están regulados por incremento y colágeno 4A1, 4A2 y 8A2 están regulados por disminución. Se reveló que el cultivo en ausencia de un inhibidor de la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) da como resultado una célula que ha experimentado transformación de tipo transición epitelial-mesenquimatosa que crece, madura y se diferencia potenciando la calidad de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Se entiende que la presente invención puede comprender o no una etapa de cultivo en una condición en la que una célula que ha experimentado transformación de tipo transición epitelial-mesenquimatosa crece, madura y se diferencia (por ejemplo, cultivo en ausencia de un inhibidor de la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)).

En otro aspecto más que tampoco forma parte de la presente invención, el método de fabricación de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional comprende además una etapa de cultivo de la célula derivada de tejido endotelial corneal o la célula progenitora endotelial corneal en una condición en la que se suprime la senescencia celular.

Tal condición en la que se suprime la senescencia celular puede lograrse cultivando en presencia de un inhibidor de MAP quinasa p38. Los ejemplos de inhibidores de MAP quinasa p38 incluyen, pero no se limitan a, 4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol (SB-202190), trans-4-[4-(4-fluorofenil)-5-(2-metoxi-4-pirimidinil)-1H-imidazol-1-ilo]ciclohexanol (SB-239063), 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol (SB-203580) y 4-(4-fluorofenil)-5-(2-metoxipirimidin-4-ilo)-1-(piperidin-4-ilo)imidazol (SB-242235), y similares.

En un aspecto, que tampoco forma parte de la presente invención, el método de fabricación de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o cultivos de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales en una condición de exposición de una célula a la despolimerización de actina, o maduración y diferenciación en una condición en la que una célula que ha experimentado una transformación de tipo transición epitelial-mesenquimal crece, madura y se diferencia, y una condición en la que se suprime la senescencia celular o en presencia de un inhibidor de MAP quinasa p38. Tal combinación dirige correctamente la maduración y diferenciación para suprimir o revertir la transición de estado de tipo epitelial-mesenquimatosa para suprimir la senescencia. Por lo tanto, puede fabricarse ventajosamente una célula endotelial corneal madura diferenciada funcional de alta calidad.

Cuando se fabrica una célula endotelial corneal mediante un método de fabricación conocido convencionalmente, las SP definidas por un marcador de CD de superficie celular se expresan frecuentemente en proporciones notablemente diferentes. Además, se reveló que la razón E definida por la proporción de subpoblación con CD44 negativo CD166 positivo CD24 negativo CD26 negativo CD105 negativo es del 0,2-19 % o 0,1-31,2%. También se confirmó que la expresión de CD44 disminuye a medida que una célula endotelial corneal cultivada se diferencia en una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. En presencia de una SP que expresa CD24 o CD26 en células, existe la posibilidad de la presencia de algún tipo de una SP con anomalía notable de cariotipo tal como pérdida de cromosomas sexuales, trisomía o translocación, de modo que la presencia de la misma no sea adecuada para la terapia de infusión celular. Como máximo, la proporción de células positivas para CD24 alcanzó el 54,3 %-96,8 %, y la proporción de células positivas para CD26 alcanzó el 44,2 %; se observó que estaban presentes células de expresión fuertemente positiva de CD44 en la proporción más alta superando el 80 %. El fenotipo externo no era fibroblástico, y cuando se observan con un microscopio de contraste de fase, las células tenían una forma poligonal característica y una estructura monocapa debido a la obstrucción por contacto. Sorprendentemente, tanto ZO-1 como Na^+/K^+ ATPasa, que son marcadores de HCEC bien conocidos, se tiñeron para subpoblaciones de CD24 positivo, CD26 positivo o CD44 fuertemente positivo. En vista de lo anterior, la presente invención descubrió que SP heterogéneas presentes en las cHCEC pueden no distinguirse suficientemente solo por el juicio morfológico. El método de la presente invención logra el efecto de disminuir la proporción de tales células inadecuadas y aumentar la

proporción de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención y las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales humanas que son adecuadas para la infusión. Un medio de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea humana no solo estimula el crecimiento de HCEC controlando las proteínas G1 en un ciclo celular, sino que también mantiene un fenotipo de diferenciación requerido para la función endotelial de las cHCEC. Por lo tanto, se recomendó el uso del mismo para mantener las cHCEC (Nakahara M, *et al.*, PLoS One. 2013; 8:e69009). Sin embargo, la presente invención reveló que un medio que comprende un medio de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea y un medio que está libre del mismo no tienen una diferencia en el aumento de la proporción de células funcionales de células diferenciadas maduras.

Aunque no se desea estar sujeto a ninguna teoría, el motivo por el que una célula endotelial corneal puede madurar y diferenciarse mediante el cultivo en condiciones de despolimerización de actina en la presente invención es el siguiente.

Es decir, en condiciones para madurar y diferenciar una célula endotelial corneal específica de la presente invención, la inhibición de HDAC, el aumento en la expresión de miARN34 y/o la supresión de la expresión de CD44 en una determinada ruta suprime la polimerización de actina, también suprime RhoA y suprime la polimerización de tubulina y actina en otra ruta, dando como resultado la acción de generar un pseudópodo en una célula. En otra ruta más, CD44 activa RhoA a través de MMP2. Por lo tanto, también se espera que el uso de un inhibidor de MMP2 logre el mismo efecto. Por lo tanto, la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional puede fabricarse de manera similar suprimiendo MMP2.

Como se usa en el presente documento, una “célula derivada de tejido endotelial de la córnea o célula progenitora endotelial de la córnea”, como se define en otra parte del presente documento, se refiere a una célula que se convierte en la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional a partir de una célula derivada del tejido endotelial de la córnea y diferenciación a través de una etapa de desdiferenciación, respectivamente. Tal célula abarca cualquier célula tal como células diferenciadas en células similares a células endoteliales corneales, a partir de células iPS, células ES, o similares y células progenitoras antes de la diferenciación en células endoteliales corneales, además de las células obtenidas de un endotelio corneal donador, así como células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas definidas en el presente documento.

En el método de fabricación descrito en el presente documento, pero que tampoco forman parte de la presente invención, una célula derivada de tejido endotelial de la córnea que puede usarse como material de partida se recoge de un organismo vivo. Alternativamente, los materiales de partida que pueden usarse pueden ser células progenitoras endoteliales de la córnea, tales como células diferenciadas a partir de células madre o células progenitoras. Los ejemplos de tales células diferenciadas pueden incluir, pero no se limitan a, células diferenciadas a partir de diversas células madre (por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células madre embrionarias (células ES), óvulos fertilizados y células madre somáticas). Por lo tanto, en una realización específica, los ejemplos de las células derivadas de tejido endotelial de la córnea o células progenitoras endoteliales de la córnea usadas (como material de partida) en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células madre pluripotentes, células madre mesenquimatosas, células progenitoras endoteliales de la córnea recogidas de un endotelio corneal, células endoteliales corneales recogidas de un endotelio corneal, células progenitoras endoteliales de la córnea y células similares al endotelio corneal producidas por el método de programación directa y similares. A este respecto, los ejemplos de células madre pluripotentes incluyen, pero no se limitan a, células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células madre embrionarias (células ES) y similares. Por lo tanto, se entiende que las células endoteliales corneales o las células progenitoras de las mismas usadas (como material de partida) en la presente invención incluyen células preparadas diferenciando células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células madre embrionarias (células ES) o similares en células similares al endotelio corneal. En la técnicas se conocen técnicas de diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células madre embrionarias (células ES) o similares en células similares al endotelio corneal, tales como el método AMED (Ueno *et al.* citado anteriormente), documento WO 2013/051722 (KEIO UNIVERSITY), y similares, pero las técnicas no se limitan a las mismas.

Cuando se usa una célula que no se diferencia en una célula similar al endotelio corneal, es preferible comprender una etapa de diferenciación o maduración y diferenciación en una célula similar al endotelio corneal.

En la técnica se conocen métodos para diferenciar una célula madre tal como una célula madre pluripotente o célula madre mesenquimatosa en una célula similar a células del endotelio corneal, tales como el método AMED (Ueno *et al.* citado anteriormente), documento WO 2013/051722 (KEIO UNIVERSITY) y similares, pero los métodos no se limitan a los mismos.

Las densidades de siembra de células pueden estar asociadas con la calidad de un método de fabricación. Por ejemplo, una mayor densidad de siembra de células conduce a una menor disminución en la razón de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales en el siguiente pase. Un grupo con una razón de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales superior al 90 % presenta un aumento muy rápido (es decir, la tasa de crecimiento es alta) en el número de células a una densidad de siembra de células de 200 células/mm^2. Por lo tanto, se entiende que es

ventajosa una densidad de siembra de células de 200 células/mm^2 o mayor. En una realización preferida, el cultivo en el método de fabricación se realiza ventajosamente a una densidad de cultivo de aproximadamente 200-aproximadamente 1000 células/mm^2. Más preferiblemente, de aproximadamente 400 a aproximadamente 800 células/mm^2 o similar es más ventajoso. Los ejemplos del límite inferior de densidad de cultivo incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 100 células/mm^2, aproximadamente 150 células/mm^2, aproximadamente 200 células/mm^2, aproximadamente 250 células/mm^2, aproximadamente 300 células/mm^2, aproximadamente 350 células/mm^2, aproximadamente 400 células/mm^2, y similares. Los ejemplos del límite superior del mismo incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 800 células/mm^2, aproximadamente 850 células/mm^2, aproximadamente 900 células/mm^2, aproximadamente 950 células/mm^2, aproximadamente 1000 células/mm^2, aproximadamente 1100 células/mm^2, aproximadamente 1200 células/mm^2, aproximadamente 1300 células/mm^2, aproximadamente 1400 células/mm^2, aproximadamente 1500 células/mm^2, aproximadamente 1600 células/mm^2, aproximadamente 1700 células/mm^2, aproximadamente 1800 células/mm^2, aproximadamente 1900 células/mm^2, aproximadamente 2000 células/mm^2, y similares. Se entiende que puede usarse una combinación de cualquiera de los límites superiores e inferiores.

En un aspecto, el método de fabricación comprende además una etapa de someter a prueba una célula después del cultivo usando al menos un marcador para identificar la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Los marcadores para identificar la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales se explican en otra parte del presente documento. Se entiende que puede usarse cualquiera de tales marcadores o una combinación de los mismos. Esto se debe a que la calidad puede mantenerse en o por encima de un cierto nivel sometiendo a ensayo una célula fabricada.

En otro aspecto, el método de fabricación puede comprender además una etapa de propagación selectiva en cultivos de una fracción que se determina que es la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional después de la prueba. Esto se debe a que una célula sometida a prueba es de buena calidad y una célula que no puede separarse para seleccionar, preferiblemente aislar una célula de buena calidad para mejorar aún más la calidad de la célula proporcionada. Puede usarse un enfoque conocido en la técnica para tal clasificación de células, tal como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), así como inducción de apoptosis selectiva de célula no prevista (cambio de miARN o similares), inducción de necrosis (privación de glucosa o similares) utilizando la diferencia en las propiedades celulares de una célula de interés y una célula no prevista, y similares.

En otro aspecto más, el método de fabricación usado en el presente documento comprende además una etapa de monitorización de la composición de subpoblaciones celulares durante el cultivo. Tal monitorización puede realizarse usando al menos un marcador para identificar la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional o midiendo la función mitocondrial, el consumo de oxígeno y el pH del cultivo o similares. La calidad del propio método de fabricación puede controlarse mediante tal monitorización en el proceso de fabricación. La monitorización puede materializarse, por ejemplo, rastreando al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en la función mitocondrial, el consumo de oxígeno y el pH de una disolución de cultivo, composición de aminoácidos, producto proteínico, miARN soluble, densidad celular con un enfoque de ingeniería no invasiva, tamaño celular y homogeneidad celular de los mismos.

Cuando se observa un deterioro en el método de fabricación realizado como resultado del control de calidad descrito anteriormente, el método de fabricación que se realiza puede alterarse según sea necesario. Los ejemplos de tal alteración pueden incluir, pero no se limitan a, potenciación de la maduración y diferenciación o condiciones de despolimerización de actina (por ejemplo, potenciación de la inhibición de ROCK), potenciación del crecimiento, maduración y diferenciación de una célula con transformación de tipo transición epitelial-mesenquimatosa, tal como una potenciación adicional en la inhibición de la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), potenciación de la supresión de la senescencia celular, tal como potenciación de la inhibición de MAP quinasa p38, una combinación de los mismos y similares.

En un aspecto, el método de fabricación comprende una etapa de subcultivo. El subcultivo puede hacer crecer exponencialmente la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal funcional diferenciada madura. A este respecto, el número de células se expande aproximadamente 3 veces por un solo subcultivo. El factor de expansión puede aumentarse o disminuirse alterando apropiadamente las condiciones de cultivo basándose en condiciones conocidas en la técnica. Tras el pase, es preferible que el subcultivo se realice a la densidad de siembra de células ventajosa mencionada anteriormente. Además, es preferible que la razón de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales aumente tanto como sea posible tras el pase, tal como un 90 % o más.

En un aspecto específico, el método de fabricación comprende una etapa de adición de un inhibidor de ROCK u otros agentes de despolimerización de actina, tales como inhibidor de HDAC, inhibidor de la despolimerización de actina, inhibidor de PPARgamma e inhibidor de MMP2, activador de p53 y miARN en el momento del subcultivo. Puede añadirse un inhibidor de ROCK u otro agente de despolimerización de actina en un momento distinto de durante el subcultivo para mantener la concentración en o por encima de un cierto nivel. A tal concentración, se observa muy poca mejora con aproximadamente 1 microM y se observa poco a aproximadamente 5 microM (=razón E, aumento en

la proporción de células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas) para Y-27362. Se presenta más de un efecto a aproximadamente 10 microM o más. Para el inhibidor de la polimerización de actina, la latrunculina A es aproximadamente 1-aproximadamente 50 nM y se muestra que es utilizable incluso a aproximadamente 200 microM, y la swinholida A es de aproximadamente 1 nM o menos e incluso se muestra que es utilizable a aproximadamente 3 nM. Los detalles de los mismos se explican en otra parte del presente documento, incluidos los ejemplos y similares.

El método de fabricación de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional puede realizarse en presencia o ausencia de un medio de acondicionamiento celular. En métodos convencionales, se usaron a menudo medios de acondicionamiento de células madre mesenquimatosas (por ejemplo, véase Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009) o similares, pero se reveló que un medio de acondicionamiento celular puede o no estar presente cuando se fabrica una célula funcional en las condiciones de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención abarca una realización de cultivo en ausencia de un medio de acondicionamiento celular en el método de fabricación de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional.

En otro aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para conservar células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales que comprende una etapa de cultivo continuo de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención, célula endotelial corneal diferenciada madura funcional o célula obtenida por el método de fabricación de la presente invención para la maduración de la función celular después de que la densidad celular de células cultivadas alcance una densidad de saturación, después de la fabricación. Preferiblemente, después de la maduración de la función celular, se realiza el cultivo, por ejemplo, durante 1 semana o más con solo intercambio de medio para conservar las células cultivadas. Tal intercambio de medio se realiza ventajosamente después de que las células alcancen la densidad celular saturada y la maduración de la función celular después de eso en la etapa mencionada anteriormente de cultivo adicional de las células. Se descubrió que la funcionalidad y la calidad de las células fabricadas en la presente invención, cuando se fabrican, puede mantenerse/conservarse solo cambiando los medios sin pases a diferencia de las condiciones normales de cultivo. Tal conservación se logra normalmente mediante al menos aproximadamente una semana a seis meses de intercambio de medios, tal como continuando el cultivo durante aproximadamente 2-4 semanas. Aunque el límite superior no está particularmente limitado, los inventores han descubierto que el estado de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional puede conservarse continuamente a partir del cultivo continuado durante al menos 6 meses o más, tal como más de aproximadamente 200 a aproximadamente 1 año.

En un aspecto, el método de fabricación puede comprender además una etapa de someter a prueba una función celular después del cultivo usando al menos un indicador celular o marcador sustituto para identificar la célula endotelial corneal funcional humana.

En un aspecto a modo de ejemplo, puede llevarse a cabo un método de fabricación de la siguiente manera. Es decir, una capa endotelial corneal de una sola capa se separa con las membranas de Descemet de una córnea, que se obtuvo de un banco de ojos de Estados Unidos, SightLife Inc., (ventajosamente de acuerdo con el estándar de seguridad de instituciones oficiales tales como la FDA y el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar). Las células endoteliales corneales se separan durante la noche mediante tratamiento con colagenasa. Las células se cultivan en un medio de cultivo (por ejemplo, medio Nancy (Cheng Zhu y Nancy C. Joyce, Invest Ophthalmol Vis Sci 20041743; Gary S. L. Peh *et al.*, PLoS ONE 2012 e28310 (tabla 1); documento US6541256) que comprende un componente suplementado adecuado (por ejemplo, FBS al 8 %) mientras se usa un medio adecuado (por ejemplo, Opti-MEM) como medio basal. El cultivo primario (cultivo P0) se inicia sembrando células endoteliales de los ojos izquierdo y derecho del mismo donante en una placa de colágeno I con una escala adecuada (por ejemplo, 2 pocillos/6 pocillos). Se añade al cultivo un ingrediente adecuado para la maduración y diferenciación para inducir la diferenciación en una célula diferenciada madura (10 microM de Y-27632 (inhibidor de ROCK) para inducir la diferenciación en células diferenciadas maduras. Se añade un ingrediente adecuado para la prevención de la senescencia o la supresión de la transición de estado de las células (por ejemplo, 10 microM de SB203580) durante el periodo de cultivo. Después de que las células alcancen la confluencia desde un período adecuado de cultivo (por ejemplo, después de aproximadamente 4-8 semanas), se realizan pases de las células. Después de alcanzar la confluencia, se conserva la misma calidad durante varias semanas solo cambiando el medio. En los pases, las células se desprenden de la placa con un reactivo de desprendimiento apropiado (por ejemplo, TrypLE) y se lavan con medio, y después se siembran en un matraz de colágeno I T25 a un nivel adecuado de densidad celular (por ejemplo, 400 células/mm^2 o más). Hasta P2 (pase de dos veces, lo mismo en lo sucesivo) o P3 pueden usarse células de cultivo para obtener buenos resultados. Se entiende que también pueden usar células cultivadas hasta P5-P6 para obtener células con suficiente efecto terapéutico.

Cuando se cultivan mediante el método descrito en el presente documento, la pureza y función de las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales de alta calidad de la presente invención (es decir, células de interés que se considera que presentan eficacia en la infusión) no cambian, siempre que las células endoteliales corneales se cultiven continuamente intercambiando solo medios sin más pases durante 2-8 semanas con una incubadora mantenida a 37 grados C después de que el cultivo de células endoteliales corneales haya alcanzado la confluencia. La proporción de células no previstas tampoco varía. Por lo tanto, el método de fabricación de la presente invención también se reconoce como un excelente método de fabricación en términos prácticos. Cuando se fabrica

una célula para uso clínico, es preferible que se use un medio libre de metavanadato (MVA), que generalmente está contenido en Opti-MEM, y un lote o aditivo de suero añadido al medio se somete a una prueba de lote exhaustiva por adelantado con respecto a la calidad del mismo.

(Aplicación farmacéutica de células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano)

En otro aspecto, la presente invención proporciona, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, un medicamento que comprende una célula endotelial corneal funcional capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención) o una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención, como se describe en otra parte del presente documento, abarca células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales que tienen una propiedad funcional endotelial corneal como tales sin proceso adicional y células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas, que carecen de algunas de las funciones, pero se usan de manera similar o ejercen la misma función que una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional después de la infusión celular.

Como la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional utilizada en la presente invención, puede usarse cualquiera de la célula funcional que posee la propiedad endotelial de la córnea de la invención, la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional o una población celular que comprende una subpoblación celular de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención, célula endotelial corneal diferenciada madura funcional, que se proporcionan en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, “subpoblación celular” se refiere a una población de células homogéneas dentro de un cierto intervalo, que se propagaron selectivamente en cultivos con un marcador de superficie celular o similar y entonces se considera que tienen una propiedad dentro del intervalo. “Población celular” se refiere a cualquier población de células, que puede consistir en una “subpoblación celular” o comprender múltiples “subpoblaciones celulares”, o una población que comprende cualquier célula no relacionada con una subpoblación celular particular.

Se entiende que cualquier realización explicada en la sección de (Célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano) en la presente invención o una combinación de las mismas puede usarse para la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal, célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención o población celular usada en el medicamento de la presente invención.

En una realización específica, el medicamento de la presente invención comprende una población celular con las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales que están presentes a una razón más alta. Como tal población celular, puede usarse cualquier realización descrita en la sección de (Células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano).

En una realización más preferida, el medicamento de la presente invención comprende una población celular en la que al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % de las células son las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. En esta realización, se concentran células que comprenden una propiedad funcional celular que comprende CD166 positivo y CD133 negativo y que tienen, según sea necesario, CD44 negativo a CD44 intermediamente positivo, preferiblemente CD44 negativo a CD44 débilmente negativo. Se confirma que una densidad celular (por ejemplo, aproximadamente 1000 células/mm^2 o más, de manera preferible aproximadamente 2000 células/mm^2 y generalmente 2300 células/mm^2 aproximadamente en células integradas en la superficie endotelial de la córnea), que se considera un punto de referencia para la terapia de infusión de células corneales exitosa, puede lograrse de manera más fiable mediante la presencia de células endoteliales corneales maduras diferenciadas funcionales altamente puras.

En otra realización, el medicamento de la presente invención comprende una población celular con una razón de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales que está presente a una razón mayor que una razón de origen natural. Como tal población celular, puede usarse cualquier ejemplo descrito en la sección de (Funcional endotelial corneal capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano).

En una realización más preferida, el medicamento de la presente invención comprende una población celular con al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % de las células que son células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. En esta realización, se seleccionan células contenidas en la población celular que tiene CD166 positivo, CD133 negativo y CD44 negativo a débilmente positivo (preferiblemente CD44 negativo) o

CD166 positivo, CD133 negativo y CD200 negativo. Se confirma que una densidad celular (por ejemplo, aproximadamente 2300 células/mm^2 o un nivel más alto), que se considera un punto de referencia para la terapia de infusión de células corneales exitosa, puede lograrse de manera más fiable mediante la presencia de altos niveles de las células endoteliales corneales madura funcional diferenciadas. En una realización más preferida, el medicamento de la presente invención comprende una población celular con al menos aproximadamente el 95 % o más, al menos aproximadamente el 96 % o más, al menos aproximadamente el 97 % o más, al menos aproximadamente el 98 % o más o al menos aproximadamente el 99 % o más de las células que son células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. Se demuestra que puede lograrse un resultado terapéutico que excede aproximadamente 2300 células/mm^2 (por ejemplo, aproximadamente 3000 células/mm^2 o más) en menos de un mes después de la infusión proporcionando tal población celular que comprende células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. Por lo tanto, se proporciona una técnica terapéutica rápida y de alta calidad que no estaba disponible. Se demuestra que el medicamento de la presente invención logra excelentes resultados clínicos a los 6 meses después de la cirugía. También se descubrió que dicho efecto está correlacionado con la razón E y una razón de células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. Por lo tanto, se entiende que el medicamento de la presente invención puede proporcionar un resultado clínico estable y excelente. Se descubre en particular que la razón E o la razón de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención puede aumentarse para lograr un efecto terapéutico más temprano. Se entiende que se logra un efecto clínico en la medida en que el efecto puede observarse después de 3 meses, y en algunos casos después de 1 mes. Tal efecto puede lograrse elevando la razón E o la razón de células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención, o mediante la selección de una subpoblación basada en la razón E o la razón de células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal, método de fabricación de células que permite un aumento en la razón E o la razón de células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención, o similares. Tal efecto puede lograrse mediante la divulgación de la presente invención. En particular, como se demuestra en los Ejemplos, para lo que era una densidad de células endoteliales corneales (ECD) de aproximadamente 500 células/mm^2, se logró una densidad que superaba al menos aproximadamente 1000 células/mm^2, se logró en promedio una densidad que superaba aproximadamente 2000 células/mm^2 y se logró una densidad que superaba aproximadamente 2300 células/mm^2 en casi la mitad de tales casos. Por lo tanto, se reveló que se logra un efecto terapéutico más allá del nivel que podía lograrse previamente. Además, cuando la razón E se aumenta aún más hasta el 90 % o más, ya se logró un resultado superior a 3000 células/mm^2 en promedio después de 1 mes. Se obtuvieron resultados comparables a los sujetos normales, de modo que los resultados se mejoran notablemente.

El medicamento de la presente invención también mejora notablemente otros elementos de evaluación terapéutica tales como el grosor corneal, la visión, y similares. Por ejemplo, cuando se estudia la evaluación del grosor corneal, se logra un efecto terapéutico más temprano en comparación con los métodos convencionales. Ya se logró un efecto después de 3 meses. El grosor corneal se reduce suficientemente incluso después de un mes elevando la razón E, de modo que se observa una mejora notable.

Se observa un efecto basado en el control de la razón E o la razón de células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención incluso a nivel de inspección visual. Cuando ni la razón E ni la razón de células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal se controla en la invención, se observó opacidad incluso después de 3 meses. Mientras tanto, cuando se controló la razón E o la razón de células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención, el edema corneal se aclaró en 3 meses. El aumento adicional de la razón y la elevación de la razón E permitieron que el edema se eliminara en 1 mes.

Además, el medicamento de la presente invención también mejora notablemente otros elementos, tales como la visión, el edema estromal y la puntuación total del mismo. Además, no se observó un acontecimiento adverso grave y apenas se observó un acontecimiento adverso no grave, de tal manera que se entiende que el medicamento de la presente invención proporciona un excelente resultado terapéutico.

Como un caso notable logrado por el medicamento de la presente invención, puede realizarse la infusión de células endoteliales corneales cultivadas con el uso combinado de un inhibidor de Rho quinasa en un paciente con queratopatía ampollosa. Una realización de inyección de una célula endotelial corneal recogida y cultivada a partir de una córnea proporcionada por una organización tal como el banco de ojos de Estados Unidos con un inhibidor de Rho quinasa en el lado posterior de una córnea denominado cámara anterior es un ejemplo de un método terapéutico que usa el medicamento de la presente invención. Por ejemplo, se muestra una realización de intento de adhesión de una célula infundida a la superficie endotelial en una postura boca abajo durante normalmente 3 horas o más después de la inyección.

Es preferible evitar una posible complicación tanto como sea posible observando cuidadosamente el progreso de la inflamación posquirúrgica o similar. En caso de un efecto secundario grave, pueden tomarse medidas interrumpiendo inmediatamente la terapia para tomar medidas que coincidan con el efecto secundario. El período terapéutico es normalmente de 24 semanas, pero el período puede extenderse o reducirse dependiendo del progreso en la terapia. Por ejemplo, la presente invención tiene ejemplos en los que se superan 3000 células/mm^2 un mes después de la terapia con una microscopía especular endotelial de la córnea. Por lo tanto, el progreso puede observarse después de que haya pasado un cierto período para tomar medidas. Además, generalmente es deseable observar el progreso para confirmar la seguridad y el efecto terapéutico después del final del período. Los efectos terapéuticos pueden

juzgarse mediante la evaluación de la visión, la transparencia de la córnea, la densidad de células endoteliales corneales, el grosor corneal y similares mediante observación visual. Los expertos en la técnica pueden determinar tales formas terapéuticas específicas a través de una prueba adecuada según sea necesario usando hallazgos conocidos en la técnica para la indicación, el vehículo de infusión, el número de células a infundir y similares para un paciente diana.

En una realización específica, el medicamento de la presente invención se usa para tratar una disfunción, trastorno o enfermedad endotelial de córnea. Tal disfunción, trastorno o enfermedad endotelial de córnea comprende, pero no se limita a, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en trastorno endotelial corneal de grado 3 y trastorno endotelial corneal de grado 4 (normalmente queratopatía ampollosa) (por ejemplo, distrofia corneal endotelial de Fuchs, PEX-BK (queratopatía ampollosa por pseudoexfoliación; queratopatía ampollosa que implica síndrome de pseudoexfoliación), queratopatía ampollosa posterior a iridotomía láser, queratopatía ampollosa posterior a cirugía de cataratas (incluyendo queratopatía ampollosa pseudofáquica o afáquica), queratopatía ampollosa posterior a cirugía de glaucoma y queratopatía ampollosa posterior a traumatismo, queratopatía ampollosa de causa desconocida después de múltiples cirugías, fracaso del injerto después de trasplante de córnea, distrofia endotelial corneal congénita y síndrome de hipoplasia congénita del ángulo de cámara anterior. El sistema de clasificación usado en el presente documento se basa en la clasificación de gravedad de trastornos endoteliales de la córnea, que se basa en Japanese Journal of Ophthalmology 118: 81-83, 2014. Por ejemplo, un ejemplo de queratopatía ampollosa incluye queratopatía ampollosa posterior a iridotomía láser, que implica una cirugía que abre un orificio con láser en el iris de un paciente con presión ocular que es difícil de controlar solo con un agente terapéutico contra el glaucoma para mejorar el flujo de humor acuoso. Mientras tanto, se entiende que el endotelio corneal se ve golpeado por el flujo de agua del mismo dañando el endotelio. Se considera que el medicamento de la presente invención presenta un efecto notable. La distrofia corneal de Fuchs es una enfermedad genética congénita que se considera que afecta al 4-5 % de los individuos de 40-50 años o mayores en Europa y Estados Unidos. El endotelio en el centro de la córnea se cae presentando opacidad. La distrofia corneal de Fuchs es la principal causa de trasplante corneal en Europa y Estados Unidos. También se considera que el medicamento de la presente invención presenta un efecto notable sobre la distrofia corneal de Fuchs. Además, el medicamento también es eficaz para la queratopatía ampollosa después de múltiples operaciones con una causa desconocida llamada OP-BK múltiple. Un ejemplo típico de tal operación múltiple incluye una operación con operación vitreorretiniana concurrente e inserción de catarata + lente intraocular generalmente denominada “operación triple” y similares.

El medicamento de la presente invención puede administrarse a un sujeto de cualquier manera, pero es deseable que una célula contenida en el medicamento de la presente invención se administre en la cámara anterior en una realización preferida. Se establece una técnica para infundir una célula endotelial corneal cultivada en la cámara anterior. Aunque no se desea estar sujeto a ninguna teoría, esto se debe a que el concepto de regeneración de endotelios corneales por infusión dentro de la cámara anterior (1) es mínimamente invasivo, (2) no usa material artificial y (3) permite el uso de una célula endotelial corneal altamente funcional de un donante joven con poca senescencia como célula maestra. Además, esto se debe a que la función endotelial de la córnea se regenera de la manera más eficiente mediante la infusión de la célula en la cámara anterior. Esto también se debe a que el proceso de la presente invención ha revelado que la seguridad y los POC clínicos se han establecido en aplicaciones humanas mediante estudios basados en las directrices para estudios clínicos que usan una célula madre humana (estudios clínicos exploratorios) para la expansión del cultivo *ex vivo* y luego la infusión de la suspensión celular en la cámara anterior de un paciente (con queratopatía ampollosa o similar).

Además de una célula, el medicamento de la presente invención puede administrarse junto con un agente adicional. Como tal agente adicional, pueden usarse agentes que se usan generalmente en terapia oftálmica (por ejemplo, agente esteroideo, antimicrobiano, antibacteriano o NSAID). Además de un inhibidor de ROCK, también puede incluirse un agente usado en la condición de madurar y diferenciar la célula endotelial corneal específica de la presente invención, que puede usarse como medicamento, principalmente para mantener o mejorar la calidad de una célula.

Los agentes que se usan simultáneamente incluyen agentes esteroides. A este respecto, agente esteroide corticosuprarrenal (por ejemplo, metilprednisolona (Solu-Medrol(R)), betametasona (Rinderon(R)), fluorometolona (Flumetolon(R)), dexametasona (Decadron(R) o similares), prednisolona (Predonina(R)) o similares) para suprimir un rechazo y controlar la inflamación posoperatoria. Para prevenir infecciones, se administran antibióticos. Los ejemplos de tales antibióticos incluyen, pero no se limitan a, flomoxef sódico (Flumarin(R)), clorhidrato de cefcapeno pivoxilo (Flomox(R), gatifloxacina (Gatiflo(R)) y similares), y similares. Para prevenir inflamaciones, pueden administrarse AINE. Los ejemplos de tales AINE incluyen gotas oculares de indomelol (nombre genérico: indometacina), gotas oculares de Niflan (nombre genérico: planoprofeno), gotas oculares de Diclod (nombre genérico: diclofenaco sódico), gotas oculares de Bronuck (nombre genérico: bromfenaco sódico hidratado), gotas oculares de suspensión de Nevanac (nombre genérico: nepafenaco) y similares.

Los ejemplos de inhibidores de ROCK usados como agente combinado incluyen compuestos dados a conocer en la patente estadounidense n.º 4678783, la patente japonesa n.º 3421217, los documentos WO 95/28387, WO 99/20620, WO 99/61403, WO 02/076976, WO 02/076977, WO 2002/083175, WO 02/100833, WO 03/059913, WO 03/062227, WO 2004/009555, WO 2004/022541, WO 2004/108724, WO 2005/003101, WO 2005/039564, WO 2005/034866, WO 2005/037197, WO 2005/037198, WO 2005/035501, WO 2005/035503, WO 2005/035506, WO 2005/080394, WO

2005/103050, WO 2006/057270, WO 2007/026664, y similares. Tales compuestos pueden fabricarse mediante el método descrito en cada documento divulgado. Los ejemplos de los mismos incluyen 1-(5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina o una sal de la misma (por ejemplo, fasudil o clorhidrato de fasudil), (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexanocarboxamida o una sal de la misma (por ejemplo, Y-27632 (diclorhidrato de (R)-(+)-trans-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-ciclohexanocarboxamida monohidratado), y similares), y preferiblemente que comprende Y-27632.

Tal agente de adición puede estar comprendido en el medicamento celular de la presente invención como medicamento, o se proporciona en una forma administrada por separado. En una forma proporcionada o administrada por separado, el agente adicional se proporciona como un kit o agente combinado. Cuando se usa como un kit o agente combinado, también puede combinarse un prospecto o similar que describa el método de uso del mismo.

El medicamento, composición farmacéutica o agente (agente terapéutico, agente profiláctico o similar) de la presente invención puede proporcionarse como un kit. En una realización específica, la presente invención proporciona un paquete o kit de agentes que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más ingredientes de la composición o medicamento de la presente invención. En algunos casos, puede mostrarse información que muestra la aprobación para la fabricación, el uso o la venta para la administración a seres humanos por una agencia gubernamental en dicho recipiente en una forma definida por la agencia gubernamental que restringe la fabricación, el uso o la venta de un medicamento o producto biológico.

La célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención contenida en el medicamento de la presente invención puede estar contenida a una densidad de, por ejemplo, aproximadamente 5 X 10^4 células/300 microlitros a aproximadamente 2,0 X 10^6 células/300 microlitros, o de aproximadamente 2 X 10^5 células/300 microlitros a aproximadamente 5 X 10^5 células/300 microlitros. Una densidad celular adecuada no está limitada a la misma. Cada uno de los límites superior e inferior de los mismos puede variarse adecuadamente. Los ejemplos del límite inferior incluyen aproximadamente 5 X 10^4 células/300 microlitros, aproximadamente 1 X 10^5 células/300 microlitros, aproximadamente 1,5 X 10^5 células/300 microlitros, aproximadamente 2 X 10^5 células/300 microlitros, aproximadamente 2,5 X 10^5 células/300 microlitros, aproximadamente 3 X 10^5 células/300 microlitros, y similares. Los ejemplos del límite superior incluyen aproximadamente 3 X 10^6 células/300 microlitros, aproximadamente 2,5 X 10^6 células/300 microlitros, aproximadamente 2,0 X 10^6 células/300 microlitros, aproximadamente 1,5 X 10^6 células/300 microlitros, aproximadamente 1,0 X 10^6 células/300 microlitros, y similares. Puede usarse cualquier combinación de los mismos.

El medicamento de la presente invención puede comprender además un vehículo de infusión celular. Tal vehículo de infusión celular puede proporcionarse después de mezclarse con la célula de la presente invención, o por separado. En una forma proporcionada o administrada por separado, tal disolución se proporciona como un kit o agente combinado. Cuando se usa como un kit o fármaco combinado, también puede combinarse un prospecto o similar que describa el método de uso del mismo.

Como se usa en el presente documento, “kit” se refiere a una unidad que generalmente proporciona porciones que van a proporcionarse (por ejemplo, fármaco de inspección, fármaco de diagnóstico, fármaco terapéutico, anticuerpo, etiqueta, manual y similares) en dos o más secciones separadas. Esta forma de un kit se prefiere cuando se pretende proporcionar una composición que no debe proporcionarse en un estado mixto y preferiblemente se mezcla inmediatamente antes de su uso por seguridad o similar. Tal kit comprende ventajosamente una instrucción o manual que describe cómo se proporcionan las porciones (por ejemplo, fármaco de inspección, fármaco de diagnóstico o fármaco terapéutico) o cómo debe manipularse un reactivo. Cuando el kit se usa en el presente documento como un kit de reactivos, el kit generalmente comprende una instrucción que describe cómo usar un fármaco de inspección, fármaco de diagnóstico, fármaco terapéutico, anticuerpo y similares.

Como se usa en el presente documento, “instrucción” es un documento con una explicación del método de uso de la presente invención para un médico u otros usuarios. La instrucción tiene una descripción instructiva del método de detección de la presente invención, método de uso de un agente de diagnóstico o la administración de un medicamento o similar. Además, una instrucción puede tener una descripción que indique la administración oral o la administración al esófago (por ejemplo, por inyección o similar) como sitio de administración. La instrucción se prepara de acuerdo con un formato definido por la agencia reguladora del país en el que se lleva a la práctica la presente invención (por ejemplo, Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar en Japón, Food and Drug Administration (FDA) en los EE.UU. o similares), con una descripción explícita que muestra la aprobación por parte de la agencia reguladora. La instrucción es un denominado prospecto y normalmente se proporciona en, pero no se limita a, medios de papel. Las instrucciones también pueden proporcionarse en una forma tal como medios electrónicos (por ejemplo, sitios web proporcionados en Internet o correos electrónicos).

Para el “vehículo de infusión celular” usado en el presente documento, puede usarse cualquier disolución siempre que pueda mantenerse una célula. Los vehículos de infusión celular incluyen aquellos que pueden usarse como disolución de irrigación intraocular o similar. Los ejemplos de disoluciones usadas como vehículo de infusión celular incluyen Opti-MEM, forma añadida de aditivo del mismo, Opeguard-MA, Opeguard-F y similares.

El vehículo de infusión celular usado en la presente invención puede comprender además al menos uno de albúmina, ácido ascórbico (o ascorbato) y ácido láctico (o lactato). Esto se debe a que la adición de estos componentes facilita el mantenimiento celular. Preferiblemente, todos estos componentes se añaden a un vehículo de infusión celular. Esto se debe a que se demuestra que los resultados terapéuticos de la disolución que los usa son excelentes. En una realización preferida, se usa una disolución que usa Opeguard-MA(R) y al menos uno, dos o los tres de albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico.

Basándose en el conocimiento obtenido en el presente documento, los pacientes pueden clasificarse usando una propiedad de expresión de un marcador de superficie celular o similar, citocina, miARN, metabolito o similar como indicador y preparar apropiadamente la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención de acuerdo con la condición patológica de los pacientes clasificados para proporcionar una terapia adecuada.

(Control de calidad o control de procesos de la célula producida, medio celular, vehículo de infusión celular o similar) (que no forma parte de la presente invención)

En otro aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, una técnica dirigida al control de calidad o al control de procesos de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial de la córnea producidas de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales, medio celular para estas células (disolución de cultivo), vehículo de infusión celular (suspensión) o similares. En un aspecto, se divulga un método de control de calidad o control de procesos de una célula endotelial corneal funcional humana cultivada capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana, célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional, que comprende la etapa de medir al menos un indicador celular seleccionado del grupo que consiste en: un marcador de superficie celular; un producto proteínico y un material biológico relacionado del producto; una proteína relacionada con SASP; miARN (por ejemplo, miARN secretado (soluble) o miARN intracelular); un exosoma; un metabolito celular que comprende un aminoácido y un material biológico relacionado del metabolito; tamaño celular; densidad celular y la presencia de una célula reactiva con autoanticuerpos. Cada uno de los indicadores celulares, es decir, marcadores de superficie celular; productos proteínicos y materiales biológicos relacionados de los productos; proteínas relacionadas con SASP; miARN (por ejemplo, miARN secretado (soluble) o miARN intracelular); exosomas; metabolitos celulares y materiales biológicos relacionados de los metabolitos; tamaños celulares; densidades celulares y la presencia de una célula reactiva con autoanticuerpos se explican en detalle en otra parte del presente documento. Tal técnica de control de calidad o control de procesos usando un indicador celular no se proporcionó previamente. Se reveló que las células usadas en la terapia de infusión son mezclas de subpoblaciones celulares heterogéneas y las células de interés se limitan a una porción de las mismas al proporcionar tal técnica usando indicadores celulares para revelar las propiedades en detalle. También se reveló que las células endoteliales corneales humana cultivadas están compuestas por subpoblaciones de células endoteliales corneales maduras funcionales diferenciadas, células endoteliales corneales intermediamente diferenciadas, células no previstas y similares. También se reveló que se producen anomalías de cariotipo de manera selectiva en la subpoblación, y hay autoanticuerpos que reaccionan con la subpoblación selectivamente. Se reveló que la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional no tienen tal anomalía y tienen baja expresión de antígenos asociados a degeneración celular o antígenos HLA de clase I asociados con rechazo inmunológico en relación con otra subpoblación. Dado que se revela que una célula no prevista tiene una alta producción de citocinas (SASP) asociada con la senescencia celular de modo que la cantidad de SASP en el entorno de la cámara anterior donde se infunde una célula varía mucho dependiendo del paciente, estos indicadores celulares pueden usarse para realizar el control de calidad o el control de procesos de la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención. La técnica de la presente invención es la primera en poder realizar tal control de calidad o control de procesos, los que era completamente inimaginable a partir del conocimiento convencional.

Se descubrió que el control de calidad o el control de procesos pueden realizarse evaluando la pureza de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales, la proporción de células coexistentes no previstas, las proteínas relacionadas con SASP secretadas de células infundidas o endógenas en el sitio de infusión celular, miARN, metabolitos y similares en el lado de la célula, y evaluando un factor del huésped tal como un autoanticuerpo en el lado del organismo vivo.

Además, se desarrolló un método de evaluación o control de procesos que puede identificar la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Por ejemplo, los presentes inventores descubrieron que los miARN secretados, metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) frente a metabolitos del sistema glucolítico y similares pueden utilizarse eficazmente para la identificación de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional y la célula no prevista en células de cultivo. Por lo tanto, la presente invención proporciona, por ejemplo, un método para evaluar la pureza mediante el miARN secretado o metabolito del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) frente al metabolito del sistema glucolítico, y equipo para su uso en el mismo.

También se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método de seguimiento del metabolismo que puede rastrear y evaluar el proceso de producción de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de

la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional y el equipo para su uso en el mismo.

Además, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método de control de calidad o control de procesos de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional, que comprende evaluar un área celular y una distribución de la misma.

En un aspecto específico, se usan al menos tres de los indicadores celulares de la presente invención. Usando al menos tres indicadores celulares, la calidad de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional puede evaluarse adecuadamente, y puede implementarse el control de procesos.

En un aspecto preferido, los indicadores celulares usados en el presente documento comprenden el tamaño celular, la densidad celular o una combinación de los mismos. La funcionalidad de un endotelio corneal puede evaluarse en un grado considerable evaluando el tamaño celular, la densidad celular o una combinación de los mismos.

En un aspecto específico, los indicadores celulares usados en el presente documento comprenden una combinación de: al menos uno de marcador de superficie celular, producto proteínico celular y material biológico relacionado del producto; al menos uno de miARN (miARN intracelular, miARN secretado, y similares); y al menos uno de metabolito celular y material biológico relacionado del metabolito. Esto se debe a que el uso de estos tres tipos de indicadores celulares puede excluir de manera más fiable una célula transformada, excluir una célula no prevista e identificar una célula endotelial corneal intermediamente diferenciada. Además, mediante el uso de miARN secretado, puede realizarse un control de calidad no invasivo o un control de procesos con una combinación de cada indicador con un producto de una célula (producto proteínico y metabolito).

El método de control de calidad o control de procesos comprende además identificar una subpoblación de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales mediante un indicador celular y/o una propiedad funcional corneal.

Por ejemplo, en un aspecto, es posible realizar un control de calidad o un control de procesos midiendo al menos uno de los indicadores celulares (por ejemplo, marcador de superficie celular) de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional. Para indicadores celulares tales como marcadores de superficie celular, se entiende que cualquier realización comentada en detalle en el presente documento (células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano) o similar puede usarse sola o en combinación.

En un aspecto de la técnica de control de calidad o de control de procesos de la presente invención, una propiedad funcional corneal comprende la expresión de un antígeno de superficie celular que comprende CD166 positivo y CD133 negativo en una superficie celular. Preferiblemente, la propiedad puede caracterizarse por el antígeno de superficie celular que comprende CD166 positivo, CD133 negativo y CD44 negativo a intermediamente positivo, o CD166 positivo, CD133 negativo y CD44 negativo a CD44 débilmente positivo. Además, la propiedad puede caracterizarse por el antígeno de superficie celular que comprende CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo y CD90 negativo. Alternativamente, en otra realización, la propiedad se caracteriza por el antígeno de superficie celular que comprende CD166 positivo, CD133 negativo y CD200 negativo.

En un aspecto específico, el control de calidad o el control de procesos pueden realizarse seleccionando una pluralidad de indicadores de cada uno de producto proteínico y material biológico relacionado del producto, miARN secretado, y metabolito celular que comprende un aminoácido y material biológico relacionado del metabolito para examinar una variación en un perfil de cada indicador para determinar la homogeneidad de las células que tienen un indicador celular que comprende CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo y CD90 negativo a débilmente positivo.

En un aspecto, el producto proteínico celular y material biológico relacionado del producto usado en la presente invención incluye, pero no se limita a, aquellos con (A) expresión elevada en una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional y (B) expresión disminuida en una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional.

En un aspecto, cualquier marcador de miARN descrito en el presente documento en la sección de (Células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano) o similar puede usarse como marcadores de miARN usados en la invención preestablecida.

En un aspecto, el exosoma usado en el presente documento puede tener (A) un indicador celular con expresión disminuida en una célula funcional, y más específicamente, comprende al menos un indicador seleccionado del grupo que consiste en CD63, CD9, CD81, HSP70 y similares.

En un aspecto, cualquier metabolito celular y material biológico relacionado del metabolito descrito en el presente

documento en la sección de (Células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano) o similar puede usarse como metabolito celular y material biológico relacionado del metabolito usado en la presente invención.

En otro aspecto, el tamaño celular usado en el presente documento tiene un área celular media de aproximadamente 250 microm^2 o menos, aproximadamente 240 microm^2 o menos, aproximadamente 230 microm^2 o menos, aproximadamente 220 microm^2 o menos, aproximadamente 210 microm^2 o menos, o aproximadamente 200 microm^2 o menos. Alternativamente, el área celular media puede ser de aproximadamente 300 microm^2 o menos, aproximadamente 290 microm^2 o menos, aproximadamente 280 microm^2 o menos, aproximadamente 270 microm^2 o menos, o aproximadamente 260 microm^2 o menos. La célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención logró una disminución de tamaño al mismo nivel que una célula relativamente pequeña con funcionalidad. Además, se reveló que una célula es funcional al lograr el tamaño definido en la presente invención y el tamaño se correlaciona con la calidad. Por lo tanto, la calidad de la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención puede controlarse determinando si el tamaño es como se define en la presente invención.

En un aspecto adicional, la densidad celular media en el cultivo celular saturado de la población celular utilizada en la presente invención es de al menos aproximadamente 2000 células/mm^2 o más. Puede determinarse si la población celular de la presente invención puede usarse en terapia observando que la densidad celular media en cultivo celular saturado es de al menos aproximadamente 1500 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 1600 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 1700 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 1800 células/mm^2 o más, al menos aproximadamente 1900 células/mm^2 o más, o al menos aproximadamente 2000 células/mm^2 o más. Alternativamente, la densidad celular media en el cultivo celular saturado de la población celular es de al menos 2100 células/mm^2 o más, al menos 2200 células/mm^2 o más, al menos 2300 células/mm^2 o más, al menos 2400 células/mm^2 o más, o al menos 2500 células/mm^2 o más, pero no se limita a los mismos. El límite superior puede ser cualquier valor materializable, pero los ejemplos de límite superior materializable incluyen aproximadamente 3000 células/mm^2 o más, aproximadamente 3100 células/mm^2, aproximadamente 3200 células/mm^2, aproximadamente 3300 células/mm^2, aproximadamente 3400 células/mm^2, aproximadamente 3500 células/mm^2, aproximadamente 3600 células/mm^2, aproximadamente 3700 células/mm^2, aproximadamente 3800 células/mm^2, aproximadamente 3900 células/mm^2, aproximadamente 4000 células/mm^2 y similares. Se entiende que cualquier combinación de tal límite superior y límite inferior se usa como intervalo preferido de densidad celular en cultivo celular saturado de la población celular de la presente invención.

Por ejemplo, el control de procesos puede realizarse cuantificando el producto proteínico (por ejemplo, citocinas o similares) en cultivo en cualquier punto durante el subcultivo por ELISA. La morfología de una célula puede inspeccionarse al mismo tiempo. Además, algunas de las células pueden extraerse en un momento determinado antes de la infusión (por ejemplo, 1 día antes, 1 semana antes, 2 semanas antes, 3 semanas antes, o similares, cualquier punto entre inmediatamente antes y tres semanas antes de la infusión o similar, o antes de tres semanas o más o similares) para inspeccionar si los rasgos de la superficie celular cumplen el estándar de especificación mediante FACS. Alternativamente, esto puede realizarse durante el subcultivo. Es común que no se reconozca una diferencia a un nivel que diverja del valor de especificación entre múltiples matraces en el intervalo del mismo lote. Por lo tanto, es suficiente que el análisis FACS se realice para cualquier matraz o placa de escala reducida cuando hay múltiples placas.

Alternativamente, puede realizarse adicionalmente o por separado una prueba de especificación de calidad (prueba de confirmación de función celular). Por ejemplo, puede realizarse una prueba de inmunotinción (Na^+/K^+ ATPasa, ZO-1) como una prueba de especificación de calidad (prueba de confirmación de función celular). Por ejemplo, pueden usarse células sembradas a la misma densidad celular y cultivadas en placas (el ejemplo de las mismas incluye placas de 24 pocillos) para dicha prueba de inmunotinción. Pueden incorporarse células endoteliales corneales humanas obtenidas mediante cultivo a otra escala en un método de evaluación cuando se evalúa una célula en suspensión para infusión en seres humanos.

En un aspecto a modo de ejemplo de la presente invención, el control de calidad o el control de procesos pueden realizarse de la siguiente manera. Es decir, se espera que la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional se inyecte como una suspensión celular en la cámara anterior de un ojo humano. Las células de cultivo varían no solo en formas (tamaño, morfología, o similares), sino también en términos de todos los aspectos, tales como una amplia gama de rasgos celulares (adhesividad, capacidad de producción de producto soluble, rasgo de superficie celular, expresión de molécula funcional intracelular). Mientras tanto, una célula de cultivo primario de cepa no celular presenta diversas transformaciones (transición epitelial-mesenquimatosa, senescencia celular y similares) y diversas plasticidades normales dependiendo del cultivo. A diferencia de los compuestos de molécula pequeña, un medicamento celular requiere muchos intentos a priori para determinar la especificación de calidad. Por lo tanto, el método de control de calidad o control de procesos de la presente invención es importante. Un ejemplo típico de un método de fabricación de la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional objetivo de la presente invención incluye un método que comprende añadir, por ejemplo, Y-27632 10 microM (inhibidor de ROCK) para inducir la diferenciación en una célula diferenciada madura, añadir, por ejemplo, 10 microM de SB203580 para

suprimir la transición de estado celular durante el período de cultivo, continuar el cultivo intercambiando el medio durante varias semanas después de que las células de cultivo alcancen la saturación celular (confluencia) en términos de densidad celular para la maduración y diferenciación de células, y similares. En este momento, se divulga un método que usa múltiples tipos (por ejemplo, 9 tipos) de rasgos de superficie celular para definir objetiva y reproduciblemente la pureza de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales. Como método de control de procesos, esto puede lograrse seleccionando parte del recipiente de cultivo en el proceso de cultivo y usando la disolución de cultivo en el momento del intercambio de la disolución de cultivo para establecer el elemento de control/especificación de procesos y determinar un valor estándar. La evaluación de calidad o el control de procesos pueden realizarse para determinar la densidad celular del cultivo en cada pase, tamaño celular y distribución de tamaño definiendo un valor de especificación. La presente invención proporciona un estándar para el metabolito celular y miARN que puede estimar la contaminación de una célula no prevista como método de ensayo de control/especificación de procesos no invasivo. Por lo tanto, la evaluación de la calidad o el control de procesos pueden lograrse en cada situación usando los diversos valores estándar.

En otro aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para detectar una célula no funcional endotelial de la córnea (célula no prevista) que coexiste con una célula endotelial corneal humana cultivada que comprende una etapa de medir al menos un indicador celular seleccionado del grupo que consiste en tamaño celular, densidad celular y la presencia de una célula reactiva con autoanticuerpos.

En otro aspecto más, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea para la célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal de la invención o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional, que comprende un reactivo o medios para medir el indicador celular de la presente invención.

Los medios de medición pueden ser cualquier cosa que pueda medir un indicador celular.

El “agente” usado en el presente documento como agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea o similares puede ser cualquier sustancia u otro elemento (por ejemplo, energía, radiación, calor, electricidad y otras formas de energía) siempre que pueda lograrse el objetivo previsto. Los ejemplos de tal sustancia incluyen, pero no se limitan a, proteína, polipéptido, oligopéptido, péptido, polinucleótido, oligonucleótido, nucleótido, ácido nucleico (incluyendo, por ejemplo, ADN tales como ADNc y ADN genómico y ARN tales como ARNm), polisacárido, oligosacárido, lípido, molécula pequeña orgánica (por ejemplo, hormona, ligando, sustancia transmisora de información, molécula pequeña orgánica, molécula sintetizada por química combinatoria, molécula pequeña que puede usarse como medicamento (por ejemplo, ligando de molécula pequeña y similares)) y una molécula compleja del mismo. Los ejemplos típicos de un agente específico para un polinucleótido incluyen, pero no se limitan a, un polinucleótido que tiene complementariedad con una determinada homología de secuencia (por ejemplo, el 70 % o más de identidad de secuencia) con una secuencia del polinucleótido, polipéptido tal como un factor de transcripción que se une a una región promotora y similares. Los ejemplos típicos de un agente específico para un polipéptido incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo dirigido específicamente al polipéptido o un derivado o análogo del mismo (por ejemplo, anticuerpo monocatenario), un ligando o receptor específico cuando el polipéptido es un receptor o ligando, un sustrato cuando el polipéptido es una enzima y similares.

Para marcadores de superficie celular (por ejemplo, marcador de CD), incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos. Para miARN, incluyen, pero no se limitan a, sondas con una secuencia complementaria. Tales medios de medición están preferiblemente marcados.

Para productos proteínicos celulares y materiales biológicos relacionados del producto, proteínas SASP, exosomas, metabolitos celulares y materiales biológicos relacionados del metabolito y similares, los medios incluyen un kit de medición que utiliza una reacción enzimática.

En un aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método de propagación selectiva en cultivos de una célula endotelial corneal funcional humana, que comprende las etapas de: A) proporcionar una muestra que posiblemente comprende una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional); B) determinar si la muestra comprende la célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) usando el agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea de la presente invención, en donde se determina que la muestra comprende la célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano cuando un resultado de la evaluación con el agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea indica que la célula es una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunde en una

cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional); y C) propagar selectivamente en cultivos una célula que se determina que es una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional).

En otro aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para someter a ensayo la calidad de una célula endotelial corneal funcional humana, que comprende las etapas de:

A) obtener información relacionada con un indicador celular de la célula endotelial corneal funcional de células proporcionadas como células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) usando el agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea de la presente invención; y

B) determinar que las células proporcionadas son células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) basándose en la información.

En otro aspecto más, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para evaluar la calidad en la preparación de una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional), que comprende las etapas de: A) obtener información relacionada con un indicador celular de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) de células obtenidas en la preparación usando el agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea de la presente invención; y B) determinar que la preparación es adecuada para la preparación de una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) basándose en la información.

Además, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para someter a ensayo la pureza de una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional), que comprende las etapas de: A) proporcionar una muestra que posiblemente comprende la célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional); B) obtener información relacionada con un indicador celular de una célula endotelial corneal funcional de las células usando el agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea de la presente invención; y C) calcular la pureza de la célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) en la muestra basándose en la información.

La presente invención proporciona un método para someter a ensayo la calidad de un medio para una célula endotelial corneal funcional humana, que comprende las etapas de: A) cultivar células proporcionadas como células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) para obtener información relacionada con un indicador celular de la célula endotelial corneal funcional de las células usando el agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea; y B) determinar que el medio es adecuado para la fabricación de la célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) basándose en la información.

También se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para someter a ensayo la calidad de un vehículo de infusión celular para una célula endotelial corneal funcional humana, que comprende las etapas de: A) cultivar células proporcionadas como células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional de la córnea humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional) para obtener información relacionada con un indicador celular de la célula endotelial corneal funcional de las células usando el agente de evaluación de la calidad, agente de control de procesos o agente de detección de células no funcionales endoteliales de la córnea de la presente invención; y B) determinar que el vehículo de infusión celular es adecuado para la terapia de infusión celular basándose en la información.

Como se usa en el presente documento, “muestra que posiblemente comprende una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano (o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional)” se refiere a cualquier muestra obtenida por el método de fabricación de células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano (o células

endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales) de la presente invención u otro método. Cualquier muestra se encuentra dentro de dicha muestra siempre que la muestra comprenda posiblemente una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano.

En otro aspecto, también se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método de control de calidad o control de procesos de una célula endotelial corneal funcional humana cultivada capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano o la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional comprende la etapa de examinar uno o una pluralidad de los siguientes: (1) prueba de pureza por ELISA de sobrenadante de cultivo, TIMP-1: 500 ng/ml o menos, IL-8: 500 pg/ml o menos, PDGF-BB: 30 pg/ml o más, MCP-1: 3000 pg/ml o menos, (2) prueba de pureza por FACS celular, CD166 = 95 % o más, CD133 = 5 % o menos, CD105 negativo-bajo positivo = 95 % o más, CD44 negativo-bajo positivo = 70 % o más, CD44 medio-alto positivo = 15 % o menos, CD24 = 10 % o menos, CD26 positivo = 5 % o menos, CD200 = 5 % o menos, (3) función de barrera (ZO-1) positiva, (4) función de bombeo (Na^+/K^+ ATPasa) positiva, (5) tasa de supervivencia celular, 70 % o más con tinción de azul de tripano, (6) forma celular, la célula transformada no puede encontrarse mediante inspección visual (7) Claudina10 positiva, (8) célula efectora (razón E) > 50 % (9) célula no prevista, célula no prevista A (célula CD44 fuertemente positiva) < 15 %, célula B no prevista (célula positiva para CD26) < 5 %, célula C no deseada (célula positiva para CD24) < 10 %, y (10) anomalía de cariotipo negativa.

De hecho, también pueden someterse a prueba otros elementos tales como los siguientes: prueba aséptica (por ejemplo, no se observa crecimiento bacteriano por el método Bacterialert), micoplasma (por ejemplo, negativo por PCR), endotoxina (por ejemplo, menos de 2,3 pg/ml (menos de 0,017 UE/ml o similar) por el método de análisis de tiempo nefelométrico), virus (por ejemplo, negativo por PCR) y BSA residual (por ejemplo, 125 ng/ml o menos para la disolución lavada final mediante ELISA).

Estos elementos implican verificar o evaluar uno o más elementos mediante el método de propagación selectiva en cultivos de una célula endotelial corneal funcional humana, método para someter a ensayo la calidad de una célula endotelial corneal funcional humana, método para evaluar la calidad en la preparación de una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano, método para analizar la pureza de una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano, método para someter a ensayo la calidad de un medio para una célula endotelial corneal funcional humana, o método para someter a ensayo la calidad de un vehículo de infusión celular para una célula endotelial corneal funcional humana, que puede implementarse de tres semanas a inmediatamente antes de (por ejemplo, 7 días antes de) la terapia de inyección celular o durante el subcultivo o cultivo de conservación con solo intercambio de medio.

La verificación puede llevarse a cabo de tres semanas a inmediatamente antes de, o preferiblemente 7 días antes de a inmediatamente antes de la terapia de infusión celular o durante el cultivo conservado solo intercambiando un medio. Durante el subcultivo se refiere a, pero no se limita a, antes, en el medio de, y después del subcultivo y un período de aproximadamente 1-7 días o menos desde el mismo. La célula de la presente invención, después de la fabricación, solo puede conservarse intercambiando el medio. Durante el cultivo conservado solo intercambiando un medio se refiere a un tiempo, o el período alrededor de dicho tiempo, de intercambio de un medio a continuación. Alrededor puede ser un período de aproximadamente 1-7 días o menos desde el mismo.

En otro aspecto, el método de control de calidad o control de procesos de una célula endotelial corneal funcional humana cultivada capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional comprende la etapa de determinar una o una pluralidad de las siguientes características con respecto a una célula diana: (1) retención de funciones de bombeo/barrera endotelial; (2) adhesión/unión a una laminina específica; (3) perfil de citocinas secretadas; (4) perfil de metabolitos producidos; (5) densidad celular saturada tras cultivo *in vitro*; (6) tamaño espacial y distribución de células obtenidas en cultivo; y (8) retención celular en caso de infusión celular después del daño por congelación por criotratamiento con nitrógeno líquido en una córnea de ratón.

En un aspecto, la determinación de (1) la retención de las funciones de bombeo/barrera endotelial se determina mediante el uso de un método de medición de la función de bombeo o un método de medición de la función de barrera comúnmente usado para el tejido endotelial de la córnea.

En un aspecto, la determinación de (2) la retención de las funciones de bombeo/barrera endotelial se determina mediante el uso de un método de medición de la función de bombeo o un método de medición de la función de barrera comúnmente usado para el tejido endotelial de la córnea.

En un aspecto, la determinación de (3) la adhesión/unión a una laminina específica se determina por la adhesividad a laminina 511 (compuesta por cadena alfa5, cadena beta1 y cadena gamma1), laminina 521 (compuesta por cadena alfa5, cadena beta2 y cadena gamma1), o un fragmento funcional de la misma y/o el aumento en la expresión de integrina con respecto a la misma como indicador.

En un aspecto, la determinación del (4) perfil de citocinas secretadas comprende medir un nivel de producción de un perfil de citocinas de suero o humor acuoso.

En un aspecto, la determinación del (5) perfil de metabolitos producidos comprende medir un nivel de producción de metabolitos de la célula.

En un aspecto, la determinación del (6) perfil de microARN producido (miARN) comprende obtener ARN total para obtener un perfil de expresión de microARN.

En un aspecto, la determinación de (7) la densidad celular saturada tras el cultivo *in vitro* comprende contar las células en una imagen de las células obtenida usando un sistema de captura de imágenes.

En un aspecto, la determinación de (8) la retención de células en caso de infusión celular después del daño por congelación por criotratamiento con nitrógeno líquido en la córnea de ratón comprende: infundir una célula que va a determinarse en una cámara anterior de un ojo humano de un modelo hecho por pretratamiento de una región central de una córnea de ratón por daño por congelación para eliminar una célula endotelial; observar clínicamente las características de una córnea; evaluar el grosor de la córnea con un paquímetro; someter a prueba histopatológicamente la adhesión de HCEC con tinción nuclear humana; y examinar si la célula tiene una función.

Por ejemplo, la información relacionada con los indicadores celulares puede almacenarse o emitirse en un estado legible por ordenador. Los datos en tal estado pueden usarse para determinar una célula proporcionada adicionalmente como una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional adecuada para la terapia de infusión celular, propagar selectivamente en cultivos una célula determinada como una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional, determinar que la preparación es adecuada para la preparación de una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional adecuada para la terapia de infusión celular, y calcular la pureza de las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales en una muestra.

En un aspecto a modo de ejemplo, la prueba de calidad, la prueba de pureza, el examen de la función y similares para una célula infundida pueden realizarse como se describe a continuación.

(Prueba de calidad, prueba de pureza, examen de función para la célula para infusión, que no forma parte de la presente invención)

Una célula endotelial corneal cultivada se sometió a la siguiente prueba de control de calidad o control de procesos (Control de calidad: QC). Un producto que tiene suficiente calidad y cumple con la especificación de suministro se usa como célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal o célula endotelial corneal diferenciada madura funcional.

1) Prueba de control de procesos

*Inspección visual (cada matraz)

TIMP-1, IL-8, PDGF-betabeta, MCP-1 en el medio (cada matraz)

*Recuento de células vivas/tasa de supervivencia

2) Ejemplo de especificación de entrega del producto final y método de prueba

[Tabla 1F]

Elemento de prueba	Método	Estándar
Morfología celular	Inspección visual	No se encuentra ninguna célula transformada
Tasa de supervivencia celular	Tinción con azul de tripano	Las células supervivientes son el 70 % o más
Función de barrera	Inmunotinción (ZO-1)	Positivo
Bombeo	Inmunotinción (Na^+/K^+ ATPasa)	Positivo
BSA residual	ELISA de disolución lavada final	125 ng/ml o menos
Ensayo de pureza	ELISA en sobrenadante de cultivo IL-8 TIMP1 PDGFbb MCP-1	 500 ng/ml o menos 500 pg/ml o menos 30 pg/ml o más 3000 pg/ml o menos
Ensayo de pureza	FACS en células	

	CD166 CD133 CD105 bajo CD44 bajo CD44 alto CD24 CD26+ CD200	100 % 0 % 100 % 70 % o más 5% o menos 5% o menos 5% o menos 0 %
Prueba aséptica	Prueba de Bacterialert	No se observa crecimiento de bacterias
Micoplasma	PCR	Negativo
Endotoxina	Método de análisis de tiempo nefelométrico	Menos de 2,3 pg/ml, (menos de 0,017 UE/ml)
Virus	PCR	Negativo

La entrega se realizó de acuerdo con el procedimiento estipulado en la instrucción/registro de juicio de entrega.

(Técnicas generales)

El enfoque de biología molecular, el enfoque bioquímico y el enfoque microbiológico usados en el presente documento son enfoques bien conocidos y convencionales en la técnica que se describen en, por ejemplo, Sambrook J. *et al.* (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor y su 3ª ed.(2001); Ausubel, F.M. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience; Ausubel, F.M.(1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience; Innis, M.A.(1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F.M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F.M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M.A. *et al.* (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F.M.(1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, y actualizaciones anuales; Sninsky, J.J. *et al.* (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press, Bessatsu Jikken Igaku [Experimental Medicine, volumen complementario], Idenshi Donyu Oyobi Hatsugen Kaiseki Jikken Ho [Experimental Methods for Transgenesis & Expression Analysis], Yodosha, 1997, Ekusosomu Kaiseki Masuta Lessun [Exosome analysis master lesson], (Jikken Igaku Bessatsu Yodosha) [Experimental Medicine, volumen complementario, Yodosha], Riaru Taimu PCR Kanzen Jikken Gaido [Real time PCR complete experimental guide] (Jikken Igaku Bessatsu Yodosha) [Experimental Medicine, volumen complementario, Yodosha], Idenshi donyu Purotokoru [Transgenesis protocol] (Jikken Igaku Bessatsu Yodosha) [Experimental Medicine, volumen complementario, Yodosha], RNAi JiIkken Naruhodo Q&A [RNAi I understand Q&A] (Yodosha) y similares.

Las técnicas de ADN y la química de ácidos nucleicos se describen en, por ejemplo, Gait, M.J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M.J.(1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R.L. *et al.* (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman&Hall; Shabarova, Z. *et al.* (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G.M. *et al.* (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G.T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press, y similares.

Como se usa en el presente documento, “o” se usa cuando puede emplearse “al menos uno o más” de los asuntos enumerados en la frase. Cuando se describe explícitamente en el presente documento como “dentro del intervalo de dos valores”, el intervalo también incluye los dos valores en sí mismos.

Como se describió anteriormente, la presente invención se ha descrito mientras se muestran realizaciones preferidas para facilitar la comprensión. La presente invención se describe a continuación en el presente documento basándose en los ejemplos. La descripción mencionada anteriormente y los siguientes ejemplos no se proporcionan para limitar la presente invención, sino con el único propósito de ejemplificar. Por lo tanto, el alcance de la presente invención no se limita a las realizaciones y ejemplos específicamente descritos en el presente documento y está limitado solo por el alcance de las reivindicaciones.

Si bien la presente invención se explica adicionalmente a continuación en el presente documento con ejemplos, la presente invención no se limita a los mismos, sino que se define por las reivindicaciones. Todos los experimentos relacionados con seres humanos se realizaron de conformidad con la Declaración de Helsinki, y otras regulaciones gubernamentales y universitarias. Los animales se criaron y manipularon de acuerdo con la declaración ARVO (la Declaración ARVO para el Uso de Animales en Investigación Oftálmica y de la Visión) para el uso de animales en investigación de la visión y oftálmica. Para reactivos, se usaron los productos específicos descritos en los ejemplos. Sin embargo, los reactivos pueden sustituirse por un producto equivalente de otro fabricante (Sigma, Wako Pure Chemical, Nacalai Tesque, Abcam, Santa Cruz Biotechnology, R & D Systems, Abnova, AssayPro, Origene, Biobyt,

Biorad, Cell Signaling Technology, GE Healthcare, IBL, o similares).

(Abreviaturas)

Las siguientes abreviaturas se usan apropiadamente.

SP: Subpoblación

cHCEC: Célula endotelial corneal humana cultivada

CST: transición de estado celular

EMT: transición epitelial-mesenquimatosa

Razón E: número obtenido dividiendo el número total de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales y células progenitoras funcionales endoteliales corneales diferenciadas maduras entre todas las células (razón de células de interés)

ECM: matriz extracelular

CSC: célula madre cancerosa

ECD: densidad de células endoteliales corneales

ug y ul representan microg y microlitros, respectivamente.

(Ejemplo 1: Homogeneidad celular indispensable para la terapia de infusión celular para células endoteliales corneales humanas cultivadas)

El objetivo de este ejemplo fue identificar una subpoblación (SP), adecuada para la terapia de infusión celular y desprovista de transición de estado celular (CST) entre células endoteliales corneales humanas cultivadas heterogéneas (cHCEC). Esto se debe a que las cHCEC, que se espera que sirvan como una alternativa a las córneas de donantes para el tratamiento de la disfunción endotelial de la córnea, tienen una inclinación hacia la transición de estado celular (CST) a un fenotipo senescente, dificultando de ese modo la aplicación en entornos clínicos.

La presencia de subpoblaciones en cHCEC se confirmó basándose en la expresión de marcadores de CD de superficie por citometría de flujo. Los marcadores de CD eficaces para distinguir subpoblaciones distintas se seleccionaron mediante análisis basado en cHCEC establecidas con área celular media pequeña y la alta densidad celular en cultivos. Las características de contraste entre tres subpoblaciones de cHCEC típicas también se confirmaron mediante una matriz de PCR para la matriz extracelular (ECM). El análisis combinado de marcadores de CD identificó claramente la subpoblación (células efectoras) adaptable para la terapia de infusión celular entre diversas subpoblaciones. Se compararon la expresión de ZO-1 y Na^+/K^+ ATPasa, CD200 y HLA entre subpoblaciones heterogéneas. Este experimento se resume a continuación.

(Materiales y métodos)

Donantes de células endoteliales corneales humanas

El tejido humano usado se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron HCEC de 20 córneas de cadáveres humanos y se cultivaron antes de realizar el análisis de cariotipo. Las córneas de donantes humanos se obtuvieron de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron según los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido.

Las edades de los donantes variaron de 2 a 75 años (promedio 43,7 +/- 26,4). Los donantes incluyeron 9 hombres y 11 mujeres. Todas las córneas de donantes se conservaron en Optisol GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron por avión con fines de investigación. De acuerdo con la información de los donantes, todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal y ningún donante tenía antecedentes pasados de anomalía cromosómica.

Cultivos de HCEC

A menos que se indique específicamente lo contrario, las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones. Brevemente, las membranas de Descemet con las células endoteliales corneales se extrajeron de las córneas de los donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied

Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de una única córnea de donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, el medio basal se preparó con OptiMEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. El medio acondicionado se preparó como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8(7), e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

Microscopía de contraste de fase

Se tomaron imágenes de microscopio de contraste de fase mediante un sistema de microscopio invertido (CKX41, Olympus, Tokio, Japón). Para el análisis de distribución del área celular, las cHCEC se lavaron con PBS (-) tres veces y las imágenes de contraste de fase se adquirieron mediante un sistema de microscopio BZ X-700 (Keyence, Osaka, Japón). Las distribuciones del área celular se cuantificaron mediante el software de recuento de células híbridas BZ-H3C (Keyence).

Tinción inmunofluorescente

Las HCEC se cultivaron a una densidad de 1 X 10^5 células /pocillo en una placa de cultivo celular de 24 pocillos recubierta con mezcla de recubrimiento de FNC y se mantuvieron durante de 3 a 4 semanas para el análisis de inmunofluorescencia. Las células se fijaron en un 95 % de etanol suplementado con un 5 % de ácido acético durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante 30 minutos con BSA al 1 %. Las muestras se incubaron durante la noche a 4 grados C con anticuerpos contra CD73 (1:300; BD Pharmingen Stain Buffer), CD166 (1:300; BD Pharmingen Stain Buffer), ZO1 (1:300; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, EE.UU.) y Na^+/K^+-ATPasa (1:300; Upstate Biotec, Lake Placid, NY, EE.UU.). Después de lavar con PBS, se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies) o anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (Life Technologies) como anticuerpo secundario a una dilución 1:1000. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Las células, cultivadas en una placa de cultivo celular de 48 pocillos, se examinaron directamente mediante microscopía de fluorescencia (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japón).

Tinción fluorescente de IgG e IgM

En primer lugar, las HCEC se fijaron con metanol. Las células se lavaron dos veces con PBS, se permeabilizaron con PBS-Tx-100 al 0,2 % durante 15 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con PBS de BSA al 1% durante 1 hora o más a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 250 microlitros de suero de un individuo sano diluido 5 o 25 veces con PBS de BSA al 1% a los pocillos y se incubaron durante la noche a 4 grados C. A continuación, las células se lavaron cuatro veces con PBS-Tx-100 al 0,2 %. Se añadió (250 ul/pocillo) PBS de BSA al 1 % que comprendía anticuerpo anti-IgG humana marcado con Alexa Fluor 488 (5 ug/ml) y anticuerpo anti-IgM humana marcado con Alexa Fluor 647 (5 ug/ml). Las células se incubaron después durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS-Tx-100 al 0,2 % y se lavaron una vez con PBS. Después de teñir los núcleos con DAPI (5 ug/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente y lavar con PBS, se examinaron los núcleos con un microscopio de fluorescencia invertido (BZ-9000).

Cribado mediante BD Lyoplate

Se realizó el cribado de marcadores de superficie evaluando la expresión de los marcadores a través del panel de cribado de marcadores de superficie celular humana (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, las HCEC cultivadas se incubaron con 242 anticuerpos primarios e IgG de isotipo (BD Biosciences) a la dilución indicada por el protocolo del fabricante durante 30 minutos a 4 grados C. Las células se lavaron con PBS que contenía BSA al 1% y EDTA 5 mM y luego se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor 647 (dilución 1:200, BD Biosciences) durante 30 minutos a 4 grados C. Las células se lavaron nuevamente con PBS que contenía BSA al 1% y EDTA 5 mM y se analizaron por citometría de flujo usando un instrumento BD FACSCant II (BD Biosciences) y software CellQuest Pro (BD Biosciences).

Análisis de citometría de flujo de HCEC cultivadas

Las HCEC se recogieron de la placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Las disoluciones de anticuerpos comprendían lo siguiente: mAb anti-CD26 humano conjugado con FITC, mAb anti-CD166 humano conjugado con PE, mAb anti-CD24 humano conjugado con PerCP-Cy5.5, anti-CD44 humano

conjugado con PE-Cy7 (todos de BD Biosciences) y anti-CD105 humano conjugado con APC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Clasificación celular

Para experimentos de clasificación celular, las HCEC se recogieron y se tiñeron con mAb anti-CD24 humano conjugado con FITC y mAb anti-CD44 humano conjugado con PE-Cy7 (BD Biosciences) como se describió anteriormente. Después de lavar con tampón FACS, las células se resuspendieron en tampón FACS. Las células CD24-negativo/CD44-positivo y CD24-negativo/CD44-positivo se clasificaron usando un clasificador de células BD FACSJazz (BD Biosciences) y se sembraron a una densidad de 4,2 X 10^4 células en una placa de cultivo celular de 24 pocillos para su posterior análisis. Cada secuencia usada era una secuencia que acompañaba a estos productos.

Examen del antígeno de superficie relacionado con la inmunidad

Se usaron anticuerpo anti-HLAI conjugado con Alexa647 (Santa Cruz [n.° SC-32235 AF647]), anticuerpo pan anti-HLAII conjugado con FITC (BD Biosciences [n.° 550853]) y anticuerpo anti-PDL1 conjugado con PE-Cy7 (BD Biosciences [n.° 558017]) para el marcaje fluorescente de HLA-I, HLA-II y PDL1.

Matriz de PCR

Se extrajo ARN total de las HCEC cultivadas utilizando el kit miRNeasy Mini (QIAGEN Strasse1 40724 Hilden Alemania). La síntesis de ADNc se realizó con 100 ng de ARN total para el formato de placa de 96 pocillos usando el kit RT^2 First Strand (Qiagen). La expresión de ARNm endoteliales se investigó usando la matriz extracelular humana de matriz de PCR y matriz de adhesión (Qiagen) de RT^2 Profiler según el protocolo recomendado por el fabricante, y se analizó usando la herramienta de análisis de datos de matriz de PCR de RT^2 Profiler versión 3.5.

Medición de autoanticuerpo

Los autoanticuerpos se midieron de acuerdo con el siguiente protocolo.

* Las HCEC se fijaron con metanol.

* Se lavaron dos veces con PBS

* Se permeabilizaron con PBS-Tx-100 al 0,2 % (temperatura ambiente, 15 minutos)

* Se bloquearon con BSA al 1 %/PBS (1 hora o más a temperatura ambiente)

* Se añadieron 250 microlitros de suero de un individuo sano diluido 5 o 25 veces con BSA al 1 %/PBS a los pocillos

* 4 grados C, incubación durante la noche

* Se lavaron 4 veces con PBS-Tx-100 al 0,2 %

*Se añadió BSA al 1 %/PBS que comprendía anti-IgG humana marcado con Alexa Fluor 488 (5 microg/ml) y anti-IgM humana marcado con Alexa Fluor 647 (5 microg/ml) (250 microlitros/pocillo)

* Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente

* Se lavaron dos veces con PBS-Tx-100 al 0,2 %

* Se lavaron una vez con PBS

* Los núcleos se tiñeron con DAPI (5 microg/ml) (temperatura ambiente, 15 minutos).

* Se lavaron una vez con PBS

* Se examinaron con microscopio de fluorescencia invertido (BZ-9000)

Análisis estadístico

La significación estadística (valor P) de los valores medios para las comparaciones de 2 muestras se determinó mediante la prueba t de Student. La significación estadística para la comparación de múltiples conjuntos de muestras se determinó con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los valores en los gráficos representan la media +/- error estándar.

(Resultados)

Variaciones fenotípicas entre cultivos

Se cultivaron cHCEC de donantes de 5 años de edad, un donante joven y dos recién nacidos de acuerdo con el método de Okumura *et al.* (Okumura N, *et al.*, Invest Ophthal Vis Sci. 2014; 55:7610-8.), y se caracterizaron las expresiones de superficie de CD44, CD166, CD24 y CD105 (tabla 1Ga). Los otros conjuntos de análisis de cHCEC de otros donantes para CD44, CD166, CD105 y LGR5, en lugar de CD24, se resumieron en la tabla 1Gb.

Tabla 1G

a

	Donante anciano n.° 1 P1	Donante anciano n.° 2 P1	Donante anciano n.° 3 P1	Donante anciano n.° 4 P2	Donante anciano n.° 5 P3	Donante joven n.° 1 P0	Donante recién nacido n.° 1 P0	Donante recién nacido n.° 2 P0
CD166$^-$/X$^-$/CD44$^-$/Y$^-$	0%	0%	0,8%	0%	0%	0,2%	0%	0,1%
CD166$^-$/X$^-$/CD44$^+$/Y$^-$	0%	0%	1,6%	0%	0%	0,1%	0%	0,1%
CD166$^-$/X$^-$/CD44$^-$/Y$^+$	0%	0,1%	0%	0%	0%	0%	0,1%	0%
CD166$^-$/X$^-$/CD44$^+$/Y$^+$	0%	0,2%	4,5%	0%	0,2%	0%	0,1%	0%
CD166$^-$/X$^+$/CD44$^-$/Y$^-$	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/X$^+$/CD44$^+$/Y$^-$	0%	0%	0,1%	0%	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/X$^+$/CD44$^-$/Y$^+$	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/X$^+$/CD44$^+$/Y$^+$	0%	0,2%	0,2%	0%	0%	0%	0%	0,1%
CD166$^+$/X$^-$/CD44$^-$/Y$^-$	0%	1,3%	4,1%	4,4%	0%	1,3%	0,3%	0%
CD166$^+$/X$^-$/CD44$^+$/Y$^-$	0,4%	0,1%	19,7%	7,8%	4,1%	0,8%	1,6%	0,1%
CD166$^+$/X$^-$/CD44$^-$/Y$^+$	0,1%	17,8%	0,3%	1,4%	0%	16,5%	1,7%	0%
CD166$^+$/X$^-$/CD44$^+$/Y$^+$	29,8%	19,8%	63,6%	83,1%	95,1%	77,0%	82,9%	47,1%
CD166$^+$/X$^+$/CD44$^-$/Y$^-$	0%	0%	0,1%	0%	0%	0%	0,1%	0%
CD166$^+$/X$^+$/CD44$^+$/Y$^-$	0%	0,1%	1,6%	0%	0%	0,1%	0,9%	0,6%
CD166$^+$/X$^+$/CD44$^-$/Y$^+$	0%	4,1%	0%	0,1%	0%	0,2%	0,1%	0%
CD166$^+$/X$^+$/CD44$^+$/Y$^+$	69,5%	56,5%	3,5%	3%	0,6%	3,8%	12,0%	51,9%

b

	Donante anciano n.° 1 P1	Donante joven n.° 1 P0	Donante recién nacido n.° 1 P0	Donante recién nacido n.° 2 P0
CD166$^-$/LGR5$^-$/CD44$^-$/Y$^-$	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/LGR5$^-$/CD44$^+$/Y$^-$	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/LGR5$^-$/CD44$^-$/Y$^+$	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/LGR5$^-$/CD44$^+$/Y$^+$	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/LGR5$^+$/CD44$^-$/Y$^-$	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/LGR5$^+$/CD44$^+$/Y$^-$	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/LGR5$^+$/CD44$^-$/Y$^+$	0%	0%	0%	0%
CD166$^-$/LGR5$^+$/CD44$^+$/Y$^+$	0%	0%	0%	0%
CD166$^+$/LGR5$^-$/CD44$^-$/Y$^-$	0%	1,1%	0,4%	0%
CD166$^+$/LGR5$^-$/CD44$^+$/Y$^-$	0,1%	1,0%	1,6%	0,4%
CD166$^+$/LGR5$^-$/CD44$^-$/Y$^+$	0,2%	14,2%	1,8%	0%
CD166$^+$/LGR5$^-$/CD44$^+$/Y$^+$	92,8%	80,8%	90,4%	97,1%
CD166$^+$/LGR5$^+$/CD44$^-$/Y$^-$	0%	0%	0%	0%
CD166$^+$/LGR5$^+$/CD44$^+$/Y$^-$	0%	0%	0%	0%
CD166$^+$/LGR5$^+$/CD44$^-$/Y$^+$	0%	0,3%	0,1%	0%
CD166$^+$/LGR5$^+$/CD44$^+$/Y$^+$	6,8%	2,6%	5,6%	2,4%

Se encontró que, dependiendo de la diferencia de los donantes, existe una gran distinción en las proporciones de subpoblaciones definidas con los marcadores de superficie que fue evidente. La subpoblación con la proporción más alta fue la subpoblación CD166+CD24-CD44+CD105+, mientras que la subpoblación presente en la proporción más alta en cHCEC de los donantes ancianos n.° 1 y n.° 2 fue la subpoblación con CD166+CD44+CD105+CD24-. La tabla

1b muestra que la subpoblación CD166+CD44+CD105+LGR5- está presente en la proporción más alta. Incluso las cHCEC primarias presentaron diversos fenotipos durante los cultivos en la misma condición de cultivo. El origen de cualquier tejido endotelial de la córnea cultivado mediante un método convencional conduce a diversas células mediante cultivo, dando como resultado células cultivadas con diferente tamaño, forma, densidad celular y homogeneidad. Dicha heterogeneidad puede superarse siguiendo la categorización por subpoblaciones en este ejemplo.

Para confirmar la heterogeneidad dependiendo del número de pases, se monitorizaron muchos cultivos por citometría de flujo para detectar los cambios de las composiciones de subpoblaciones. Se muestran resultados representativos en la figura 1 (A-B), junto con imágenes de microscopio de contraste de fase. La figura 2 (A-B) muestra un análisis FACS representativo (la figura 2-A corresponde a la figura 1-A y la figura 2-B a la figura 1-C). En resumen, las diferencias tanto en el número de pases como en los donantes presentaron grandes variaciones en la proporción de subpoblaciones. En vista de lo anterior, se determinó que las denominadas “células endoteliales corneales cultivadas” abarcan subpoblaciones heterogéneas y una subpoblación específica entre ellas es una célula efectora endotelial corneal diferenciada madura funcional para proceder con el siguiente análisis.

La expresión de ZO1 y Na^+/K^+ ATPasa no garantiza la homogeneidad. Tanto ZO1 como Na^+/K^+ ATPasa, que se conocen bien como marcadores de HCEC, no solo se tiñeron para las subpoblaciones CD44-, sino también para subpoblaciones CD44++CD24- y CD44++CD24+ con morfología estratificada y fibroblástica (figura 3). Las subpoblaciones CD44+++CD24+ con morfología estratificada y fibroblástica típica carecían de esta expresión (figura 3).

Expresión de CD200 y HLA de clase I entre las subpoblaciones

La expresión de CD200, reivindicado anteriormente como marcador de HCEC, estaba restringida sorprendentemente a una subpoblación de CD44++ en cHCEC vulnerables que habían experimentado CST (figura 4c). De manera importante, las células CD44- no mostraron ningún signo de expresión de CD200 (figura 4a), y más interesantemente algunas subpoblaciones que eran altamente positivas para CD44 no expresaron CD200. Con respecto a la inmunogenicidad de las cHCEC que pueden infundirse en huéspedes alogénicos, los inventores descubrieron que las subpoblaciones diferían en la expresión del antígeno de HLA de clase I de superficie, mostrando una disminución en paralelo con la disminución de la expresión de CD44 y CD26 (figura 5).

El análisis de la expresión de HLA-I, HLA-II y PDL1 en cHCEC reveló que HLA-I y PDL1 fueron positivos para cada célula endotelial corneal humana cultivada, pero HLAII fue principalmente negativo para las células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales de la presente invención, como se muestra en la figura 10-B y la figura 5.

Como se muestra en la figura 10-C, imágenes de un microscopio de fluorescencia y un microscopio de contraste de fase de células endoteliales corneales humana cultivadas que comprenden células que han experimentado una transición de estado celular muestran que IgG e IgM se unen a células endoteliales corneales humana cultivadas que han experimentado una transición de estado celular. Esto demuestra que un anticuerpo natural contra una célula en con transición de estado celular está presente en el suero. De esta manera, se determina que se produce ausencia sustancial de autoantígenos específicamente de subpoblación para la célula funcional de la presente invención. Como se muestra en este ejemplo, puede monitorizarse una subpoblación específica para seleccionar una subpoblación que esté sustancialmente libre de autoanticuerpos. Los autoanticuerpos pueden medirse mediante un método conocido en la técnica.

Se realizó análisis de citometría de flujo adicionalmente para definir la subpoblación adaptable para la infusión celular en la cámara anterior. Los fenotipos de las hCEC se examinaron con respecto a CD166, CD133, CD105, CD90, CD44, CD26, CD24, HLA-ABC, HLA-DR/DP/DQ y PD L1. Al mismo tiempo, los inventores confirmaron la expresión de estos marcadores en tejidos corneales recién extraídos y descubrieron que eran negativos para CD133, CD105, CD90, CD44, CD26, CD24 y HLA-DR/DP/DQ (figura 6-B). Basándose en este estudio inmunocitológico, los inventores definieron subpoblaciones con CD133, CD105, CD90, CD44, CD26, CD24 y HLA-DR/DP/DQ negativo y CD166 y HLA-ABC positivo como células efectoras que garantizan la aplicación a la terapia de infusión celular. Una tinción inmunocitológica representativa se representa en la figura 6-B. En los experimentos preliminares pero extensos de los inventores, el endotelio corneal humano fresco no mostró signos de la presencia de CD24, CD26, CD44, CD90 y CD133, pero mostró claramente una fuerte expresión de CD166. Esto indica que los fenotipos de la subpoblación de cHCEC mencionada anteriormente, con ausencia completa de aneuploidía, son consecuentes con los de la subpoblación de HCEC en tejidos endoteliales corneales frescos.

La subpoblación de CD44- altamente purificada provocó un fenotipo sin CST

CD44 contribuye al mantenimiento de las características de células madre, y la contribución funcional de CD44 se basa en sus habilidades de comunicación con moléculas vecinas, células adyacentes y la matriz circundante. En consecuencia, se clasificaron subpoblaciones CD44 negativo (compuerta B en la figura 7) y positivo (compuerta A) mediante el clasificador de células BD FACSJazz y se cultivaron las subpoblaciones purificadas en placas de 24

pocillos seguido de 17 días adicionales de cultivo. La subpoblación obtenida como una subpoblación CD44+ proliferó rápidamente con morfología fusiforme y mostró una débil tinción irregular de Na^+/K^+ ATPasa, mientras que una subpoblación obtenida como una subpoblación de CD44- mostró un crecimiento relativamente lento y una expresión evidente de Na^+/K^+ ATPasa (figura 7). Los resultados respaldan además el concepto recién introducido de la presencia de una célula efectora en subpoblaciones adecuadas para la terapia de infusión celular.

Discriminación de subpoblaciones mediante matriz de PCR para ECM

Se investigó la expresión de ARNm de células endoteliales a partir de células efectoras y otras dos subpoblaciones con CST se investigaron usando la matriz extracelular humana de matriz de PCR y moléculas de adhesión (Qiagen) de RT^2 Profiler. Se confirmaron las características de contraste entre tres subpoblaciones de cHCEC típicas. El análisis de agrupamiento (mapa de calor) demostró la clara distinción entre estas tres subpoblaciones como se muestra en la figura 8, lo que indica nuevamente la presencia de subpoblaciones efectoras con firmas génicas de EMA distintas.

Prueba de presencia de una subpoblación específica como células efectoras en el contexto del marcador de CD

Se evaluaron marcadores de superficie celular para las cHCEC CD44- y CD44+ mediante cribado para detectar la expresión de 242 antígenos de superficie celular mediante citometría de flujo (Lyoplate, BD Biosciences). Los perfiles de expresión de los marcadores de CD se muestran en la figura 9 y la tabla 2.

[Tabla 2]

Especificidad	Célula funcional	Célula no prevista
CD59	+++	+++
CD147	+++	+++
CD81	+++	+++
CD73	+++	++
CD49c	+++	++
CD166	+++	+++
CD56	++	+
CD54	++	++
B2-uGlob	++	±
CD47	++	+
CD46	++	++
CD141	++	++
CD151	++	+
CD98	+	+
CD165	+	+
CD340 (Her2)	+	±
CD58	+	±
CD201	+	±
CD140b	+	-
EGF-r	+	±
CD63	+	±
CD9	±	++
CD49b	±	+
CD227	±	-
CD90	±	++
CD44	±	+++

El valor de la mediana de intensidad de fluorescencia de cada marcador/mediana de intensidad de fluorescencia del control negativo (tinción por anticuerpo de control de isotipo) es

30 o más: +++

10 o más y menos de 30: ++

5 o más y menos de 10: +

menos de 5: -

No se muestran los marcadores que presenten una expresión de bajo nivel en ambos grupos. La expresión proteica de CD73, CD26, CD105 solo se observó en subpoblaciones CD44+, pero estaba completamente ausente en las subpoblaciones CD44-. Por otro lado, CD166, que se usó como marcador representativo para una célula derivada de HCEC, se observó en la mayoría de las subpoblaciones, independientemente de la intensidad de expresión de CD44. La observación fue consecuente con los resultados de Okumura *et al.* que describen que CD166 se expresó tanto en

células normales como fibroblásticas. Los marcadores de CD eficaces para distinguir subpoblaciones distintas se seleccionaron analizando aquellos en cHCEC establecidas con un área celular media pequeña y alta densidad celular. El análisis combinado de marcadores de CD identifica claramente la subpoblación (células efectoras) adaptable para la terapia.

Factores de este ejemplo que influyen en la proporción de células efectoras en las cHCEC. En ausencia de un índice científico práctico para definir subpoblaciones, la única forma de calificar las variaciones de unos cultivos a otros es la observación microscópica de la morfología. Sin embargo, los inventores han desarrollado un método para cuantificar la proporción de subpoblación efectora en cultivos (razón E). El método aclara la relación de las edades de los donantes, la densidad de células endoteliales del donante y el período de tiempo entre la muerte y el tiempo de conservación (D-P), con la razón de células efectoras (razón E) en cHCEC (figura 10-A). Resultó que solo la edad del donante tiene una correlación estadísticamente significativa con la razón E.

Factores que afectan a la razón E

Como se mencionó anteriormente, CD44 desempeña diversos papeles críticos en CST, en el mantenimiento de las características de células madre y en la inducción de una célula madre cancerosa (CSC). Por lo tanto, es importante investigar los factores que determinan la expresión de CD44 en las cHCEC. Durante el cultivo prolongado en cultivo primario, la expresión de CD44 disminuyó gradualmente (figura 11-A), lo que indica el vínculo de la reducción de CD44 con la progresión a un tipo diferenciado maduro. Incluso en el sexto pase, la adición de Y-27632 a lo largo de 35 días de cultivo aumentó sorprendentemente la razón E del 1,2 % al 52,3 %, aunque no se pudo reconocerse ningún cambio morfológico. La adición de Y-27632 durante el cultivo durante 47 días también aumentó la razón E. Esto también se confirmó con el claro estrechamiento de la distribución de las áreas celulares, la disminución del área celular promedio de 258 a 216 microm^2 y el aumento de la densidad celular cultivada de 2229 a 2582 células/mm^2 (figura 12 (A-B)).

(Sumario)

El análisis de citometría de flujo identificó la célula efectora que expresa CD166+CD105-CD44-CD24-CD26-, pero no CD200-. También se confirmó la presencia de otras subpoblaciones con CD166+CD105-CD44+++ (uno de CD24 y CD26 es + y el otro es -). La matriz de PCR reveló los tres perfiles de expresión completamente distintos de ECM. Algunas de estas subpoblaciones expresaron ZO1 y Na^+/K^+ ATPasa a niveles comparables con células efectoras, mientras que solo una de estas subpoblaciones expresó CD200, pero no en células efectoras. La expresión de HLA se redujo en la subpoblación efectora. La proporción de células efectoras (razón E) fue inversamente proporcional a la edad de los donantes y disminuyó durante los pases prolongados de los cultivos. La presencia de inhibidor de ROCK aumentó la razón E en las cHCEC. El área promedio de las células efectoras fue de aproximadamente 200-220 microm^2, y la densidad celular cultivada superó 2500 células/mm^2.

(Conclusiones)

Las células efectoras cultivadas especificadas que comparten los fenotipos de superficie con HCEC maduradas en tejidos corneales pueden servir como alternativa a las córneas de donantes para el tratamiento de disfunciones endoteliales de la córnea.

Las células cultivadas variaron no solo morfológicamente, sino también en gran medida en términos de la composición de subpoblaciones en cHCEC de unos cultivos a otros (tabla 1G) incluso en el protocolo de cultivo ideal. Esto puede atribuirse a la variación en la edad del donante (Senoo, T., Joyce, N.C., 2000. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41, 660e667; Zhu, C., Joyce, N.C., 2004. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45, 1743e1751), así como a la diferencia en el número de pases de cultivo, mientras que este también fue el caso para el cultivo de células madre mesenquimatosas (MSC) con respecto a los marcadores de células madre CD29, CD49e, CD73, CD90, CD105 y CD166. Las edades de los donantes de córnea presentaron una correlación significativamente inversa con la frecuencia de células efectoras (figura 10-A), pero una correlación positiva con la aneuploidía de cariotipo (Miyai T, *et al.* Mol Vis. 2008; 14:942-50).

No se han definido marcadores de superficie celular específicos de HCEC antes de la divulgación de la presente invención. Hasta ahora, no se había proporcionado una combinación de marcadores de CD para evaluar cuantitativamente subpoblaciones de alta calidad. Los inventores aplicaron la combinación de marcadores de CD relacionados con células madre cancerosas (CSC) para uso clínico debido a las frecuentes apariciones de EMT en cultivos de HCEC.

Un CD44 multifuncional regula diversas funciones en muchas células, incluido el comportamiento de células madre, como la autorrenovación y la diferenciación, y detecta cambios en la ECM en respuesta a cambios en las interacciones célula-célula y célula-ECM, tráfico celular, eventos de direccionamiento y transducción de señales, permitiendo las respuestas flexibles al entorno tisular (Karamanos NK, *et al.* FEBS J. 2011; 278:1429-43; Williams K *et al.*, Exp Biol Med (Maywood). 2013; 38:324-38). Se reveló que puede identificarse una célula efectora mediante la expresión de CD44-CD166+CD133-CD105-CD24-CD26-, pero no por la expresión de CD200. También se confirmó la presencia de otras subpoblaciones con CD44+ a +++ CD166+ CD133-CD105- (uno de CD24 y CD26 es + y el otro es -). Además, dependiendo de las variaciones de las condiciones de cultivo, tal como la presencia de Y27632 y la extensión de los

periodos de cultivo, la expresión de CD44 probablemente se redujo, dando como resultado el aumento de las razones E. Se requiere un estudio futuro para determinar el papel que desempeña CD44 en las rutas de diferenciación a HCEC maduradas. Los factores de señalización aguas abajo de CD44 incluyen RhoA y MMP 2, que se requieren para la organización del citoesqueleto de tubulina y actina y la formación de pseudópodos celulares (Lin L, *et al.*, Oncol Rep. 2015; 34:663-72).

Se induce EMT de manera anómala en muchas enfermedades. Las HCEC cultivados tienen una inclinación hacia CST en EMT. A través del proceso de EMT, se reduce la adhesión de célula a célula. Una célula que experimenta EMT frecuentemente obtiene una propiedad de tipo células madre, incluyendo la inducida por TGF-beta. Se sabe bien que la EMT está estrechamente implicada en la generación de células madre cancerosas o sus nichos durante la conversión fenotípica (Krawczyk N, *et al.*, Biomed Res Int. 2014; 2014:415721. Epub 8 de mayo de 2014). Esto había llevado a los inventores a descubrir que la presencia de subpoblaciones heterogéneas en términos de CD44 puede investigarse y distinguirse.

Considerando la heterogeneidad fenotípica debida a la inestabilidad genética de las cHCEC, la selección de una combinación de marcadores que incluyen marcadores de CSC puede permitir una evaluación apropiada de la calidad de la subpoblación más adecuada para la terapia celular.

McGowan *et al.* han identificado con éxito células madre endoteliales de la córnea, pero nunca las aislaron para cultivo (McGowan, S.L., *et al.*, Mol. Vis. 13, 1984e, 2000).

CD44 es la característica distintiva que distingue cHCEC diferenciadas de cHCEC indiferenciadas o cHCEC que han experimentado CST. CD44 desempeña un papel crítico como una molécula de adhesión principal de ECM en la inducción del fenotipo mesenquimatoso mediada por TGF-beta. La pérdida de CD44 anuló estos cambios (Nagano O, *et al.*, Cancer Sci. 2004; 95:930-935). La pérdida de CD44 aumenta el flujo a la respiración mitocondrial e inhibe la entrada en la glucólisis. Dichos cambios metabólicos inducidos por la pérdida de CD44 dan como resultado un agotamiento notable del glutatión reducido (Tamada M *et al.*, Cancer Res. 2012; 72:1438-48). HDAC1 regula la activación del eje miARN-34a/CD44 y los factores aguas abajo de CD44 incluidos RhoA y MMP 2 (Lin L, *et al.*, Oncol Rep. 2015; 34:663-7245).

Este estudio demostró que las cHCEC se componen de diversas células, y una subpoblación de cHCEC específica con expresión superficial de CD44-, CD166+, CD133-, CD105-, CD24-, CD26- puede cultivarse de manera reproducible sin CST o EMT. La combinación de marcadores de CD descritos anteriormente puede evaluar cualitativamente subpoblaciones que muestran la inclinación a OXHOS dependiente de mitocondrias, pero no a glucólisis anaerobia. Por lo tanto, la subpoblación identificada no muestra signos de anomalía de cariotipo, abriendo de ese modo el camino a proporcionar las células cultivadas de una manera segura y estable para la terapia, concretamente, la infusión de cHCEC en la cámara anterior en forma de una suspensión celular para tratar la queratopatía ampollosa.

(Ejemplo 2: La aneuploidía de células endoteliales corneales humanas cultivadas depende de la presencia de subpoblaciones heterogéneas con distintos fenotipos de diferenciación)

El propósito de este ejemplo es aclarar si una subpoblación específica (SP) en cHCEC heterogéneas presentaría aneuploidía mientras que otras no.

En este ejemplo, se analizaron las subpoblaciones presentes en las cHCEC basándose en los niveles de expresión de antígenos de CD de superficie mediante citometría de flujo. Los antígenos de CD analizados son CD166, CD105, CD44, CD26 y CD24. Se realizó un examen citogenético para 23 lotes de cHCEC, o bien como preparaciones de células completas (en masa) que consisten en algunas subpoblaciones celulares o bien como una subpoblación semipurificada por clasificación de células con perlas magnéticas (MACS) con distintos marcadores de CD de superficie. Los donantes de HCEC variaron de 9 a 69 años y los pases de cultivo usados fueron del primer al quinto pase.

(Materiales y métodos)

Donantes de células endoteliales corneales humanas

El tejido humano usado se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron HCEC de 23 córneas de cadáveres humanos y se cultivaron antes de realizar el análisis de cariotipo. Las córneas de donantes humanos se obtuvieron de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron bajo los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido.

Las edades de los donantes variaron de 9 a 69 años. Los donantes incluyeron 14 hombres y 7 mujeres. Todas las córneas de donantes se conservaron en Optisol-GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron por avión con

fines de investigación. De acuerdo con la información de los donantes, todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal y ningún donante tenía antecedentes pasados de anomalía cromosómica.

Cultivos de HCEC

Las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones (Nayak SK, Binder PS. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984; 25:1213-6). Se usaron un total de 30 córneas de donantes humanos a distintas edades para los experimentos. Brevemente, se extrajeron las membranas de Descemet con las células endoteliales corneales de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de una córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. El medio acondicionado se preparó como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

Citometría de flujo

Se realizó el cribado de marcadores de superficie celular evaluando la expresión de marcadores a través del panel de cribado de marcadores de superficie celular humana (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, las HCEC cultivadas se incubaron con 242 anticuerpos primarios e IgG de isotipo (BD Biosciences) a la dilución indicada por el protocolo del fabricante durante 30 minutos a 4 grados C. Las células se lavaron con PBS que contenía BSA al 1% y EDTA 5 mM y luego se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor 647 (dilución 1:200, BD Biosciences) durante 30 minutos a 4 grados C. Las células se lavaron nuevamente con PBS que contenía BSA al 1% y EDTA 5 mM y se analizaron por citometría de flujo usando un instrumento BD FACSCant II (BD Biosciences) y software CellQuest Pro (BD Biosciences).

Análisis de citometría de flujo de HCEC cultivadas

Las cHCEC se recogieron de la placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Las disoluciones de anticuerpos comprendían lo siguiente: mAb anti-CD26 humano conjugado con FITC, mAb anti-CD166 humano conjugado con PE, mAb anti-CD24 humano conjugado con PerCP-Cy5.5, anti-CD44 humano conjugado con PE-Cy7 (todos de BD Biosciences), anti-CD105 humano conjugado con APC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Aislamiento de subpoblaciones de HCEC por MACS

Las HCEC se separaron con TrypLE Select como se describió anteriormente y las subpoblaciones de CD44-HCEC (subpoblación efectora) se aislaron usando microperlas anti-CD44 humano (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y el programa depl05 de un separador autoMACS Pro (Miltenyi Biotec). La pureza de la subpoblación efectora aislada fue superior al 95% en todos los casos como se demostró por citometría de flujo.

Cariotipado

Se realizó examen citogenético en células sometidas a varios pases de 21 donantes como se muestra en la tabla 3. En la etapa temprana de este estudio, se realizó examen citogenético solo para las células de cultivo a granel sin clasificación celular. Se usaron técnicas convencionales de recogida citogenética, fijación y bandas G después de tripsina y Giemsa (bandeo GTG) para las HCEC. Después de la incubación con colcemida 0,06 microg/ml durante 16 horas para detener la mitosis celular, se separaron las HCEC usando tripsina al 0,05 %/EDTA. Las HCEC se trataron con KCl 0,075 M y luego se fijaron con el fijador de Carnoy (una mezcla 3:1 de metanol y acético glacial). La disolución de HCEC se vertió sobre un portaobjetos de vidrio y se secó al aire. A continuación, las HCEC se trataron con tripsina al 0,005 % durante 7 minutos y se tiñeron con disolución de tinción de Giemsa al 6 % durante 3,5 minutos. El número de cromosomas se analizó en 50 células para cada preparación de HCEC. Se analizó un cariotipo detallado en 20 células para cada preparación de HCEC. Se siguieron el sistema internacional estándar para la nomenclatura citogenética humana (ISCN) 1995 y las definiciones del mismo. Se examinó la frecuencia de pérdida o ganancia de cromosomas individuales. Se sometió a prueba la frecuencia de aneuploidía por muestra (el número de células anómalas dividido entre el número total de células examinadas en la metafase). Todos los análisis se llevaron a cabo en Nippon Gene Research Laboratories (NGRL Sendai, Japón).

(Resultados)

Características generales de los cariotipos de cHCEC

Se analizaron los cariotipos de 21 HCEC cultivadas de donantes de entre 9 y 69 años de edad. Las células cultivadas variaban no solo morfológicamente, sino también en gran medida en términos de la composición de subpoblaciones en cHCEC en tamaño y morfología de unos cultivos a otros a pesar del protocolo de cultivo idéntico. Esto puede atribuirse a la variación en la edad del donante, así como a la diferencia en el número de pases de cultivo. Las edades de los donantes de córnea presentaron una correlación significativamente inversa con la frecuencia de las células efectoras, pero una correlación positiva con la aneuploidía de cariotipo (Miyai T, *et al.* Mol Vis. 2008; 14:942-50).

En la etapa temprana de este ejemplo, se realizó examen citogenético solo para las células de cultivo a granel sin clasificación celular. Se analizó el número de cromosomas en 50 células para cada preparación de HCEC. Se analizó un cariotipo detallado en 20 células para cada preparación de HCEC (figura 13).

Como se notificó anteriormente, las HCEC muestran tanto pérdida de cromosomas sexuales como trisomía, que también se observaron en este estudio (figura 13, tabla 3).

[Tabla 3]

N.º de lote	Edad	Género	Pase	ECD del donante (células/mm^2)	Anomalía	45	46	47	48
1	69	hombre	6	3161	Sin tinción nuclear				
2	63	hombre	4	3265	Deleción del cromosoma Y (100%)	50	-	-	-
3	68	hombre	1	2830	Deleción del cromosoma Y (98%)	49	1	-	-
4	67	mujer	0	2718	Trisomía en el cromosoma 20 (34%)	-	33	17	-
5	69	hombre	0	2654	Deleción del cromosoma Y (100%)	50	-	-	-
6	56	hombre	0	2612	Deleción del cromosoma Y (98%)	49	1	-	-
7	67	mujer	3	2718	Sin tinción nuclear				
8	23	hombre	3	3504	Pocos mitosis, análisis en 14 células	-	14	-	-
9	23	hombre	2	3194	Deleción del cromosoma Y (36 %)	18	32	-	-
10	58	mujer	3	2630		-	50	-	-
11	29	mujer	3	3007	Deleción del cromosoma X (22%)	11	39	-	-
12	9	hombre	5	3507		-	50	-	-
13	42	hombre	4	3111	Trisomía en el cromosoma 7 (79%)	-	26	24	-
14	15	mujer	3	3733		-	50	-	-
15	22	mujer	3	2813	Trisomía en el cromosoma 6, 20 (18 %)	-	41	8	1
16	16	hombre	2	3433		-	50	-	-
17	28	mujer	3	3504		-	50	-	-
18	19	hombre	3	3062		-	50	-	-
19	23	hombre	2	3833	Translocación (5%),	-	50	-	-
20	29	mujer	3	3413		-	50	-	-
21	29	mujer	3	3309	Trisomía en el cromosoma 12 (4%)	-	48	2	-

Se analizó el cariotipado de 21 cultivos a granel de cHCEC de donantes de entre 9 y 69 años de edad con respecto a los pases de cultivo y las variaciones de donantes. La información del donante se resume junto con los resultados del análisis de cariotipo (tabla 3). Ninguna descripción significa la proliferación insuficiente para obtener cHCEC en metafase antes del examen citogenético. Como se mencionó anteriormente, las cHCEC presentaron la misma frecuencia de anomalías de cariotipo tales como pérdida de cromosomas sexuales y trisomía que el informe de Miyai *et al.* Sin embargo, se observó translocación en solo uno (donante n.° 13) de los 21 casos mencionados anteriormente, que no se observó en el estudio anterior. En el estudio actual, las HCEC cultivadas a granel demostraron aneuploidía en la mayoría de los casos, independientemente del número de pases desde el cultivo primario hasta los quintos pases. Esto no excluye la conclusión de estudios previos porque el número de pases de cultivo celular en el estudio actual se limitó a como máximo 5 pases. Aunque no se llevaron a cabo análisis estadísticos, la densidad de células endoteliales corneales (ECD) del donante no afectó directamente a la frecuencia de la aneuploidía. A diferencia de la ECD de los donantes, la menor densidad celular de cHCEC en el momento del análisis puede tener alguna correlación con la frecuencia de aneuploidía. Entre 8 cHCEC con una densidad celular inferior a 1000 células/mm^2, 7 presentaron aneuploidía evidente (casi alcanzando el 90 %). Por el contrario, ninguna de las cuatro cHCEC con una densidad celular mayor de 1000 células/mm^2 presentó anomalía. Esto indica indirectamente que la calidad o eficiencia de los

cultivos de cHCEC o la presencia de CST pueden tener correlación con la aneuploidía observada.

Edad del donante y aneuploidía de cariotipo

En línea con el informe anterior (Mimura T *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004; 45: 2992-299710), la frecuencia de aneuploidía mostró una clara correlación inversa con la edad de los donantes de HCEC. 10 de 14 HCEC de donantes jóvenes (aparentemente definidos como aquellos por debajo de 29) presentaron cariotipo normal (71 %), mientras que los 4 restantes presentaron o bien pérdida de cromosomas sexuales o bien trisomía. En los casos de HCEC de donantes de 30 a 69 años de edad, 6 de 8 presentaron aneuploidía (75 %) con solo un 25 % presentando cariotipos normales. Considerando el concepto generalmente aceptado de que el envejecimiento aumenta la inestabilidad genética y disminuye la expresión de genes de reparación de ADN, el aumento de la aneuploidía es posiblemente apropiado.

Sin embargo, el problema más relevante es la presencia de anomalía de cariotipo en el 29 % de las cHCEC de donantes jóvenes menores de 29 años. Las figuras 14a-14d muestran ejemplos típicos de cariotipado. La aneuploidía es la ausencia en cHCEC del donante mayor n.° 10 (edad 58, mujer, pase de cultivo P3), de donantes jóvenes n.° 19 (edad 23, hombre macho, P2), n.º 9 (edad 23, hombre, P2) y n.º 14 (edad 15, mujer P3). La presencia de anomalía de cariotipo en el 29 % de las cHCEC de donantes jóvenes menores de 29 años indica que algunos factores intrínsecos desconocidos latentes en cultivos de HCEC pueden facilitar la aneuploidía de cariotipo, independientemente de o además de la edad del donante. A este respecto, los inventores han investigado la composición de las cHCEC en detalle.

Análisis de subpoblaciones en cHCEC por citometría de flujo

Las cHCEC eran heterogéneas en tamaño y morfología y se componían de subpoblaciones distintas dependiendo de las condiciones de cultivo (ejemplo 1). Para explorar factores intrínsecos desconocidos latentes en cultivos de HCEC, se aplicó análisis de citometría de flujo a cHCEC en el contexto de marcadores de antígeno de CD de superficie. Las cHCEC con alto contenido de subpoblación CD44- presentaron morfología hexagonal y ningún signo de CST, mientras que los cultivos que contienen subpoblaciones con expresión de o bien CD44+++, CD24+ o bien CD26+ presentaron morfología similar a CST irregular (figuras 15 y 16). Es evidente a partir de este análisis que las características fenotípicas de las cHCEC varían mucho de unos cultivos a otros, acompañado de la variación en subpoblaciones compuestas en cHCEC. Esta variación puede exceder la influencia de factores descritos anteriormente, tales como la edad del donante, el número de pases de la ECD del donante con respecto a la frecuencia de aneuploidía en cHCEC.

La composición de las cHCEC afecta en gran medida a la aneuploidía

La subpoblación de cHCEC con CD44-, CD166+, CD105-, CD24-, CD26- se purificó por clasificación de células con perlas magnéticas (MACS). Debido a la expresión heterogénea de CD44 en las subpoblaciones mostradas en la figura 16, se usaron principalmente perlas magnéticas de CD44 para separar las subpoblaciones. Las subpoblaciones CD44-, CD166+, CD105-, CD24- y CD26- separadas por perlas magnéticas de CD44 se semipurificaron hasta una pureza superior al 90 %. Las subpoblaciones con expresión de o bien (CD44+++, CD166+, CD24-, CD26+) o bien (CD44+++, CD166+, CD24+, CD26-) también se semipurificaron hasta una pureza superior al 70 %.

Como se muestra en la figura 17, la primera subpoblación con CD44-, CD166+, CD105-, CD24-, CD26- no mostró ninguna aneuploidía en 150 células. Por el contrario, subpoblaciones con CD44+++, CD166+, CD24-, CD26+ provocaron la pérdida de cromosoma sexual en el 100 % de las células (60 células), mientras que las subpoblaciones con CD44+++, CD166+, CD24+, CD26- presentaron trisomía frecuente en los cromosomas 6, 7, 12 y 20.

Las edades de los donantes de córnea y la frecuencia de las subpoblaciones CD44-, CD166+, CD105-, CD24-, CD26- tuvieron una correlación inversa significativamente, mientras que las edades de los donantes de córnea tuvieron una correlación positiva con la aneuploidía de cariotipo.

(Sumario)

El análisis de citometría de flujo demostró la presencia de al menos tres subpoblaciones de cHCEC. Una subpoblación de cHCEC específica, purificada por MACS, con expresión superficial de CD166+, CD105-, CD44-, CD24-, CD26- no presentó ningún tipo de aneuploidía en 150 células. Por el contrario, la subpoblación de cHCEC CD166+, CD44+++, CD24-, CD26+ presentó pérdida de cromosoma sexual en el 100 % de las células (60 células), mientras que la subpoblación CD166+, CD44+++, CD24+, CD26- presentó, aunque en parte, trisomía en los cromosomas 6, 7, 12 y 20.

Conclusión: Este ejemplo presenta nuevos hallazgos de que la aneuploidía observada durante el cultivo de HCEC está estrechamente vinculada con subpoblaciones específicas presentes en las cHCEC, y solo una subpoblación específica que comparte el fenotipo de superficie con HCEC maduradas presentes en los tejidos corneales no presenta la anomalía de cariotipo.

Discusión

El progreso reciente ha elevado la posibilidad de nuevas modalidades terapéuticas basadas en técnicas de ingeniería de tejidos para diversas enfermedades (Okano H Nakamura M Yoshida K. Circ Res. 2013; 112: 523-533., Tabar V Studer L. Nat Rev Genet. 2014; 15: 82-92.) Las cHCEC expandidas en cultivo *in vitro* pueden ser una mezcla de diversas subpoblaciones con distintas CST. Esto ha sido un obstáculo para definir claramente las características de las cHCEC. Dado que las HCEC pueden cultivarse en cultivo, se ha explorado la terapia de inyección de cHCEC para tratar disfunciones endoteliales de la córnea. Una célula cultivada tiene un riesgo potencial de experimentar cambios de cariotipo en general. Por lo tanto, la calidad de las cHCEC debe monitorizarse cuidadosamente para los entornos clínicos, donde la seguridad y la estabilidad de la medicación deben controlarse estrictamente.

Actualmente, no se ha notificado ningún antígeno de superficie celular específico de HCEC. Se propusieron glipicano-4 y CD200 como marcadores de HCEC para distinguir las HCEC de los fibroblastos del estroma corneal (Cheong YK *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54: 4538-4547). Sin embargo, el problema práctico del cultivo de HCEC es la presencia de subpoblaciones vulnerables que se han experimentado CST que es claramente distinta en las cHCEC. CD200 notificado por Cheong *et al.* no pudo distinguir HCEC diferenciadas, sino que se expresó más bien en la subpoblación de cHCEC que se había experimentado una cierta CST. Se reveló que marcadores de CD convencionales pueden distinguir las células de fenotipo no fibroblástico que conservan las funciones normales de una célula que ha experimentado cambios fibroblásticos, pero que luchan por identificar la célula endotelial corneal diferenciada madura funcional de la presente invención. Este ejemplo mostró claramente la presencia de subpoblaciones en células no fibroblásticas con anomalía de cariotipo. Para identificar la calidad de las cHCEC que es suficiente para los entornos clínicos, se necesitaría un análisis más detallado para distinguir las subpoblaciones que han experimentado CST distinta de los cambios fibroblásticos en cHCEC. El objetivo de este estudio es identificar los antígenos de CD de superficie celular expresados en subpoblaciones de cHCEC con o sin aneuploidía para aclarar si la aneuploidía observada actualmente en cHCEC depende de la presencia de subpoblaciones con fenotipos de diferenciación distintos.

En este ejemplo, las HCEC cultivadas presentaron aneuploidía en la mayoría de los casos, a pesar del uso de células desde cultivo primario hasta quintos pases. La aneuploidía observada en las cHCEC puede haber sido inducida por la división celular en cultivo. Consecuente con la observación de Miyai *et al.* (Miyai T, *et al.*, Mol Vis. 2008; 14:942-50), la mayoría de los cariotipos anómalos observados en cHCEC pueden haber sido inducidos en una etapa muy temprana de cultivo, debido a la presencia de anomalías incluso en células de cultivo primario (n.° 4, n.º 5 y n.º 6 en la tabla 3). Aunque no se ha llevado a cabo un análisis estadístico, la edad del donante y la frecuencia de aneuploidía pueden tener una correlación significativamente positiva como señalan Miyai *et al.*

En este ejemplo, las cHCEC tendían a tener un mosaico de la monosomía cromosómica sexual y trisomía del cromosoma 6, 7, 12 y 20. Estudios previos notificaron que los cromosomas sexuales mostraron pérdida dependiente de la edad en linfocitos periféricos, células de médula ósea, queratocitos corneales [Stone JF, *et al.*, Mutat Res. 1995; 338: 107-13; Pettenati MJ, *et al.*, Hum Genet. 1997; 101:26-9], y endotelios corneales. Por lo tanto, la pérdida de cromosomas sexuales es un fenómeno dependiente de la edad que no depende del tipo de célula. Los resultados en este ejemplo son muy consecuentes con los resultados de los estudios de Miyai *et al* (citado anteriormente), al menos en términos de la pérdida de un cromosoma sexual, pero no con respecto a la presencia de trisomía en los cromosomas 6, 7, 12 y 20, porque el informe anterior describe solo la trisomía del cromosoma 8. El síndrome del mosaico de trisomía del cromosoma 8 está asociado con la opacidad corneal [Miyata K, *et al.*, Cornea. 2001; 20:59-63]. Se requiere un estudio detallado adicional para dilucidar esta discrepancia en la ubicación de la trisomía. Los resultados en este ejemplo también indican que las cHCEC para terapias clínicas deben obtenerse de donantes jóvenes. Además, los resultados muestran que el examen cuidadoso del cariotipo en las cHCEC es crucial antes de la aplicación clínica.

El análisis de citometría de flujo demostró que una subpoblación de cHCEC específica, semipurificada por MACS, con expresión de fenotipos superficiales de CD166+, CD105-, CD44-, CD24- y CD26- no mostró ningún tipo de aneuploidía en 150 células. Incluso en esta subpoblación, la presencia de subpoblaciones CD90+ y - se indicó mediante análisis adicional de los inventores, pero no parece afectar al resultado del cariotipado. Este ejemplo es el primer hallazgo que indica directamente la presencia de una subpoblación de cHCEC sin aneuploidía de cariotipo, haciendo posible adaptar la subpoblación para entornos clínicos. Por el contrario, la subpoblación de cHCEC con la expresión superficial de CD166+, CD44+++, CD24-, CD26+ presentó pérdida de cromosoma sexual en el 100 % de las células, mientras que la subpoblación con la expresión superficial de CD166+, CD44+++, CD24+, CD26- presentó, aunque en parte, trisomía en los cromosomas 6,7,12 y 20. En experimentos preliminares, pero exhaustivos de los inventores, un endotelio corneal humano fresco no mostró signos de la presencia de CD24, CD26, CD44 o CD90, pero expresó uniformemente CD166. Esto indica que los fenotipos de subpoblación de cHCEC mostrados en el presente documento sin aneuploidía parecen ser consecuentes con los de las subpoblaciones de HCEC en tejidos de endotelio corneal frescos.

Este ejemplo presenta nuevos hallazgos de que la aneuploidía presente en el cultivo de cHCEC notificada hasta la fecha se produce en subpoblaciones limitadas de cHCEC en una escala muy limitada, pero la subpoblación refinada bioquímicamente que comparte el fenotipo de superficie con HCEC diferenciadas maduras, presente en tejidos

corneales frescos, está libre de la anomalía de cariotipo.

(Ejemplo 3: Producción de células endoteliales corneales humana cultivadas homogéneas indispensables para la terapia de infusión celular)

El ejemplo de este estudio es establecer protocolos de cultivo para producir de manera reproducible como máximo una subpoblación homogénea (SP) con características funcionales de HCEC maduras y desprovista de CST para terapia celular.

En este ejemplo, se confirmó la presencia de subpoblaciones en cHCEC en términos del nivel de expresión de marcadores de CD de superficie por citometría de flujo. El análisis se realizó en marcadores de CD que pueden especificar definitivamente la subpoblación (células efectoras) de interés más adecuada para la terapia celular entre las diversas subpoblaciones. Los procesos de cultivo se evaluaron en el contexto de la proporción de subpoblación de células efectoras (razón E).

(Materiales y métodos)

(Reactivos y anticuerpos)

Se recogieron HCEC de la placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Las disoluciones de anticuerpos se prepararon mezclando los siguientes anticuerpos: mAb anti-CD26 humano conjugado con FITC o PE, mAb anti-CD166 humano conjugado con PE, mAb anti-CD24 humano conjugado con Per-CP-Cy5.5, anti-CD44 humano conjugado con PE-Cy7 o PerCP-Cy5.5 (todos de BD Biosciences) y anti-CD105 humano conjugado con APC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Donantes de células endoteliales corneales humanas

El tejido humano utilizado se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Las HCEC se obtuvieron de 20 córneas de cadáveres humanos y se cultivaron antes de realizar el análisis de cariotipo. Las córneas de donantes humanos se obtuvieron de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron bajo los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado particular en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido. La edad de los donantes varió de 2 a 75 años (promedio 43,7+/-26,4). Se incluyeron nueve hombres y 11 mujeres. Todas las córneas de donantes se conservaron en Optisol GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron por avión con fines de investigación. La información de los donantes mostró que todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal y ningún donante tenía antecedentes pasados de anomalía cromosómica.

Cultivos celulares de HCEC

A menos que se indique lo contrario, las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones. Se usaron un total de 30 córneas de donantes humanos a distintas edades para los experimentos. Brevemente, las membranas de Descemet con células endoteliales corneales se extrajeron de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. Se preparó un medio acondicionado como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

Tratamiento con tricostatina A (TSA) de HCEC

Se trataron HCEC con tricostatina A como sigue. Las membranas de Descemet con las células endoteliales corneales se extrajeron de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio que contiene tricostatina A se preparó con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA,

EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón), 50 microg/ml de gentamicina y 0,5 microM de tricostatina A. Las HCEC se cultivaron usando el medio que contenía tricostatina A en 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Las células se cultivaron durante 30 días. Se usaron las HCEC del segundo pase para la observación con un microscopio de fluorescencia.

Microscopía de contraste de fase

Se tomaron imágenes de contraste de fase mediante un sistema de microscopio invertido (CKX41, Olympus, Tokio, Japón). Para el análisis de distribución del área celular, las cHCEC se lavaron con PBS (-) tres veces y se adquirieron imágenes de contraste de fase mediante un sistema de microscopio BZ X-700 (Keyence, Osaka, Japón). Las distribuciones del área se cuantificaron mediante el software de recuento de células híbridas BZ-H3C (Keyence).

Tinción inmunofluorescente

Las HCEC se cultivaron a una densidad de 1 X 10^5 células/pocillo en una placa de cultivo celular de 24 pocillos recubierta con mezcla de recubrimiento de FNC y se mantuvieron durante 3 a 4 semanas para análisis de inmunofluorescencia. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % o etanol al 95 % suplementado con ácido acético al 5 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante 30 minutos con BSA al 1 %. Las muestras se incubaron durante la noche a 4 grados C con anticuerpos contra CD73 (1:300; BD Pharmingen Stain Buffer), CD166 (1:300; BD Pharmingen Stain Buffer), ZO1 (1:300; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, EE.UU.) y Na^+/K^+-ATPasa (1:300; Upstate Biotec, Lake Placid, NY, EE.UU.). Después de lavar con PBS, se usó o bien anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies) o bien anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (Life Technologies) como anticuerpo secundario a una dilución 1:1000. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Las células, cultivadas en una placa de cultivo celular de 48 pocillos, se examinaron directamente mediante microscopía de fluorescencia (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japón).

Análisis de citometría de flujo de las HCEC cultivadas

Las HCEC se recogieron de la placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Las disoluciones de anticuerpos comprendían lo siguiente: mAb anti-CD26 humano conjugado con FITC, mAb anti-CD166 humano conjugado con PE, mAb anti-CD24 humano conjugado con PerCP-Cy5.5, anti-CD44 humano conjugado con PE-Cy7 (todos de BD Biosciences) y anti-CD105 humano conjugado con APC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Resultados

Las variaciones de la composición de subpoblaciones en las cHCEC no determinaron la calidad del cultivo. Se cultivaron HCEC de donantes de edades diferentes de acuerdo con el método de Okumura *et al.* (Okumura N, *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014; 55: 7610-8), y se caracterizó la expresión superficial de CD44, CD166, CD24, CD26 y CD105 (figura 19). Las HCEC representativas se resumen en las figuras 18-20, junto con las imágenes de microscopio de contraste de fase. A primera vista, es bastante evidente que las cHCEC contienen una variedad de subpoblaciones. La razón E definida por la proporción de subpoblaciones CD44-CD166+CD24-CD26-CD105- varió (figura 19). Como se describe en otra parte, la expresión de CD44 disminuyó de acuerdo con la diferenciación de las cHCEC a cHCEC maduras. La presencia de subpoblaciones que expresan o bien CD24 o bien CD26 en algunos cultivos puede indicar la presencia de algunas subpoblaciones con anomalía notable de cariotipo, tal como pérdida de cromosomas sexuales, trisomía o translocación. En este contexto, la mayoría de estas células no son adecuadas para su infusión en entornos clínicos. La proporción de células CD24+ varió hasta el 54,3 %-96,8 % y las de células CD26+ hasta el 44,2 %. Las células que expresan CD44+++ estaban presentes en las razones más altas de más del 80 %. Aunque los fenotipos visibles no eran fibroblásticos, la microscopía de contraste de fase reveló la forma y la monocapa poligonal inhibida por contacto características. Tanto ZO1 como Na^+/K^+-ATPasa que se conocen bien como marcadores de HCEC se tiñeron sorprendentemente para las subpoblaciones CD24+, CD26+ o CD44+++. Esto sugiere una posibilidad de que el juicio morfológico solo pueda no ser suficiente para distinguir subpoblaciones heterogéneas presentes en las cHCEC. Esto llevó a los inventores a reevaluar los protocolos de cultivo para evaluar con precisión los procesos de cultivo en el contexto de la proporción de subpoblación de células efectoras (razón E).

Pueden proporcionarse cHCEC de alta calidad utilizando la señalización de TGF-beta.

Las HCEC cultivadas tienen una inclinación hacia la transición de estado celular (CST) a un fenotipo de senescencia, EMT y una morfología de células fibroblásticas. En vista de las funciones pluripotentes de TGF-beta y su existencia

en humores acuosos, los inventores postularon que TGF-beta puede funcionar interfiriendo con la adquisición de un fenotipo invasivo en la matriz extracelular (ECM). Por el contrario, TGF-beta puede promover y mantener la EMT en una variedad de sistemas biológicos y patológicos. Sin embargo, el mismo factor de crecimiento es la molécula de señalización clave para EMT, y el papel de TGF-beta como molécula clave en el desarrollo y la progresión de EMT está bien estudiado (Wendt MK, *et al.*, Future Oncol 5: 1145-1168). A este respecto, se conjeturó que la funcionalidad de las células endoteliales corneales diferenciadas maduras puede mantenerse o potenciarse manteniendo la señalización de TGF-beta. Por este motivo, el examen de los resultados del cultivo en condiciones libres de inhibidor de la señalización de TGF-beta hizo posible confirmar que se mantiene la funcionalidad de las células dentro de la córnea humana (figura 22-A). Además, las HCEC, cuando se cultivan en un medio complementado con un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC) tricostatina A, puede promoverse la diferenciación en cHCEC maduras (figura 22-D).

La densidad celular de siembra influye en las razones E en cHCEC

Como se muestra en este ejemplo, la calidad de las cHCEC puede monitorizarse principalmente por la razón E y la proporción de células CD44+++. Antes de finalizar el protocolo de cultivo de HCEC hasta la homogeneidad para uso clínico, los inventores investigaron la influencia de la densidad celular de siembra en las razones E y la proporción de células CD44+++. Para llegar a la conclusión correcta, los inventores investigaron tres lotes de cHCEC, de los cuales las razones E eran diferentes, concretamente el 54,0 % (pase de cultivo 2), 77,3 % (pase 1) y 93,4 % (pase 2). En todos los grupos, una mayor densidad celular de siembra conduce a una menor reducción de la razón E en pases posteriores. El grupo con altas razones E antes del cultivo presentó la reducción más baja de las razones E. El grupo con una razón E superior al 90 % mostró un aumento muy brusco en el número de células (concretamente, alta tasa de proliferación) a la densidad celular de siembra de 200 células/mm^2 y alcanzó una densidad celular comparable a la de los grupos que comenzaron a partir de una densidad celular de siembra de 750 y 1000 células/mm^2. Sorprendentemente, la proporción de células CD44+++ de este grupo fue del 0,7 al 24 %, en comparación con la del 1,2 % en el grupo con una densidad de siembra de 750 células/mm^2. Sin embargo, el aumento en la proporción que cambia de CD44- a CD44++ fue prominente en los grupos con una menor densidad celular de siembra.

Protocolo de cultivo para casi homogeneidad de HCEC para uso clínico

Tomadas las observaciones mencionadas anteriormente en conjunto, el protocolo de cultivo para la homogeneidad máxima de HCEC para uso clínico se determinó tentativamente de la siguiente manera. La condición usada fue: la edad del donante está entre las edades de 7 a 29; la densidad celular de siembra después del pase 1 es superior a 400 células/mm^2; y no se inhibe una señalización de TGF-beta (normalmente no se usa un inhibidor). Además, la adición del inhibidor de ROCK Y-27632 se cambió a cada tres días durante todo el período de cultivo para lograr una diferenciación eficiente en la subpoblación CD44. En esta condición de cultivo, Y-27632 indujo drásticamente la diferenciación de las cHCEC a estado maduro con expresión reducida de CD44. Los factores aguas abajo de CD44 incluyen RhoA, la diana de Y-27632. La adición continua de Y-27632 aumentó drásticamente la razón E y redujo la proporción de subpoblaciones CD24+ o CD26+ como se ilustra en las figuras 21, 22B y 22C. Las razones E fueron aproximadamente el 90 % o más altas y las subpoblaciones contaminantes apenas se encontraron en las cHCEC. En estas condiciones, se observaron cHCEC con alta calidad a una alta frecuencia, incluso en el quinto pase o de donantes que tenían de 57 a 71 años.

El análisis de citometría de flujo que identifica células efectoras CD44-CD166+CD133-CD105-CD24-CD26- es un método conveniente y fiable para estandarizar los procedimientos de cultivo. Para garantizar la producción reproducible de cHCEC con razones E superiores al 90 % y sin anomalía de cariotipo, se prefirió que la edad del donante fuera inferior a 29. Las razones E varió mucho de cultivo a cultivo, dependiendo de las condiciones de cultivo tales como la presencia de aditivos tales como un inhibidor de ROCK. También se descubrió que puede mantenerse o potenciarse una funcionalidad endotelial corneal diferenciada madura de mayor calidad utilizando la señalización de TGF-beta. La densidad celular de siembra durante los subcultivos también fue crítica para mantener una alta razón E durante pases prolongados. La presencia continua del inhibidor de ROCK Y-27632 durante todo el periodo de cultivo mejoró adicionalmente la razón E. La presencia del inhibidor de HDAC tricostatina A también mejoró la razón E.

Conclusión: Se determinaron las condiciones de cultivo detalladas para producir de manera reproducible cHCEC con altas razones E para confirmar que pueden proporcionarse cHCEC homogéneas con funciones maduras que son adecuadas para el tratamiento de la disfunción endotelial de la córnea.

Discusión

Los inventores definieron la subpoblación de cHCEC que es CD133, CD105, CD90, CD44, CD26, CD24, HLA-DR, DQ negativo y CD166, HLA-ABC y PD L1 positivo como células efectoras que garantizan una aplicación segura y estable a la medicina regenerativa. Para la producción reproducible de cHCEC con razones E superiores al 90 % y sin anomalía de cariotipo, las condiciones recomendadas son la presencia continua del inhibidor de ROCK Y-27632 durante todo el período de cultivo, la presencia de un inhibidor de HDAC tricostatina A, y sin inhibición de la señalización de TGF-beta.

CD44 contribuye al mantenimiento de las características de células madre, y la contribución funcional de CD44 se

basa en sus habilidades de comunicación con moléculas vecinas, células adyacentes y la matriz circundante (Zoller M. Front Immunol. 2015; 6: 1-25). CD44 es la característica distintiva para distinguir las cHCEC diferenciadas de o bien cHCEC no diferenciadas o bien cHCEC que han experimentado CST. Por lo tanto, la investigación de los factores que regulan los niveles de expresión de CD44 en las cHCEC está profundamente relacionada con la determinación de los protocolos de cultivo para obtener el producto final con una razón E superior al 90 %. Un CD44 multifuncional regula diversas funciones en muchas células, incluido el comportamiento de las células madre, como la autorrenovación y la diferenciación, y detecta cambios en la ECM en respuestas a cambios en las interacciones célula-célula y célula-ECM, tráfico celular, eventos de direccionamiento y transducción de señales, permitiendo respuestas flexibles al entorno tisular (Williams K, *et al.*, Exp Biol Med (Maywood). 2013; 38: 324-38). Los factores de señalización aguas abajo de CD44 incluyen RhoA y MMP 2, que se requieren para la organización del citoesqueleto de tubulina y actina y la formación de pseudópodos celulares (Lin L, *et al.*, Oncol Rep. 2015; 34: 663-72). La pérdida de CD44 conduce a cambios del mismo (Nagano O, *et al.*, Cancer Sci. 2004; 95: 930-935). La supresión de CD44 aumentó el flujo a la respiración mitocondrial e inhibió la entrada en la glucólisis. La activación del eje miARN-34a/CD44 regula los factores aguas abajo de CD44, tales como RhoA y MMP 2 (Lin L, *et al.*, Oncol Rep. 2015; 34: 663-72). Esta ruta de señalización puede, aunque en parte, participar en la reducción de la expresión de CD44 en las cHCEC por Y-27632. Los inventores confirmaron previamente la regulación por incremento de miR29 en paralelo con la de la expresión de CD44 entre subpoblaciones distintas, es decir, este miR fue el más regulado por disminución en las células efectoras con un fenotipo CD44- entre las subpoblaciones de cHCEC. Curiosamente, este miR tiene al parecer el efecto promotor de EMT (Rostas JW 3º, *et al.*, Mol Cancer. 2014; 13:200).

Al comienzo de este ejemplo, las HCEC cultivadas presentaron fenotipos inestables con expresión variable de CD44 y CD24 con CST (figuras 18-20) y niveles elevados de MMP2.

Como se mencionó anteriormente, CD44 también está asociado con la ruta de miR34/RhoA/MMP2. El único miR capaz de distinguir una célula efectora CD44- de las subpoblaciones CD44++ a CD44+++ se identificó como miR34a.

Los protocolos de cultivo detallados para producir de manera reproducible cHCEC con alta proporción de células efectoras se desarrollaron utilizando el índice recientemente desarrollado razón E, permitiendo de ese modo la provisión de cHCEC con funciones maduras para servir como una preparación celular para la terapia de inyección celular para el daño tisular a una célula endotelial corneal debido a distrofia corneal endotelial de Fuchs, traumatismo o intervención quirúrgica.

De acuerdo con los hallazgos obtenidos en relación con el método de fabricación de este ejemplo, una célula proliferativa indiferenciada se diferencia por despolimerización de actina para ser una célula diferenciada madura funcional (célula efectora), y se desdiferencia para ser una célula proliferativa indiferenciada. Mientras tanto, cuando la célula se vuelve fibroblástica o senescente, la célula se convierte en una célula en estado de reposo senescente o célula fibroblástica. Tal célula puede convertirse en una célula endotelial corneal diferenciada madura funcional sometiéndola a cultivo en condiciones en las que una célula que ha experimentado transformación de tipo transición epitelial-mesenquimatosa crece, madura y se diferencia de nuevo.

(Ejemplo 4: Plasticidad metabólica en la homeostasis del estado celular y diferenciación de células endoteliales corneales humana cultivadas)

El propósito de este ejemplo fue aclarar si las cHCEC, heterogéneas en su estado de diferenciación, presentarían un metabolismo energético distintivo, con el objetivo de explorar un método para clasificar correctamente las cHCEC adaptables para la medicina regenerativa.

La presencia de subpoblaciones en cHCEC se investigó en el contexto de la expresión de marcadores de CD de superficie. Se prepararon extractos metabólicos de cHCEC o sobrenadantes de cultivo correspondientes de cHCEC con fenotipos celulares distintivos y se analizaron usando un sistema CE-MS/MS conectado a electroforesis capilar (CE) (HMT, CARCINOSCOPE). Las concentraciones de metabolitos se calcularon normalizando el área pico de cada metabolito con respecto al área del patrón interno y usando curvas patrón.

Materiales y métodos

Donantes de células endoteliales corneales humana

El tejido humano usado en este ejemplo se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron HCEC de 20 córneas de cadáveres humanos y se cultivaron antes de realizar el análisis de cariotipo. Las córneas de donantes humanos se obtuvieron de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron bajo los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido.

La edad de los donantes varió de 2 a 75 años (promedio 43,7 +/- 26,4). Se incluyeron tanto hombres como mujeres. Todas las córneas de los donantes se conservaron en Optisol-GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron

por avión con fines de investigación. De acuerdo con la información de los donantes, todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal y ningún donante tenía antecedentes pasados de anomalía cromosómica.

Cultivos celulares de HCEC

A menos que se indique lo contrario, las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones. Se usaron córneas de donantes humanos a distintas edades para los experimentos. Brevemente, las membranas de Descemet con las CEC se extrajeron de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. El medio acondicionado se preparó como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2, y el medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

Análisis de citometría de flujo de HCEC cultivadas

Las HCEC se recogieron de la placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Evaluación inmunocitoquímica de la expresión de c-Myc

Las HCEC cultivadas en placas de 6 pocillos se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4 % durante 15 minutos, después se lavaron con PBS, seguido de tratamiento con TritonX100 al 0,1 % en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo se llevó a cabo con BSA al 1% en PBS durante 5 minutos y las células se tiñeron con anticuerpo (Ab) de conejo anti-c-Myc (Cell Signaling n.º 5605) a 4 grados C durante la noche. Después de lavar con PBS tres veces, se tiñó con anti-IgG de conejo conjugado con Alexa488 (1:1000, Invitrogen A1 1034) como Ab secundario. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

Análisis de fluorescencia de captación de 2-NBDG

Captación de glucosa por HCEC cultivadas a granel analizadas por citometría de flujo. Brevemente, las cHCEC desprendidas se incubaron con 2NBDG 600 microM durante 5, 10, 30 minutos a 37 grados C, después de reemplazar el medio de cultivo con medio de cultivo fresco con deleción de glucosa durante 15 minutos. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón FACS frío (PBS que contenía BSA al 1 %), se resuspendieron en tampón FACS helado y se sometieron a citometría de flujo. Las muestras se analizaron usando BD FACS Canto II (BD Biosciences) en el intervalo de FITC (filtro paso banda de excitación 490 nm, emisión 525 nm). Se analizó la intensidad de fluorescencia media de diferentes grupos mediante el software BD FACS Diva y se corrigió para la autofluorescencia de células no marcadas.

Privación de glucosa

Las HCEC se cultivaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados.

Se expusieron las HCEC cultivadas, durante diferentes períodos de tiempo, a condiciones de cultivo con agotamiento de glucosa complementadas con y sin lactato (10 mM a menos que se indique lo contrario). Las HCEC expuestas se evaluaron en términos de morfología, marcadores de superficie y expresiones génicas de marcadores funcionales relacionados con HCEC tales como colágeno 4A1, 4A2 y 8A2.

Na^+/K^+-ATPasa

Para evaluar la eliminación parcial de subpoblaciones de cHCEC en cultivos a granel, se realizó la tinción inmunohistoquímica de Na^+/K^+-ATPasa antes y después de la privación de glucosa. Se usó Na^+/K^+-ATPasa como marcador relacionado con la función de las HCEC. Las células se fijaron con metanol helado durante 10 minutos, y después se permeabilizaron con PBS(-) que contenía Triton X- al 0,1 %. Después de bloquear la reactividad no

específica con BSA al 1% en PBS(-) durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizó la tinción de Na^+/K^+-ATPasa con 2 microg/ml de anticuerpos monoclonales frente a Na^+/K^+-ATPasa (Millipore, Temecula, CA, EE.UU.), seguido de Histofine MAX-PO (MULTI) (Nichirei Biosciences, Tokio, Japón). Después de lavar con PBS (-) que contenía Triton X-100 al 0,1 %, las células se revelaron con solución Histofine Simple Stain DAB (Nichirei Biosciences) y se contratiñeron con hematoxilina (Merck, Darmstadt, Alemania). Finalmente, las células se montaron con medio de montaje acuoso Histofine (Nichirei Biosciences) y se observaron bajo un microscopio de campo brillante.

RT-PCR cuantitativa

Se extrajo ARN total de las HCEC cultivadas usando el kit miRNeasy Mini (QIAGEN Strasse1 40724 Hilden Alemania). Se sintetizó el ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad con inhibidor de ARNasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Las reacciones PCR se realizaron usando la mezcla maestra avanzada rápida TaqMan (Applied Biosystems) y ensayos de expresión génica TaqMan, en catálogo (Applied Biosystems), en las siguientes condiciones. Cada secuencia usada era una secuencia que acompañaba a estos productos. Los ID de cebador usados se muestran a continuación:

[Tabla 4]

	ID de ensayo		ID de ensayo		ID de ensayo
MMP1	Hs00899658_m1	CD44	Hs01075862_m1	CDH2	Hs00983056_m1
MMP2	Hs01548727_m1	CD166	Hs00977641_m1	VIM	Hs00185584_m1
MMP4	Hs01128097_m1	CD105	Hs00923996_m1	CDKN1B	Hs01597588_m1
TIMP1	Hs00171558_m1	CD24	Hs03044178_m1	CDKN1C	Hs00175938_m1
BMP2	Hs00154192_m1	COL3A1	Hs00943809_m1	IGFBP3	Hs00365742_g1
SPARK	Hs00234160_m1	COL4A1	Hs00266237_m1	SNAIL1	Hs00195591_m1
TGFβ1	Hs00998133_m1	COL4A2	Hs01098873_m1	SNAIL2	Hs00950344_m1
TGFβ2	Hs00234244_m1	COL8A2	Hs00697025_m1	IL1B	Hs01555410_m1
FN1	Hs00365052_m1			18S	Hs99999901_s1
SERPINB2	Hs01010736_m1				

Se realizaron activación de la enzima a 95 grados C durante 20 segundos, 40 ciclos de desnaturalización a 95 grados C durante 1 segundo y apareamiento/alargamiento a 60 grados C durante 20 segundos. Se usó el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems) para la amplificación y el análisis de PCR.

Los niveles de MMP1, MMP2, MMP4, TIMP1, BMP2, SPARC, TGF-beta1, TGF-beta2, FN1, SERPINB2, CD44, CD166, CD105, CD24, Col3A1, Col4A1, Col4A2, Col8A2, CDH2, VIM, CDKN1B, CDKN1C, IGFBP3, SNAIL1, SNAIL2 e IL1B se normalizaron al de ARNr 18S. Los resultados se presentaron como .delta..delta.Ct (unidades relativas de expresión).

Análisis estadístico

La significación estadística (valor p) de los valores medios para las comparaciones de 2 muestras se determinó mediante la prueba t de Student. La significación estadística para la comparación de múltiples conjuntos de muestras se determinó con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los valores mostrados en los gráficos representan la media +/- EE.

Medición de metabolitos en cHCEC

Se prepararon extractos metabólicos de metabolitos intracelulares a partir de cHCEC cultivando placas de 6 pocillos o placas de 24 pocillos con disolución de patrón interno que contenía metanol (Human Metabolome Technologies; HMT, Inc., Tsuruoka, Japón). El medio se aspiró del pocillo y las células se lavaron dos veces con disolución de manitol al 5 % (1,5 ml primero y luego 0,5 ml para placas de 6 pocillos o 0,3 ml primero y luego 0,1 ml para placas de 24 pocillos). Las células se trataron luego con 600 microlitros (placas de 6 pocillos) o 200 microlitros (placas de 24 pocillos) de metanol y se dejaron reposar durante 30 segundos para inactivar las enzimas. A continuación, el extracto celular se trató con 10 microlitros (placas de 6 pocillos) o 140 microlitros (placas de 24 pocillos) de agua Milli-Q que contenía los patrones internos (H3304-1002, Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Japón) y se dejó en reposo durante otros 30 segundos. El extracto se obtuvo y se centrifugó a 2.300 x g y 4 °C durante 5 minutos y luego toda la capa acuosa superior se filtró por centrifugación a través de un filtro Millipore de punto de corte de 5 kDa a 9.100 x g y 4 °C durante 120 minutos para eliminar las proteínas. El filtrado se concentró por centrifugación y se resuspendió en 50 microlitros de agua Milli-Q para el análisis de CE-MS.

Medición de metabolitos en medio de cultivo

Se mezclaron 20 microlitros de medio y 80 microlitros de agua Milli-Q que contenía los patrones internos (H3304-1002, Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Japón) meticulosamente. La mezcla se filtró por centrifugación a

través de un filtro Millipore de punto de corte de 5 kDa a 9.100 x g y 4 °C durante 120 minutos para eliminar proteínas y macromoléculas. El filtrado se diluyó 5 veces con agua Milli-Q para el análisis de CE-MS.

Análisis de datos del análisis del metaboloma

Se midieron compuestos catiónicos en el modo positivo de CE-TOFMS y se midieron compuestos aniónicos en los modos positivo y negativo de CE-MS/MS de acuerdo con los métodos desarrollados por Soga, *et al* (Soga, D. *et al.*, T. Soga, *et al.*, Anal. Chem. 2002; 74: 2233-2239 Anal. Chem. 2000; 72:1236-1241; T. Soga, *et al.*, J. Proteome Res. 2003; 2: 488-494). Los picos detectados por CE-TOFMS y CE-MS/MS se extrajeron usando software de integración automática (MasterHands, Universidad Keio, Tsuruoka, Japón (M. Sugimoto, *et al.*, Metabolomics, 2009; 6: 78-95) y MassHunter Quantitative Analysis B.04.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU., respectivamente) para obtener información de picos, incluidos m/z, tiempo de migración (MT) y área de pico. Los picos se anotaron con metabolitos supuestos de la base de datos de metabolitos de HMT basándose en sus MT en CE y valores de m/z determinados por TOFMS. El intervalo de tolerancia para la anotación de pico se configuró en +/- 0,5 minutos para MT y +/- 10 ppm para m/z. Además, las concentraciones de metabolitos se calcularon normalizando el área pico de cada metabolito con respecto al área del patrón interno y las curvas patrón, que se obtuvieron mediante calibraciones de tres puntos.

El análisis de grupos jerárquicos (HCA) y el análisis de componentes principales (PCA) se realizaron por software propio de los inventores, PeakStat y SampleStat, respectivamente. Los metabolitos detectados se representaron gráficamente en mapas de rutas metabólicas usando el software VANTED (Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data) (B. H. Junker, *et al.*, BMC Bioinformatics. 2006; 7: 109). Las mediciones del metaboloma se llevaron a cabo a través de un servicio en una instalación de Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Japón.

(Resultados)

Expresión de C-Myc y captación de glucosa por células cultivadas a granel

Las cHCEC cultivados a granel sin agrupar en subpoblaciones se tiñeron inmunocitoquímicamente con anticuerpos anti-c-Myc. La expresión de C-Myc se confirmó en una posición de formas similares a células transformadas morfológicamente en microscopía de contraste de fase (figura 23). Esto indica que, en ciertas condiciones de cultivo, hay al menos dos subpoblaciones con o sin expresión de c-Myc en cHCEC. Considerando el papel de c-Myc en la glucólisis, se investigó la captación de glucosa en cHCEC cultivadas a granel mediante citometría de flujo, y se confirmó la captación considerable en las cHCEC, aunque no se confirmó ninguna diferencia en el grado de captación de glucosa (picos individuales de captación de 2-NBDG en todos los tiempos de incubación) (figura 23). Se ha demostrado que muchos tipos de células captan 2NBDG por un transportador de glucosa. Esto plantea inmediatamente la cuestión de si la privación de glucosa causa la eliminación parcial, pero selectiva de las subpoblaciones de cHCEC en cultivos a granel.

Cambios fenotípicos y morfológicos por privación de glucosa

Para evaluar la eliminación selectiva de subpoblaciones de cHCEC en cultivos a granel, se cultivaron cHCEC en DMEM con privación de glucosa sin FBS en presencia de lactato. La ausencia de FBS estaba destinada a evitar el arrastre de glucosa por FBS. Después de los pases hasta P3 en condiciones normales de cultivo, las células cultivadas se incubaron en DMEM con glutamina, pero sin glucosa, en ausencia o presencia de lactato hasta 10 mM durante 72 horas, a continuación, las cHCEC resultantes se cultivaron adicionalmente a tres pases de dilución distintos (1:3, 1:9, 1:30), en condiciones normales durante 4 semanas. Los cambios morfológicos detectados por microscopía de contraste de fase (figura 24-A) demostraron la eliminación de algunas subpoblaciones en cHCEC, lo que indica la presencia de metabolismo energético glucolítico incluso bajo captación uniforme de glucosa (figura 23). Para evaluar la eliminación parcial de subpoblaciones de cHCEC en cultivos a granel, se realizó la tinción inmunohistoquímica de Na^+/K^+-ATPasa antes y después de la privación de glucosa. Se usó Na^+/K^+-ATPasa como marcador relacionado con la función de las HCEC. La eficacia de la recuperación del efecto de eliminación dependía claramente de la concentración de lactato añadido (figura 24-B). La eliminación parcial de las cHCEC por privación de glucosa también se confirmó con el uso de otro lote de cultivo de HCEC. La privación se realizó en el pase P3 durante 72 horas y seguido de recuperación morfológica durante 4 semanas a dilución 1:3.

Alteración de EMT, genes relacionados con senescencia celular y fibrosis por privación de glucosa

La eliminación selectiva parcial de subpoblaciones de cHCEC por privación de glucosa se confirmó de manera reproducible, independientemente de la diversidad morfológica de unos cultivos a otros, lo que indica la presencia de subpoblaciones distintas en su metabolismo energético glucolítico. Para profundizar en la comprensión de los efectos de eliminación, se extrajeron ARN de las cHCEC previamente sometidas a privación y las sometidas a privación durante 72 horas. Se analizó la expresión de genes relacionados con CST, tales como EMT, senescencia celular y fibrosis, por PCR cuantitativa en tiempo real (figura 25(A-H)). La regulación por incremento más impresionante después de la privación de glucosa estaba asociada con MMP1, MMP2, BMP2 y TGF-beta1, mientras que TGF-beta2

mostró una disminución (figura 25(A-H)).

En el mismo experimento con otras condiciones de cultivo y privación, se confirmó la regulación por incremento para MMP1, MMP2, MMP4, TIMP1, BMP2 y TGF-beta1, mientras que TGF-beta2 mostró una disminución. Por el contrario, la mayoría de los genes asociados con EMT y fibrosis estaban regulados por disminución uniformemente. Los genes regulados por disminución incluyen SPARC, TGF-beta2, IL-1beta, CD44, CD24, CDH2, VIM, SNAIL1, SNAIL2, IGFBP 3, 4, 7 (figura 25(A-H)). Varias isoformas de colágeno también estaban reguladas por disminución (3A1, 4A1, 8A2) y las CDKN1 mostraron una tendencia decreciente.

Agrupamiento de perfiles metabolómicos entre cHCEC heterogéneas

Para identificar variaciones de metabolitos intracelulares entre diferentes cHCEC, se realizó análisis de CE-MS para perfilar los niveles de metabolitos de molécula pequeña. Se analizaron tres lotes de cHCEC (C16P6, C21P3 y 164P1), y se extrajeron proteínas 2 o 3 días después de los cambios de medio a densidades celulares subconfluentes (7,22 X 10^5, 9,85 X 10^5 y 3 X 10^5, respectivamente). El posicionamiento de la señal de metabolitos intracelulares normalizada se representa relativamente en la figura 26-A como análisis de PCA, junto con metabolitos típicos en los componentes PCA1 y 2. El agrupamiento jerárquico (HCA) de las intensidades de metabolitos normalizadas mostró una clara separación entre tres lotes de cHCEC (figura 26-A). Las diferencias morfológicas de estos cHCEC se muestran junto con el análisis de citometría de flujo (figuras 26-E a 26-G). A pesar de las características microscópicas superficialmente similares, el HCA difirió mucho especialmente entre C16, C164 y C21. La distinción por análisis de citometría de flujo coincidió bien con el resultado. No obstante, los perfiles de metabolitos fueron distintos entre C164 y C16, posiblemente debido a la presencia de poblaciones de células CD44+++ en C16 (figura 26-D). Estos resultados de agrupamiento son consecuentes con la posibilidad de que se requiera reprogramación metabólica tanto durante el proceso de diferenciación/maduración como durante la adquisición de CST tal como EMT o fibrosis.

Las razones de lactato/piruvato fueron mayores en C164 que en C16 y C21, y el contenido de GSH, GSSG, así como glutatión total, que son los marcadores del estado redox intracelular, fue drásticamente menor en C16 y C21 en comparación con C164. Los niveles más bajos de GSH en las células transformadas sugieren que se produce reducción de la actividad antioxidante en el proceso de CST.

En resumen, las observaciones sugieren que C16 y C21 son relativamente propensos a usar glucólisis anaerobia que C164, quizás debido a la exposición al estrés celular.

Agrupamiento de perfiles metabolómicos de metabolitos secretados

El objetivo de este ejemplo es proporcionar un modo práctico, no invasivo y sensible para monitorizar la conformidad de la calidad de cHCEC para la terapia regenerativa como un medicamento innovador, en lugar del modo invasivo de seguir los marcadores de CD de superficie. Un estudio exhaustivo de los metabolitos secretores en el medio clasificó con precisión subpoblaciones de cHCEC distintas en los niveles de expresión de antígenos CD44 de superficie. La figura 27 caracteriza los cambios de metabolitos en los medios acondicionados. El agrupamiento jerárquico de perfiles metabolómicos de los medios de cultivo identificó subconjuntos de metabolitos que se correlacionaban con la presencia de CST. Los grupos se dividieron al menos en cuatro subconjuntos de metabolitos: metabolitos que aumentaron en todas las cHCEC (n.° 66, n.º 72, n.º 55); metabolitos que aumentaron principalmente en el n.º 72 y el n.º 55, pero no en el n.° 66; metabolitos que disminuyeron más en el n.º 66; y metabolitos que están presentes más o menos en tres grupos (figura 27-A). Varios compuestos intermedios en sistemas glucolíticos eran más altos en el n.º 72 y el n.º 55 que en el n.º 66, lo que es consecuente con el “efecto Warburg” de aumento de la tasa de glucólisis. El efecto Warburg incluye un aumento de la producción de lactato. De hecho, las razones de lactato/piruvato fueron mayores en el n.° 72 y el n.° 55 que en el n.° 66 (figura 27-B). Cabe destacar que estos tres lotes presentaron buena morfología bajo inspección microscópica, lo que indica la mayor utilidad de un estudio exhaustivo de metabolitos secretores en un medio.

Distinción fina de metabolitos secretados entre cHCEC de calidad controlada sin subpoblaciones CD44+++, CD24+ y/o CD26+

Para validar la utilidad de monitorizar metabolitos extracelulares durante el cultivo de HCEC para la terapia de inyección celular, se analizó un medio de HCEC producido en la condición GMP y sin células CD44+++, CD24+ o CD26+. Se investigaron cuatro cHCEC que diferían en su composición de subpoblaciones en el contexto de la subpoblación CD44- a CD44+ frente a CD44++. De acuerdo con el agrupamiento descrito anteriormente, HCA identificó cuatro subconjuntos de metabolitos como se describió anteriormente (figuras 28-A a 28-E). Los cuatro lotes presentaron un perfil de metabolitos similar, pero C23 presentó una fuerte disposición a OXHOS dependiente de mitocondrias en lugar de glucólisis anaerobia, como se verificó con la producción más baja de lactato, la razón más baja de lactato/piruvato y la producción más alta de compuestos intermedios del ciclo de TCA tales como citrato/isocitrato y cis-aconitato. Curiosamente, el consumo de Gln fue el más alto en C24, mientras que fue el más bajo en C21, lo que indica la posible diferencia en la glutaminólisis en los dos. No hubo grandes diferencias en la distinción en el metabolismo de los aminoácidos y el estado redox. Este resultado sugirió diferencias cuantitativas en los metabolitos secretados entre estos cuatro lotes. En general, los datos refuerzan la conclusión del análisis de

metabolitos secretados. Las alteraciones del metabolismo del ciclo de TCA acompañan a la alta calidad de las cHCEC adecuadas para la terapia celular. Para confirmar la reducción de metabolitos de la glucólisis y la disposición a OXHOS dependiente de mitocondrias en las cHCEC C23 más ideales, los inventores proponen un método simple para monitorizar metabolitos en un medio mediante la razón de citrato/lactato. La figura 28-H son gráficos que muestran las diferencias en las razones de citrato/lactato entre el n.º 66, n.º 55 y n.º 72, diferentes en el contenido de subpoblaciones CD44+++, y aquellas entre C21, C22, C23 y C24, que difieren solo en la proporción de CD44- a CD44+ frente a CD44++. La calidad puede controlarse mediante la razón de citrato con respecto a lactato en sobrenadantes de cultivo de cHCEC.

(Sumario)

Se examinaron HCEC cultivadas en detalle con respecto a los marcadores funcionales relacionados con el metabolismo energético C-Myc y CD44. Para obtener información sobre los mecanismos moleculares subyacentes al cambio de fenotipo, se investigó la propensión de los requisitos metabólicos en cHCEC heterogéneas en subpoblaciones. Se ha revelado que las cHCEC estaban compuestas por subpoblaciones con distintos requisitos metabólicos para el suministro de energía. Los inventores han logrado distinguir subpoblaciones en términos de sus metabolitos secretores, y se encontró que las subpoblaciones con transición de estado celular (CST) presentaban la disposición a la glucólisis anaerobia, en lugar de la fosforilación oxidativa dependiente de mitocondrias. Esto abre el camino por primera vez para monitorizar la disposición de las cHCEC en su metabolismo energético, conduciendo a una medicina regenerativa segura y estable usando cHCEC definidas metabólicamente en forma de una suspensión celular.

(Conclusiones)

Los resultados de este estudio revelaron la existencia de subpoblaciones en cHCEC con metabolismos energéticos distintivos, y proporcionan la posibilidad de establecer condiciones de cultivo eficaces para expandir selectivamente cHCEC maduras con formas de adoquín, dispuestas a la fosforilación oxidativa dependiente de mitocondrias.

Dado que las HCEC pueden hacerse crecer en cultivo, se ha explorado ampliamente la terapia de infusión celular con cHCEC para tratar la disfunción endotelial de la córnea. Como indican varios grupos, las células cultivadas generalmente tienen un riesgo de cambios de cariotipo (Miyai T, *et al.*, Mol Vis. 2008; 14: 942-50). Uno de los obstáculos más notables contra la aplicación de cHCEC a la terapia celular es el método para validar la calidad celular de las cHCEC. En este ejemplo, los inventores han logrado proporcionar un candidato para monitorizar de manera no invasiva la calidad celular en lugar de un método invasivo para rastrear marcadores de CD de superficie. El estudio exhaustivo de los metabolitos secretados en medio de cultivo identificó con precisión subpoblaciones de cHCEC distintas en los niveles de expresión de antígenos CD44 de superficie.

La transición del metabolismo oxidativo, típica de tejidos somáticos, a la glucólisis es un requisito previo para la reprogramación al estado pluripotente. Por el contrario, la redirección de la pluripotencia hacia linajes definidos requiere la biogénesis mitocondrial y la maduración de la generación eficiente de energía oxidativa.

El estado metabólico influye en el estado celular. El efecto Warburg en una célula cancerosa destinada a la glucólisis aerobia es un ejemplo representativo. No obstante, queda por explorar el requisito de reprogramación metabólica específica en la maduración y diferenciación de HCEC. Los hallazgos de los inventores describen por primera vez el cambio profundo de los estados del metabolismo energético entre distintas subpoblaciones en las cHCEC. Las cHCEC con transición de estado celular cambian hacia el metabotipo glucolítico, mientras que las cHCEC diferenciadas se vuelven más dependientes del sistema respiratorio oxidativo de las mitocondrias. La baja producción de lactato y la elevada activación de los niveles de fosforilación en subpoblaciones maduras de cHCEC sugieren la posible aplicación de la metabolómica en el control de la calidad celular y/o la utilidad de la misma como biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y eficacia terapéutica para disfunciones endoteliales de la córnea, tales como distrofia corneal endotelial de Fuchs.

Este ejemplo también proporciona nuevos conocimientos sobre el origen de las guttas en FECD con características cardinales tales como anomalías de las células, coalescencia de múltiples guttas y contorno. Considerando la necesidad de hacer coincidir la producción metabólica con las demandas de la función celular para la integridad del tejido en condiciones homeostáticas y de estrés, la aclaración futura de los orígenes de las guttas con respecto a los cambios metabólicos proporcionará nuevos conocimientos sobre la patogenia de la distrofia corneal de Fuchs (FECD).

En resumen, los datos de los inventores proporcionan un modo de monitorizar la disposición de las cHCEC en su metabolismo energético, lo que conduce a una medicina regenerativa segura y estable mediante cHCEC definidas metabólicamente en forma de una suspensión celular. Al mismo tiempo, los nuevos hallazgos de los inventores, aunque muy preliminares, proporcionar evidencias que pueden vincular la regulación metabólica en el endotelio corneal con el desarrollo de terapias dirigidas más eficientes para tratar pacientes con queratopatía ampollosa incluida FECD.

(Ejemplo 5: Los perfiles de microARN clasifican las características fenotípicas de las células endoteliales

corneales humanas cultivadas)

El objetivo de este ejemplo fue encontrar un modo no invasivo de evaluar e identificar células cultivadas libres de CST adaptables para la terapia celular.

Las variaciones de las cHCEC en su composición de subpoblaciones heterogéneas (SP) se comprobaron en el contexto de sus marcadores de CD de superficie y morfología. Los perfiles de miARN en células cultivadas o sobrenadantes se detectaron mediante 3D-gene (Toray). Los perfiles también se analizaron para detectar tejidos corneales frescos con distintas densidades de células endoteliales (ECD) con o sin gutatta. Para evaluar los resultados de 3D-gene, se llevó a cabo qPCR. Los ARN se extrajeron de las cHCEC transfectadas con miARN seleccionados, y los genes diana se estimaron por matriz de PCR (Qiagen).

(Materiales y métodos)

Donantes de células endoteliales corneales humanas

El tejido humano usado en este ejemplo se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron HCEC de 20 córneas de cadáveres humanos y se cultivaron antes de realizar el análisis de cariotipo. Las córneas de donantes humanos se obtuvieron de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron bajo los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido.

La edad de los donantes varió de 2 a 75 años (promedio 43,7 +/- 26,4). Se incluyeron tanto hombres como mujeres. Todas las córneas de donantes se conservaron en Optisol-GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron por avión con fines de investigación. De acuerdo con la información de los donantes, todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal y ningún donante tenía antecedentes pasados de anomalía cromosómica. Para el análisis de tejidos de endotelio corneal con gutatta, se usaron tejidos con densidad de células endoteliales (ECD) inferior a 2000 células/mm^2 (hasta 380) y se compararon con tejidos en el mismo intervalo de edad.

Cultivos celulares de HCEC

A menos que se describa lo contrario, las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones. Se usaron córneas de donantes humanos a distintas edades para los experimentos. Brevemente, las membranas de Descemet con CEC se extrajeron de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. Se preparó medio acondicionado como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

Microscopía de contraste de fase

Se tomaron imágenes de contraste de fase mediante un sistema de microscopio invertido (CKX41, Olympus, Tokio, Japón).

Para el análisis de distribución del área, las cHCEC se lavaron con PBS (-) tres veces y se obtuvieron imágenes de contraste de fase con un sistema de microscopio BZ X-700 (Keyence, Osaka, Japón). Las distribuciones de área se cuantificaron mediante el software de recuento de células híbridas BZ-H3C (Keyence).

Tinción inmunofluorescente

Las HCEC se cultivaron a una densidad de 1 X 10^5 células/pocillo en una placa de cultivo celular de 24 pocillos recubierta con mezcla de recubrimiento de FNC y se mantuvieron durante 3 a 4 semanas para el análisis de inmunofluorescencia. Las células se fijaron en etanol al 95 % suplementado con ácido acético al 5 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 hora con BSA al 1 %. Las muestras se incubaron durante la noche a las 4 grados C con anticuerpos contra CD73 (1:300; BD Pharmingen Stain Buffer), CD166 (1:300; BD Pharmingen Stain Buffer), ZO-1 (Life Technologies) y Na^+/K^+-ATPasa (Milford, MA, EE.UU.). Después de lavar con PBS, se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies) o anticuerpo de

cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (Life Technologies) como anticuerpo secundario a una dilución 1:1000. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Las células, cultivadas en una placa de cultivo celular de 48 pocillos, se examinaron directamente mediante un microscopio de fluorescencia (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japón).

Análisis de citometría de flujo de HCEC cultivadas

Se recogieron HCEC de una placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Las disoluciones de anticuerpos contenían lo siguiente: mAb anti-CD26 humano conjugado con FITC, mAb anti-CD166 humano conjugado con PE, mAb anti-CD24 humano conjugado con PerCP-Cy5.5, anti-CD44 humano conjugado con PE-Cy7 (todos de BD Biosciences), CD105 conjugado con APC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Análisis de micromatrices (3D-Gen)

Extracción de microARN:

Se obtuvieron tejidos endoteliales corneales y tejidos epiteliales después de la extracción de las córneas de donantes, y se almacenaron en reactivo de lisis QIAzol (QIAGENstrasse1 40724 Hilden Alemania) a -80 grados C hasta la extracción de ARN total. Se extrajo ARN total usando el kit miRNeasy Mini (QIAGEN). La calidad de los ARN totales purificados se analizó mediante un instrumento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif., EE.UU.).

Perfil de expresión de microARN

Los inventores utilizaron chips de microARN humano 3D-Gene™ de Toray (miRBase versión 17-19) para el perfil de expresión de microARN. Uno era de 250 ng-500 ng de ARN total derivado de muestras de tejido y células marcadas con kits de marcaje de potencia de microARN miRCURY LNA™ (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca), el otro era todo el miARN derivado de 400 microlitros de sobrenadante que se marcó. Los microARN marcados se hibridaron individualmente en la superficie de los chips de microARN, y se incubaron a 32 grados C durante 16 horas. Los chips de microARN lavados y secos en un entorno sin ozono se escanearon usando un escáner 3D-Gene 3000 (Toray Industries Inc., Tokio, JAPÓN) y se analizaron usando el software 3D-Gene Extraction (Toray). Cada secuencia usada era una secuencia que acompañaba a estos productos.

Procesamiento de datos estandarizados

Las señales fluorescentes digitalizadas proporcionadas por el software se consideraron datos sin procesar. Todos los datos estandarizados se estandarizaron globalmente por micromatriz, de modo que la mediana de la intensidad de fluorescencia se ajustó a 25. En un caso donde un gráfico de barras de tejido, CHCEC y sobrenadante, los niveles estandarizados se ajustaron para que coincidieran con el valor 100 del rango más alto.

Matriz de PCR

Se extrajo ARN total de las HCEC cultivadas utilizando el kit miRNeasy Mini (QIAGEN Strasse1 40724 Hilden Alemania). La síntesis de ADNc se realizó en 100 ng de ARN total para un formato de placa de 96 pocillos usando el kit RT^2 First Strand (Qiagen). La expresión de ARNm endoteliales se investigó usando la matriz de PCR RT^2 Profiler (matriz extracelular humana y moléculas de adhesión, ruta de señalización de p53 humana, fibrosis humana, senescencia celular humana y transición epitelial a mesenquimatosa humana (EMT) (Qiagen) y se analizó usando la herramienta de análisis de datos de matriz de PCR RT^2 Profiler versión 3.5.

Análisis estadístico

La significación estadística (valor p) de los valores medios para las comparaciones de 2 muestras se determinó mediante la prueba t de Student. La significación estadística para la comparación de múltiples conjuntos de muestras se determinó con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los valores mostrados en los gráficos representan la media +/- EE.

(Resultados)

Perfiles de expresión de miR distintos entre cultivos de HCEC

Este ejemplo comentó cultivos mejorados de cHCEC con apenas ninguna EMT notoria. Sin embargo, es difícil distinguir la presencia de una EMT diminutas entre subpoblaciones heterogéneas. En primer lugar, los inventores compararon los perfiles de miR detectados por 3D-gene (Toray) con una subpoblación CD44- (célula efectora) y varias células cultivadas con composición desconocida de subpoblaciones (2911, 3411 y 3511, todas estaban en el pase 1)

(figura 29-B). Hubo una ligera regulación por incremento en la expresión de miR29c y una regulación por disminución en la expresión de miR378 en las últimas subpoblaciones en comparación con las células efectoras. A continuación, la subpoblación CD44- efectora se comparó con células cultivadas 67 con CST evidente (cuyas composiciones de subpoblaciones se representan en las figuras 30-A a 30-C) (figura 29-C). La comparación también reveló una regulación por disminución en la familia de miR378. Esto indica claramente la presencia de al menos dos tipos diferentes de CST en las cHCEC, incluso en ausencia de EMT notoria. La reducción notable de miR378 se confirmó en cultivos distinguibles morfológicamente con poca calidad, y los niveles de expresión de la familia de miR378 fueron comparables entre los cultivos C66 y C11.

Perfiles de expresión de MiR entre subpoblaciones con distintos marcadores de CD

Con el objetivo de revelar la dependencia de los perfiles de expresión de miR de las composiciones de subpoblaciones con distintos niveles de expresión de marcadores de CD tales como CD44, el ARN extraído de las subpoblaciones de cHCEC definidas por FACS (figuras 30-A a 30-C) se sometió a análisis por 3D-gene. Estas tres cHCEC, a5, a1 y a2, contienen subpoblaciones compuestas principalmente por subpoblaciones CD44-CD24-CD26-, CD44++CD24-CD26- y CD44+++CD24-CD26++, respectivamente. De nuevo, los niveles de expresión de la familia de miR378 fueron comparables entre a5 y a1, pero se confirmó una disminución drástica en a2 junto con una expresión elevada de CD44. La figura 31-A ilustra las diferencias en la expresión para cada subpoblación de la familia de miR378 tal como miR378a-3p, 378a-5p y 378f. Además de la familia de miR378, las familias 23, 27, 30, 130 y 181 presentaron una correlación negativa con la expresión de CD44, mientras que las familias 29, 31, 193 y 199 presentaron una correlación positiva. Para aclarar la situación, los cambios se dividieron en cinco clases. En la figura 31-B, la disminución de la expresión de la familia de miR378 en la dirección opuesta de la expresión de CD44 se vuelve gradual con el aumento de CD44, de modo que no puede distinguirse CST entre a5 y a1 (puede distinguirse entre a5 y a2). Lo más adecuado es que los cambios en el nivel de expresión de miR34 entre a5 y a1 sean notables de modo que pueda distinguirse CST entre a5 y a1, aunque no entre a1 y a2.

Solo algunos aspectos de los hallazgos se sometieron a validación adicional. La Q-RT-PCR también demostró la observación de que la familia de miR378 era la más altamente expresada. Al mismo tiempo, miR1246 estaba regulado por disminución en células positivas para CD44, mientras que miR1273 y miR205 estaban regulados por incremento en esas células (datos no mostrados).

Perfiles de expresión de miR distintos en sobrenadantes de cultivo

Los objetivos de este ejemplo fueron encontrar miR en sobrenadantes cultivados que puedan servir como herramienta alternativa para identificar de manera no invasiva subpoblaciones de cHCEC, adaptables para terapia celular. Usando las mismas tres cHCEC anteriores (es decir, a5, a1 y a2), se extrajeron ARN de los sobrenadantes de cultivo correspondientes y se sometieron a análisis de 3D-gene. Se seleccionaron muchos miR y los patrones de cambios se dividieron en 6 categorías. Entre ellos, se representan patrones con una tendencia característica en la figura 33(A-B).

A diferencia de los resultados de las cHCEC, miR184 disminuyó gradualmente como en la familia de miR378 en las células, de manera inversa con la expresión de CD44. MiR24-3p/1273e fue capaz de distinguir a5 y a1 de a2, como en las familias de miR 23, 27 y 181 en células, por su disminución en a2. También hubo cuatro miR que pueden distinguir a5 y a1 de a2, por su aumento en a2, en marcado contraste con miR24-3p/1273e.

Tejido endotelial corneal con gutatta y miR378 y 146

Considerando la similitud entre CST *in vitro* tal como EMT, senescencia celular y fibrosis, los inventores compararon entonces los perfiles de miR en tejidos de endotelio corneal frescos. Los gráficos de dispersión de los perfiles de expresión de miR entre tejidos con niveles normales de ECD con los de ECD378 demostraron la regulación por incremento de la familia de miR 378 más en el tejido del endotelio corneal que en los tejidos del epitelio corneal (datos no mostrados), pero una disminución drástica en los tejidos con baja ECD que acompañan a la gutatta avanzada. Por el contrario, miR146b-5p con un alto nivel de expresión más alto que la familia de miR378 no se redujo. La regulación por incremento de la familia de miR378 fue comparable entre tejidos endoteliales y epiteliales de la córnea. Cabe destacar que la familia también estaba notablemente regulada por incremento durante el cultivo y se observó la expresión más alta en la subpoblación de células efectoras negativas para CD44 (figura 34(A-G)).

Se sometieron varios miR a validación adicional de los hallazgos anteriores. La Q-RT-PCR también demostró que la expresión de la familia de miR378 (a-3p, e y f) se suprimió uniformemente en tejidos con ECD 795 y 1410 (en este momento, sin ARN del tejido con ECD 378 disponible), mientras que miR 200c, 205 y 124-5p estaban regulados por incremento en esas células.

Objetivo candidato de miR378

Finalmente, los inventores realizaron una transfección preliminar de miméticos de miR378a-3p o 5f en una subpoblación de cHCEC CD44+++, donde no se detectó la expresión de los mismos. Las células provocaron la firma génica de la clase de moléculas de adhesión y ECM como se muestra en la figura 35-C. Las células presentaron

regulación por incremento en muchas firmas génicas de familias de colágeno, ITG y MMP, así como CD44. La figura 35-C muestra mapas de calor de las firmas génicas después de la transfección de dos miméticos de miR, tal como se sometió a ensayo por matrices de PCR de senescencia, EMT, fibrosis, p53 y EMA. Algunos de los genes tales como CCNF, TWIS1 y GADD45 estaban regulados por incremento en la matriz de senescencia. Muchos genes mostraron firmas distintas en la matriz de PCR de p53 después de la transducción, así como regulación por disminución por un mimético de miR378f de TCF4, TCF3, TGF-beta2, TGF-beta3 y SOX10i en la matriz de EMT. La transfección de miR146 además de la familia de miR378 puede añadir información complementaria a la patogenia de BK, incluida FECD.

(Sumario)

Los perfiles de expresión de miARN entre una variedad de cHCEC morfológicamente diferentes revelaron una clara distinción entre ellos. El miR34a se identificó como miR capaz de distinguir una subpoblación CD44- de subpoblaciones con fenotipos CD44++ a CD44+++. La regulación por disminución de los miR en la familia 378 fue paralela a la regulación por incremento de CD44 de superficie en cHCEC. Curiosamente, los miR regulados por incremento en la familia 378 en el endotelio corneal disminuyeron drásticamente en los tejidos con ECD inferior con gutatta avanzada, proporcionando nueva información sobre la patogenia de la distrofia corneal endotelial de Fuchs (FECD).

(Conclusiones)

Se demostró que las subpoblaciones cultivadas identificadas que comparten los fenotipos de superficie CD44- con HCEC maduras presentaban la expresión más alta de miR378. Por el contrario, las subpoblaciones con CD44+++ regulado por incremento presentaron una reducción en miR378. Por lo tanto, el miARN en células cultivadas o sobrenadantes puede servir como una herramienta alternativa para identificar cHCEC cultivadas.

La expansión de cHCEC a partir de un endotelio corneal de donante podría proporcionar una herramienta pragmática para la terapia celular de cHCEC. Las cHCEC expandidas en un sistema de cultivo *in vitro* pueden ser una mezcla de subpoblaciones con CST distinta. Una célula cultivada tiende a cambiar los cariotipos. Por lo tanto, las cHCEC deben monitorizarse cuidadosamente con respecto a su calidad y pureza en el contexto de una composición de subpoblaciones heterogénea desde el punto de vista de los entornos clínicos, donde la seguridad debe garantizarse estrictamente.

No solo las variaciones morfológicas de las células cultivadas, sino la composición de las subpoblaciones de cHCEC clasificadas por marcadores de CD varió mucho, incluso con aspectos morfológicos similares, de unos cultivos a otros. El análisis combinado de marcadores de CD identificó claramente la subpoblación (células efectoras) adaptable para la terapia celular entre diversas subpoblaciones. Los inventores propusieron un método para cuantificar la proporción de subpoblación efectora en cultivos (razón E) como se describe en el presente documento. Los inventores descubrieron que la subpoblación con CD133, CD105, CD90, CD44, CD26, CD24, HLA-DR negativo y CD166, HLA-ABC y PD-L1 positivo son células funcionales, que están completamente libres de aneuploidía de cariotipo y tienen un perfil de marcadores de CD consecuente con el de las HCEC en tejidos corneales frescos.

La plasticidad debida a conversiones morfológicas y fenotípicas, tales como la expresión de marcadores mesenquimatosos y la pérdida de marcadores epiteliales, se denomina colectivamente EMT. Las HCEC cultivadas tienen una inclinación hacia CST en EMT. Numerosos miARN estaban implicados en la EMT (familias de miR-200, miR-34 y miR-203). En la comparación de cultivos distintos que se muestra en la figura 29-A, no se detectó ningún cambio evidente en estos miR relacionados con EMT, de acuerdo con el criterio de los inventores de que las condiciones de cultivo en este ejemplo excluyen tal EMT notoria. Sin embargo, como se resume en la tabla 5, muchos de la familia de miR378 estaban claramente regulados por disminución en cultivos con subpoblaciones heterogéneas o bajas razones E.

[Tabla 5]

Perfiles de expresión de la familia de miR378

Nombre	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	66-1	66-2	66-3	C13	C14	C15	C11-1	C11-2
miR-378*	0,1	9,5	0,1	6,4	0,1	10,8	8,0	0,1	7,1	26,2	20,6	37,2	0,1	16,7	12,0	25,7	29,6
miR378	22,9	27,0	67,8	32,1	17,6	212,9	153,3	60,7	26,6	733,0	656,2	710,0	75,6	85,4	139,2	425,1	481,7
miR-378b	0,1	13,1	10,4	9,1	0,1	12,3	10,2	12,0	15,6	30,0	17,4	25,6	9,2	18,0	22,6	18,6	39,7
miR-378c	0,1	12,4	30,2	0,1	0,1	115,9	69,3	30,9	47,7	443,2	384,9	413,2	50,5	47,7	73,2	268,6	288,2
miR-378d	0,1	8,0	26,9	9,9	6,9	113,8	65,8	37,0	9,9	407,1	321,9	336,6	49,5	47,4	84,5	245,7	237,4
miR-378e	8,6	11,2	26,7	13,4	0,1	108,1	59,2	28,0	0,1	267,0	207,7	212,3	25,5	32,8	63,5	153,5	152,9
miR378f	8,4	9,5	24,3	10,0	0,1	119,5	72,7	29,4	11,5	411,6	319,8	340,8	36,1	50,8	66,6	259,1	218,8
miR-378g	17,4	13,9	29,9	6,8	8,6	114,5	65,3	28,9	17,1	292,5	237,8	234,7	32,2	42,3	53,4	173,7	157,6
miR-378h	0,1	0,1	0,1	0,1	7,0	9,4	0,1	5,9	10,2	17,3	8,2	0,1	0,1	10,3	13,1	14,6	0,1
miR-378i	13,2	13,7	27,9	13,9	16,4	154,2	105,2	38,4	8,2	552,5	460,0	521,2	44,7	104,8	110,4	349,5	326,9
miR-422a	24,1	40,2	49,9	30,4	30,9	207,0	108,6	69,8	104,5	656,1	473,4	530,2	94,2	142,1	140,0	421,5	424,2
miR-130a	432,9	682,6	923,4	693,0	777,5	1342,6	1322,6	1281,2	523,1	8557,8	7834,0	8032,3	1391,5	1946,3	2477,1	2637,1	2468,6

En tejidos de HCE frescos, se observaron características de contraste de las firmas de miR. Los miR relacionados con la EMT estaban regulados por incremento en tejidos de HCE con baja ECD, como fue el caso para miR146 (también regulado por incremento en tejidos con gutatta avanzada). La familia de miR378 estaba regulada por disminución en cultivos con bajas razones E (figura 34), en un informe reciente (Bracken CP, *et al.*, Cancer Res. 2015; 75: 2594-9).

miR-146a afecta a las proteínas estructurales de la ECM importantes en el ensamblaje, la composición y la organización de la ECM.

miR-378 realiza un cambio metabólico que conduce a una reducción en la expresión génica del ciclo del ácido

tricarboxílico (TCA) y un aumento en la producción de lactato. CD44 es el sello distintivo para distinguir las cHCEC diferenciadas de las cHCEC que o bien no están diferenciadas o bien tienen CST por razones E. La supresión de CD44 aumentó el flujo metabólico a la respiración mitocondrial e inhibió al mismo tiempo la entrada en un sistema glucolítico. Tal reprogramación metabólica inducida por la supresión de CD44 dio como resultado un notable agotamiento del glutatión reducido intracelular (Tamada M, *et al.*, Cancer Res. 2012; 72: 1438-48).

Cabe destacar que miR34a se identificó como miR capaz de distinguir las células efectoras CD44- de las subpoblaciones CD44++ a CD44+++ (figura 31-B). El eje miR-34a/CD44 activa los factores aguas abajo de CD44 incluidos RhoA y MMP-2 (Lin L, *et al.*, Oncol Rep. 2015; 34: 663-72). En 2007, varios grupos identificaron los miembros de la familia miR-34 como los miARN inducidos por p53 más prevalentes. Actualmente, los miembros de la familia miR-34 se reconocen como mediadores importantes de la supresión del cáncer (He L, *et al.*, Nat Rev Cancer. 2007; 7:819-22). Esto es consecuente con los resultados descritos anteriormente en el ejemplo 2 donde solo la subpoblación efectora CD44- presentó la ausencia de anomalía de cariotipo.

La familia de miR378 presentó una disminución gradual en paralelo con disminuciones en la expresión de CD44 (figura 31-B). Se sabe que miR-378 desempeña un papel en la homeostasis energética mitocondrial (Eichner LJ, P. *et al.*, Cell Metab. 2010; 12: 352-361l; Carrer M, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109: 15330-15335). Esto indica inmediatamente que el cambio de metabolismo oxidativo aerobio a metabolismo glucolítico es un rasgo característico de algunas CST en cHCEC (véase el ejemplo 4). El piruvato se procesa mediante un ciclo de TCA a través de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Las razones de citrato/lactato pueden distinguir células efectoras CD44- no solo de CD44+++ sino también de subpoblaciones CD44++ con ligera CST (véase el ejemplo 4).

También se ha demostrado que varios microARN (miARN) incluidos miR-378a-5p están implicados en la senescencia mientras se dirigen a la ruta de p53. La inducción de senescencia podría proporcionar posibilidades adicionales del mecanismo para que miR-378a-5p esté implicado en la regulación de CST en las cHCEC.

Las siguientes conclusiones pueden extraerse de este ejemplo con respecto a las opciones terapéuticas para BK o FECD. La remodelación del tejido bajo estrés crónico parece que resulta, aunque en parte, de la regulación por disminución de miR-378 y la regulación por incremento de la familia de miR200 que regula la EMT. Por lo tanto, una adaptación insuficiente al estrés tisular puede ser una manifestación de la progresión de la patogenia controlada por estos miR.

Este ejemplo demostró que las cHCEC presentaban expresiones desreguladas de una jerarquía de grupos de miR, probablemente debido a la presencia de CST y senescencia. Las isoformas de miR378 estaban reguladas por disminución y las isoformas de miR146, en cambio, estaban reguladas por incremento en tejidos frescos de endotelio corneal con baja ECD, así como con gutatta. Los perfiles de miR detectados en el medio fueron distintos de los de las cHCEC. El ensayo de los miR secretados en el medio pudo distinguir claramente cHCEC CD44+++ con transición de estado celular de las células efectoras negativas para CD44 por miR34a. Sin embargo, el perfil de los miR en el medio no pudo distinguir las células progenitoras indiferenciadas de las células efectoras, de modo que el problema debe trasladarse a estudios futuros. Además del propósito práctico, los nuevos hallazgos presentados en el presente documento justifican una investigación adicional para desarrollar una mejor comprensión del papel de la expresión desregulada de miR en la patogenia de BK y FECD.

La regulación por incremento de miR29 en subpoblaciones de cHCEC con CST también es notable con respecto al reciente informe que describe su papel en el efecto promotor de EMT a través de la señalización de Wnt/beta-catenina (Rostas JW 3rd, *et al.*, Mol Cancer. 2014; 13:20031). Los detalles de la regulación por disminución de TCF4 y otros por una subpoblación de cHCEC miR378f CD44+++ con EMT se describen en el presente documento en otros ejemplos o similares.

(miARN adicionales)

Lo siguiente se reveló adicionalmente como resultado de un experimento similar al anterior para otros miARN.

(C) a5:a1:a2 presenta alta expresión: baja expresión: baja expresión:

(secretado por células) miR4419b, miR371b-5p, miR135a-3p, miR3131, miR296-3p, miR920, miR6501-3p;

(F) a5:a1:a2 presenta alta expresión: baja expresión: alta expresión:

(secretado por células) miR92b-5p; y

(G) a5:a1:a2 presenta baja expresión: alta expresión: baja expresión:

(secretado por células) miR1246, miR4732-5p, miR23b-3p, miR23a-3p, miR1285-3p, miR5096

Los resultados anteriores se muestran en la figura 35-D. Los diferentes patrones de expresión de miR secretado para

cada subpoblación celular se clasificaron en 6 categorías.

Nivel de expresión de CD44 y perfil de miR

Aunque los cultivos de cHCEC preparados mediante un método conocido tenían la mayoría de las EMT evidentes eliminadas en este ejemplo, se mantuvieron las formas senescentes. Para eliminar la interferencia por cHCEC senescentes, se añadió un inhibidor de proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK), SB203580, a todo el cultivo para controlar las CST senescentes. Bajo tal protocolo de cultivo, los inventores obtuvieron con éxito los cultivos a5, a1 y a2, que no tenía ninguna forma senescente a primera vista. Curiosamente, eran heterogéneos con respecto a la expresión de CD44, CD24 y CD26 en la superficie (figura 35-E). Tales cHCEC se usaron para extraer ARN del sobrenadante de cultivo correspondiente. Se identificaron miR (miR de 23a-3p, 184, 1260a, 3130-3p, 23b-3p, 135a-3p, 1246, 3131, 24-3p, 296-3p, 1290, 4419b, 92a-2-5p, 371b-5p, 6501-3p y 920) que presentan expresiones diferentes entre tales cHCEC (es decir, a5, a1, y a2) usando un gráfico de volcán (figura 35-E).

Además, se identificaron miR de 92b-5p, 1273e, 1285-3p, 4732-5p, 221-3p, 1273f, 1915-3p, 4745-5p, 1246, 1273g-3p, 1972, 4792, 3937 y 5096 en cultivo sobrenadante de células de alta calidad (células efectoras) entre células que se distinguen por el estándar de la calidad de la forma. Por lo tanto, tales miR son candidatos para miR secretados usados en la determinación de la calidad de células no invasivas.

El análisis de miR en sobrenadante de cultivo de subpoblaciones (efectora, subcalificada, CD44+++) por 3D-GEne identificó miR de 23a-3p, 184, 1260a, 3130-3p, 23b-3p, 135a-3p, 1246, 3131, 24-3p, 296-3p, 1290, 4419b, 92a-2-5p, 371b-5p, 6501-3p y 920 como miR que presentan patrones de expresión diferentes entre dichas subpoblaciones. Por lo tanto, tales miR son candidatos para miR secretados usados para distinguir la calidad de células no invasivas.

(Ejemplo 6: Diferentes propiedades de unión de subpoblaciones de células endoteliales corneales humanas cultivadas a componentes de la membrana de Descemet)

Para aclarar las propiedades adherentes de estas subpoblaciones (SP), este ejemplo comparó las capacidades de unión de las subpoblaciones de HCEC cultivadas a los principales componentes de la membrana de Descemet que se distribuyen en la superficie endotelial (es decir, laminina-511, -411, colágeno de tipo IV y proteoglicanos).

En este ejemplo, cada subpoblación se preparó controlando las condiciones de cultivo o usando separación magnética de células, y luego se examinó mediante tinción con varios marcadores de superficie celular. Para someter a prueba las capacidades de unión de las subpoblaciones de HCEC, las células se añadieron a placas de cultivo de 96 pocillos inmovilizadas con colágenos, lamininas o proteoglicanos, y las placas se centrifugaron después. Las células unidas se evaluaron luego bajo un microscopio de contraste de fase.

(Materiales y métodos)

Donadores de células endoteliales corneales humanas

El tejido humano usado en este ejemplo se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron córneas de donantes humanos de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron bajo los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido. Todas las córneas de donantes se conservaron en Optisol GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron por avión con fines de investigación. La información de los donantes mostró que todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal.

Cultivos celulares de células endoteliales corneales humanas

A menos que se indique lo contrario, las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones. Se usaron un total de 30 córneas de donantes humanos para los experimentos. Brevemente, las membranas de Descemet con CEC se extrajeron de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. El medio acondicionado se preparó como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia.

Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

El ensayo de unión celular

Se sometió a prueba la unión celular a lamininas, colágeno de tipo I, proteoglicanos y glicoproteína mediante el ensayo de unión celular por centrifugación descrito anteriormente (Friedlander *et al.*, 1998. J. Cell Biol. 107: p2329) con algunas modificaciones. Se adquirieron laminina-521, -511, -411 y -332 de Veritas (Tokio, Japón). Se adquirieron perlecano, agrina, nidógeno-1, TSP-1 y fibulina 5 se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN). Se adquirió colágeno de tipo IV de BD Biosciences (San José, CA, EE.UU.).

Cada pocillo de una placa Maxisorp de 96 pocillos en forma de U (Nunc) se recubrió con 40 microlitros de disolución de laminina, colágeno, proteoglicano o glicoproteína durante la noche a 4 grados Celsius. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS (-) y se bloquearon con BSA al 1 % en $NaHCO_3$ 0,1 M (pH 8,0) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las HCEC cultivadas se suspendieron en Opti-MEM, Opeguard-MA (Senju Pharmaceutical, Osaka, Japón) o BSS-Plus (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, EE.UU.) a una concentración de 1 X 10^5 células/ml, y se añadieron 0,1 ml de la suspensión celular a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos. Después, la placa se centrifugó a 200 x g durante 2 minutos. Las imágenes de la pila Z de campo brillante se capturaron mediante un microscopio BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japón) con un aumento del objetivo de 2x y se crearon imágenes omnifocales a partir de estas imágenes usando el software BZ-II Analyzer. De acuerdo con la descripción de Friedlander *et al.* (Friedlander *et al.*, 1998. J. Cell Biol. 107: p2329), las células se centrifugaron dando un sedimento en el fondo del pocillo sobre sustratos no adhesivos. A medida que aumenta la adhesividad del sustrato, más células se unen a los sustratos a lo largo de la pared del pocillo. La unión al sustrato se detecta en un área circular con un diámetro medible en el fondo o el pocillo. En sustratos fuertemente adhesivos, las células se distribuyeron más o menos uniformemente en el pocillo (Grumet M, Flacucus A, y Margolis RU. J. Cell Biol. 1993; 120:815-824).

Tinción inmunofluorescente

Las HCEC se cultivaron a una densidad de 1 X 10^5 células/pocillo en una placa de cultivo celular de 24 pocillos recubierta con colágeno de tipo I y se mantuvieron durante 3 a 4 semanas para el análisis de inmunofluorescencia. Las células se fijaron en metanol helado durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 hora con BSA al 1%. Las muestras se incubaron durante la noche a 4 grados C con anticuerpos contra ZO-1 (Life Technologies) y Na^+/K^+-ATPasa (Milford, MA, EE.UU.). Después de lavar con PBS(-), se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies) o anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (Life Technologies) como anticuerpo secundario a una dilución 1:1000. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Las células, cultivadas en una placa de cultivo celular de 48 pocillos, se examinaron directamente mediante un microscopio de fluorescencia (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japón).

Análisis de citometría de flujo de HCEC cultivadas

Las HCEC se recogieron de una placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de solución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Aislamiento de subpoblaciones de HCEC por MACS

Las HCEC se desprendieron con TrypLE Select como se describió anteriormente y se aisló una subpoblación de HCEC $CD44^-$ (subpoblación efectora) usando microperlas anti-CD44 humano y el programa depl05 de un separador autoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La pureza de la subpoblación efectora aislada era superior al 95 % en todos los casos como se demostró por citometría de flujo.

(Resultados)

Las HCEC cultivadas se unieron más fuertemente a laminina-511 que a laminina-411 y -332. En la terapia de inyección celular, una de las etapas importantes para la eficacia terapéutica es la unión de las HCEC a la membrana de Descemet. La membrana de Descemet está compuesta principalmente por colágenos de tipo IV, lamininas, fibronectinas y proteoglicanos/glicoproteínas [Fitch *et al.*, 2014., 1990 y Suda *et al.*, 1981] (tabla 6) (Weller JM, Zenel M, Schlotzer-Schrehardt U, Bachmann OB, Tourtas T, Kruse FE. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014; 55: 3700-3708).

[Tabla 6]

	Membrana de Descemet	
	Cara estromal	Cara endotelial
Cadenas de colágeno de tipo IV	a1, a2	a3-a6
Cadenas de laminina	Ninguna	a4, a5, b1, g1
Isoformas de laminina posibles	Ninguna	411, 511

Nidógeno-1/entactina-1	-	+
Nidógeno-2/entactina-2	-	+
Perlecano	-	+
Netrina-4/b-netrina	-	+
Matrilina-4	-	±†
Colágeno de tipo VIII	+	-
Colágeno de tipo XII	-	+ (Forma corta)
SPARC/BM-40/osteonectina	±	-
Colágeno de tipo XVIII	-	±
Trombospondina-1	-	+
Fibronectina	+	-
Vitronectina	+	-

La intensidad de expresión es la siguiente, -, falta de tinción; ±, tinción débil en algunos casos, +, tinción distinta en la mayoría o todos los casos, † Algunos casos fueron negativos.

Por lo tanto, este ejemplo sometió a prueba las capacidades de unión de las HCEC a los componentes de la membrana de Descemet enumerados en la tabla 6. Como método para evaluar la capacidad de unión de las HCEC, este ejemplo realizó un ensayo de unión celular por centrifugación [Friedlander *et al.*, 1998. J. Cell Biol. 107: p2329] con alguna modificación (figura 36). Las HCEC cultivadas se desprendieron de las placas de cultivo como se describe en (Materiales y métodos) y la suspensión celular se preparó a una concentración de 1 X 10^5 células/ml. Se añadieron 100 microl de la suspensión celular a cada pocillo de las placas de 96 pocillos con fondo en U recubiertas con laminina-511, laminina-411, colágeno de tipo IV u otros componentes de la membrana de Descemet enumerados en la tabla 6. La placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 200 x g durante 2 minutos. Las células unidas se evaluaron bajo un sistema de microscopio BZ-9000 como se describe en (Materiales y métodos).

Como se muestra en la figura 37, las HCEC se distribuyeron uniformemente en el fondo de los pocillos recubiertos con laminina-521 o -511, mientras que las HCEC formaron sedimentos en el fondo de los pocillos recubiertos con BSA de control negativo. En los pocillos recubiertos con laminina-411 o -332, las HCEC formaron un sedimento circular. Estos resultados sugieren que las HCEC se unieron más fuertemente a la laminina-521 y -511 que a la laminina-411 y -332.

Este ejemplo comparó adicionalmente la capacidad de unión de las HCEC cultivadas a laminina-521 y a la laminina-511 disminuyendo la concentración de recubrimiento de lamininas. Como se muestra en la figura 38, las HCEC cultivadas se unieron a la laminina-521 y -511 de una manera dependiente de la concentración, pero no se observaron diferencias claramente entre la laminina-521 y -511.

HCEC cultivadas unidas a colágeno de tipo IV

A continuación, los inventores examinaron la unión de HCEC cultivadas al colágeno de tipo IV. Se realizó un ensayo de unión por centrifugación de manera similar con placas recubiertas de colágeno de tipo IV. Como se muestra en la figura 39, las HCEC cultivadas se unieron a colágeno de tipo IV de una manera dependiente de la concentración.

HCEC cultivadas débilmente unidas a agrina, TSP-1 y perlecano

Este ejemplo también examinó la unión de HCEC cultivadas a proteoglicano/glucoproteínas que se notificó que existen en la membrana de Descemet (es decir, agrina, nidógeno-1, fibulina 5, TSP-1 y perlecano). No se observó unión cuando las concentraciones de recubrimiento de estos proteoglicanos/glucoproteínas fueron las mismas 5 nM que en la figura 37 (datos no mostrados), pero se observó unión a agrina, TSP-1 y perlecano a concentraciones de recubrimiento de aproximadamente 400 nM (figura 40). Estos resultados muestran que las HCEC cultivadas se unen a estos componentes, pero con una afinidad considerablemente menor que a las lamininas.

Influencia del vehículo de infusión de suspensión celular sobre la unión de HCEC cultivadas

En terapia de inyección celular, la elección del vehículo de infusión de suspensión celular es crítica. Por lo tanto, los inventores compararon el efecto de vehículos de infusión de suspensión celular sobre la unión de HCEC a componentes de la membrana de Descemet. Como vehículo de infusión de suspensión celular, se seleccionaron Opti-MEM, Opeguard-MA y BSS Plus. Opti-MEM (usado en las figuras 37-40) es el medio base del cultivo de HCEC. Opeguard-MA y BSS Plus son disoluciones de irrigación intraocular usadas en rutinas clínicas. El componente de la membrana de Descemet usado fue laminina-411, debido a que la laminina 411, con alta afinidad por las cHCEC, se considera más fácilmente detectable que la laminina-511. Tanto para Opti-MEM como para Opeguard-MA, las HCEC se unieron a la laminina-411, pero no se observó unión en BSS Plus (figura 41). Este ejemplo examinó adicionalmente si la adición de componentes del humor acuoso (proteínas, ácidos ascórbicos y ácidos lácticos) a Opeguard-MA potencia la afinidad de unión de las HCEC cultivadas a laminina-511 y -411. Como se muestra en las figuras 42 y 43, no se observó un efecto potenciado.

Las subpoblaciones (SP) de HCEC cultivadas tienen propiedades de unión diferentes. La tendencia a entrar en la

transición de estado celular (CST), tal como la transición epitelial-mesenquimatosa o la fibrosis durante el cultivo produce diferentes subpoblaciones (SP) con distintos marcadores de CD de superficie a partir de las HCEC. Hasta la fecha, los inventores han desarrollado un método para distinguir claramente esas subpoblaciones con respecto a sus marcadores de superficie celular. Para aclarar las propiedades adherentes de estas subpoblaciones, este ejemplo comparó las capacidades de unión de subpoblaciones de HCEC cultivadas mediante un ensayo de unión por centrifugación.

Se prepararon subpoblaciones de HCEC purificadas que no presentan signos de CST con formas hexagonales (subpoblaciones de HCEC maduras completamente diferenciadas) mediante clasificación de células con perlas magnéticas (MACS) con perlas magnéticas de CD44 humano mediante selección negativa (como se describe en (Materiales y métodos)). Como se muestra en la figura 44, las subpoblaciones efectoras separadas por MACS con perlas magnéticas de CD44 se purificaron hasta más del 90 % de pureza (tal como se determina mediante análisis de citometría de flujo) y estas células expresaron Na^+/K^+ ATPasa y ZO-1 (figura 45).

Para obtener subpoblaciones con fenotipo EMT ($CD166^+$, $CD44^{+++}$, $CD24^-$), no se realizó selección positiva con MACS con perlas magnéticas de CD44 humano, sino que en su lugar se usó la subpoblación generada espontáneamente en cultivos (figura 46). Esto es para evitar la influencia de la interacción directa entre CD44 en la superficie celular y las perlas magnéticas de CD44 en las capacidades de unión celular.

Se encontró que tanto la subpoblación de HCEC madura completamente diferenciada como la subpoblación con fenotipo EMT se unían a placas recubiertas con laminina o colágeno (figura 47). Curiosamente, las propiedades para unirse a las lamininas fueron diferentes entre estas subpoblaciones. Aunque los niveles de células unidas a la placa recubierta con laminina-411 fueron los mismos entre las subpoblaciones de HCEC, la subpoblación de HCEC madura completamente diferenciada se unió significativamente más fuertemente a laminina-511 que la subpoblación con fenotipo EMT (figura 47).

Diferencia en la expresión de la subunidad alfa2 de integrina en subpoblaciones de HCEC cultivadas. Previamente, Okumura *et al.* notificaron que la interacción entre la laminina-511 y las cHCEC se facilitaba por la integrina alfa3beta1 y alfa6beta1 (Okumura *et al.* (2015) Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015; 56:2933-2942). Por lo tanto, este ejemplo sometió a prueba la expresión de integrina alfa3 y alfa6 en estas subpoblaciones. Inesperadamente, la expresión de estas subunidades de integrina alfa en la subpoblación con un fenotipo EMT fue comparable o ligeramente mayor que la de las SP de HCEC maduras (figura 48). Curiosamente, la expresión de la subunidad alfa2 de integrina en la subpoblación con un fenotipo EMT fue notablemente mayor que la de las SP de HCEC maduras (figura 48).

(Sumario)

Las HCEC cultivadas se unieron a laminina-511, laminina-411 y colágeno de tipo IV de una manera dependiente de la concentración. Estas células se unieron débilmente a perlecano, agrina y TSP-1. Los inventores compararon la influencia de los vehículos de infusión de suspensión celular en la unión de HCEC cultivadas. Cuando las HCEC se suspendieron en Opti-MEM u Opeguard-MA, estas células se unieron a la laminina, pero no se observó unión en BSS Plus. A continuación, los inventores compararon las propiedades adherentes de las subpoblaciones de HCEC. Se encontró que tanto la subpoblación de HCEC madura completamente diferenciada como la subpoblación de fenotipo EMT se unían a placas recubiertas con laminina o colágeno. Curiosamente, las propiedades de unión a lamininas fueron diferentes entre estas subpoblaciones. Aunque los niveles de células unidas a las placas recubiertas con laminina-411 fueron los mismos entre las subpoblaciones de HCEC, la subpoblación de HCEC madura completamente diferenciada se unió significativamente más fuertemente a laminina-511 que la subpoblación con fenotipo EMT.

Conclusiones: los resultados en este ejemplo sugieren que la capacidad de unión de las HCE a los principales componentes de la membrana de Descemet es distinta entre las subpoblaciones de HCEC cultivadas. Opeguard-MA es útil como vehículo de infusión de suspensión celular en terapia de inyección celular al igual que OptiMEM. Además, los métodos simples usados en el presente documento son eficaces para evaluar la interacción entre las HCEC y los componentes de la matriz extracelular.

Este ejemplo investigó las propiedades de unión de las HCEC cultivadas mediante el ensayo de unión celular por centrifugación. Las HCEC cultivadas se unieron más fuertemente a la laminina-521 y -511 que a la laminina-411 y -332, lo que sugiere que las HCEC cultivadas tienen una alta afinidad por la subunidad alfa5 de laminina. Estas células también se unieron a colágeno de tipo IV de una manera dependiente de la concentración. Las concentraciones mínimas necesarias para la unión celular observada en este ejemplo son las siguientes; laminina 511: 4 pM (3 ng/ml), laminina 411: 1,25 nM (2,85 microg/ml) y colágeno de tipo IV: 200 ng/ml. La unión a perlecano, TSP-1 y agrina solo se observó a las concentraciones a 400 nM.

Las HCEC expresan varias integrinas (alfa2beta1, alfa3beta1 alfa5beta1 y alfa6beta1). Recientemente, Okumura *et al.* notificaron que las HCEC que se unen a la laminina-511 están mediadas por integrinas alfa3beta1 y alfa6beta1 [Okumura *et al.* (2015) Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015; 56:2933-2942]. Las integrinas alfa3beta1 y alfa6beta1 tienen mayor afinidad por la laminina-511 que la laminina-332 o -411 [Barczyk *et al.* (2010) Cell Tissue Res. 2010; 339:269-280]. En este ejemplo, a pesar de tener una mayor afinidad por la laminina-511, la expresión de alfa3 y alfa6 en la

subpoblación de HCEC madura completamente diferenciada fue menor que la de la subpoblación con un fenotipo EMT. Mientras tanto, la expresión de la subunidad alfa2 de integrina fue mayor en la primera subpoblación que en la última subpoblación. Adicionalmente, la expresión de integrina beta1 no fue notablemente diferente entre estas dos subpoblaciones (datos no mostrados: evaluada por Lyoplate (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.)). Es posible que la alta expresión de la subunidad alfa2 de integrina produzca el complejo alfa2beta1 conocido como integrina de unión a colágeno [Barczyk *et al.* (2010) Cell Tissue Res. 2010; 339:269-280], dando como resultado una menor expresión de los complejos alfa3beta1 o alfa6beta1. Esto indica claramente la presencia de distinción en la razón de integrina alfa2beta1 frente a alfa3beta1 y alfa6beta1 entre subpoblaciones, y la proporción de las mismas se observó de manera prominente en HCEC cultivadas.

En "terapia de infusión celular", el vehículo de infusión de suspensión celular es importante para la eficacia terapéutica. En este ejemplo, se compararon los efectos de tres vehículos de infusión de suspensión celular, Opti-MEM, Opeguard-MA y BSS Plus en la unión de HCEC a laminina. Opeguard-MA fue comparable con Opti-MEM. Debido a que el proveedor no revela la composición de Opti-MEM, Opeguard-MA (disolución de irrigación intraocular usada en rutinas clínicas) podría ser más preferible como vehículo de infusión de suspensión celular para terapia de infusión celular.

(Ejemplo 7: Desarrollo de un modelo murino de daño por congelación crioinducido para evaluar la calidad celular de las células endoteliales corneales cultivadas para la terapia de infusión celular (infusión de células endoteliales corneales humanas) - desarrollo del criterio de valoración sustituto)

El objetivo de este ejemplo es determinar el criterio de valoración sustituto de las HCEC utilizando un modelo de ratón.

Las cHCEC con composición completamente caracterizada por análisis de citometría de flujo se proporcionaron para el examen de los modelos propuestos. La región central de 2 mm de córneas de BALB/c se sometió a daño por congelación crioinducido para eliminar las células endoteliales, luego se inyectaron 4 X 10^4 cHCEC en la cámara anterior del ojo. Las características corneales se observaron clínicamente, y el grosor corneal se evaluó mediante un paquímetro. Para la suspensión de cHCEC, se compararon Opti-MEM, Opeguard MA y Opeguard MA suplementado con albúmina humana, ácido ascórbico y ácido láctico (Opeguard-F) en el modelo. También se evaluó la presencia de un inhibidor de ROCK (Y-27632).

(Materiales y métodos)

Donantes de células endoteliales corneales humanas

El tejido humano utilizado en este ejemplo se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron córneas de donantes humanos se obtuvieron de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron bajo los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido. Todas las córneas de los donantes se conservaron en Optisol GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron por avión con fines de investigación. De acuerdo con la información de los donantes, todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal.

Cultivos de células endoteliales corneales humana

A menos que se indique lo contrario, las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados (Nakahara M, Okumura N, Kay EP, *et al.* PLoS One 2013; 8:e69009), con algunas modificaciones. Se usaron un total de 4 córneas de donantes humanos a distintas edades para los experimentos. Brevemente, las membranas de Descemet con células endoteliales corneales se extrajeron de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. Las HCEC se cultivaron a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en el pase 2 para todos los experimentos.

Preparación de suspensión celular para inyección

Se recogieron HCEC de una placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 6,7 X 10^6 células/ml en Opti-MEM u Opeguard-MA (Senju Pharmaceutical, Osaka, Japón) con o sin aditivos. Los aditivos usados fueron Y-27632 100 microM para Opti-MEM y albúmina sérica

humana al 0,024 %, ácido ascórbico 1,06 mM, ácido láctico 4,5 mM, Y-27632 100 microM para Opeguard-MA.

Análisis de citometría de flujo de HCEC cultivadas

Se recogieron HCEC de una placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Las disoluciones de anticuerpos comprendían lo siguiente: mAb anti-CD26 humano conjugado con FITC, mAb anti-CD166 humano conjugado con PE, mAb anti-CD24 humano conjugado con PerCP-Cy5.5, mAb anti-CD44 humano conjugado con PE-Cy7 (todos de BD Biosciences) y mAb anti-CD105 humano conjugado con APC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Animales

Se usaron ratones BALB/c macho (H-2^d) (SLC, Osaka, Japón) de entre 8 y 12 semanas de edad en este ejemplo. Todos los animales se trataron de acuerdo con el “Declaración para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión”, dictada por la “Asociación para la investigación de la visión y la oftalmología”. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Investigación Animal, de la Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto. Antes de cualquier procedimiento quirúrgico, todos los animales se anestesiaron completamente con una inyección intraperitoneal de 3 mg de ketamina.

Tratamiento de daño por congelación e inyección de HCEC en la cámara anterior del ojo. Se aplicó daño por congelación para eliminar las células endoteliales al ojo derecho de cada ratón (Han SB, *et al.*, Mol Vis 2013; 19:1222-1230; Koizumi N, *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48:4519-4526). Brevemente, después de la aplicación tópica de agente midriático (Mydrin P, Santen, Japón), se inició la congelación transcorneal colocando suavemente una criosonda hecha de acero inoxidable (2 mm de diámetro) (preenfriada hasta -196 grados C con nitrógeno líquido) en el centro de la córnea. No se aplicó presión para evitar daños al tejido adyacente, incluidos el cristalino y la malla trabecular. La superficie lateral de la sonda, en lugar de la punta, se colocó en la córnea para maximizar la superficie de contacto. La criosonda se mantuvo sobre la superficie corneal hasta que se formó una bola de hielo sobre la córnea y cubrió toda la superficie corneal (corresponde a una duración de 10 segundos). Se demostró que el defecto en el endotelio era del mismo tamaño que la bola de hielo notificada (Khodadoust AA, G Invest Ophthalmol 1976; 15:96-101). Inmediatamente después de la congelación, la criosonda se liberó de la superficie corneal, se lavó con una solución salina equilibrada y se permitió que la córnea se descongelara de manera natural. No se aplicó medicación tópica durante el período de estudio.

Después de eliminar las células endoteliales por daño por congelación, se realizó una incisión diagonal en el centro de la córnea de ratones BALB/c huésped con una microcuchilla, y se retiraron 3 microl de humor acuoso con una aguja de vidrio. A continuación, se inyectaron 0,5 - 2 X 10^4 HCEC en 3 microl de una disolución apropiada en la cámara anterior sin ninguna fuga (Streilein JW. FASEB J 1987; 1:199-208; Yamada J, *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38:2833-2843). Este recuento de células se calculó a partir de 5 X 10^5 células en caso del ser humano. Estos ratones se anestesiaron durante 3 horas con 1 mg adicional de inyección de ketamina por hora para la precipitación de HCEC en la superficie del endotelio.

Evaluación clínica e histopatológica

Para evaluación clínica, los ojos se examinaron con un biomicroscopio con lámpara de hendidura y se confirmó que no había problemas técnicos. El grosor de la córnea se midió mediante un paquímetro (SP-100, Tomey, Japón) antes del daño por congelación, 24 y 48 horas después de la inyección de HCEC.

Para la evaluación histopatológica, los ojos se enuclearon 48 horas después de la infusión, luego se fijaron con paraformaldehído al 4 % a 4 grados C durante 3 días y se disecaron para preparar copas oculares corneales. Después de lavar con PBS (-) dos veces, los ojos se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con tritón X-100 al 0,1 % en PBS (-) para la permeabilización. Posteriormente, después de lavar con PBS (-) dos veces, los ojos se incubaron con BSA al 1 % en PBS (-) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se tiñeron las copas oculares con anticuerpos de ratón anti-núcleos humanos conjugados con Alexa Fluor 488 (Merck Millipore, Alemania) a una dilución 1:20 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces, las copas oculares se montaron planas mediante 4 incisiones, y se tiñeron con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Las secciones se evaluaron con un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS, Tokio, Japón).

Métodos estadísticos

Se usó la prueba t de Student para datos apareados para comparar los grosores corneales. P valores de < 0,05 se consideraron significativos.

(Resultados)

El modelo murino propuesto resultó ser eficaz para diferenciar el efecto de cHCEC inyectadas distintas en su celularidad. 48 horas después de la inyección de cHCEC fue el período de tiempo seleccionado para monitorizar el efecto de las cHCEC inyectadas. La inyección de cHCEC mejoró significativamente el grosor corneal ($p < 0,01$).

Preparación y selección de células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales (HCEC efectoras)

Los inventores, con sus colaboradores, desarrollaron una terapia de inyección de cHCEC. Esta es una modalidad de tratamiento novedosa para la queratopatía ampollosa que implica inyecciones directas de cHCEC en la cámara anterior. Se reveló que la calidad de la composición de cHCEC es crítica para las implicaciones farmacológicas en este método. Por este motivo, se evaluó la composición de las cHCEC usadas en este estudio.

Las células se desprendieron de una placa de cultivo, y se analizó la expresión de CD166, CD24, CD44, CD105 y CD26 con un citómetro de flujo FACS Canto II como se describe en (Materiales y métodos). Después de seleccionar CD166+CD24- (R1) o CD166+CD24+ (R2), se definieron las siguientes cinco subpoblaciones: subpoblación CD166+CD24-CD44- a +CD105+ a - (compuerta 1 = G1), subpoblación CD166+CD24-CD44++CD105+ (G2), subpoblación CD166+CD24-CD44+++CD105+ (G3), subpoblación CD166+CD24+CD44+CD105+ (G4) y subpoblación CD166+CD24+CD44++CD105+ (G5). También se detectaron células CD44++CD26+ (figura 49(A-B)). Dado que los inventores plantearon la hipótesis de que las células G1 eran la subpoblación de células efectoras (ejemplo 1) ya que se consideraron esenciales para la acción como medicamento, el matraz de cultivo que contenía un alto porcentaje de células G1 se usó en los siguientes experimentos. (Las células de la figura 49(A-B) se sometieron a prueba en cada una de las figuras 51-53).

Determinación del protocolo de evaluación después de la inyección de HCEC en modelos de ratón.

Teniendo en cuenta la simplicidad y facilidad de los procedimientos, se seleccionaron ratones como receptores para utilizar el modelo de daño por congelación notificado por Han *et al* (Han SB, *et al.*, Mol Vis 2013; 19:1222-1230). Se seleccionó un ratón albino BALB/c, dado que los ratones BALB/c se usan principalmente para estudios de trasplante de córnea de combinaciones alogénicas (Sonoda Y, y Streilein JW. J Immunol 1993; 150:1727-1734) y xenogénicas (Tanaka K, *et al.*, Transplantation 2000; 69: 610-616). Los ojos no pigmentados de estos ratones facilitan la evaluación de la observación *in vivo*, así como el examen histológico. Además, Los ratones BALB/c son más resistentes al rechazo corneal que los ratones C57BL/6 (Yamada J, y Streilein JW. Transpl Immunol 1998; 6:161-168). Cuando los inventores han intentado un examen similar en ratones C57BL/6 o C3H, se observaron varias dificultades técnicas, tal como la cámara anterior poco profunda, flotación de pigmentos de iris en la cámara anterior del ojo (datos no mostrados).

En primer lugar se examinó la diferencia individual de pérdida endotelial después del daño por congelación. Se descubrió por el examen histológico del núcleo teñido por DAPI que las células endoteliales de ratones en la córnea con diámetros de 1,8 a 2,2 mm se dañaron letalmente justo después del daño por congelación. De manera importante, no se observaron células endoteliales sanas en la región central, pero todas las CEC en una región periférica estaban sanas (datos no mostrados). Los ojos BALB/c criolesionados (n = 6 cada uno) se disecaron entonces en los períodos apropiados, se montaron planos y se tiñeron con DAPI. Como se muestra en la figura 50, la mayoría de las células endoteliales de los ratones se separaron de la membrana de Descemet y solo permanecieron los núcleos dañados en la región central 24 horas después del daño por congelación (figura 50(A-c)). El borde periférico de las células endoteliales dañadas era claramente visible (flecha blanca). Se observaron células endoteliales corneales normales con núcleos claros en la región periférica de la córnea criolesionada. A las 48 horas después del daño por congelación, estos núcleos de células endoteliales derivadas de ratones BALB/c desaparecen de tal manera que la superficie de la membrana de Descemet parece estable (figura 50(A-f)). Sin embargo, se observó un rápido crecimiento endotelial corneal de ratones a las 72 horas después de la lesión (figura 50). A partir de estas observaciones, la observación a las 48 horas después de la lesión debe ser el período de evaluación preferido para comparar las HCEC unidas.

Inmediatamente después del daño por congelación en las córneas BABL/c, se inyectaron de 0 a $2,0 \times 10^4$ HCEC en Opti-MEM por vía intracameral (N=4 cada uno). De acuerdo con el resultado clínico (figura 50), las córneas se volvieron edematosas y opacas a las 24 horas y 48 horas después del daño por congelación, y recuperaron la mayor parte de su transparencia a las 72 horas incluso en los ojos de control sin inyección de HCEC. No se observó rechazo xenogénico típico en el plazo de 72 horas. La transparencia corneal (evaluada por la visibilidad del borde del iris, etc.) variaba en cada córnea, de modo que no pudo evaluarse el efecto de la inyección de HCEC. Se midió el grosor corneal de estos ojos y los resultados se muestran en la figura 50(C). El grosor corneal aumentó notablemente después de 24 horas y se recuperó gradualmente. Al inyectar HCEC por vía intracameral, el grosor corneal se recuperó rápidamente. Especialmente las córneas en las que se inyectaron $2,0 \times 10^4$ HCEC mostraron una recuperación significativa a las 48 horas ($p < 0,05$).

Al considerar estas observaciones, los inventores han seleccionado el período de observación de 48 horas después del daño por congelación y el recuento de células inyectadas de $2,0 \times 10^4$. El grosor corneal y la tinción histológica de las HCEC se compararon en los siguientes experimentos.

Evaluación de cHCEC inyectadas usando vehículos de infusión de suspensión celular distintos. A continuación, los inventores evaluaron si este ensayo es útil como criterio de valoración sustituto comparando el efecto de las cHCEC

inyectadas usando vehículos de infusión de suspensión celular distintos (figuras 51-53).

Después de la lesión, se inyectaron 2,0 X 10^4 cHCEC (población de la figura 49) por vía intracameral con 4 tipos de vehículos de infusión, Opti-MEM (a) y Opeguard MA (b). Se compararon con el control inyectado con Opeguard MA solamente (c) (n=3 cada uno). Además, para imitar la implicación de diversos factores en el humor acuoso en la adherencia de las cHCEC, se suplementó Opeguard MA con albúmina humana, ácido ascórbico y ácido láctico (Opeguard F). A continuación, se realizaron experimentos similares mediante inyección intracameral de cHCEC (población de la figura 49) con Opti-MEM (a) u Opeguard F (b), y se compararon con el control del vehículo Opeguard F solamente (c) (n=3 cada uno). Como se muestra en la figura 51, el resultado corneal a las 48 horas tuvo diferencias individuales, pero todos los ojos mantuvieron una cámara anterior normal y sin hipema. Al inyectar 2,0 X 10^4 HCEC, se considera que la transparencia corneal muestra una mejor recuperación de la observación de la visibilidad del borde del iris. El grosor corneal se recuperó significativamente a las 48 horas después del daño por congelación mediante la inyección de HCEC (figura 52). Especialmente, la recuperación del grosor corneal fue repetible cuando se usó Opeguard (figura 52). A diferencia de las células endoteliales corneales de primate, las células endoteliales corneales murinas proliferan rápidamente *in vivo*. Por lo tanto, para diferenciar la adherencia de cHCEC inyectadas de la de las células endoteliales corneales murina del huésped proliferadas, se evaluó la adherencia de cHCEC mediante tinción con anticuerpo anti-núcleos humanos (Kuzma-Kuzniarska M, *et al.* Differentiation 2012; 83:128-137; Sanchez-Pernaute R, *et al.* Stem Cells 2005; 23:914-922; Le Belle JE, *et al.*, J Neurosci Res 2004; 76:174-183; Wurmser AE, *et al.*, Nature 2004; 430:350-356) como se muestra en la figura 53. Aunque estaban presentes células positivas para núcleos humanos en la superficie endotelial en los dos grupos inyectados con HCEC, los núcleos de HCEC alineados fueron los más claramente visibles en el grupo de Opeguard F (figura 53). Se observó una mejor adherencia de HCEC, en orden descendente, en el grupo de Opeguard F, Opti-MEM y Opeguard MA.

(Sumario)

Las 48 horas después de la inyección de HCEC fue el período de tiempo apropiado para todas las evaluaciones. La inyección de HCEC mejoró significativamente el grosor corneal ($p< 0,01$).

Conclusiones: Este modelo de ratones sustituto establecido en el presente documento es eficaz para la evaluación funcional de HCEC inyectadas *in vivo*. Dado que están contenidos varios aminoácidos, se obtuvo la mejor capacidad de unión de las HCEC a la membrana de Descemet de ratones *in vivo*.

Este ejemplo es el primero en establecer un modelo de ratón para la evaluación de la calidad de HCEC *in vivo*. Las HCEC inyectadas pudieron adherirse bien a la superficie interna corneal y desempeñaron un papel en la supresión del edema corneal. Además, hubo diferencias notables en los resultados entre los vehículos de infusión de inyección. Aunque Opti-MEM es un vehículo de infusión de inyección de HCEC clínicamente excelente, actualmente no está aprobado para uso humano. En este ejemplo, Opeguard F, modificado a partir de Opeguard MA, presentó una unión de HCEC notablemente excelente y supresión del edema corneal. Los resultados en este ejemplo pueden soportar una infusión de HCEC más segura.

La adherencia de cHCEC es uno de los factores más importantes para el éxito de la infusión de células endoteliales. La adherencia de cHCEC se puede evaluar *in vitro* centrifugando una placa de cultivo de 96 pocillos con colágenos, lamininas o proteoglicanos inmovilizados (ejemplo 6 o similares). Teóricamente, los ratones BALB/c rechazan las cHCEC xenogénicas de manera hiperaguda, pero no se observó rechazo hiperagudo en el estudio con conejos (Ishino Y, *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45:800-806; Mimura T, *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45:2992-2997) y con ratas (Mimura T, *et al.* Exp Eye Res 2004;79:231-237) en modelos de trasplante endotelial. En el modelo real usado en este ejemplo, muchas células positivas para los núcleos humanos sobrevivieron 72 horas después de la inyección. Si bien se usaron a menudo campos magnéticos para intentar que las células endoteliales corneales se adhieran a una superficie corneal mediante el uso de un campo magnético, los resultados en este ejemplo indican que las propias HCEC tienen la capacidad de unirse a la superficie interna corneal y el vehículo de infusión usado para el trasplante es un factor importante para la adhesión de HCEC. Pueden entenderse más detalles de la influencia de la expresión de moléculas de adhesión celular mediante examen.

Hubo diferencias significativas en los resultados entre los vehículos de infusión. Opeguard-MA, que comprende reactivos de seguridad, es un vehículo de infusión clínicamente excelente. Los inventores han seleccionado albúmina sérica humana, ácido ascórbico y ácido láctico para el Opeguard MA modificado, Opeguard F. Estos tres reactivos son componentes del humor acuoso y están disponibles comercialmente como materiales de calidad clínica. A este respecto, el Opeguard MA modificado, Opeguard F, presentó una unión de HCEC significativamente mejor y supresión del edema corneal. Se entiende, en vista de los resultados de este ejemplo, que puede lograrse una infusión de cHCEC más segura en seres humanos.

En conclusión, los inventores establecieron un nuevo modelo murino para evaluar un criterio de valoración sustituto para la terapia de inyección de cHCEC *in vivo*. Este modelo de ratón *in vivo* también es valioso para la evaluación de sistemas asociados con la terapia de infusión de cHCEC, tal como el efecto de fármacos combinados, el vehículo de infusión de suspensión de cHCEC, el recuento de células óptimo para la inyección, o similares.

(Ejemplo 8: Desarrollo basado en firmas génicas de ensayos ELISA para la calificación reproducible de células endoteliales corneales humanas cultivadas)

Este ejemplo desarrolló un método para calificar la función de las cHCEC adaptables en entornos clínicos.

Este ejemplo examinó diversos genes y firmas de miARN en HCEC a partir de una variedad de tejidos y donantes por 3D-gene (Toray). Estas firmas se compararon con las de más de 20 cHCEC con distinta morfología celular o lotes de cultivo. Los genes candidatos se seleccionaron después de la validación por qRT-PCR, y los genes se sometieron a ensayo mediante ELISA. Después de etapas de cribado adicionales, se seleccionaron las citocinas candidatas finales para la calificación.

(Materiales y métodos)

Donantes de células endoteliales corneales humanas

El tejido humano utilizado se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Las HCEC obtenidas de 20 córneas de cadáveres humano se cultivaron antes de realizar el análisis de cariotipo. Se obtuvieron córneas de donantes humanos de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron bajo los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido. Todas las córneas de los donantes se conservaron en Optisol GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron por avión con fines de investigación. De acuerdo con la información de los donantes, todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal y ningún donante tenía antecedentes pasados de anomalía cromosómica.

Cultivos de HCEC

A menos que se indique lo contrario, las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones. Brevemente, las membranas de Descemet con células endoteliales corneales se extrajeron de las córneas del donante y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de una la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. El medio acondicionado se preparó como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8(7), e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

Microscopía de contraste de fase

Se tomaron imágenes de contraste de fase mediante un sistema de microscopio invertido (CKX41, Olympus, Tokio, Japón).

Extracción de ARN total: Se almacenaron tejidos endoteliales y tejidos epiteliales corneales en el reactivo de lisis QIAzol (QIAGEN Strasse1 40724 Hilden Alemania) a -80 grados C hasta la extracción de ARN total. Las HCEC cultivadas y el sobrenadante de las cHCEC se lisaron mediante el reactivo de lisis QIAzol y se almacenaron a -80 grados C hasta la extracción de ARN total. Se extrajo ARN total usando el kit miRNeasy Mini (QIAGEN). La calidad de los ARN totales purificados se analizó mediante un instrumento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif., EE.UU.). Perfil de expresión de microARN: Se usó el chip de oligo de miARN humano “3D-Gene” de Toray (miRBase versión 17) para el perfil de expresión de microARN. Se prepararon 250 ng-500 ng de ARN total derivado de muestras de tejido y células que se marcaron con Hy5 usando kits de marcaje de potencia de microARN miRCURY LNA(R) (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) y miARN total marcado derivado de 400 microlitros de sobrenadante. Los microARN marcados se hibridaron individualmente sobre la superficie de los chips de microARN, y se incubaron a 32 grados C durante 16 horas. Los chips de microARN lavados y secados en un entorno libre de ozono se escanearon usando un escáner 3D-Gene 3000 (Toray Industries Inc., Tokio, JAPÓN) y se analizó utilizando el software 3D-Gene Extraction (Toray).

Perfil de expresión de ARNm: Se usó el chip 25K de oligo humano “3D-Gene” de Toray (versión 2.1) para obtener un perfil de expresión de ARNm. Se amplificaron 200 ng-500 ng de ARN total usando el kit de amplificación de aARN Amino Alyl MessageAmp™ II (Ambion, CA, EE.UU.). Los ARN amplificados se marcaron con Cy5 usando colorante mono-reactivo Amersham Cy5 (GE Healthcare, Reino Unido). Los ARN amplificados marcados se hibridaron

individualmente sobre la superficie del chip de microARN, y se incubaron a 37 grados C durante 16 horas. Los chips de oligo lavados y secados en un entorno libre de ozono se escanearon usando un escáner 3D-Gene 3000 (Toray Industries Inc., Tokio, JAPÓN) y se analizaron utilizando el software 3D-Gene Extraction (Toray).

Procesamiento de datos normalizados

Las señales fluorescentes digitalizadas proporcionadas por el software se consideraron los datos sin procesar. Todos los datos normalizados se normalizaron globalmente por micromatriz, de modo que se ajustó la mediana de la intensidad de la señal.

RT-PCR cuantitativa

Se extrajo ARN total de las HCEC cultivadas utilizando el kit miRNeasy Mini (QIAGEN Strasse1 40724 Hilden Alemania). El ADNc se sintetizó usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad con inhibidor de RNasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Las reacciones PCR se realizaron usando la mezcla maestra TaqMan Fast Advanced (Applied Biosystems) y ensayos de expresión génica TaqMan, en catálogo (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: activación de la enzima a 95 grados C durante 20 segundos; y 40 ciclos de desnaturalización a 95 grados C durante 1 segundo y apareamiento/alargamiento a 60 grados C durante 20 segundos. Se usó el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems) para la amplificación y análisis de PCR. Los niveles de expresión génica se normalizaron a los del ARNr 18S. Los resultados se denotaron como 2.delta..delta.Ct (unidades relativas de expresión).

Cada secuencia usada era una secuencia que acompañaba a estos productos. La información de ID de la misma se muestra a continuación.

[Tabla 7]

	ID de ensayo		ID de ensayo		ID de ensayo
MMP1	Hs00899658_m1	CD166	Hs00977641_m1	CDH2	Hs00983056_m1
MMP2	Hs01548727_m1	CD105	Hs00923996_m1	VIM	Hs00185584_m1
MMP4	Hs01128097_m1	CD24	Hs03044178_m1	CDKN1B	Hs01597588_m1
MMP9	Hs00234579_m1	COL1A2	Hs01028970_m1	CDKN1C	Hs00175938_m1
SPP1	Hs00959010_m1	COL3A1	Hs00943809_m1	CDKN2C	Hs01568320_m1
TIMP1	Hs00171558_m1	COL4A1	Hs00266237_m1	NOX4	Hs00418356_m1
BMP2	Hs00154192_m1	COL4A2	Hs01098873_m1	HGF	Hs00900070_m1
STEAP1	Hs00185180_m1	COL5A1	Hs00609088_m1	THBS2	Hs01568063_m1
SPARK	Hs00234160_m1	COL8A1	Hs00156669_m1	LGR5	Hs00173664_m1
IL13RA2	Hs00152924_m1	COL8A2	Hs00697025_m1	IGFBP3	Hs00365742_g1
TGFβ1	Hs00998133_m1	IL6	Hs00985639_m1	IGFBP4	Hs01057900_m1
TGFβ2	Hs00234244_m1	IL8	Hs00174103_m1	IGFBP7	Hs00266026_m1
EGFR	Hs01076078_m1	IL10	Hs00961622_m1	ITGB1	Hs00559595_m1
FN1	Hs00365052_m1	IL18	Hs01038788_m1	WNT5A	Hs00998537_m1
EGR1	Hs00152928_m1	IL33	Hs01125943_m1	SNAIL1	Hs00195591_m1
SERPINB2	Hs01010736_m1	TSLP	Hs00263639_m1	SNAIL2	Hs00950344_m1
CD44	Hs01075862_m1	CDH1	Hs01023894_m1		

Matriz de PCR

Se extrajo ARN total de las HCEC cultivadas usando el kit miRNeasy Mini (QIAGEN Strasse1 40724 Hilden Alemania). La síntesis de ADNc se realizó con 100 ng de ARN total para el formato de placa de 96 pocillos usando el kit RT^2 First Strand (Qiagen). La expresión de ARNm endoteliales se investigó usando la matriz extracelular humana de matriz de PCR y matriz de adhesión (Qiagen) de RT^2 Profiler según los protocolos recomendados por el fabricante, y se analizó usando la herramienta de análisis de datos de matriz de PCR RT^2 Profiler versión 3.5.

Bio-Plex para análisis integrado de citocinas

El sobrenadante de cultivo de las cHCEC se recogió después de 4 días de cultivo y se congeló inmediatamente y se almacenó después de la cosecha a -80 grados C hasta el análisis. Los niveles de citocinas de los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante la tecnología Luminex X-Map (Bio-Plex 200, BioRad, Hercules, CA, USA) y el kit de panel Bio-Plex Human 27-plex (BioRad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midieron las siguientes citocinas: interleucina-1beta (IL-1beta), IL-1ralfa, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), eotaxina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interferón gamma (IFN-gamma),

proteína 10 inducida por interferón (IP-10), proteína quimiotáctica monocítica-1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos-1alfa (MIP-1 alfa), MIP-1beta, factor de crecimiento derivado de las plaquetas-BB (PDGF-BB), regulada por activación, expresada y secretada por linfocitos T normales (RANTES), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se generaron curvas patrón para cada citocina (por duplicado) usando las concentraciones de citocinas de referencia suministradas en este kit y se usaron para calcular las concentraciones de citocinas en los sobrenadantes de cultivo.

Inmunoensayo enzimático

Se recogió el sobrenadante del cultivo celular de las cHCEC y se centrifugó a 1580 g a TA durante 10 minutos para eliminar las células desprendidas. El sobrenadante se recogió y se filtró a través de filtros de 0,22 microm (Millex-GV Millipore).

El ELISA se realizó usando kits ELISA competitivos de clusterina (humana) (Adipogen, Inc., Incheon, Corea), kit de EIA de péptido C de procolágeno de tipo I (PIP) (TaKaRa., JAPÓN), CCL2/MCP-1 humano, TGF-gamma1 humano, TIMP-1 humano y HGF humano, (R&D System, Inc. EE.UU.), kit de ELISA de BMP2 humano, kit de ELISA de PDGF-bb humano, kit de ELISA de IL6 humana y kit de ELISA de IL8 humana (Abcam., OFL, Reino Unido), kit de ensayo de osteopontina humana y kit de ensayo de N-Half de osteopontina humana (IBL., Gunma, JAPAN), kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (USCN Life Science INC., China), kit de ELISA IP-10, humano, kit de ELISA de IL-1RA, kit de ELISA de IFN-gamma humano y kit de ELISA de TNF-alfa humano (Invitrogen), kit de ELISA de colágeno de tipo III alfa1 humano (-) y kit ELISA de la cadena alfa-2 de colágeno (VIII) humano (-) (CUSABIO).

Análisis estadístico

La significación estadística (valor P) de los valores medios para las comparaciones de 2 muestras se determinó mediante la prueba t de Student. La significación estadística para la comparación de múltiples conjuntos de muestras se determinó con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los valores mostrados en los gráficos representan la media +/- error estándar.

(Resultados)

Las firmas de genes y miARN variaron entre cultivos

Se analizaron tejidos de endotelio corneal humano (Endo) de 6 donantes ancianos y 5 epitelios corneales (EP) por 3D-gene (Toray) para determinar sus firmas de ARNm y miARN. La discrepancia de las firmas génicas entre Endo y EP fue evidente, mientras que las firmas de miR entre estos dos tejidos no fueron notablemente diferentes para el ARNm (figura 54-A(a), 54-A(b) y 54-B). Las firmas fueron casi las mismas entre los 6 donantes. Además, los cambios no fueron evidentes en tejidos de cuatro generaciones, tanto en Endo como Ep, excepto por las firmas de ARNm en donantes neonatales.

Por el contrario, las firmas tanto de ARNm como de miARN de las cHCEC resultaron ser muy distintas de las de Endo fresco (figura 54-A(a), 54-A(b) y 54-B), y las firmas estaban muy separadas de las del tejido fresco en miARN. Esto indica el papel de la regulación epigenética en cultivos.

Variación en la expresión de genes relacionados con CST

Se sometieron cultivos típicos claramente diferentes en morfología (figuras 55-A y 55-B), junto con Endo fresco, a una matriz de PCR usando la matriz de PCR RT^2 Profiler para EMT, fibrosis y senescencia celular. De acuerdo con el hallazgo de que la expresión génica cambia notablemente en cultivos de HCEC, el mapa de calor reveló la clara distinción entre estos tres grupos. Cabe destacar que incluso dos grupos de cHCEC representados en las figuras 55-A y 55-B presentaron distintos perfiles de expresión génica. Casi 50 genes estaban comúnmente elevados en dos células cultivadas. Estos incluyeron Col3A1, FN1, IGFBP3, 4 y 5, ITGA3 y 5, MMP2, TIMP1, ZEB2, MAP1B, Serpine1, THBS2, TGFbR2, TGFb1 y CD44. Entre dos cultivos en las figuras 55-A y 55-B, se encontraron muchos genes regulados por incremento y regulados por disminución (datos no mostrados), lo que sugiere una expresión génica diferenciada entre cultivos de cHCEC incluso bajo el mismo protocolo de cultivo. A partir de estos resultados de cribado de genes variables entre cultivos, se seleccionaron 50 genes candidatos para su validación adicional mediante qRT-PCR (se les añadieron 32 genes seleccionados mediante cribado y 18 genes considerados funcionalmente importantes en CST) (tabla 8).

[Tabla 8]

(Tabla 8) Candidatos para 50 genes por matriz de PCR y 3D-gene

MMP1	TGFβ1	COL1A2	IL6	CDH1	NOX4	IGFBP3
MMP2	TGFβ2	COL3A1	IL8	CDH2	HGF	IGFBP4

MMP4	EGFR	COL4A1	IL10	VIM	THBS2	IGFBP7
MMP9	FN1	COL4A2	IL18	CDKN1B	LGR5	ITGB1
SPP1	EGR1	COL5A1	IL33	CDKN1C		WNT5A
TIMP1	SERPINB2	COL8A1	TSLP	CDKN2C		SNAIL1
BMP2	CD44	COL8A2				SNAIL2
STEAP1	CD166					
SPARC	CD105					
IL13RA2	CD24					

Validación de genes seleccionados por qRT-PCR

Los genes candidatos se validaron mediante qRT-PCR comparando su expresión en dos cHCEC representadas en las figuras 56-A y 56-B (es decir, 665A2 y 675A2, que contrastaban morfológicamente). Las figuras 56-A y 56-B muestran parte de los resultados. Las expresiones génicas de CDH2, TGF-beta2 y Col8A2 estaban claramente reguladas por incremento en cHCEC sin CST (es decir, 665A2), mientras que las de TIMP1, Col3A1, CD44, IL-6, IL-8 y BMP2 estaban reguladas por incremento en cHCEC con CST (es decir, 675A2). En esta comparación, los genes VIM, CD166, CD105, CD24 y MMP4 se expresaron a niveles comparables en ambas cHCEC. Los resultados se resumen en la figura 56-B (la tabla no incluye los genes expresados a niveles muy bajos).

Validación de genes seleccionados usando cHCEC clasificadas morfológicamente

Los resultados mencionados anteriormente muestran claramente que CST varió más que el nivel teniendo en cuenta EMT, senescencia y fibrosis. Por lo tanto, se investigaron los niveles de expresión con más detalle. Las cHCEC se clasificaron en 11 tipos asignando puntos de 0 a 10 en términos de la morfología de las células cultivadas (participaron tres personas) (figura 57-A). Los niveles de expresión de algunos de los genes investigados se ilustran en la figura 57-B. Un grupo presentó expresión regulada por incremento en una correlación inversa con el orden de los puntos y el segundo grupo presentó una correlación positiva, mientras que el tercer grupo apenas tuvo ninguna correlación con los puntos. Curiosamente, incluso entre las cHCEC de 10 puntos, la expresión de CD24 fue distinta, lo que indica que este gen está más finamente regulado que los otros genes mostrados en la figura 57-B. La validación posterior se realizó usando cHCEC producidas en el Centro de Procesamiento Celular bajo GMP (figuras 58-A y 58-B). En esta comparación, dos cHCEC aparentemente distintas en su forma de CST (C9 y C11) presentaron perfiles de expresión génica contrastantes. Por ejemplo, CD24 estaba regulado por incremento solo en C9, así como Col4A1 y 4A2. Sin embargo, MMP2, TIMP1, IL-6, IL-8 y TGF-beta1 estaban elevados solo en C11. CD44, THBS2, Col3A1 y HGF estaban regulados por incremento tanto en C9 como en C11.

Cribado de citocinas producidas por el panel 27-plex de citocinas humanas Bio-Plex

La expresión génica generalmente corresponde a productos que consisten en una cadena sencilla y no refleja suficientemente los productos como un heterodímero. Para superar este problema y confirmar los posibles ensayos mediante sobrenadantes de cultivo, se analizaron los sobrenadantes de cultivo de diversas cHCEC por el panel 27-plex de citocinas humanas Bio-Plex (Bio-Rad). Se proporcionaron tres cHCEC (n.° 82, n.º 84 y n.º 88), diferentes en la frecuencia de los pases de cultivo para el análisis. Los resultados típicos se ilustran en la figura 59-A. La mayoría de las citocinas secretadas presentaron una disminución o aumento dependiendo del aumento de la frecuencia de pases. A partir de esta prueba, IL-6, MCP-1 e IL-8 mostraron un aumento junto con un deterioro en la calidad del cultivo. Por el contrario, IL-1Ralpha, IFN-gamma, IP-10, PDGF-bb y MIP-1beta en el cultivo mostraron un aumento correspondiente con la mejora en la calidad del cultivo.

Ensayos ELISA para el control de calidad reproducible de cHCEC

Estudios extensos han desarrollado un método de control de calidad reproducible de cHCEC y cuatro citocinas (es decir, TIMP1, MCP-1, IL-8 y PDGF-bb). Las condiciones finales se redujeron después de la prueba, el método puede usarse en la práctica para evaluar la calidad de 32 lotes de cHCEC producidos en el Centro de Procesamiento Celular en la Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto. La selección también se investigó en cuanto a si la capacidad de evaluación de la calidad de la misma corresponde a la de FACS en el momento de la recolección de células el día de la terapia de infusión celular. Los valores estándar para cada citocina son < TIMP1 500 ng/m, < IL-8 500 pg/ml, < MCP-1 3000 pg/ml y > 30 pg/ml de concentración de PDGF. El control de calidad debe llevarse a cabo 7 días antes de la terapia de inyección celular. Se investigó la diferencia en la cantidad de MCP-1, IL-8 y PDGF-bb secretados en el sobrenadante de cultivo para cultivos con diversas cepas cultivadas, número de pases y días de pase (figuras 59-B a 59-C). Se muestra que una diferencia en la razón de subpoblaciones da como resultado un rendimiento de citocinas diferente.

(Sumario)

Las firmas génicas y de miARN de las cHCEC entre distintos lotes de cultivo variaron más que las de los tejidos frescos de donantes con edades diferentes. Comparando más de 20 lotes de cultivos, se consideró que 32 genes candidatos

estaban asociados con una diferencia en las características morfológicas de las cHCEC. La investigación de genes candidatos por qRT-PCR reveló los genes que están regulados por incremento o por disminución de acuerdo con las varianzas morfológicas en las cHCEC (por ejemplo, características tales como EMT o senescencia celular). Se añadieron adicionalmente los resultados de ELISA por el panel 27-plex de citocinas humanas Bio-Plex, y se seleccionaron 11 citocinas candidatas como adecuadas para controlar la calidad de la función de las cHCEC. Después de considerar la presencia de estas citocinas en la cámara anterior, se seleccionaron finalmente IL-8, TIMP-1, MCP-1 y PDGF y se aplicaron en la práctica para evaluar la calidad de las cHCEC que realmente pueden usarse en estos estudios de infusión celular en entornos clínicos.

Conclusión

Se determinaron citocinas específicas para distinguir adecuadamente las características funcionales de las cHCEC, haciendo posible controlar la calidad de las cHCEC adaptables como alternativa a córneas de donantes para el tratamiento de disfunciones endoteliales de la córnea.

La expansión de las cHCEC a partir de un endotelio corneal de donante pudo proporcionar un método para la terapia de infusión de células cHCEC. Las HCEC cultivadas expandidas en sistemas de cultivo *in vitro* pueden contaminarse por cHCEC que han experimentado CST. Las células cultivadas también tienden a experimentar un cambio de cariotipo (véase el ejemplo 2). Por lo tanto, la calidad de las cHCEC debe monitorizarse cuidadosamente para su uso clínico.

Las características morfológicas de las cHCEC variaron mucho de unos cultivos a otros incluso bajo protocolos de cultivo idénticos. Uno de los mayores obstáculos contra la aplicación de cHCEC para la terapia celular es cómo validar la calidad celular de las cHCEC.

Se detectó fácilmente transformación fibroblástica de cHCEC mediante observación microscópica (figuras 55-A y 55-B). Como resultado, un control de calidad relevante y más difícil es la discriminación de las cHCEC que no han experimentado CST de aquellas con senescencia celular (figuras 60-A y 60-B).

Se induce EMT de manera anómala en muchas enfermedades. Las HCEC cultivadas tienen tendencia a CST en EMT. La adhesión de célula a célula disminuye en el proceso de EMT. Las células que han experimentado EMT con frecuencia obtienen propiedades similares a células madre (Krawczyk N, Meier-Stiegen F, Banys M, *et al.* Biomed Res Int. 2014; 2014:415721), incluidas las inducidas por TGFbeta. Al comienzo de este estudio, esta CST similar a EMT se observó con frecuencia, pero después de mejorar los protocolos de cultivo, muchos cultivos tendían a presentar CST senescente.

La senescencia se regula de manera dependiente del estímulo mediante una red de señalización que implica los supresores tumorales p53 y pRb (Sheerin AN, *et al.*, Aging Cell. 2012; 11: 234-240). Sin embargo, las células senescentes son metabólicamente activas, propagando de ese modo el proceso de senescencia a las células vecinas, especialmente a través de la secreción de una gran cantidad de mediadores inflamatorios denominados mediadores SASP (Lasery A, Ben-Neriah Y. Cell, 2015; 36:217-228).

En este ejemplo, se ha proporcionado con éxito un candidato para monitorizar la calidad de la célula de una manera no invasiva. Estudios comparativos de las firmas génicas y de miARN de diversas cHCEC hicieron posible desarrollar con éxito un ensayo ELISA para distinguir la calidad de las cHCEC. Se seleccionó SASP en paralelo. Un ensayo que usa miARN secretado se publica en otra parte. En el presente documento se describe por primera vez un método para la discriminación de si las cHCEC han experimentado CST a partir de sobrenadantes de cultivo.

Este ensayo de prueba de calidad permite proporcionar cHCEC de alta calidad para la terapia de infusión celular para el daño tisular de las HCEC debido a distrofia corneal endotelial de Fuchs, traumatismo o intervención quirúrgica.

(Ejemplo 9: Análisis de exosomas)

En este ejemplo, se analizaron los exosomas. En particular, se analizaron CD63 y CD9.

(Materiales y métodos)

Donantes de células endoteliales corneales humanas

El tejido humano usado en este ejemplo se manipuló de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron HCEC de 20 córneas de cadáveres humanos y se cultivaron antes de realizar el análisis de cariotipo. Las córneas de donantes humanos se obtuvieron de SightLife Inc. (Seattle, WA, EE.UU.). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la donación de ojos para la investigación de los familiares de todos los donantes muertos. Todos los tejidos se recuperaron bajo los principios de la Uniform Anatomical Gift Act (UAGA) del estado en el que se obtuvo el consentimiento del donante y se recuperó el tejido.

La edad de los donantes varió de 2 a 75 años (promedio 43,7 +/- 26,4). Se incluyeron tanto hombres como mujeres. Todas las córneas de los donantes se conservaron en Optisol GS (Chiron Vision, Irvine, CA, EE.UU.) y se importaron por avión con fines de investigación. De acuerdo con la información de los donantes, todas las córneas de donantes se consideraron sanas sin enfermedad corneal y ningún donante tenía antecedentes pasados de anomalía cromosómica.

Cultivos celulares de HCEC

A menos que se indique lo contrario, las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones. Se usaron córneas de donantes humanos a distintas edades para los experimentos. Brevemente, las membranas de Descemet con CEC se extrajeron de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. Se preparó un medio acondicionado como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a razones de 1:3 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

Aislamiento de exosomas

Se usó aislamiento de exosomas total de los medios de cultivo celular (Invitrogen) para aislar exosomas del sobrenadante de cultivo de cada célula de acuerdo con el protocolo de producción.

Inmunotransferencia de tipo Western

Se aislaron exosomas del sobrenadante de cultivo de cada célula o un anticuerpo específico para un marcador de superficie representativo de exosomas (anticuerpo anti-CD63, anticuerpo anti-CD9 y anticuerpo anti-CD81) para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Se usó el kit de ensayo de proteínas Qubit (Q33211, Life Technologies) para medir la concentración de proteína de la disolución de exosomas mencionada anteriormente. Se prepararon muestras por debajo de 10 microg de proteína por muestra/condiciones no reductoras basándose en la concentración medida. Las muestras se calentaron a 70 grados C durante 10 minutos. Las muestras calentadas se cargaron en gel Bolt Bis-Tris Plus al 4-12 % (NW04120BOX Invitrogen). Las muestras se sometieron a electroforesis a 165 V durante 35 minutos a 60 mA (1 mini gel) o 130 mA (2 mini geles). Se usó el sistema de transferencia en seco iBlot 2 (IB21001 Life Technologies) para transcribir proteínas en gel previo a la ejecución a la membrana de PVDF (iBlot2 PVDF Regular Stacks IB24001 Life Technologies). Las condiciones de transcripción fueron 20 V durante 1 minuto, 23 V durante 4 minutos y 25 V durante 2 minutos.

Se usó un sistema iBind Western (SLF1000S, Life Technologies) para llevar a cabo reacciones de bloqueo y de anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios. Las reacciones se llevaron a cabo usando 2 ml de anticuerpo primario específico para una diana del mismo a una concentración final de 10 ug/ml. Se usaron anticuerpos anti-ratón marcados con HRP como anticuerpo secundario a una dilución de 1000 a 2000 veces. La detección quimioluminiscente de antígeno usando reacciones de HRP se llevó a cabo como una detección usando un kit de reactivos de sustratos quimioluminiscentes Novex ECL (WP20005 Invitrogen)/cámara CCD ImageQuant-LAS-3000 (Fujifilm).

(Resultados)

Se encontró una banda de detección de inmunotransferencia de tipo Western para CD63 y CD9, permitiendo la comparación visual del tamaño de la misma (figura 64-A). Tal banda no pudo detectarse para CD81 (datos no mostrados). La figura 64-B muestra además los resultados de la detección de los marcadores CD63 y/o CD9 en proteínas exosómicas en sobrenadante de cultivo usando Exoscreen.

(Sumario)

Por lo tanto, se confirmó que los exosomas secretados por las HCEC pueden detectarse al menos usando CD63 o CD9 como marcador.

Los exosomas pueden estar asociados con el mecanismo de una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo

humano de interés en la presente invención cambiando a una célula con transición de estado no prevista. Por ejemplo, la transición de estado puede ocurrir cuando un sistema de metabolismo energético se desvía hacia el metabolismo anaeróbico de la glucosa del ciclo aerobio de TCA del sistema respiratorio mitocondrial debido a diversos estreses. Se sugiere la posible implicación de la expresión de miR de miR378 o similar en tal sesgo en el metabolismo. Los exosomas y miR secretado pueden estar implicados en la amplificación de dicho miR.

(Ejemplo 10: Investigación clínica sobre la infusión de células funcionales que poseen la propiedad endotelial de la córnea humana para queratopatía ampollosa)

En este ejemplo, el objetivo de las investigaciones clínicas (a continuación en el presente documento, denominadas presentes ensayos) sobre la infusión de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial de la córnea humana de la invención para pacientes con queratopatía ampollosa (los pacientes objetivo aplicables mencionados a continuación se denominan colectivamente como tales a continuación en el presente documento) fue confirmar la seguridad y la eficacia de la infusión de células endoteliales corneales humanas cultivadas y la adecuación del estándar de calidad para células infundidas mientras se seleccionan como diana pacientes con queratopatía ampollosa cuyo único método terapéutico convencional es el trasplante de córnea usando una córnea de donante alogénico (córnea alogénica).

Los presentes ensayos se realizaron mediante el siguiente procedimiento.

(*Cumplimiento de las directrices)

Las presentes investigaciones clínicas se realizaron de acuerdo con la “Declaración de Helsinki”, “Ley sobre la seguridad de la medicina regenerativa”, “Un estudio para garantizar la calidad y seguridad de productos farmacéuticos y dispositivos médicos derivados del procesamiento de células madre somáticas humanas alogénicas”, “Evaluación de seguridad viral de productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal” y “Estándar para ingredientes biológicos” después de recibir una aprobación para “Investigación clínica sobre trasplante de células endoteliales corneales cultivadas para queratopatía ampollosa” del comité de examen para estudios clínicos de células madre humanas establecidos bajo la supervisión del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón.

(*Método de ensayo)

1. Protocolos de ensayo e institución médica que realiza los ensayos

Después de recibir una aprobación final del Consejo de Ciencias de la Salud del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, este estudio se centró en 15 casos diagnosticados como que requieren trasplante de córnea debido a queratopatía ampollosa en el Hospital Universitario de la Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto.

2. Pacientes sujeto y enfermedades

Los pacientes sujetos fueron pacientes con queratopatía ampollosa diagnosticados como que requieren cirugía de trasplante de córnea, que han dado un consentimiento por escrito antes de la participación en los presentes ensayos y cumplen con todos los siguientes criterios para determinar la elegibilidad: 1) la mejor agudeza visual corregida es inferior a 0,5, 2) no puede observarse una célula endotelial corneal con un microscopio especular endotelial corneal o la densidad de células endoteliales es inferior a 500 células/mm^2; 3) grosor corneal de 630 micrón o mayor y presencia de edema epitelial corneal; 4) pacientes que tienen 20 años o más y menos de 90 años de edad en el momento de dar el consentimiento; y 5) pacientes que han dado su consentimiento por escrito por sí mismos o por un representante legal; y que no entran dentro de ninguno de los siguientes criterios de exclusión: 1) pacientes con una infección corneal activa (bacterias, hongos, virus o similares); 2) pacientes que están o pueden estar embarazadas, o pacientes que están en lactación; 3) pacientes con una enfermedad hemorrágica; 4) pacientes que el médico encargado determinó que eran incapaces de una comprensión o cooperación suficiente debido a discapacidad mental (incluyendo demencia media y grave); 5) pacientes con glaucoma con control alterado de la presión intraocular; 6) pacientes con diabetes con control de azúcar en sangre deteriorado; 7) pacientes con hipersensibilidad a agentes esteroides; 8) pacientes con complicaciones de una enfermedad autoinmunitaria sistémica (SLE, enfermedad de Behcet, o similares); 9) pacientes que se sospecha fuertemente que tienen deterioro de la visión debido a otra causa; 10) pacientes que ya se han sometido a terapia según este protocolo; 11) pacientes que usan o están programados para usar un agente anticancerígeno; 12) pacientes con antecedentes de vasculopatías (infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, arritmia con control deficiente, o similares), enfermedad cerebrovascular (ictus) (y/o complicación de la misma); y 13) otros pacientes que el médico responsable del estudio o el médico encargado del estudio determina que tienen un impedimento para participar en la presente terapia, tales como pacientes que no se consideran adecuados para realizar esta terapia debido a complicaciones o similares.

3. Método de preparación de células endoteliales corneales cultivadas para los ensayos de este ejemplo y dosificación y administración durante la cirugía de infusión

Se infundieron células endoteliales corneales cultivadas/preparadas una vez a 1 X 10^6 células/300 microlitros en la

cámara anterior de acuerdo con la técnica de cirugía de trasplante de córnea de acuerdo con los siguientes procedimientos de 1)-3).

1) Tejido corneal de materia prima: Las córneas usadas como materia prima para el subcultivo se recibieron de SightLife Inc., que es un banco de ojos en Seattle, EE.UU. Se determinó que las córneas humanas eran adecuadas para el trasplante de córnea mediante el diagnóstico de la elegibilidad del donante de córnea y la prueba de seguridad sobre la córnea extraída realizada por SightLife Inc.

2) Preparación de células endoteliales corneales cultivadas

Se prepararon células endoteliales corneales cultivadas de acuerdo con el Procedimiento Operativo Estándar (SOP) del Centro de Procesamiento de Células de la Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto (CPC) que se ajusta a las GMP. Brevemente, las células endoteliales corneales se extrajeron con la membrana de Descemet de las córneas humanas y se trataron con colagenasa A, y después se suspendieron en un medio de cultivo celular. Las células se sembraron en una placa de cultivo para subcultivo. Las células se cultivaron usando las condiciones descritas en el método de preparación de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención descritas en el ejemplo 2 u 11 en la presente memoria descriptiva como condiciones específicas. Después de confirmar que las células están libres de contaminación o anomalía cuando se proporcionan las células tras la cirugía de trasplante, las células se recuperaron mediante tratamiento con enzima TrypLE y se lavaron con Opti-MEM I libre de rojo fenol. Las células se dispensaron en Proteosave de manera que el número de células endoteliales corneales cultivadas fue 1,5 x 10^6 células/450 microlitros en Opti-MEM I suplementado con Y-27632 (diclorhidrato de (R)-(+)-trans-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-ciclohexanocarboxamida monohidratado) con una concentración final de 100 microM para preparar una muestra para trasplante.

3) Infusión de células endoteliales corneales cultivadas

Las cirugías se realizaron en principio usando anestesia local. Después de crear una incisión de aproximadamente 2 mm en el limbo corneal, se usó una aguja de silicona para el desprendimiento del endotelio corneal (disponible de Inami o similar) para eliminar las células endoteliales corneales degeneradas o la matriz extracelular anómala de un receptor con un diámetro de 5-10 mm. Después de la eliminación, las células endoteliales corneales cultivadas suspendidas en Opti-MEM I (Life Technologies) que contenía Y-27632 con una concentración final de 100 microM se infundieron en la cámara anterior a 1 x 10^6/300 microlitros usando una aguja de 26G. Se inyectó un agente esteroide (véase a continuación) bajo la conjuntiva. Inmediatamente después de la finalización de la cirugía, se pidió a los pacientes que reposaran boca abajo durante tres horas o más.

(*Elementos examinados/observados)

1) Elementos de examen y período de examen

La tabla 9 muestra el programa de ensayo para los elementos inspeccionados y el período de inspección.

Tabla 9 Lista de cada elemento examinado y período de examen

[Tabla 9]

Periodo de examen / Elemento examinado	Antes	Día de infusión	Después de la infusión										
	Antes de la inclusión		2 días	1 semana	2 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas	16 semanas	20 semanas	24 semanas
Antecedentes del sujeto de prueba	○										
Examen clínico*5	○					○		△			○
Examen general	○		△	○	△	○	△	○	△	△	○
Prueba oftalmológica A	○		△	○	△	○	△	○	△	△	○
Prueba oftalmológica B	○			○		○		○			○
Síntoma subjetivo	○			△		○		○			○
Imagen del segmento ocular anterior	△		△	△		△	△	△	△	△	△
NEI VFQ-25	○										○
Uso de fármaco	△	△	△	○	△	○	△	○	△	△	○
Examen de infección	○										
Observación tras el trasplante		○									
Periodo de notificación de casos	●			●		●		●			●
Acontecimiento adverso											

Antes de la inclusión: puede usarse cualquier dato dentro de las 4 semanas anteriores a la inclusión. Después de la infusión: 2 días +/- 1 día, 7 días +/- 2 días y 14 días +/- 2 días se consideran aceptables. Además, 4 semanas +/- 7 días, 8 semanas +/- 7 días, 12 semanas +/- 7 días, 16 semanas +/- 7 días, 20 semanas +/- 7 días y 24 semanas +/- 14 días se consideran aceptables. Para cada uno de los exámenes de 8 semanas, 16 semanas y 20 semanas, es aceptable que lo examine un médico asociado cercano si el paciente no puede hacer una visita de larga distancia. Se realizan exámenes clínicos de 12 semanas (+/- 7 días) y 24 semanas (+/- 14 días) durante la administración sistémica continua de fármacos. Los datos también estaban disponibles en los 15 casos a 1 año y 8 casos a los 2 años después de la infusión celular como período de observación de seguimiento.

Leyenda: círculo en blanco: elemento descrito en el informe de casos

triángulo: elemento que no se requiere que se describa en el informe de casos

círculo relleno: período de informe de casos, cada uno de los cuales es un elemento llevado a cabo en este ejemplo.

Cabe señalar que la descripción de 4 semanas es sinónimo de 1 mes, la descripción de 12 semanas es sinónimo de tres meses y la descripción de 24 semanas es sinónimo de 6 meses en este ejemplo y diagramas relacionados.

<1> Como antecedentes del sujeto de prueba, se examinaron las circunstancias de la enfermedad original, el historial

de trasplante de córnea y cirugía ocular y la presencia de enfermedad sistémica/alergia farmacológica mediante entrevista y diagnóstico.

<2> Como examen clínico antes de la cirugía, se examinó lo siguiente: (1) examen hematológico: recuento de glóbulos rojos, recuento de glóbulos blancos, cantidad de hemoglobina, valor de hematocrito, recuento de plaquetas, recuento diferencial de glóbulos blancos [INR (PT/APTT), fibrinógeno]; (2) inspección bioquímica de la sangre: azúcar en sangre, colesterol total, triglicéridos, proteína total, albúmina, creatinina, bilirrubina total, GOT, GPT, gamma-GTP, LDH y ALP; y (3) examen de infección: presencia de VHB, VHC, VIH, HTLV, infección por sífilis e infección corneal activa (bacterias, hongos, virus, o similares).

<3> Como examen oftálmico general, se midió la agudeza visual como agudeza visual decimal. El grosor corneal se midió cronológicamente usando un instrumento Pentacam. El examen de células endoteliales corneales se realizó usando un microscopio especular sin contacto o de contacto, y la presión ocular se midió usando un tonómetro sin contacto o de contacto.

<4> El examen oftalmológico A se realizó clasificando y puntuando la observación de la córnea mediante un microscopio con lámpara de hendidura (edema epitelial, trastorno epitelial, edema estromal y opacidad estromal), observación de la cámara anterior y observación de la conjuntiva (hiperemia conjuntival y edema conjuntival) en 4 niveles, es decir, 0: ninguno, 1: leve, 2: moderado y 3: grave, y la observación del segmento ocular anterior se registró tomando imágenes.

<5> Para la observación oftalmológica B, se realizó un examen con microscopio con lámpara de hendidura o un examen de campo visual y se realizó una fundoscopia con respecto a la observación del iris, cataratas, glaucoma y enfermedades retinianas que pueden afectar a la visión para la determinación en 4 niveles, es decir, 0: ninguno, 1: leve, 2: moderado y 3: grave.

<6> Para evaluar la relación entre el cambio en la función visual antes y después del trasplante y la QOL, se realizó una encuesta mediante NEI VFQ-25 (cuestionario de función visual del Instituto Nacional del Ojo de 25 puntos).

2) Acontecimientos adversos

Todas las indicaciones, síntomas o enfermedades desfavorables o no deseados que se producen durante el seguimiento de los presentes ensayos se consideran acontecimientos adversos. Reacciones cuya relación causal con la técnica de trasplante, las células trasplantadas o la terapia global asociada con la terapia del protocolo no puede negarse se consideraron efectos secundarios. En caso de un acontecimiento adverso, el nombre del acontecimiento, la fecha de inicio, el juicio con respecto a grave/no grave relacionado con muerte/hospitalización/daño irreversible, gravedad, fecha de confirmación del resultado de un acontecimiento adverso y el resultado se evaluó en 4 niveles, es decir, eliminado, aliviado, sin cambio y exacerbado. En caso de que se encuentre un acontecimiento adverso, se realizó una investigación de seguimiento hasta que el resultado fue definitivo independientemente de la presencia de una relación causal con la presente terapia de infusión. La relación causal con la técnica de infusión, las células infundidas o la terapia asociada se registraron para acontecimientos adversos cuya relación causal con la presente terapia no puede negarse.

3) Fármaco combinado y tratamiento combinado

La terapia combinada se realizó mediante administración sistémica y tópica de agente esteroide corticosuprarrenal (inyección intravenosa de metilprednisolona, inyección intravenosa/administración oral de betametasona, gota ocular de betametasona o gota ocular de fluorometolona) para suprimir el rechazo y controlar la inflamación posoperatoria y antibióticos o agente antimicrobiano sintético (inyección intravenosa de flomoxef sódico, administración oral de cefcapeno pivoxilo o gota ocular de gatifloxacina) como profilaxis para la infección posoperatoria, de acuerdo con el régimen de dosificación de fármaco en el trasplante corneal normal. Estaban prohibidos agentes anticancerígenos para tratar tumores malignos, administración de un fármaco en el cuerpo vítreo, o similares durante el período de seguimiento y el tratamiento/cirugía invasiva, tal como la cirugía de cataratas en el ojo trasplantado.

(*Método de evaluación y enfoque estadístico)

Todos los casos en los que se infundieron células endoteliales corneales cultivadas se consideraron la población sometida a análisis. Se calcularon la proporción del número de casos con la densidad de células endoteliales corneales 24 semanas después de la cirugía de infusión, usado como criterio de valoración final, de 500 células/mm^2 y el intervalo de confianza del 95 % del mismo, cambio en el grosor corneal desde antes de la infusión hasta 24 semanas después de la infusión y el intervalo de confianza del 95 % del mismo, y la proporción del número de casos con grosor corneal 24 semanas después de la infusión de 650 micrómetros o menos y el intervalo de confianza del 95 % del mismo.

Como criterios de valoración secundarios, la proporción de casos que logran una mejora en la visión de 2 niveles o más desde antes de la infusión hasta 24 semanas después de la infusión y el intervalo de confianza del 95 % del mismo, la proporción de casos donde la suma de las puntuaciones para el edema estromal corneal + opacidad desde

antes de la infusión hasta 24 semanas después de la infusión mejoró 1 punto o más y el intervalo de confianza del 95 % del mismo, y se calculó la proporción de casos con mejoría en la puntuación de VFQ-25 desde antes de la infusión hasta 24 semanas después de la infusión y el intervalo de confianza del 95% del mismo.

Con el fin de explorar y examinar la relación entre la especificación de células endoteliales cultivadas y los efectos clínicos, se realizó análisis de estratificación entre la proporción de razones E de células endoteliales usadas como células infundidas y la densidad de células endoteliales corneales postoperatoria y el adelgazamiento del grosor corneal.

Para acontecimientos adversos, se calculó la proporción de casos de acontecimientos adversos que se habían producido entre el inicio de la terapia del protocolo, a través de cirugía de trasplante, y 24 semanas después del trasplante y el intervalo de confianza del 95 % del mismo.

(* Base para establecer el número objetivo de casos)

Se exploran la seguridad y la eficacia de la cirugía de infusión de células endoteliales corneales cultivadas dirigida a la queratopatía ampollosa. Se determinaron 15 casos considerados necesarios para examinar la validez del establecimiento del estándar para células endoteliales corneales cultivadas.

(Resultados)

La tabla 10 muestra la lista de 15 casos en los que se realizó cirugía de infusión de células endoteliales corneales en estos ejemplos con los resultados de los mismos.

A continuación se notifica la observación/evaluación hasta dos años después de la operación de los criterios de valoración primarios, el cambio en la densidad de células endoteliales corneales y el grosor corneal y los criterios de valoración secundarios, la agudeza visual y la observación/medición corneal en casos de cirugía de infusión de células endoteliales corneales sometiendo un total de 15 casos (promedio 67,3 +/- 11,4 años de edad) que consistían en 7 hombres y 8 mujeres que se incluyeron de acuerdo con los estándares de inclusión/exclusión después de recibir un consentimiento por escrito.

[Tabla 10-1]

Lista de cirugía de infusión de células endoteliales cultivadas

N.° de paciente	Edad	Sexo	Enfermedad	Propiedad de la célula infundida				
				Razón E	Célula funcional que posee la propiedad endotelial corneal célula funcional + célula semifuncional	CD44 intermediamente positivo CD24 negativo CD26 negativo (Célula endotelial corneal intermediamente diferenciada)	CD44 intermediamente positivo CD24 positivo CD26 negativo	CD44 fuertemente positivo CD24 positivo CD26 negativo
A	70-79	Hombre	Síndrome de pseudoexfoliación	14,2	86	71,8	0,5	0,9
B	40-49	Hombre	Distrofia corneal de Fuchs					
C	70-79	Mujer	Iridotomía láser	55,5	96	40,5	1,4	0,9
D	70-79	Mujer	Distrofia corneal de Fuchs					
E	50-59	Mujer	Distrofia corneal de Fuchs	77	97,4	20,4	2,3	0,3
F	60-69	Hombre	Después de múltiples cirugías					
G	80-89	Mujer	Distrofia corneal de Fuchs	40,4	96,2	55,8	0	0
H	50-59	Mujer	Distrofia corneal de Fuchs					
I	60-69	Mujer	Distrofia corneal de Fuchs	93,9	93,9	0	0,3	0
J	70-79	Mujer	Iridotomía láser					

K	70-79	Hombre	Después de la cirugía de infusión corneal						
L	70-79	Mujer	Iridotomía láser Después	99,2	99,3	0,1	0,4	0	
M	70-79	Hombre	pseudofáquica						
N	70-79	Hombre	Después de la cirugía de infusión corneal						
O	40-49	Hombre	Corneal endotelial congénito						

[Tabla 10-2]

Densidad de células endoteliales corneales células/mm²					Cambios en el grosor corneal μm					
Semana 4 (ECD)	Semana 12 (ECD)	Semana 24 (ECD)	1 año (ECD)	2 años (ECD)	Antes de la infusión	Semana 4	Semana 12	Semana 24	1 año	2 años
Incapaz de medir	1577	1271	1542	871	792	752	667	640	658	710
Incapaz de medir	1437	1134	1067	959	637	534	501	509	512	529
2268	2703	2232	2096	1447	775	522	517	505	526	525
Incapaz de medir	1942	2288	1757	1316	750	671	600	626	580	550
Incapaz de medir	3571	2833	2591	2188	657	627	475	489	490	503
Incapaz de medir	2463	1880	1961	1546	649	701	648	595	598	543
2326	2695	2141	2028	1600	741	521	545	539	542	523
Incapaz de medir	2247	2331	1996	1610	725	605	586	561	577	572
3484	2647	2857	2924		681	571	561	544	556	
3155	3067	2710	2746		824	564	548	541	529	
3333	3021	2950	3040		774	532	553	519	527	
3584	3115	3546	3226		780	557	535	544	557	
4854	4348	4149	4184		792	569	554	556	550	
2804	3584	3788	2283		806	584	584	543	549	
4016	3534	3115	2924		792	637	666	643	647	

[Tabla 10-3]

Grosor corneal Δ % de cambio					Cambio en la agudeza visual corregida (agudeza visual logMAR)			
					Fecha de observación			
Semana 4	Semana 12	Semana 24	1 año	2 años	Antes de la infusión	Semana 4	Semana 12	Semana 24
-5,1	-15,8	-19,2	-16,9	-10,4	1,00	1,15	0,52	0,40
-16,2	-21,4	-20,1	-19,6	-17,0	0,40	1,00	0,40	0,00
-32,6	-33,3	-34,8	-32,1	-32,3	1,00	0,40	0,10	0,10
-10,5	-20,0	-16,5	-22,7	-26,7	0,52	0,52	0,52	0,52
-4,6	-27,7	-25,6	-25,4	-23,4	0,70	1,40	0,40	0,30
8,0	-0,2	-8,3	-7,9	-16,3	0,40	1,00	0,30	0,30
-29,7	-26,5	-27,3	-26,9	-29,4	0,70	0,22	0,10	0,10
-16,6	-19,2	-22,6	-20,4	-21,1	1,52	0,40	0,05	0,05
-16,2	-17,6	-20,1	-18,4		0,40	0,15	0,10	0,05
-31,6	-33,5	-34,3	-35,8		1,40	1,00	0,52	0,30
-31,3	-28,6	-32,9	-31,9		1,40	0,70	1,10	1,00
-28,6	-31,4	-30,3	-28,6		0,70	0,22	0,10	0,15
-28,2	-30,1	-29,8	-30,6		2,00	1,22	0,52	0,52
-27,5	-27,5	-32,6	-31,9		1,70	1,22	1,00	0,82
-19,6	-15,9	-18,8	-18,3		0,70	0,52	0,70	0,30

[Tabla 10-4]

Puntuación del edema estromal corneal				Puntuación de opacidad del estroma corneal	
Fecha de observación				Fecha de observación	
Antes de la infusión	Semana 4	Semana 12	Semana 24	Antes de la infusión	Semana 24
2	2	1	0	2	0
2	1	0	0	2	0
2	0	0	0	2	0
2	2	1	1	1	1
2	2	0	0	2	0
2	1	0	0	2	0
2	0	0	0	1	0
2	1	0	0	2	0
2	1	0	0	1	0
2	0	0	0	0	0
3	1	0	0	1	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
3	1	0	0	1	1

A continuación, La tabla 11 muestra un elemento de evaluación, la distribución de células endoteliales corneales.

[Tabla 11]

Distribución de la densidad de células endoteliales corneales después de la cirugía de infusión

Densidad del endotelio		Incapaz de medir	< 1000	1000 ≦	2000 ≦	3000 ≦	4000 ≦	Total
4 semanas después de la cirugía	**Total**	**6**			**3**	**4**	**2**	**15**
	E-R<90	6			2			8
	E-R≧90				1	4	2	7
12 semanas después de la cirugía	**Total**			**3**	**5**	**6**		**15**
	E-R<90			3	4	1		8
	E-R≧90				1	5	1	7
24 semanas después de la cirugía	**Total**			**3**	**8**	**3**	**1**	**15**
	E-R<90			3	5			8
	E-R≧90				3	3	1	7
1 año después de la cirugía	**Total**			**5**	**7**	**2**	**1**	**15**
	E-R<90			5	3			8
	E-R≧90				4	2	1	7
2 años después de la cirugía	**Total**		**2**	**5**	**1**			**8**
	E-R<90		2	5	1			8
	E-R≧90							

Se completó la observación de seguimiento un año después de la cirugía para 15 casos (2 años para 8 casos), lo que dio como resultado densidades de células endoteliales de 1000 células/mm^2 o mayores en los 15 casos. Las densidades se recuperaron a la normalidad o grado 1 (leve) bajo la clasificación de gravedad de trastornos endoteliales corneales (Japanese Journal of Ophthalmology 118: 81-83, 2014). Para los 15 casos sometidos a examen en este ejemplo, la densidad de células endoteliales corneales antes de la cirugía no pudo observarse/medirse con un microscopio especular (a continuación en el presente documento, especular) debido a un edema estromal corneal previo a la cirugía y opacidad y los casos se diagnosticaron como queratopatía ampollosa con clasificación de gravedad de grado 4. Se confirmó que estos casos se recuperaban de nuevo a la clasificación de gravedad de grado 1 de 4 semanas a 24 semanas después de la cirugía, y 12 de 15 casos, es decir, el 80,0 % (intervalo de confianza del 95 %: 51,9-95,7 %) mantuvieron una densidad endotelial de 2000 células/mm^2 o más, que se considera una córnea normal sin ningún problema para mantener la función endotelial de una córnea.

La tabla 12 muestra un criterio de valoración primario, el cambio en el grosor de la córnea.

Para córneas con edema estromal corneal y opacidad, el grosor corneal disminuyó hasta 650 microm o menos, que es un estándar general para la observación de una anomalía en el grosor corneal en los EE.UU, en 12 de 15 casos,

es decir, el 80,0% (intervalo de confianza del 95 %: 51,9-95,7 %), 4 semanas después de la cirugía de infusión o 13 de 15 casos, es decir, el 86,7 % (intervalo de confianza del 95 %: 59,5-98,3 %), 12 semanas después de la cirugía de trasplante. Los 15 casos superaron este estándar 24 semanas después de la cirugía. El grosor corneal de 745 +/- 61 microm antes de la cirugía presentó un adelgazamiento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) hasta 596 +/- 69 microm 4 semanas después de la cirugía, y luego hasta 569 +/- 57 microm 12 semanas después de la cirugía, luego disminuyó gradualmente hasta 557 +/- 48 microm 24 semanas después de la cirugía, y finalmente hasta un grosor corneal estable que era casi normal. Véase la tabla 12 para más resultados (1 y 2 años).

[Tabla 12]

Cambio en el grosor corneal antes y después de la cirugía

•		**Incapaz de medir**	< 500	500 ≦	550 ≦	600 ≦	650 ≦	700 ≦	750 ≦	800 ≦	**Total**
Antes de la cirugía	**Total**					**2**	**2**	**2**	**7**	**2**	**15**
	E-R<90					2	1	2	3		8
	E-R≧90						1		4	2	7
4 semanas después de la cirugía	**Total**			**4**	**5**	**3**	**1**	**1**	**1**		**15**
	E-R<90			3		2	1	1	1		8
	E-R≧90			1	5	1					7
12 semanas después de la cirugía	**Total**		**1**	**5**	**5**	**2**	**2**				**15**
	E-R<90		1	3	1	2	1				8
	E-R≧90			2	4		1				7
24 semanas después de la cirugía	**Total**		**1**	**8**	**3**	**3**					**15**
	E-R<90		1	3	2	2					8
	E-R≧90			5	1	1					7
1 año después de la cirugía	**Total**		**1**	**6**	**6**	**1**	**1**				**15**
	E-R<90		1	3	3		1				8
	E-R≧90			3	3	1					7
2 años después de la cirugía	**Total**			**5**	**2**			**1**			**8**
	E-R<90			5	2			1			8
	E-R≧90										

La tabla 13 muestra un criterio de valoración secundario, el cambio en la agudeza visual LogMAR.

Se completó una observación de seguimiento 24 semanas después de la cirugía para 15 casos, que mostró una mejora significativa ($p < 0,001$) en la visión 12 semanas o más después de la cirugía, ya que la visión de LogMAR media fue 0,43 +/- 0,33 después de 12 semanas y 0,33 +/- 0,29 después de 24 semanas hasta 0,97 +/- 0,52 antes de la cirugía de trasplante. Se observó una mejora de 5,4 niveles en promedio después de 12 semanas y 6,4 niveles después de 24 semanas (intervalo de confianza del 95 %: de 4,2 a 8,7 niveles) con respecto a la visión antes de la cirugía. 13 de 15 casos, es decir, el 86,7 % (intervalo de confianza del 95 %: 59,5-98,3 %), vieron una mejora en la visión de 2 o más niveles después de 24 semanas. Ahora es posible aliviar/disminuir el edema corneal con regeneración de las células endoteliales corneales mediante terapia de infusión. Esto se considera un resultado de tal mejora histológica o morfológica que se refleja en la visión que está directamente relacionada con la QOL de los pacientes. La visión decimal se muestra entre paréntesis en la tabla.

[Tabla 13]

Cambio en la agudeza visual logMAR [*1)]

LogMAR (agudeza visual decimal)		≦ 0,00 (≧ 1,0)	≦ 0,15 (≧ 0,7)	≦ 0,30 (≧ 0,5)	≦ 0,52 < (≧ 0,3)	□ 1,00 (≧ 0,1)	1,00 < (0,1 >)	**Total**
Antes de la cirugía	**Total**				**4**	**6**	**5**	**15**
	E-R<90				3	4	1	8
	E-R≧90				1	2	4	7
24 semanas después de la cirugía	**Total**	**1**	**5**	**4**	**3**	**2**		**15**
	E-R<90	**1**	3	2	2			8
	E-R≧90		2	2	1	2		7

[x1)] **La agudeza visual decimal se muestra entre paréntesis**

La tabla 14 muestra la distribución de puntos de mejora de la puntuación total de opacidad estromal corneal y edema estromal mediante un microscopio con lámpara de hendidura. Entre los 15 casos con seguimiento completado de 24 semanas después de la cirugía de trasplante, 13 de 15 casos, es decir, el 86,7 % (intervalo de confianza del 95 %: 59,5-98,3 %) vieron una mejora notable cuando la puntuación total de la observación del estroma corneal fue de 0. Los 15 casos presentaron una mejora significativa de 1 punto o más en la suma de los totales de la puntuación, que

es un criterio de valoración secundario.

[Tabla 14]

Estroma corneal (opacidad + edema) Cambio en la puntuación								
Puntuación de opacidad + edema		5	4	3	2	1	0	**Total**
Puntuación antes de la cirugía	**Total**		**8**	**5**	**2**			**15**
	E-R<90		6	2				8
	E-R≧90		2	3	2			7
Puntuación 24 semanas después de la cirugía	**Total**				**1**	**1**	**13**	**15**
	E-R<90				1		7	8
	E-R≧90					1	6	7

En este ejemplo, todas las especificaciones de las células endoteliales corneales usadas en los 15 casos de cirugía de infusión de células endoteliales corneales tenían una proporción recientemente establecida de células funcionales con respecto a células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal combinadas con células semifuncionales de más del 90 %.

Sin embargo, las razones E que indican la proporción de células funcionales estaban ampliamente distribuidas, del 10 % =< al 90 % =<. Por lo tanto, el efecto de las razones E sobre el grosor corneal y las células endoteliales corneales se comparó y estudió separando las células en 2 grupos que consisten en el grupo de razón E >= 90 % y el grupo de razón E < 90.

El grupo de razón E < 90 % consiste en los casos A-H. El grosor corneal disminuyó hasta menos de 600 microm a partir de la semana 4 después de la cirugía en pacientes de 3 de 8 casos, y el grosor corneal alcanzó el estándar de menos de 650 microm, que es un indicador y un criterio de valoración primario, en pacientes en 5 casos. Mientras tanto, en los casos I-O del grupo de razón E >= 90 %, el grosor corneal, el criterio de valoración primario, alcanzó el estándar de menos de 650 microm 4 semanas después de la cirugía en pacientes de los 7 casos. El grosor corneal se recuperó adicionalmente hasta menos de 600 microm en 6 de 7 casos.

La figura 69 es un gráfico que muestra el cambio en el grosor corneal antes de la infusión, 4 semanas, 12 semanas y 24 semanas después de la infusión de pacientes que tienen una población celular con una razón E de menos del 90 % infundida en (pacientes A-H) y pacientes que tienen una población celular con una razón E del 90 % o más infundida en (pacientes I-O). Puede entenderse que el adelgazamiento de las córneas se logra temprano por las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. La disminución en el grosor corneal es prominente en el grupo de pacientes con I-O sometidos a cirugía de infusión (con selección de subpoblación, razón E >= 90 %) por la presente invención. Como se muestra en la figura 69, se observó un adelgazamiento significativo en el grosor corneal, de 747 +/- 63 microm antes de la cirugía a 596 +/- 69 microm a las 4 semanas después de la cirugía. Se confirmó que 6 de 7 casos alcanzaron un nivel de alrededor de 550 microm después de 24 semanas, que puede considerarse un grosor corneal casi normal.

La figura 70 compara un método convencional (método sin selección de subpoblación) con casos de infusión de células preparadas por selección de subpoblación de la presente invención en la cámara anterior. La figura 70 muestra los resultados de la cirugía de infusión (sin selección de subpoblación) mediante un método convencional en la fila superior, resultados de cirugía de infusión (con selección de subpoblación, razón E < 90 %) por la presente invención en la fila media y los resultados de la cirugía de infusión (con selección de subpoblación, razón E >= 90%) por la presente invención en la fila inferior. Desde el lado izquierdo de cada fila, resultados de imágenes de microscopio de contraste de fase durante el subcultivo, resultados del análisis FACS basado en CD24, CD26 y CD44 de células infundidas y valores numéricos (células/mm^2) de densidad de células endoteliales corneales e imágenes de especulares después de cirugía en el lado derecho. Cuando se infunde una población celular preparada por un método convencional, se encuentran algunos casos (aunque en un pequeño número de casos) en los que es difícil tomar imágenes de células endoteliales corneales con un especular incluso 12 semanas después de la cirugía debido al efecto de la opacidad estromal corneal o edema. Sin embargo, cuando se usa cirugía de infusión (con selección de subpoblación, razón E < 90 %) según la presente invención, pudieron observarse células endoteliales con un especular desde 3 meses después de la cirugía. Como se muestra en la fila inferior, cuando se usa cirugía de infusión (con selección de subpoblación, razón E >= 90%), fue posible tomar imágenes claras y observar las células endoteliales corneales con un especular a las 4 semanas después de la cirugía. En el grupo de E-R< 90, pudieron tomarse imágenes con un especular 1 mes después de la cirugía en 2 de 8 casos (25,0 %), mientras que lo mismo fue posible en los 7 casos de infusión en el grupo de E-R >= 90%. Además, la densidad endotelial promedio de 3604 +/- 666 células/mm^2 se alcanzó en el grupo de E-R >= 90% a las 4 semanas después de la cirugía, que es la regeneración histológica al mismo nivel que la densidad de células endoteliales de individuos jóvenes. Pudieron tomarse imágenes con un especular en los 8 casos en E-R<90% a las 12 semanas después de la cirugía. La densidad de células endoteliales media se recuperó a una densidad endotelial normal de 2329 +/- 696 células/mm^2. Mientras tanto, en E-R >= 90%, una densidad de células endoteliales corneales más significativa (p = 0,00899) que E-R < 90 % también se confirmó a 3331 +/- 551 células/mm^2 a partir de 12 semanas después de la cirugía. A las 24 semanas después de la

cirugía, que es el período de tiempo de observación final, se mantuvo una densidad de células endoteliales corneales más significativa ($p < 0,001$) que E-R <90 %, es decir, 2014 +/- 567 células/mm^2 para E-R <90 % a 3302 +/- 535 células/mm^2 para E-R >= 90 %. Se reveló que se logra un efecto notable antes para las células preparadas por la selección de subpoblación de la presente invención en relación con los métodos convencionales. La figura 71 muestra la observación de la hendidura del segmento ocular anterior después de la cirugía en la terapia de infusión de células endoteliales corneales de la presente invención, DSAEK (método convencional) y PKP (queratoplastia penetrante, método convencional). Después de la terapia de infusión de células endoteliales de la presente invención, la posibilidad de astigmatismo irregular o distorsión notable en las suturas de infusión como en PKP es baja. Además, se considera un método quirúrgico con pocos casos de etapas o distorsión en la superficie endotelial de la córnea como en DSAEK. Para un especular endotelial corneal 24 semanas después del trasplante, un elemento de evaluación principal, la densidad de células endoteliales corneales excede el estándar de 500 células/mm^2 antes de 6 meses, y los 15 casos lograron una densidad de células endoteliales de 1000 células/mm^2. En la estratificación por razones E, 5 de 8 casos de los pacientes A-H en el grupo de razón E < 90 % se recuperaron al nivel de 2000 células/mm^2 o más, que se clasifica como endotelio corneal normal en la clasificación de gravedad del trastorno endotelial corneal, a las 24 semanas después de la cirugía. Además, la densidad de células endoteliales de 2500 células/mm^2 o mayor se mantuvo en todos los pacientes en 7 casos a partir de 24 semanas después de la cirugía para I-O en el grupo de pacientes con una razón E elevada al 90 % o más. Además, 4 de 7 casos alcanzaron un nivel muy alto de densidad de células endoteliales corneales de 3000 células/mm^2 o más que en un individuo joven para demostrar un resultado terapéutico significativo.

Además, los métodos convencionales tales como DSAEK o queratoplastia penetrante (PKP) no pueden evitar urdimbres en las córneas. Sin embargo, puede confirmarse que el método de este ejemplo es un método terapéutico con una invasividad muy mínima en la córnea para revertir la curvatura de la córnea después de la cirugía a un valor inherente para el organismo como puede observarse en la imagen de hendidura del segmento ocular anterior y la imagen OCT del segmento ocular anterior de diferentes métodos quirúrgicos tomadas después de la cirugía (figura 71). Además, los casos K y N son pacientes que presentaron un rechazo en el trasplante de córnea. Se consideró que las técnicas convencionales carecían de un método terapéutico eficaz contra tales casos. Sin embargo, la terapia de infusión con células sometidas a selección de subpoblación de este ejemplo indujo tolerancia inmunológica en la cámara anterior y muestra un progreso suave en la recuperación de la densidad endotelial corneal y el grosor corneal a pesar de ser casos que presentan un rechazo hasta este punto. Por lo tanto, se demuestra que tal terapia puede ser una terapia revolucionaria y segura y eficaz para los pacientes para reemplazar a DSAEK, DMEK o PKP convencionales.

Los acontecimientos adversos incluyeron un caso de elevación no grave de la presión ocular que se produjo en una mujer de 57 años de edad a los 3 meses después de la cirugía, que se cree que se debe a gotas oculares esteroides en un fármaco de terapia combinada. La gota ocular de betametasona se cambió a gota ocular de flumetolón y se usó el fármaco anti-glaucoma Xalacom simultáneamente para la elevación de la presión ocular para terminar la observación del progreso de acuerdo con un protocolo de 24 semanas. Sin embargo, no se observó ningún otro acontecimiento adverso debido a las células endoteliales corneales cultivadas usadas en terapia tal como una inflamación intraocular, infección o acontecimiento iatrogénico asociado con una técnica de infusión.

Los resultados anteriores demuestran que las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal y células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales de la presente invención logran un excelente efecto terapéutico en comparación con las técnicas convencionales. Para medicamentos celulares preparados basándose en la clasificación de subpoblación de la presente invención, se encontró que los resultados terapéuticos han mejorado en general en relación con los casos que usan una población celular que se considera que tiene una función endotelial corneal obtenida por un método de preparación celular convencional, que no usan clasificación de subpoblación. En particular, se encontró un caso como se muestra en la figura 70 donde no pudieron observarse células endoteliales corneales debido a los efectos de la opacidad estromal corneal después de tres meses cuando se administró la terapia de inyección en casos sin clasificación de subpoblación, mientras que el edema/opacidad del estroma corneal se eliminó 3 meses después de la cirugía con medicamentos usando las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal y/o células endoteliales corneales diferenciadas maduras funcionales de la presente invención que se prepararon con la clasificación de subpoblación de la presente invención, demostrando así la posibilidad de un método terapéutico de alta calidad, revolucionario capaz de restaurar la transparencia de una córnea temprano en 1 mes después de la cirugía elevando la razón E.

En particular, la clasificación de subpoblación ha permitido la identificación de la razón E o la razón de las células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención y similares. De esta manera, los inventores han descubierto en la presente invención que los resultados terapéuticos pueden mejorarse elevando la razón E o la razón de células funcionales que poseen la propiedad endotelial corneal de la invención. Esto no se reveló mediante técnicas convencionales de preparación celular, o enfoque de clasificación o selección celular. Por lo tanto, se demostró que el efecto como células basado en la clasificación de subpoblación, el método de fabricación de las mismas y el medicamento celular de acuerdo con la presente invención revelan que deben ser un indicador indirecto o directo para el control de calidad.

Como se comentó anteriormente, se produjo un caso de elevación no grave en la presión intraocular debido a terapia

combinada, pero no se observó un acontecimiento adverso grave en ningún caso en el que se administró cirugía de infusión de células endoteliales corneales. Además, se alivian la presión mental mientras se espera la disponibilidad de una córnea de donante y la carga física durante la cirugía. Por lo tanto, se entiende que la QOL lograda mejoró drásticamente a partir de la terapia endotelial corneal por la presente invención.

(Ejemplo 11: Método de fabricación de células)

Este ejemplo resume a continuación un método de fabricación de células endoteliales corneales cultivadas humanas que tienen como objetivo el tratamiento de la queratopatía ampollosa.

Una capa endotelial corneal de una sola capa se extrajo de una córnea, que se importó de un banco de ojo de Estados Unidos, SightLife Inc., y de conformidad con el estándar de seguridad de la FDA y el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar. Las células endoteliales corneales se separaron durante la noche mediante tratamiento con colagenasa. Las células se cultivaron en un medio Nancy (Invest Ophthalmol Vis Sci 2004 1743/PLoS ONE 2012 e28310) (NGF, libre de extracto de hipófisis) que comprende FBS al 8 % mientras se usa Opti-MEM como medio basal. El cultivo de P0 se inició sembrando células endoteliales de los ojos izquierdo y derecho del mismo donante en una placa de colágeno I de 2 pocillos/6 pocillos. Se añadió Y-27632 10 microM- (inhibidor de ROCK) al cultivo para inducir la diferenciación en células diferenciadas maduras. Se añadió 10 microM de SB203580 para suprimir la transición de estado celular durante el período de cultivo. Después de que las células alcanzaran la confluencia después de aproximadamente 4-8 semanas, se realizaron pases de las células. Después de alcanzar la confluencia, se mantuvo la misma calidad durante varias semanas solo cambiando el medio. En los pases, las células se desprendieron de la placa con TrypLE y se lavaron con el medio, y después se sembraron en un matraz de colágeno I T25 a una densidad celular de 400 células/mm^2 o más. Si bien las investigaciones clínicas generalmente usan células de cultivo hasta P2 o P3, pueden usarse células de cultivo hasta P5-P6. La principal materia prima derivada de organismos usada en cultivo es FBS (fabricado en Australia).

Cultivos de HCEC

Las HCEC se cultivaron de acuerdo con protocolos publicados, con algunas modificaciones (Nayak SK, Binder PS. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984; 25:1213-6). Se usaron córneas de un total de 30 donantes humanos de diferentes edades en el experimento. Brevemente, las membranas de Descemet con las CEC se extrajeron de las córneas de donantes y se digirieron a 37 grados C con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) durante 2 horas. Las HCEC obtenidas de la córnea de un solo donante se sembraron en un pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos recubierta con colágeno de tipo I (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.). El medio de cultivo se preparó de acuerdo con protocolos publicados. Brevemente, se preparó medio basal con Opti-MEM-I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), suero bovino fetal (FBS) al 8 %, factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF; Life Technologies), ácido ascórbico 20 microg/ml (Sigma-Aldrich Corp.), cloruro de calcio 200 mg/l (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de condroitina al 0,08% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y 50 microg/ml de gentamicina. El medio acondicionado se preparó como se describió previamente (Nakahara, M. *et al.* PLOS One (2013) 8, e69009). Las HCEC se cultivaron usando el medio acondicionado a 37 grados C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO_2. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las HCEC se subcultivaron a una densidad celular de 800 células/mm^2 usando TrypLE Select 10x (Life Technologies) durante 12 minutos a 37 grados C cuando alcanzaron la confluencia. Se usaron las HCEC en los pases 2 a 5 para todos los experimentos.

Medición del recuento de células

Se mezcló una suspensión celular con una cantidad igual de disolución de azul de tripano al 0,4 % (Sigma, T8154) y se calculó el recuento de células con un hemocitómetro.

Clasificación de células

Para experimentos de clasificación celular, se recogieron HCEC y se tiñeron con mAb anti-CD24 humano conjugado con FITC y mAb anti-CD44 humano conjugado con PE-Cy7 (BD Biosciences) como se describió anteriormente. Después de lavar con tampón, se resuspendieron las células en tampón FACS. Las células negativas para CD24/negativas para CD44 y las células negativas para CD24/negativas para CD44 se clasificaron usando un clasificador celular BD FACSJazz (BD Biosciences) y se sembraron a una densidad de 4,2 X 10^4 células en una placa de cultivo celular de 24 pocillos para su posterior análisis.

Análisis de citometría de flujo de HCEC cultivadas

Se recogieron HCEC de una placa de cultivo mediante tratamiento con TrypLE Select como se describió anteriormente y se suspendieron a una concentración de 4 X 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 % y NaN_3 al 0,05 %). Se añadió un volumen igual de disolución de anticuerpos y se incubó durante 2 horas a 4 grados C. Después de lavar con tampón FACS, las HCEC se analizaron con FACS Canto II (BD Biosciences).

Aislamiento de subpoblaciones de HCEC por MACS

Las HCEC se desprendieron con TrypLE Select como se describió anteriormente y la subpoblación de HCEC $CD44^-$ (subpoblación efectora) se aisló usando microperlas anti-CD44 humano (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y el programa depl05 de un separador autoMACS Pro (Miltenyi Biotec). La pureza de la subpoblación efectora aislada era superior al 90 % en todos los casos como se demostró por citometría de flujo (figuras 65-67).

(Ejemplo 12: Preparación de una suspensión celular administrada a un paciente con queratopatía ampollosa en investigación clínica: tipo de vehículos administrados, inhibidor de ROCK, estabilidad de las células)

La preparación de la suspensión celular para infusión a un paciente con queratopatía ampollosa se resume a continuación.

Después de completar el cultivo, las células en un matraz se lavan con PBS y se tratan con TrypLE. Después de recoger las células, las células se lavan dos veces con Opti-MEM, y los componentes de la disolución de cultivo tales como BSA se eliminan completamente. La suspensión celular se ajustó añadiendo una disolución de infusión (vehículo) y 100 microM de Y-27632 para su uso en vehículo de infusión.

Se confirmó que no hay cambios en la tasa de supervivencia hasta 6 horas en hielo y temperatura ambiente cuando se usa este vehículo de infusión. También se realizó una prueba de estabilidad a largo plazo en el vehículo de infusión. La tasa de supervivencia celular se comparó durante un máximo de 72 horas con una disolución de irrigación intraocular Opeguard (suplementada con HSA al 10 %) que se usa con frecuencia en el campo oftálmico en comparación con Opti-MEM.

Como resultado, ambos presentaron una tasa de supervivencia del 80 % o más alta hasta al menos 24 horas. Para la estabilidad celular en el vehículo de infusión, una prueba de estabilidad de 24-48 horas después del reajuste con CPC mientras se esperan ensayos en múltiples instalaciones muestra estabilidad no solo para la tasa de supervivencia, sino también para elementos de prueba convencionales de calidad tales como marcadores y productos de superficie celular.

Como se describió anteriormente, la presente invención se ejemplifica mediante el uso de sus realizaciones preferidas. Sin embargo, se entiende que el alcance de la presente invención debe interpretarse únicamente basándose en las reivindicaciones.

[Aplicabilidad industrial]

La presente divulgación da lugar a un cambio de paradigma en la medicina regenerativa del endotelio corneal, que tiene una posible aplicación expandida a más de un millón de pacientes en todo el mundo como una medicina versátil que puede desplegarse internacionalmente. Por lo tanto, se encuentra aplicabilidad en la industria médica y sus industrias periféricas.

REIVINDICACIONES

1. Célula endotelial corneal funcional humana cultivada capaz de provocar una propiedad funcional endotelial corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de ojos humanos, en donde la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo y CD26 negativo.

2. Célula cultivada de la reivindicación 1, en donde la célula comprende además propiedades de expresión que consisten en CD90 negativo a débilmente positivo, LGR5 negativo, SSEA3 negativo, MHC1 débilmente positivo, MHC2 negativo, ZO1 positivo y Na^+/K^+ ATPasa positiva,

en donde la célula tiene una propiedad funcional que consiste en alta producción de PDGF-BB, en donde la célula no induce un rechazo alogénico tras la infusión en una cámara anterior,

opcionalmente, la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD105, CD90, CD26, CD24 y HLA-DR/DP/DQ negativos y HLA-ABC positivo.

3. Célula cultivada según la reivindicación 1 o 2, en donde la célula se cultiva en presencia continua de un inhibidor de ROCK, y sin inhibición de señalización de TGF-beta.

4. Célula cultivada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo, CD105 negativo, CD24 negativo y CD26 negativo.

5. Población celular que comprende la célula cultivada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. Población celular de la reivindicación 5, en donde una densidad celular media a partir del cultivo celular saturado (confluencia del cultivo) de la población celular es de al menos 1500 células/mm^2 o más,

opcionalmente, en donde una densidad celular media de células integradas en una superficie endotelial corneal humana después de infundir la población celular es de al menos 1000 células/mm^2 o más,

opcionalmente, en donde una densidad celular media de células integradas en una superficie endotelial corneal humana después de infundir la población celular es de al menos 2000 células/mm^2 o más,

opcionalmente, la población celular no induce un rechazo alogénico tras la infusión en una cámara anterior,

opcionalmente, la población celular no provoca sustancialmente una respuesta biológica no deseada que no esté asociada con la reconstrucción de tejido endotelial de córnea humana, tal como una mayor cantidad de citocinas inflamatorias en suero después de la administración *in vivo*.

7. Población celular de la reivindicación 5 o 6, que tiene uno o una pluralidad de los siguientes:

(1) prueba de pureza por ELISA de sobrenadante de cultivo

TIMP-1: 500 ng/ml o menos

IL-8: 500 pg/ml o menos

PDGF-BB: 30 pg/ml o más

MCP-1: 3000 pg/ml o menos

(2) prueba de pureza por FACS celular

CD166 = 95 % o más

CD133 = 5 % o menos

CD105 bajo positivo = 95% o más

CD44 bajo positivo = 70% o más

CD44 alto positivo = 15% o menos

CD24 = 10 % o menos

CD26 positivo = 5% o menos

CD200 = 5 % o menos

(3) función de barrera (ZO-1) positiva

(4) función de bombeo (Na+/K+ ATPasa) positiva

(5) Supervivencia celular

70 % o más con tinción de azul de tripano

(6) forma celular

no pueden encontrarse células transformadas mediante inspección visual.

(7) Claudina10 positiva

(8) célula efectora (razón E) > 50 %

(9) célula no prevista

célula no prevista A (célula CD44 fuertemente positiva) < 15 %, célula B no prevista (célula CD26 positiva) <5 %, célula C no prevista (célula CD24 positiva) < 10 %

(10) anomalía de cariotipo negativa.

8. Población celular según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde al menos el 70 % de las células en la población celular comprenden la célula cultivada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

9. Producto que comprende la célula cultivada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8.

10. Composición farmacéutica que comprende una célula endotelial corneal funcional humana capaz de provocar una propiedad funcional corneal humana cuando se infunde en una cámara anterior de un ojo humano, en donde la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo y CD26 negativo.

11. Composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de una disfunción o enfermedad endotelial de córnea, opcionalmente, en donde la disfunción o enfermedad endotelial de córnea comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en trastorno endotelial de córnea de grado 3 y trastorno endotelial de córnea de grado 4 (queratopatía ampollosa) (por ejemplo, distrofia corneal endotelial de Fuchs, PEX-BK (queratopatía ampollosa por pseudoexfoliación; queratopatía ampollosa que implica síndrome de pseudoexfoliación), queratopatía ampollosa posterior a iridotomía láser, queratopatía ampollosa posterior a cirugía de cataratas (incluyendo queratopatía ampollosa pseudofáquica o afáquica), queratopatía ampollosa posterior a cirugía de glaucoma y queratopatía ampollosa posterior a traumatismo, queratopatía ampollosa de causa desconocida después de múltiples cirugías, fracaso del injerto después de trasplante de córnea, distrofia endotelial corneal congénita y síndrome de hipoplasia congénita del ángulo de cámara anterior,

opcionalmente, en donde la célula se administra en una cámara anterior,

opcionalmente, en donde la célula se administra junto con un agente adicional, en donde el agente adicional comprende un inhibidor de ROCK,

opcionalmente, en donde la composición farmacéutica comprende la célula a una densidad de 5 X 10^4 células/300 microlitros a 2 X 10^6 células/300 microlitros,

opcionalmente, en donde la composición farmacéutica comprende además un vehículo de infusión celular,

opcionalmente, en donde el vehículo de infusión celular comprende al menos uno de inhibidor de ROCK, albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico,

opcionalmente, en donde el vehículo de infusión celular comprende albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico,

opcionalmente en donde el vehículo de infusión celular comprende todos del inhibidor de ROCK, albúmina, ácido ascórbico y ácido láctico,

opcionalmente, en donde el vehículo de infusión celular comprende OPEGUARD-MA(R),

opcionalmente, en donde el antígeno de superficie celular comprende además propiedades de expresión que consisten en CD90 negativo a débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo, CD26 negativo, LGR5 negativo, SSEA3 negativo, MHC1 débilmente positivo, MHC2 negativo, ZO1 positivo, y Na+/K+ ATPasa positiva,

en donde la célula tiene una propiedad funcional que consiste en alta producción de PDGFBB en donde la célula no induce un rechazo alogénico tras la infusión en una cámara anterior,

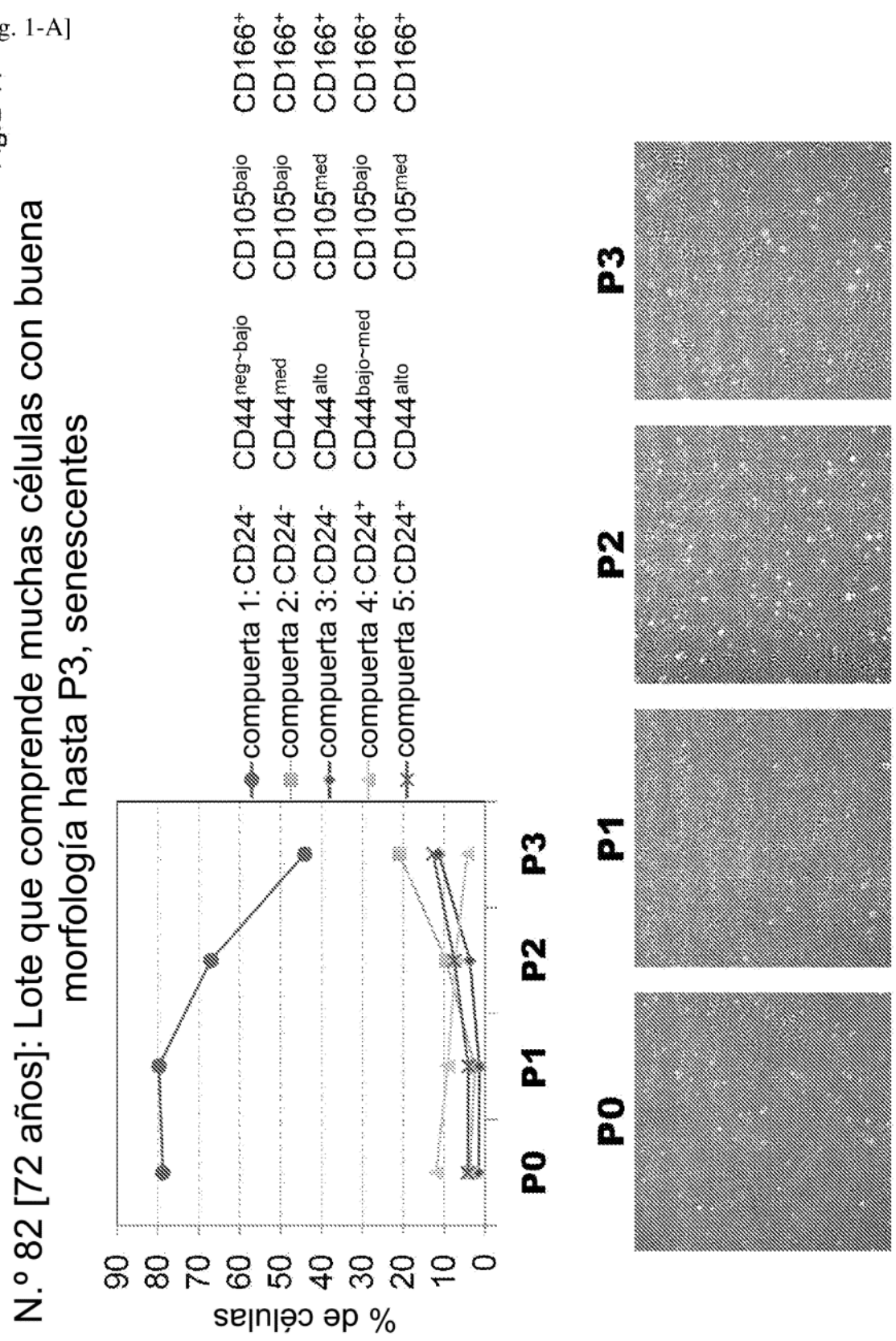
opcionalmente, en donde la célula expresa antígenos de superficie celular que comprenden fenotipos CD105, CD90, CD26, CD24 y HLA-DR/DP/DQ negativos y HLA-ABC positivo.

12. Medicamento que comprende la población celular según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8.

13. Composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde la composición farmacéutica comprende células endoteliales corneales funcionales humanas capaces de provocar una propiedad funcional de córnea humana cuando se infunden en una cámara anterior de un ojo humano, en donde al menos el 70%, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de las células comprenden un perfil de antígenos de superficie celular CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo y CD26 negativo.

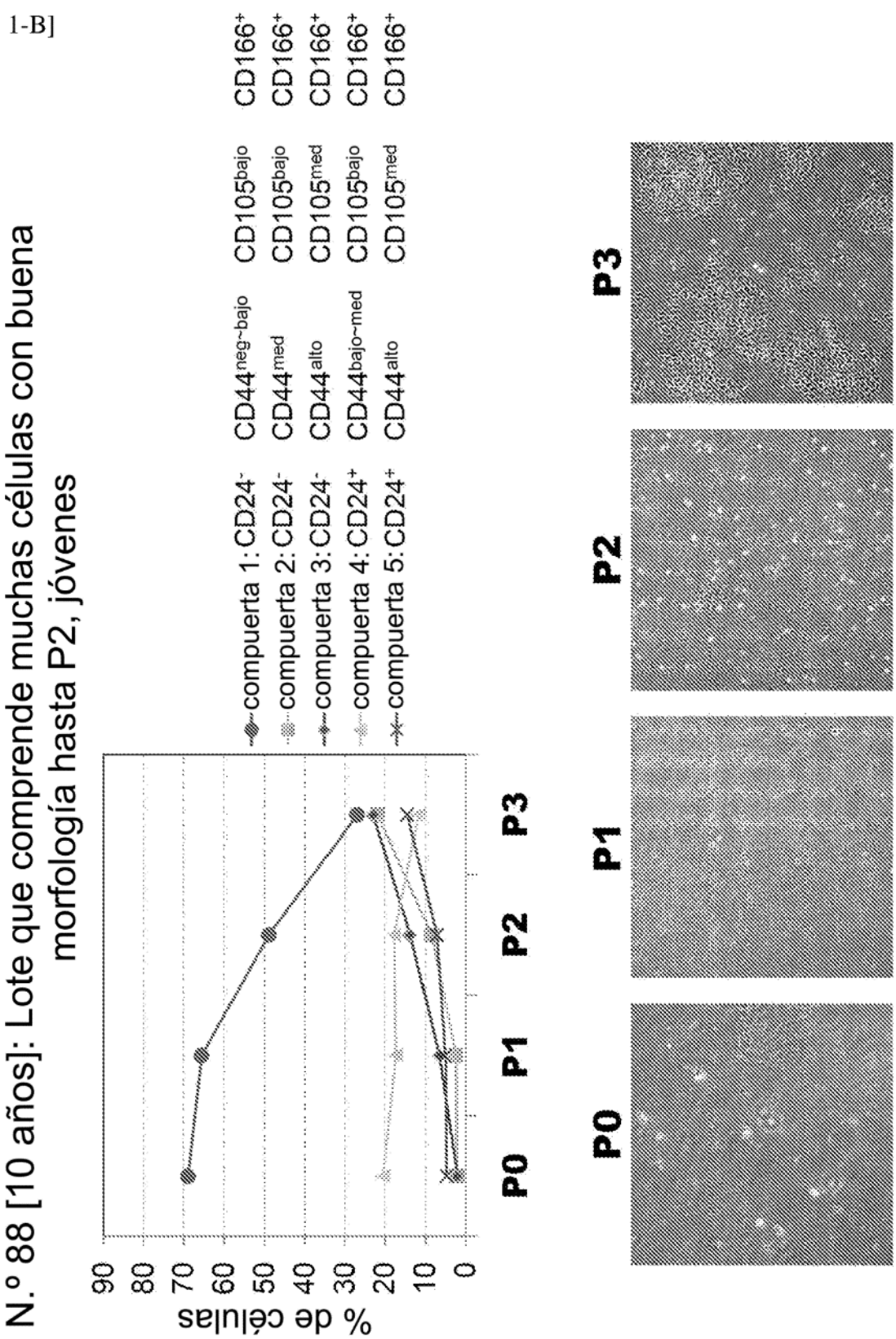
14. Medicamento de la reivindicación 12, en donde al menos el 70%, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de las células en la población comprenden un perfil de antígenos de superficie celular CD166 positivo, CD133 negativo, CD44 negativo a CD44 débilmente positivo, CD105 negativo a débilmente positivo, CD24 negativo y CD26 negativo.

[Fig. 1-A]

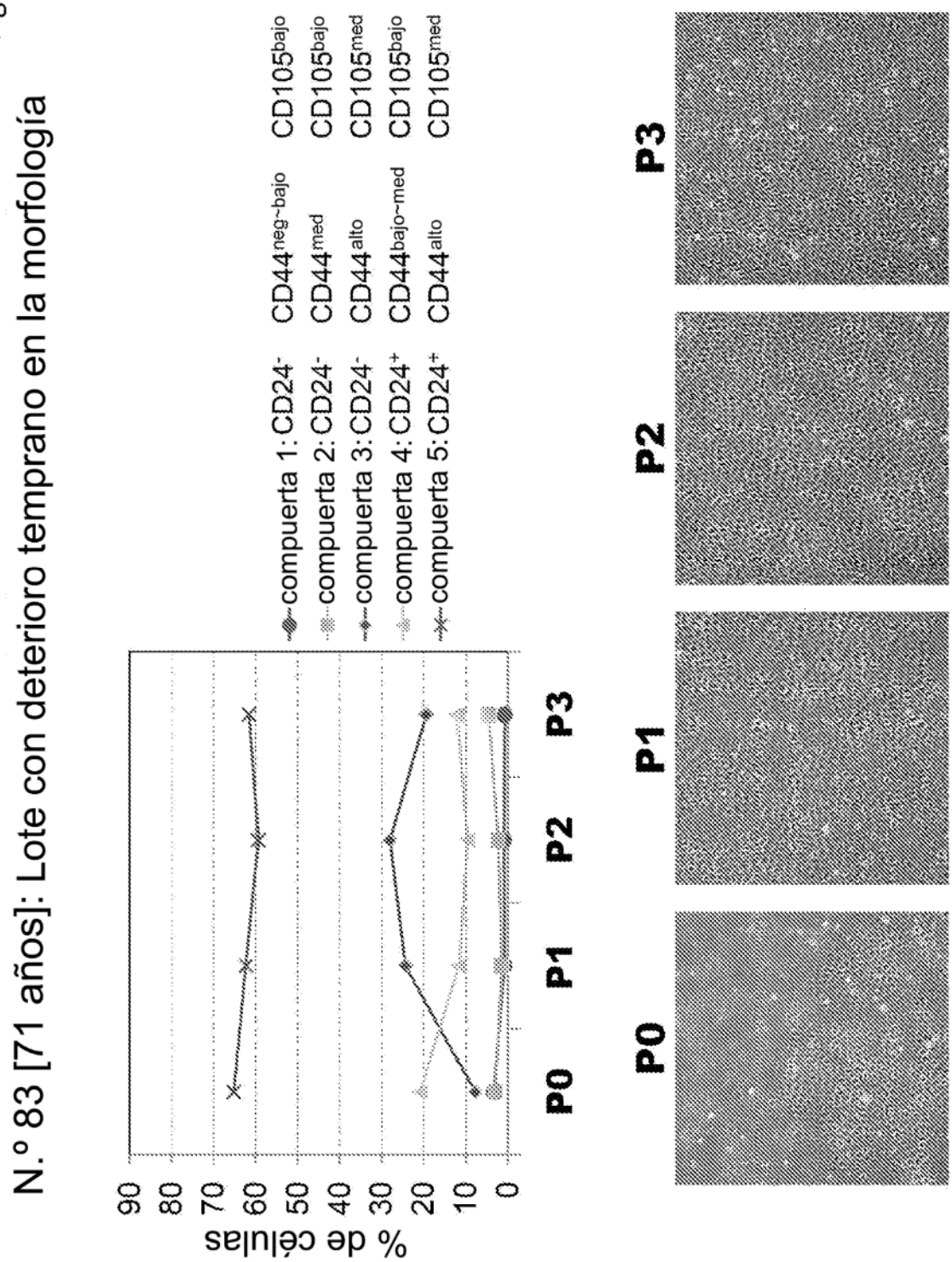

Fig.1-A
N.º 82 [72 años]: Lote que comprende muchas células con buena morfología hasta P3, senescentes
% de células
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
P0
P1
P2
P3
compuerta 1: CD24- CD44neg~bajo CD105bajo CD166+
compuerta 2: CD24- CD44med CD105bajo CD166+
compuerta 3: CD24- CD44alto CD105med CD166+
compuerta 4: CD24+ CD44bajo~med CD105bajo CD166+
compuerta 5: CD24+ CD44alto CD105med CD166+
P0
P1
P2
P3

[Fig. 1-B]

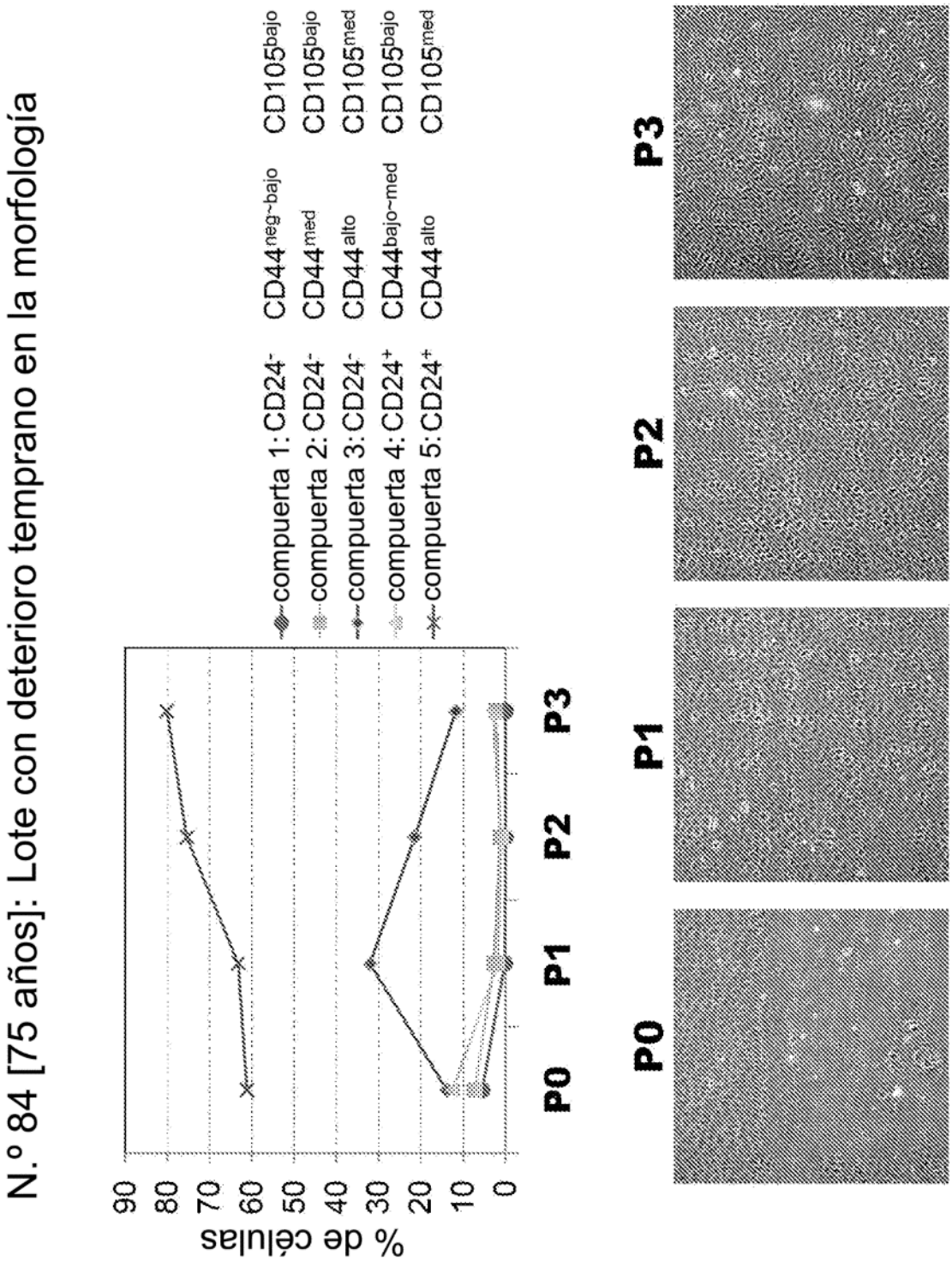
Fig.1-B


N.º 88 [10 años]: Lote que comprende muchas células con buena morfología hasta P2, jóvenes
% de células
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
P0
P1
P2
P3
compuerta 1: CD24- CD44neg~bajo CD105bajo CD166+
compuerta 2: CD24- CD44med CD105bajo CD166+
compuerta 3: CD24- CD44alto CD105med CD166+
compuerta 4: CD24+ CD44bajo~med CD105bajo CD166+
compuerta 5: CD24+ CD44alto CD105med CD166+
P0
P1
P2
P3

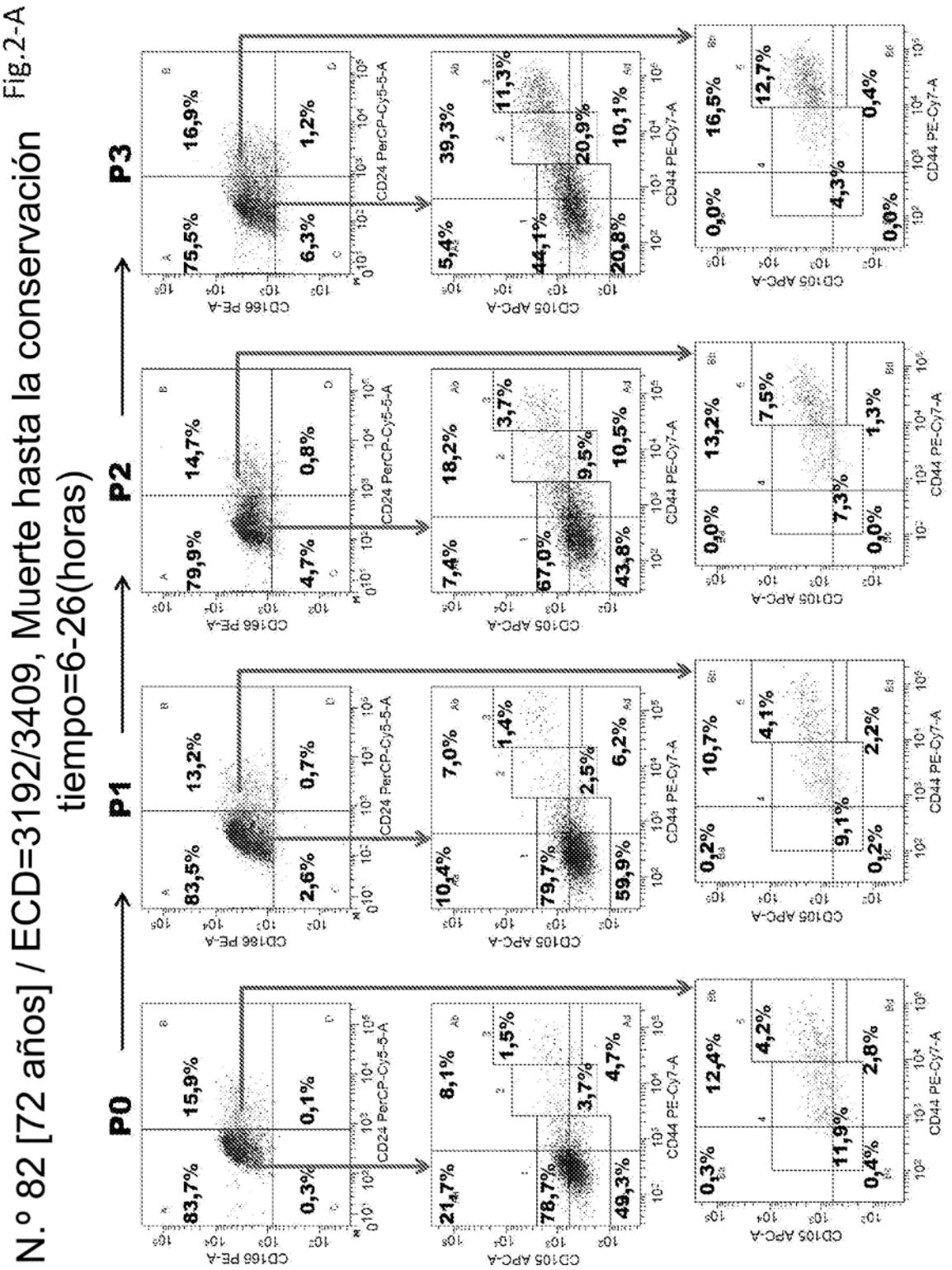
[Fig. 1-C]


Fig.1-C
N.º 83 [71 años]: Lote con deterioro temprano en la morfología
% de células
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
P0
P1
P2
P3
compuerta 1: CD24- CD44neg-bajo CD105bajo CD166+
compuerta 2: CD24- CD44med CD105bajo CD166+
compuerta 3: CD24- CD44alto CD105med CD166+
compuerta 4: CD24+ CD44bajo-med CD105bajo CD166+
compuerta 5: CD24+ CD44alto CD105med CD166+
P0
P1
P2
P3

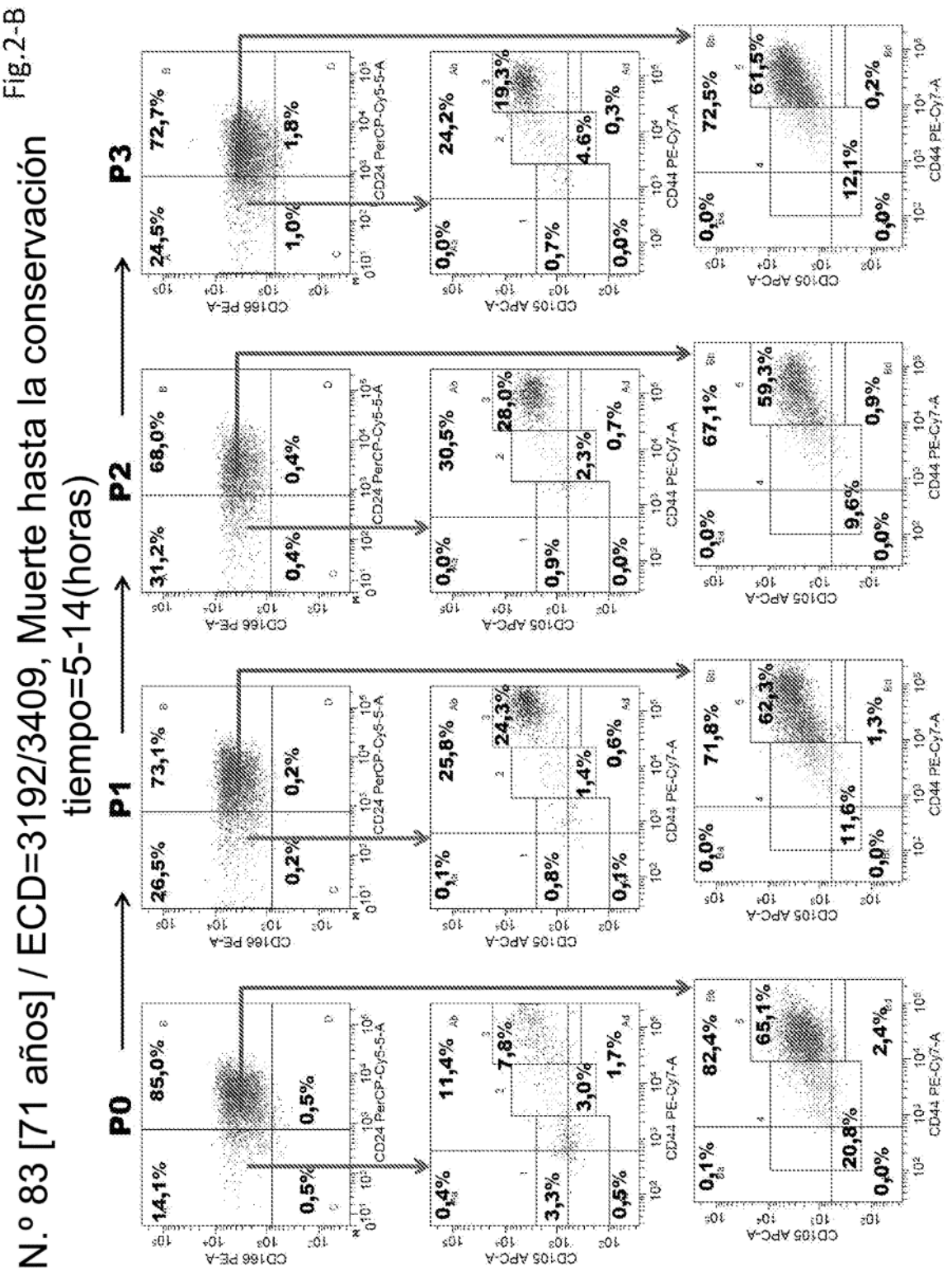
[Fig. 1-D]


Fig.1-D
N.º 84 [75 años]: Lote con deterioro temprano en la morfología
% de células
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
P0
P1
P2
P3
compuerta 1: CD24- CD44neg~bajo CD105bajo CD166+
compuerta 2: CD24- CD44med CD105bajo CD166+
compuerta 3: CD24- CD44alto CD105med CD166+
compuerta 4: CD24+ CD44bajo~med CD105bajo CD166+
compuerta 5: CD24+ CD44alto CD105med CD166+
P0
P1
P2
P3

[Fig. 2-A]

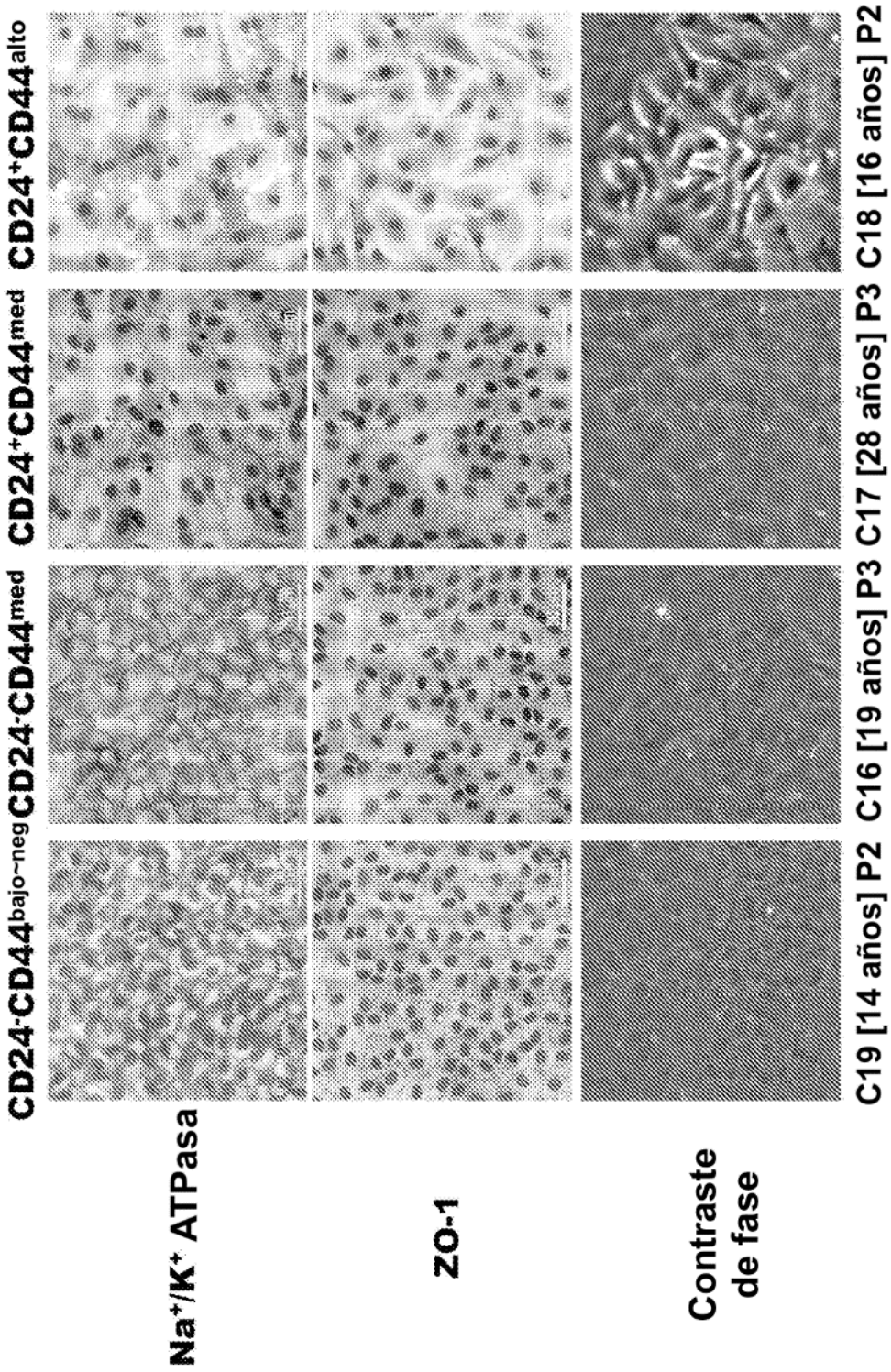

N.º 82 [72 años] / ECD=3192/3409, Muerte hasta la conservación
tiempo=6-26(horas)
Fig.2-A
P0
P1
P2
P3
CD166 PE-A
CD24 PerCP-Cy5-5-A
CD105 APC-A
CD44 PE-Cy7-A
83,7%
15,9%
0,3%
0,1%
21,7%
8,1%
78,7%
3,7%
49,3%
4,7%
0,3%
12,4%
11,9%
4,2%
0,4%
2,8%
83,5%
13,2%
2,6%
0,7%
10,4%
7,0%
79,7%
2,5%
59,9%
6,2%
0,2%
10,7%
9,1%
4,1%
0,2%
2,2%
79,9%
14,7%
4,7%
0,8%
7,4%
18,2%
67,0%
9,5%
43,8%
10,5%
0,0%
13,2%
7,3%
7,5%
0,0%
1,3%
75,5%
16,9%
6,3%
1,2%
5,4%
39,3%
44,1%
20,9%
20,8%
10,1%
0,0%
16,5%
4,3%
12,7%
0,0%
0,4%

[Fig. 2-B]

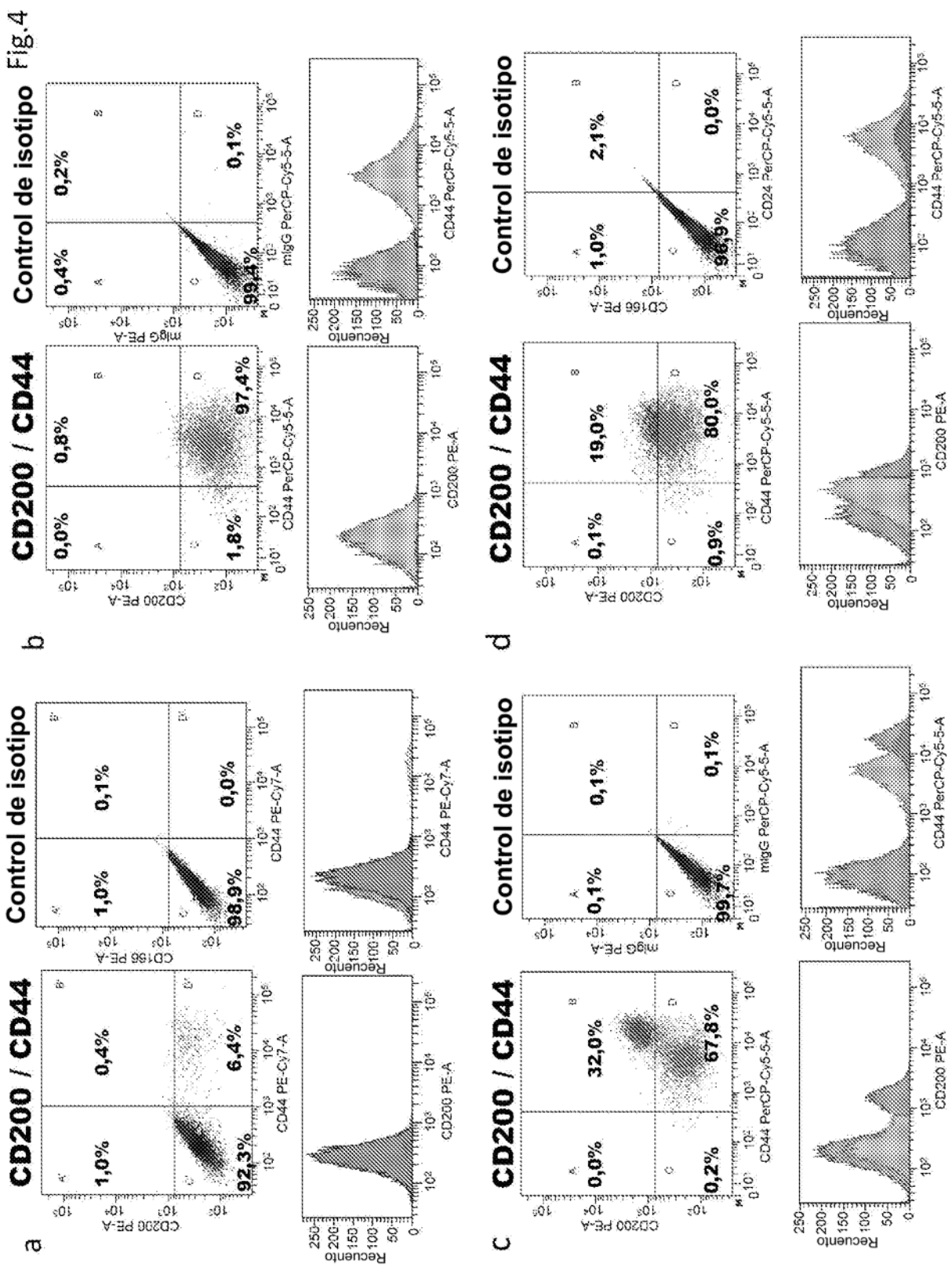

Fig.2-B
N.º 83 [71 años] / ECD=3192/3409, Muerte hasta la conservación
tiempo=5-14(horas)
P0
P1
P2
P3
CD166 PE-A
CD24 PerCP-Cy5-5-A
CD105 APC-A
CD44 PE-Cy7-A
14,1%
85,0%
0,5%
0,5%
26,5%
73,1%
0,2%
0,2%
31,2%
68,0%
0,4%
0,4%
24,5%
72,7%
1,0%
1,8%
0,4%
11,4%
7,8%
3,0%
3,3%
1,7%
0,5%
0,1%
25,8%
24,3%
1,4%
0,8%
0,6%
0,1%
0,0%
30,5%
28,0%
2,3%
0,9%
0,7%
0,0%
0,0%
24,2%
19,3%
4.6%
0,7%
0,3%
0,0%
0,1%
82,4%
65,1%
20,8%
2,4%
0,0%
0,0%
71,8%
62,3%
11,6%
1,3%
0,0%
0,0%
67,1%
59,3%
9,6%
0,9%
0,0%
0,0%
72,5%
61,5%
12;1%
0,2%
0,0%
0,0%

[Fig. 3]

Fig.3

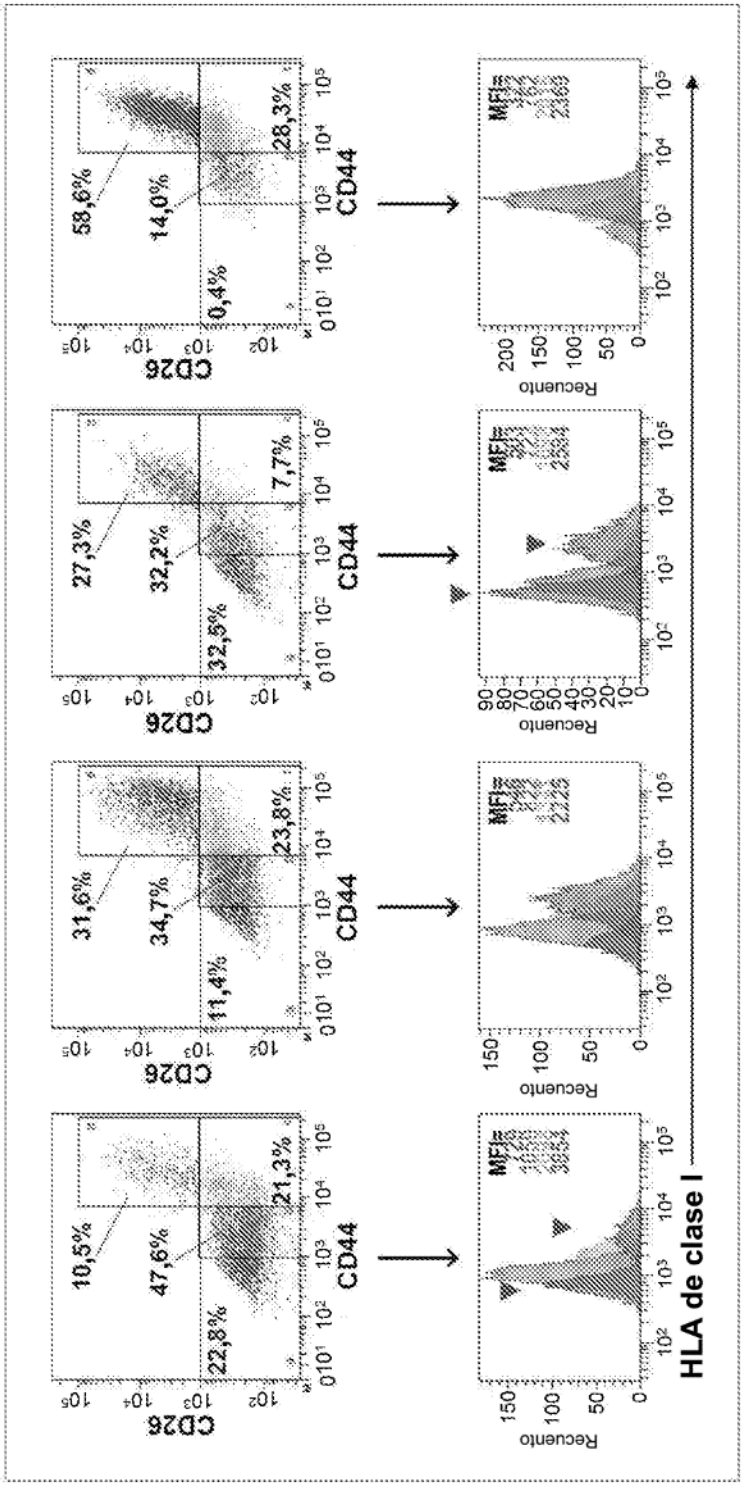

CD24-CD44bajo~neg
CD24-CD44med
CD24+CD44med
CD24+CD44alto
Na+/K+ ATPasa
ZO-1
Contraste de fase
C19 [14 años] P2
C16 [19 años] P3
C17 [28 años] P3
C18 [16 años] P2

[Fig. 4]


Fig.4
a
CD200 / CD44
Control de isotipo
1,0%
0,4%
6,4%
92,3%
1,0%
0,1%
0,0%
98,9%
CD200 PE-A
CD44 PE-Cy7-A
CD156 PE-A
Recuento
b
CD200 / CD44
Control de isotipo
0,0%
0,8%
1,8%
97,4%
0,4%
0,2%
0,1%
99,4%
CD200 PE-A
CD44 PerCP-Cy5-5-A
mIgG PE-A
mIgG PerCP-Cy5-5-A
Recuento
c
CD200 / CD44
Control de isotipo
0,0%
32,0%
0,2%
67,8%
0,1%
0,1%
99,7%
0,1%
CD200 PE-A
CD44 PerCP-Cy5-5-A
mIgG PE-A
mIgG PerCP-Cy5-5-A
CD200 PE-A
CD44 PerCP-Cy5-5-A
Recuento
d
CD200 / CD44
Control de isotipo
0,1%
19,0%
0,9%
80,0%
1,0%
2,1%
96,9%
0,0%
CD200 PE-A
CD44 PerCP-Cy5-5-A
CD166 PE-A
CD24 PerCP-Cy5-5-A
Recuento
CD200 PE-A
CD44 PerCP-Cy5-5-A
Recuento

[Fig. 5]

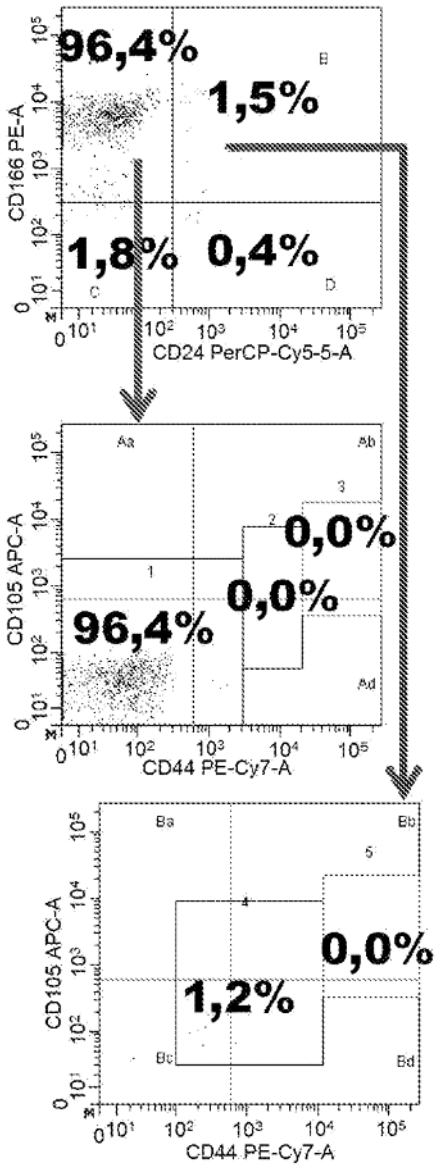
Fig.5


CD26
CD44
58,6%
14,0%
0,4%
28,3%
27,3%
32,2%
32,5%
7,7%
31,6%
34,7%
11,4%
23,8%
10,5%
47,6%
22,8%
21,3%
Recuento
MFI
HLA de clase I

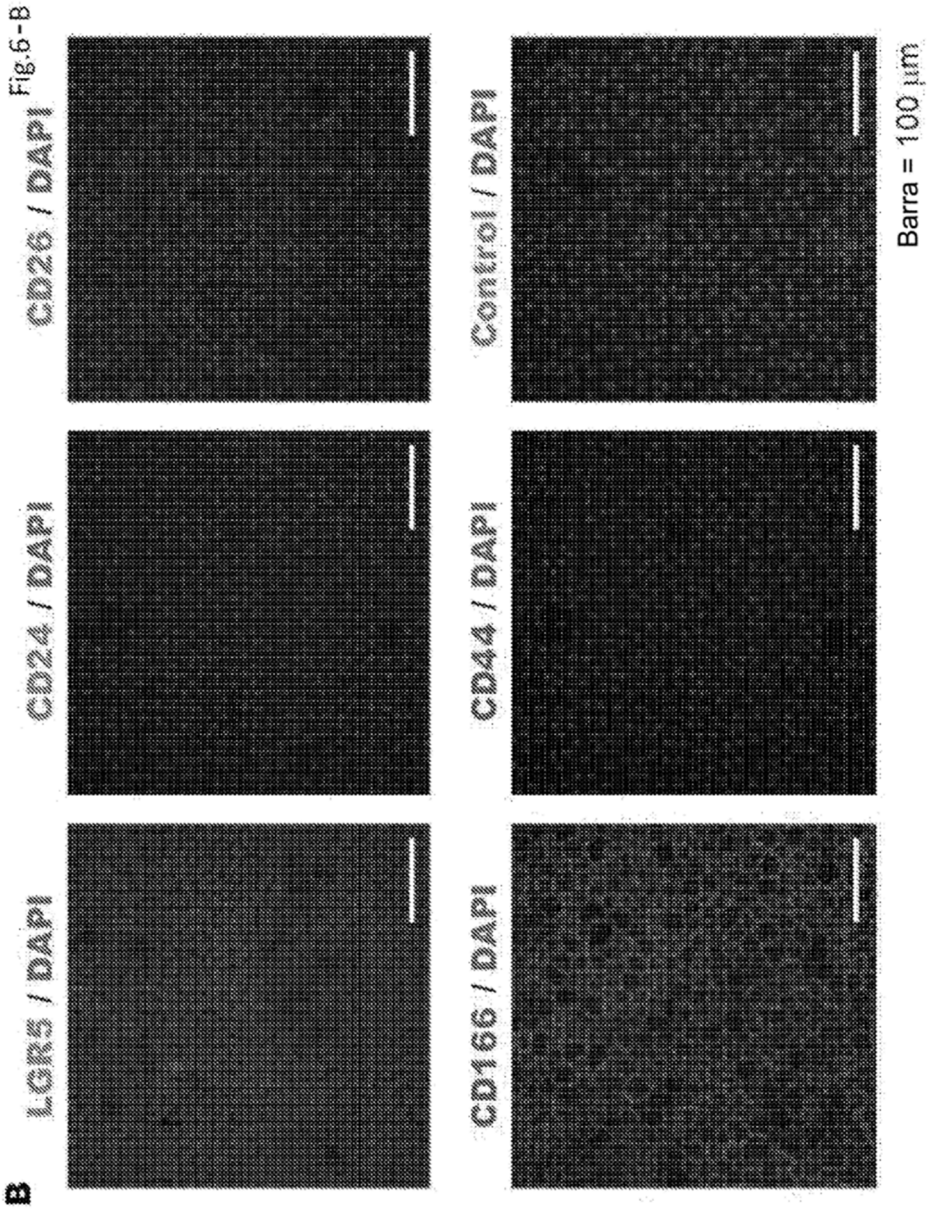
[Fig. 6-A]

Fig.6-A

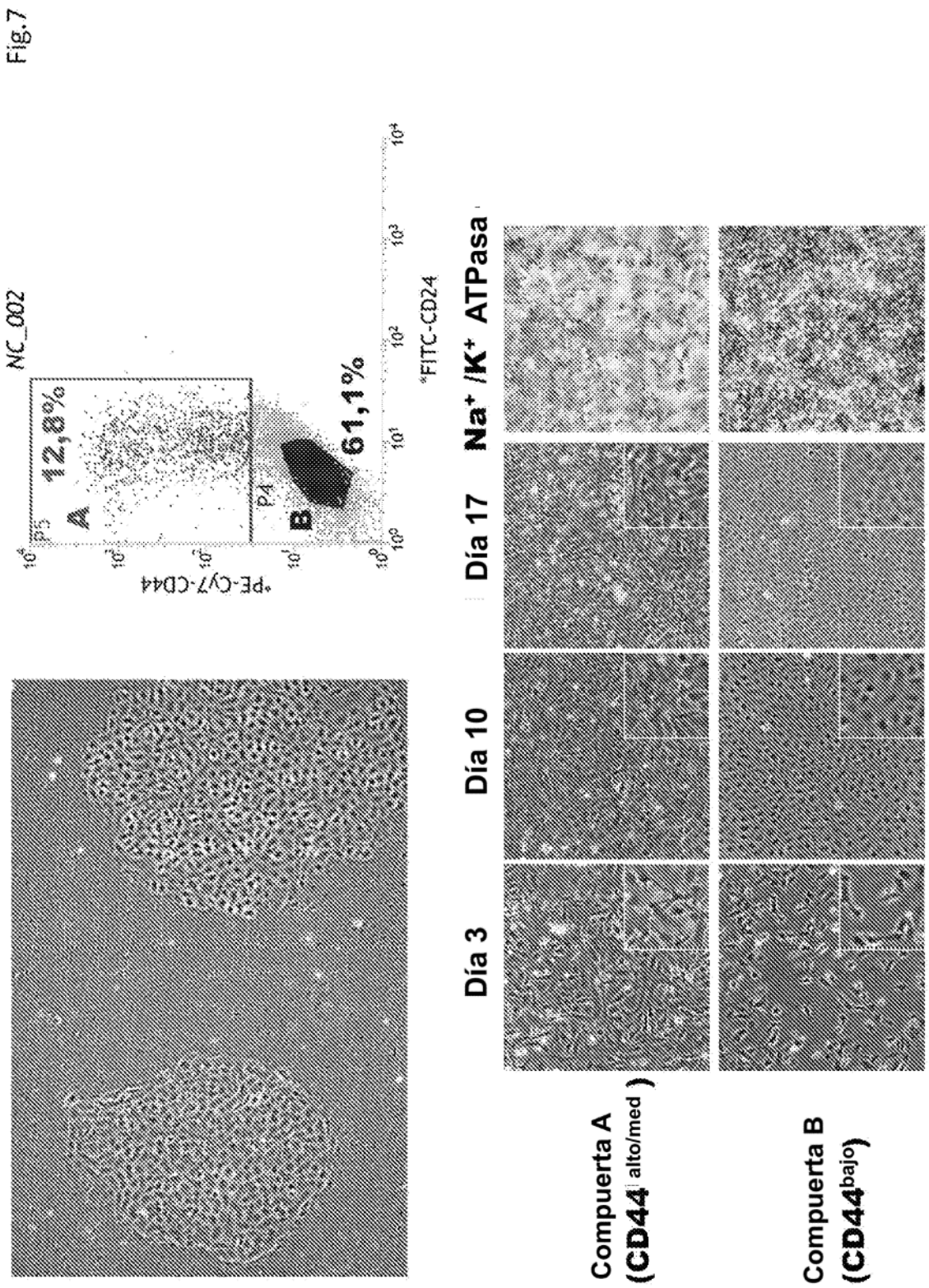
CD166/CD24 → CD105/CD44



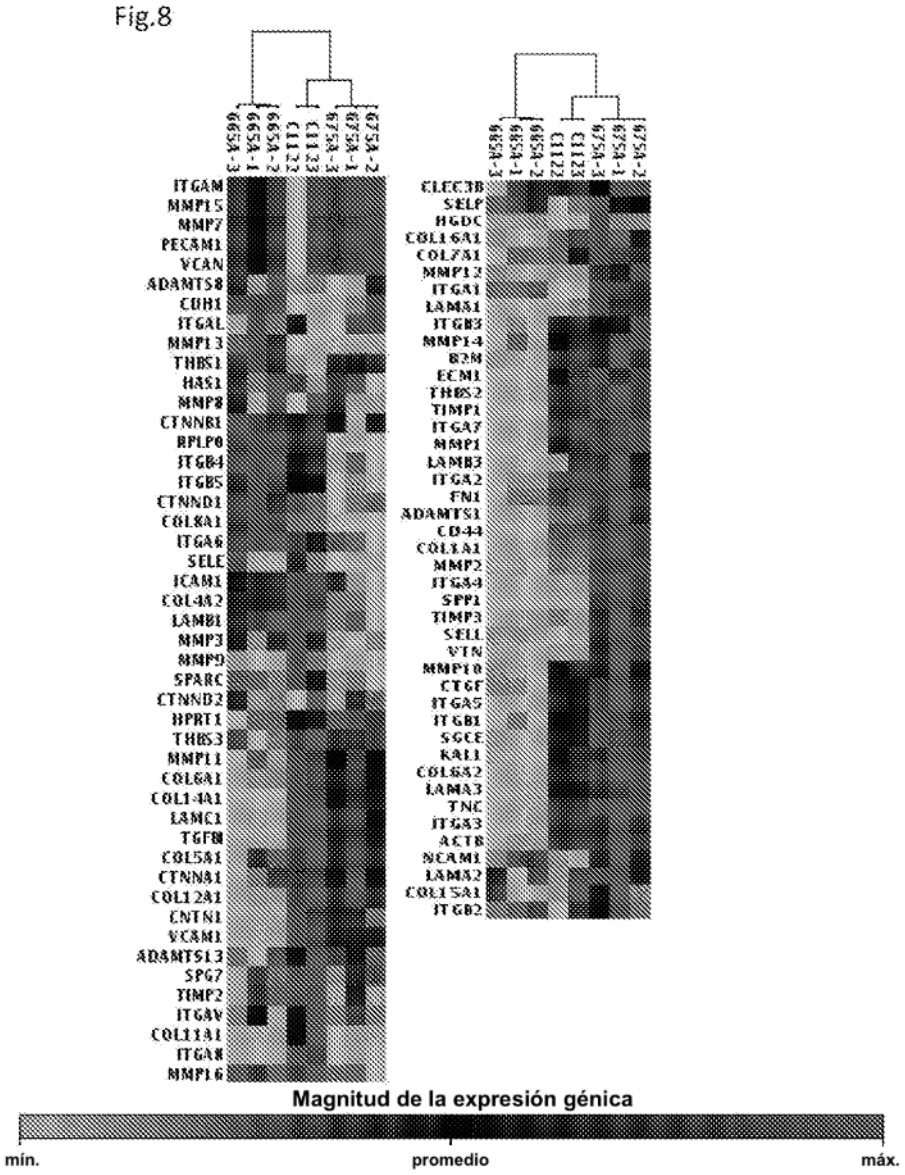
[Fig. 6-B]


Fig.6-B
B
LGR5 / DAPI
CD24 / DAPI
CD26 / DAPI
CD166 / DAPI
CD44 / DAPI
Control / DAPI
Barra = 100 µm

[Fig. 7]


Fig.7
NC_002
12,8%
A
P5
P4
B
61,1%
*PE-Cy7-CD44
*FITC-CD24
Día 3
Día 10
Día 17
Na+ /K+ ATPasa
Compuerta A
(CD44 alto/med)
Compuerta B
(CD44bajo)

[Fig. 8]


Fig.8
6659-3
6659-1
6659-2
C1122
C1123
6758-3
6758-1
6758-2
ITGAM
MMP15
MMP7
PECAM1
VCAN
ADAMTS8
CDH1
ITGAL
MMP13
THBS1
HAS1
MMP8
CTNNB1
RPLP0
ITGB4
ITGB5
CTNND1
COL8A1
ITGA6
SELE
ICAM1
COL4A2
LAMB1
MMP3
MMP9
SPARC
CTNND2
HPRT1
THBS3
MMP11
COL6A1
COL14A1
LAMC1
TGFBI
COL5A1
CTNNA1
COL12A1
CNTN1
VCAM1
ADAMTS13
SPG7
TIMP2
ITGAV
COL11A1
ITGA8
MMP16
6659-3
6659-1
6659-2
C1122
C1123
6758-3
6758-1
6758-2
CLEC3B
SELP
HGDC
COL16A1
COL7A1
MMP12
ITGA1
LAMA1
ITGB3
MMP14
B2M
ECM1
THBS2
TIMP1
ITGA7
MMP1
LAMB3
ITGA2
FN1
ADAMTS1
CD44
COL1A1
MMP2
ITGB4
SPP1
TIMP3
SELL
VTN
MMP10
CTGF
ITGA5
ITGB1
SGCE
KAL1
COL6A2
LAMA3
TNC
ITGA3
ACTB
NCAM1
LAMA2
COL15A1
ITGB2
Magnitud de la expresión génica
mín.
promedio
máx.

[Fig. 9]

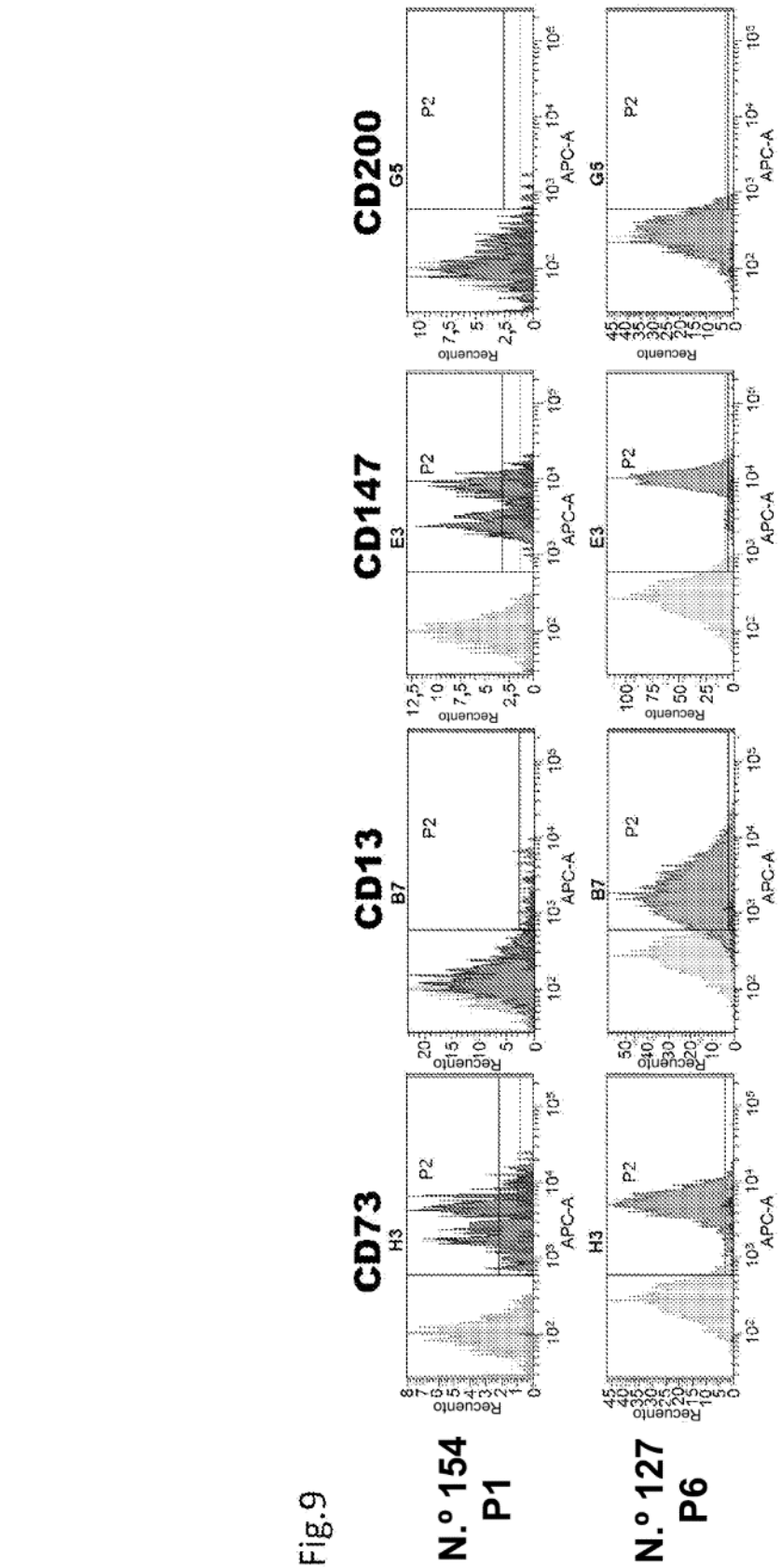
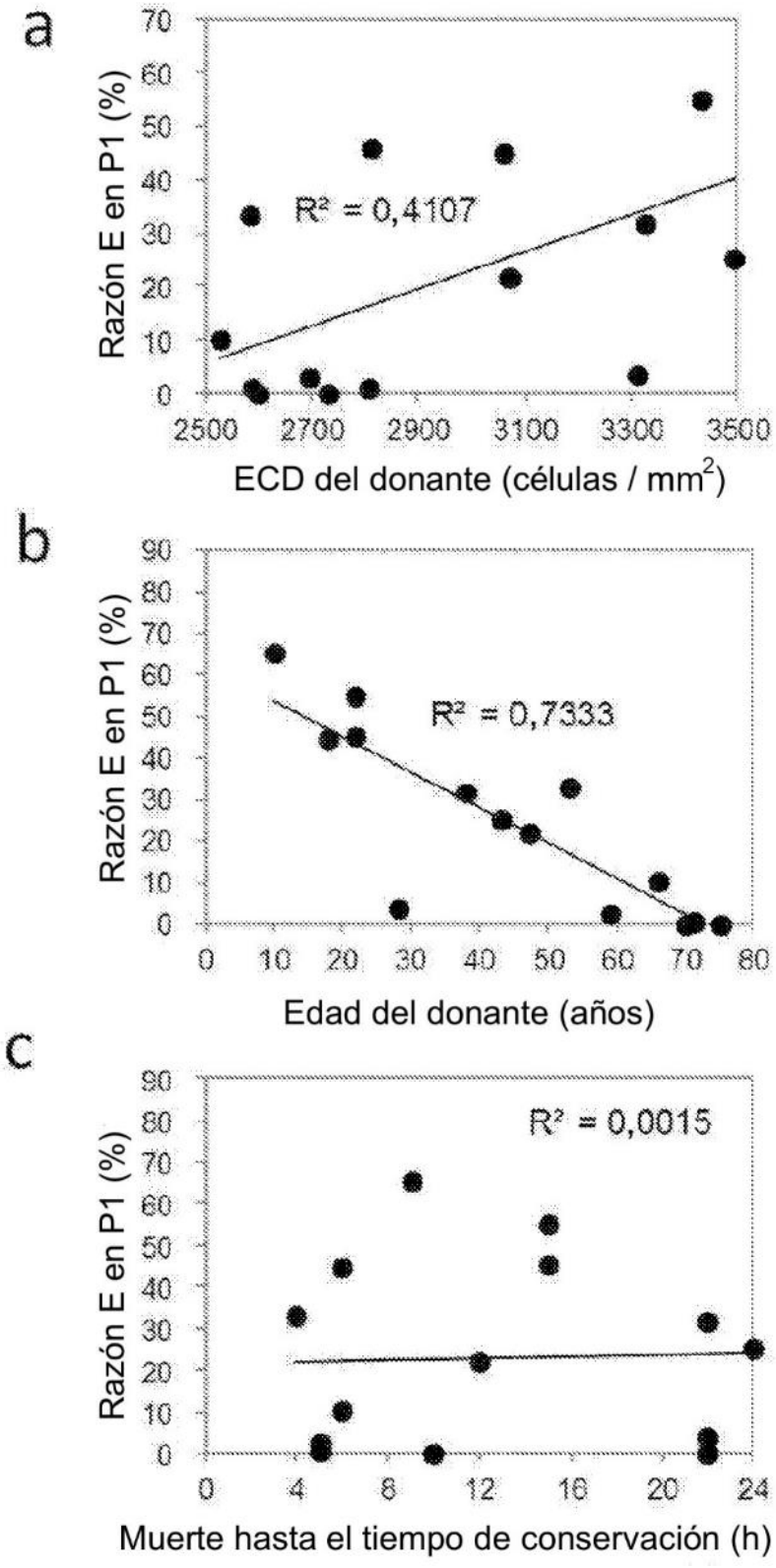

CD73
CD13
CD147
CD200
N.º 154
P1
N.º 127
P6
H3
B7
E3
G5
P2
Recuento
APC-A

Fig.9

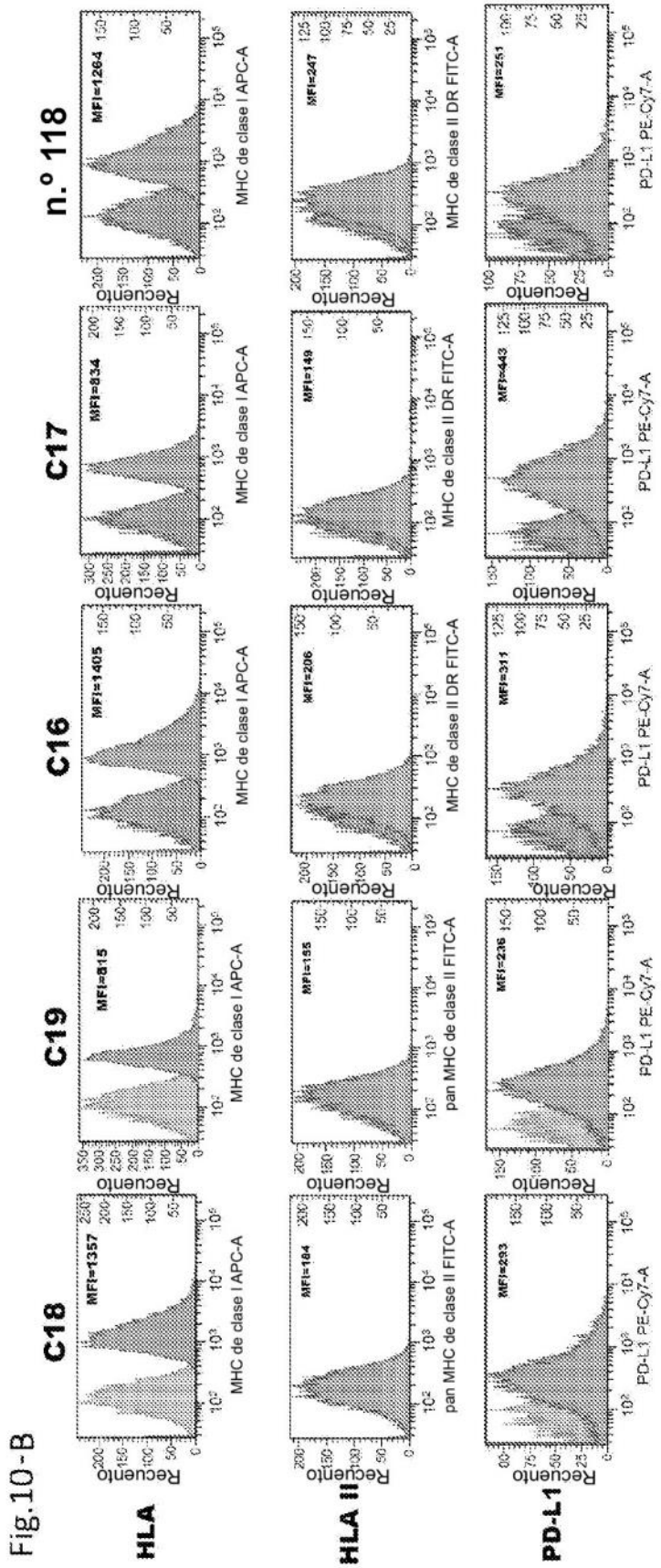
[Fig. 10-A]

Fig.10-A

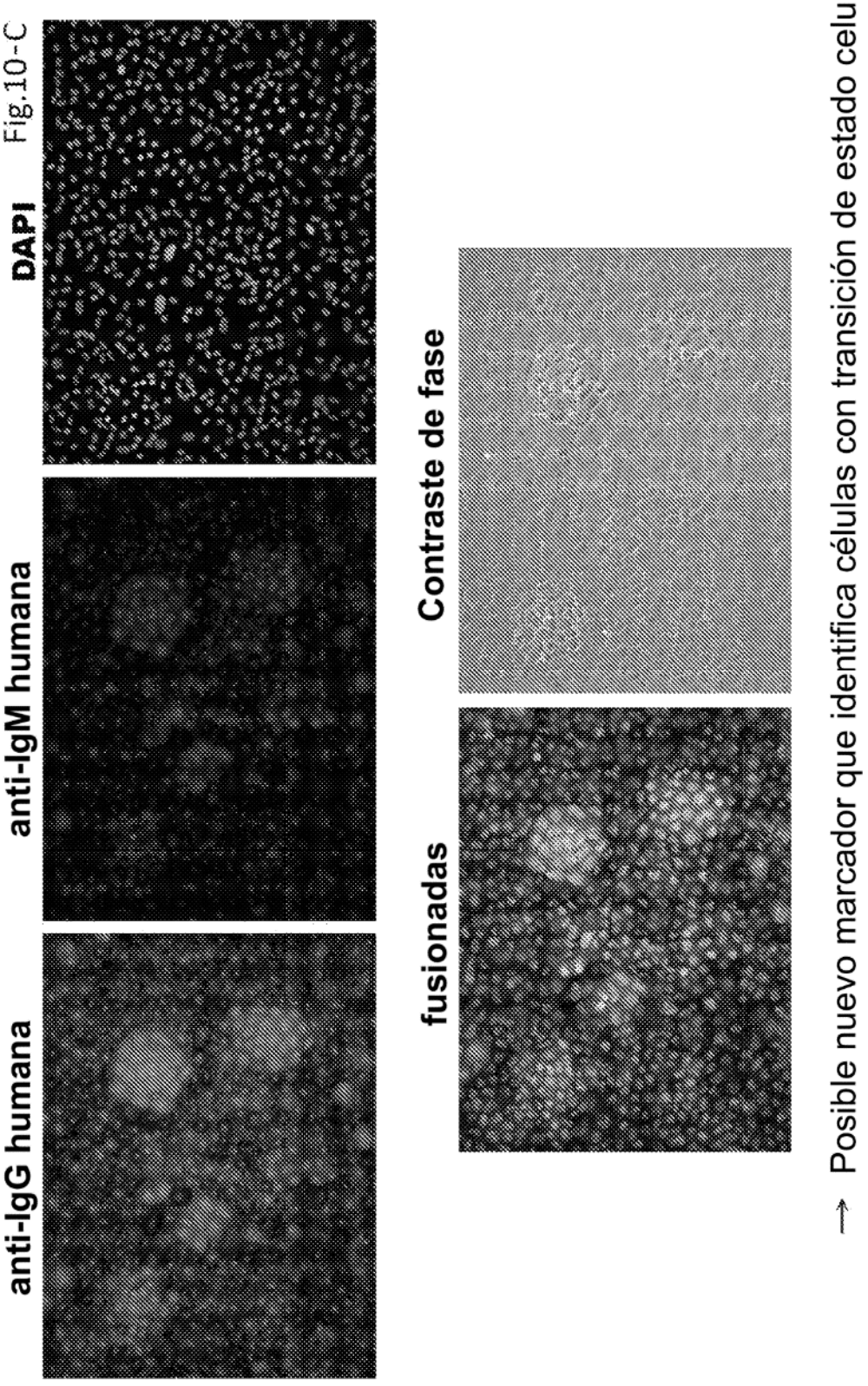


[Fig. 10-B]

Fig.10-B

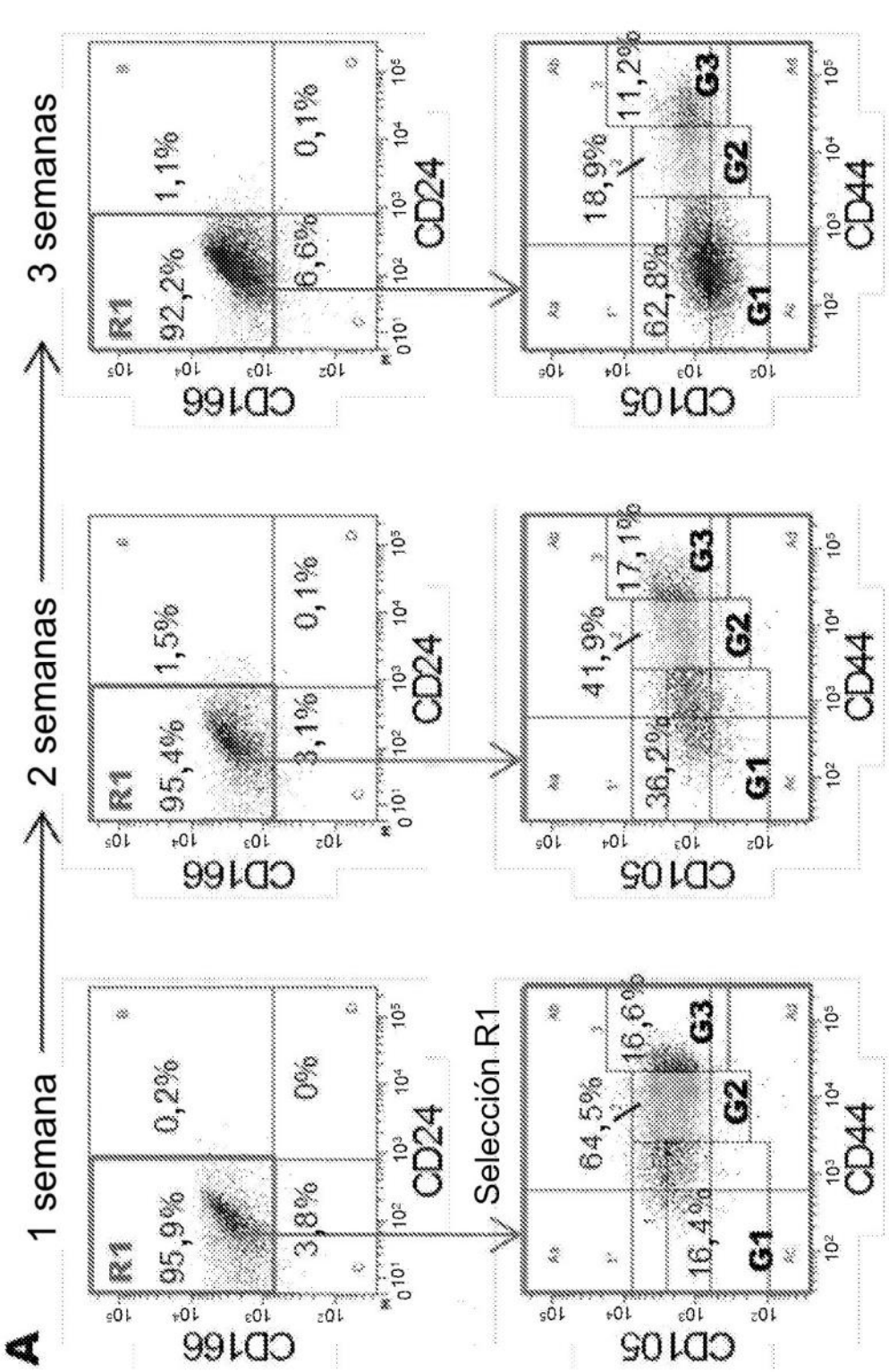


[Fig. 10-C]


Fig.10-C
DAPI
anti-IgM humana
anti-IgG humana
Contraste de fase
fusionadas
↑ Posible nuevo marcador que identifica células con transición de estado celular

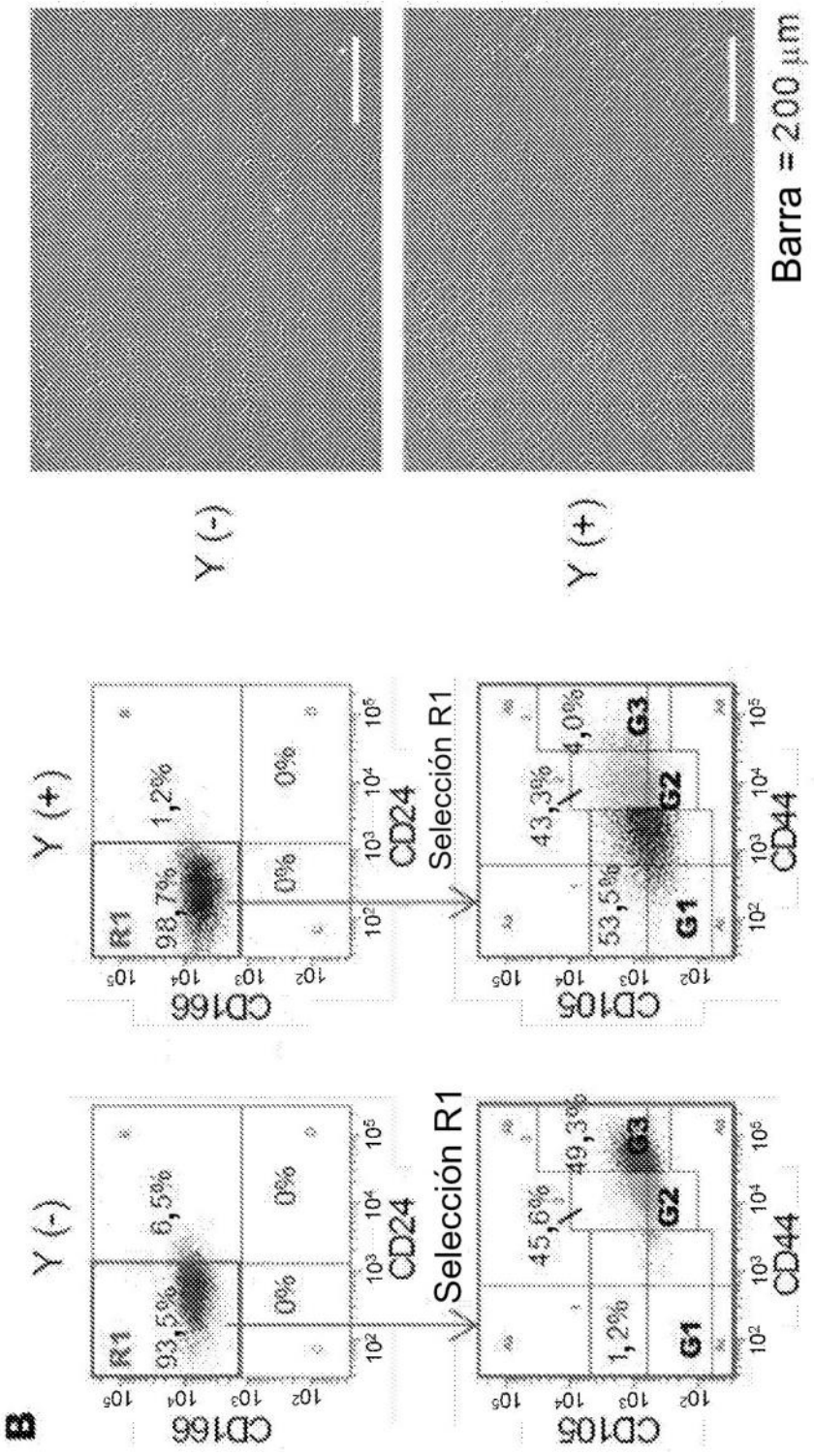
[Fig. 11-A]

Fig.11-A

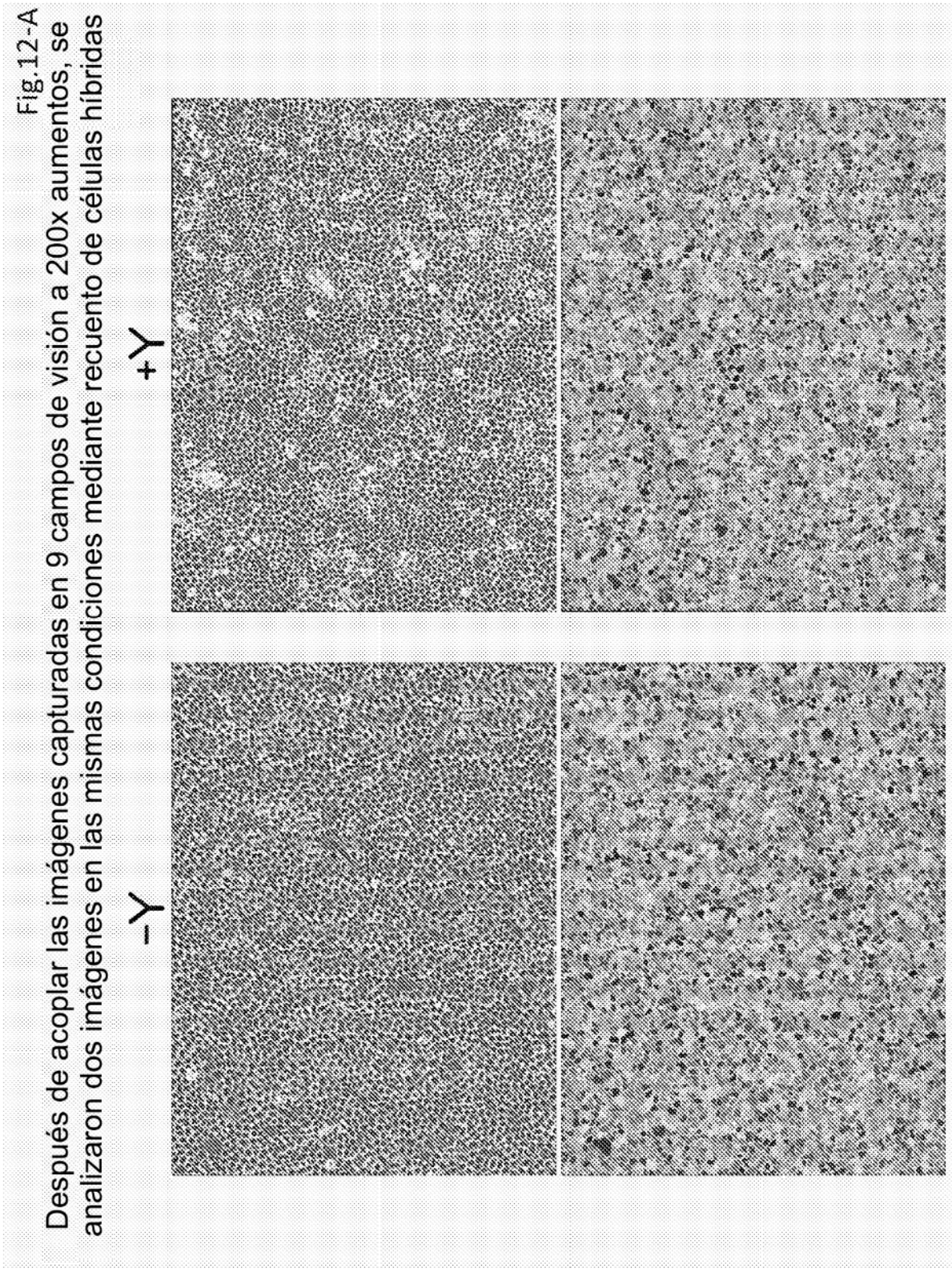


[Fig. 11-B]

Fig.11-B

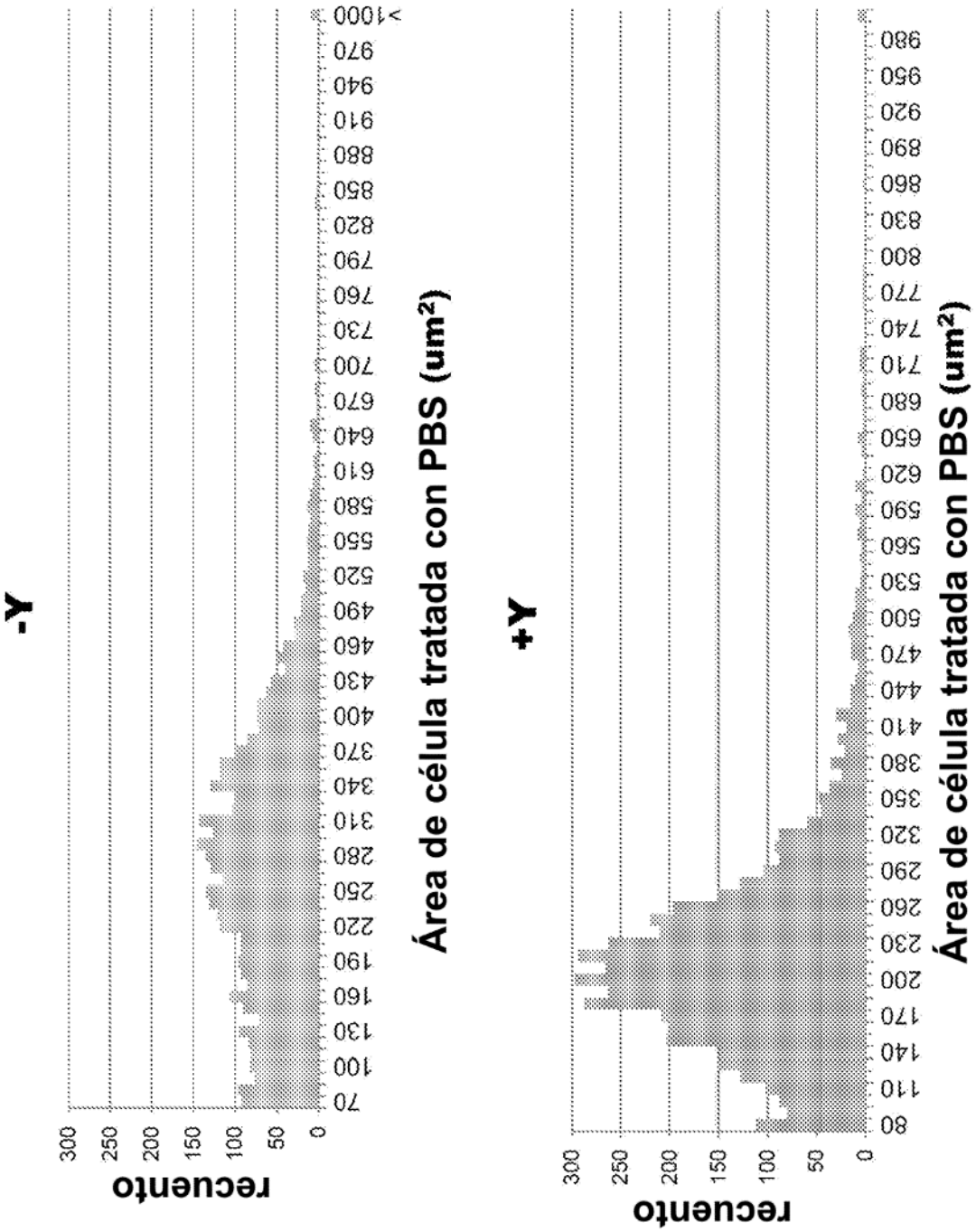


[Fig. 12-A]


Fig.12-A
Después de acoplar las imágenes capturadas en 9 campos de visión a 200x aumentos, se analizaron dos imágenes en las mismas condiciones mediante recuento de células híbridas
-Y
+Y

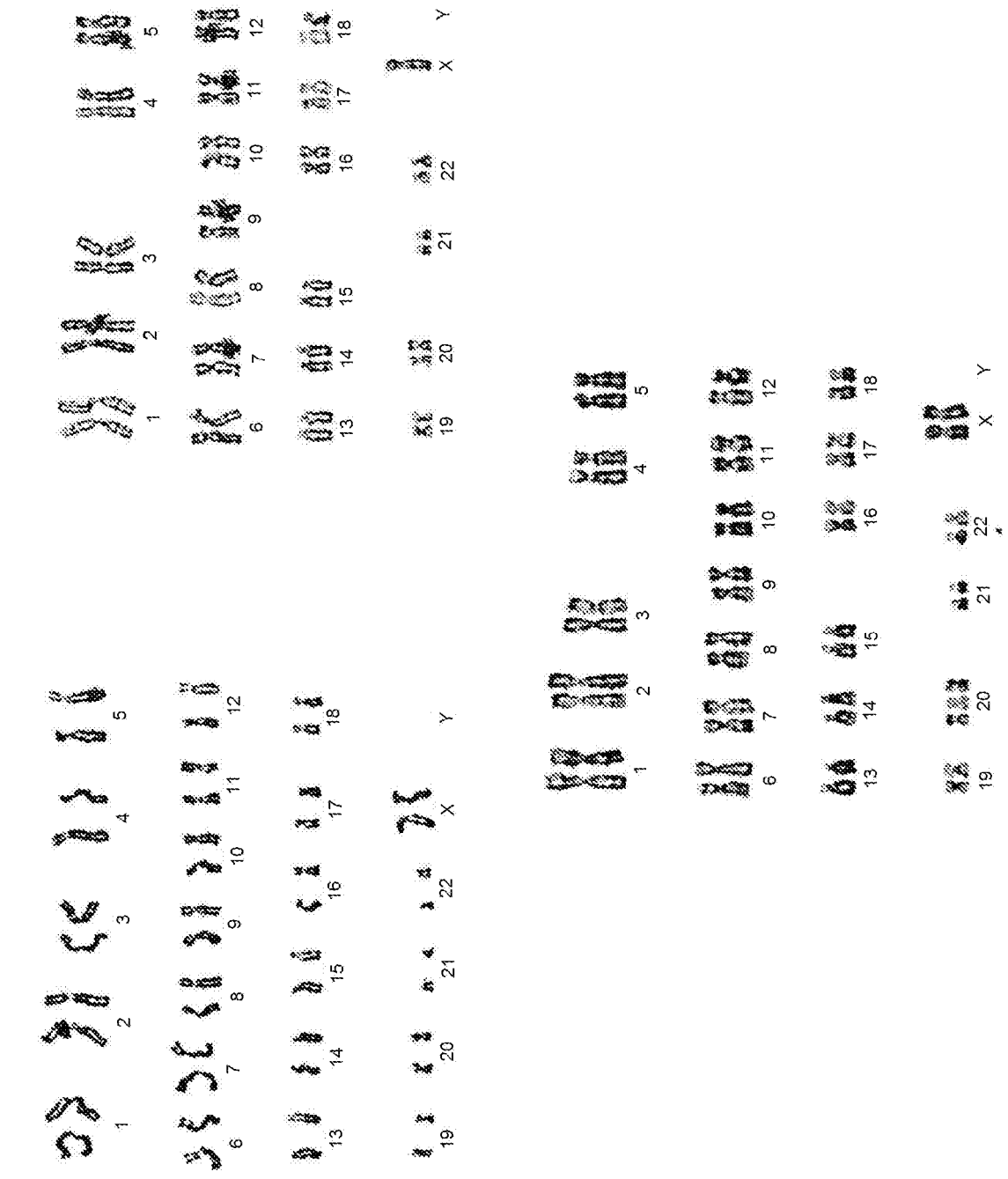
[Fig. 12-B]

Fig.12-B



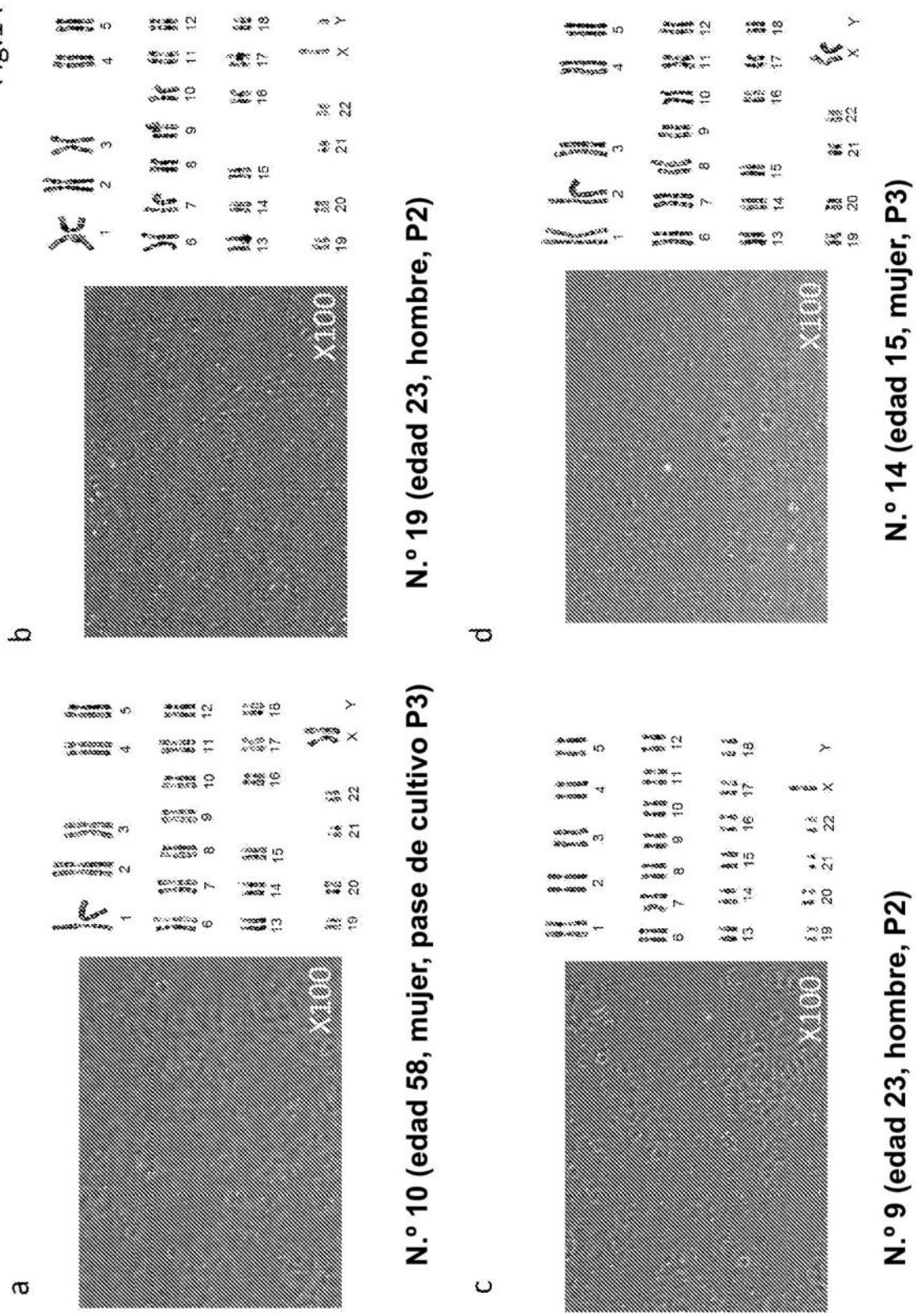
[Fig. 13]

Fig.13



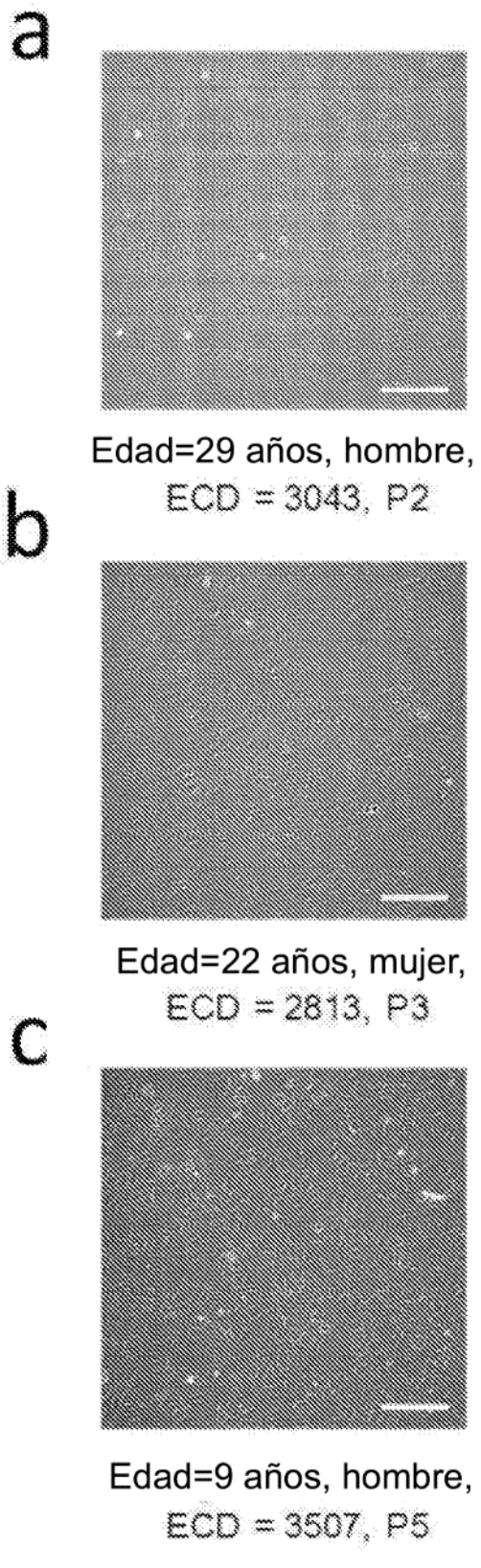
[Fig. 14]

Fig.14

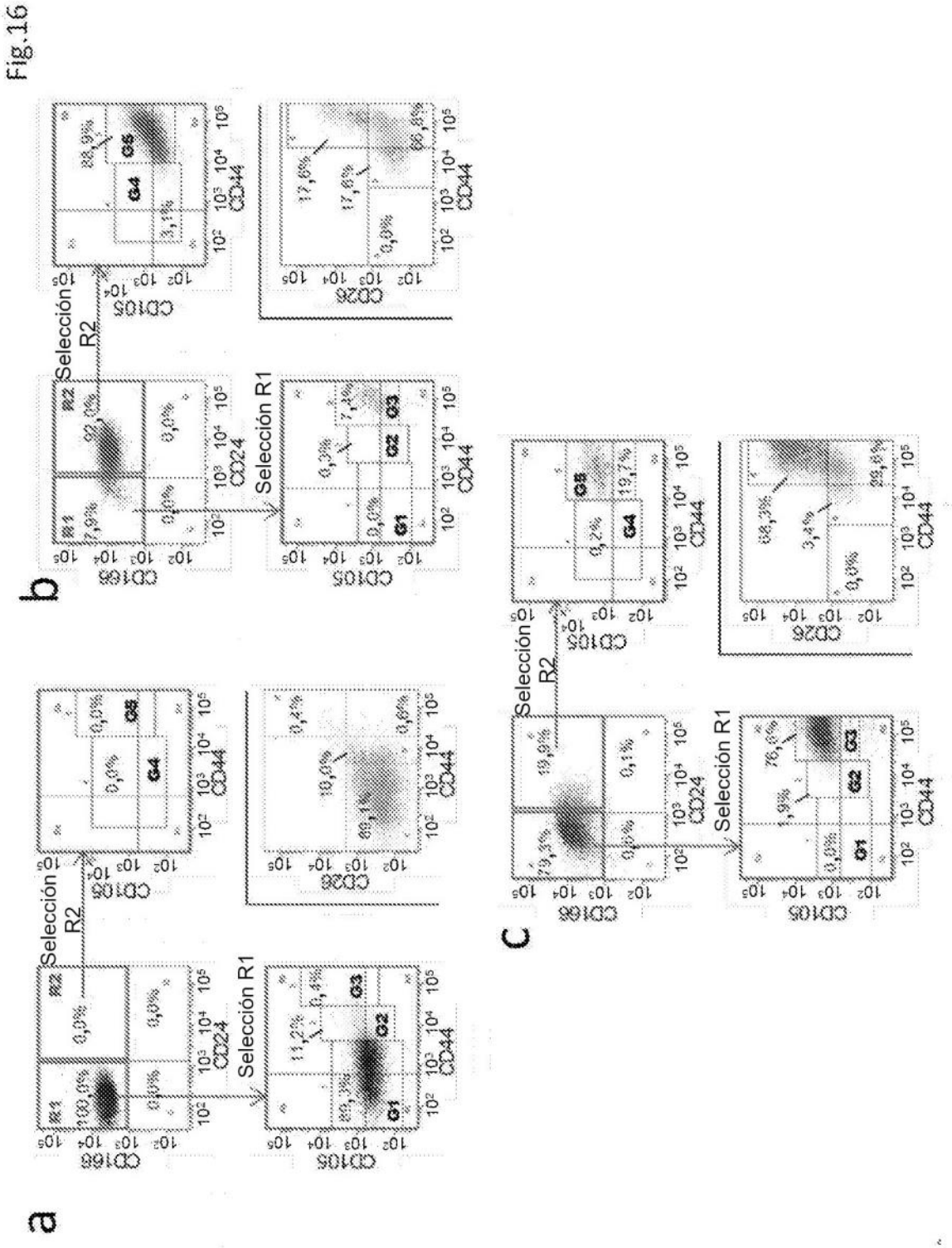

a
X100
N.º 10 (edad 58, mujer, pase de cultivo P3)
b
X100
N.º 19 (edad 23, hombre, P2)
c
X100
N.º 9 (edad 23, hombre, P2)
d
X100
N.º 14 (edad 15, mujer, P3)

[Fig. 15]

Fig.15

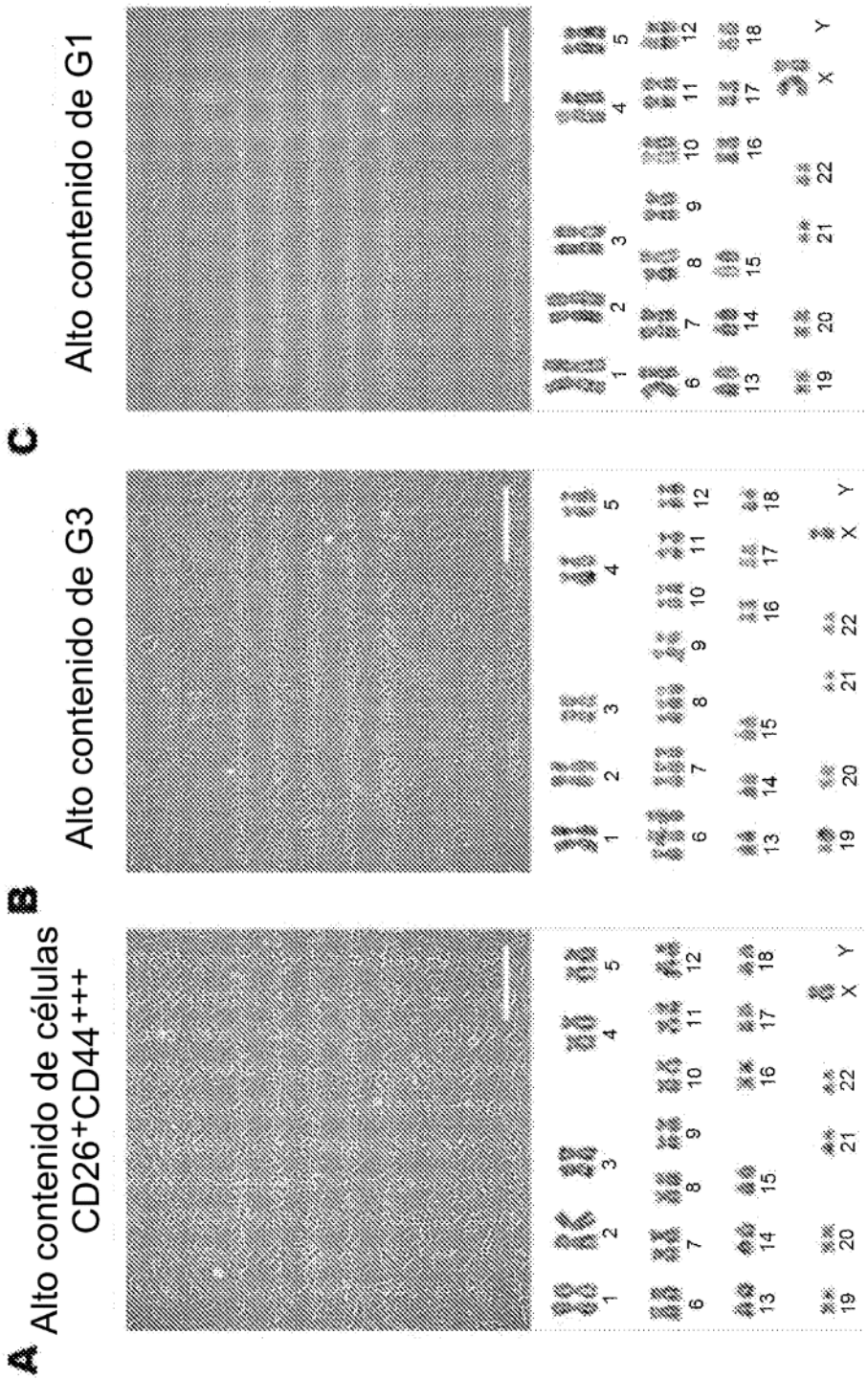

a
Edad=29 años, hombre,
ECD = 3043, P2
b
Edad=22 años, mujer,
ECD = 2813, P3
c
Edad=9 años, hombre,
ECD = 3507, P5

[Fig. 16]


Fig.16
a
b
C
Selección R1
Selección R2
CD24
CD44
CD105
CD26
CD166
G1
G2
G3
G4
G5
R1
R2

[Fig. 17]

Fig.17


A
Alto contenido de células CD26+CD44+++
B
Alto contenido de G3
C
Alto contenido de G1

[Fig. 18]

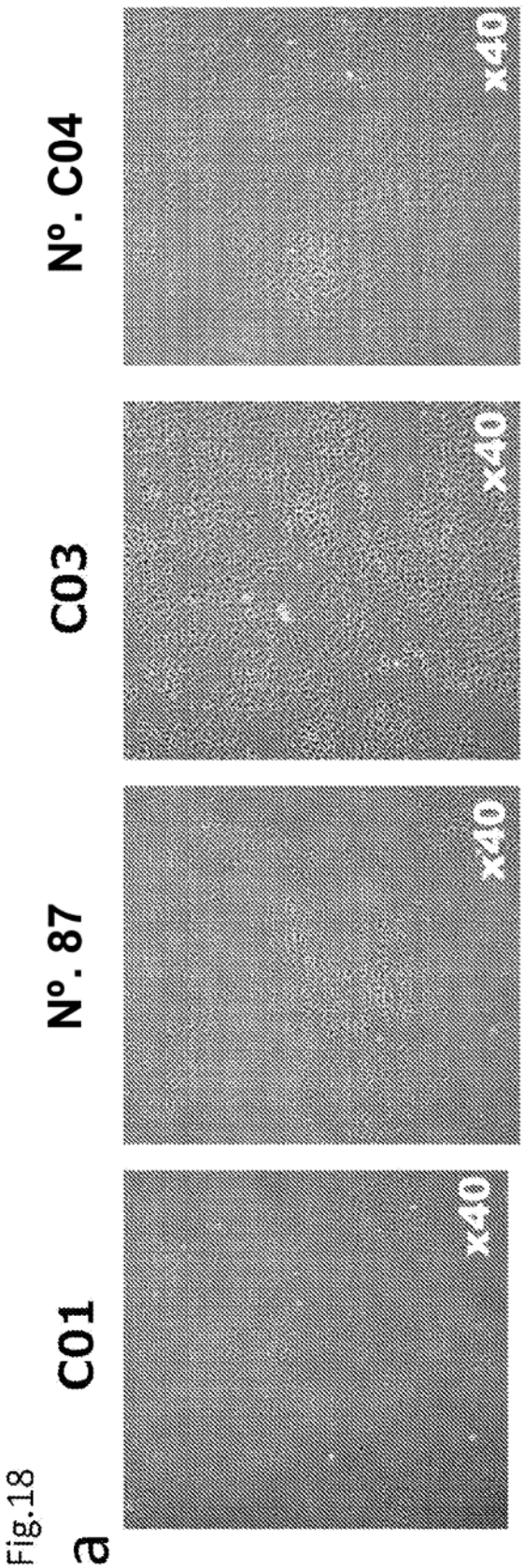


Fig.18

[Fig. 19]

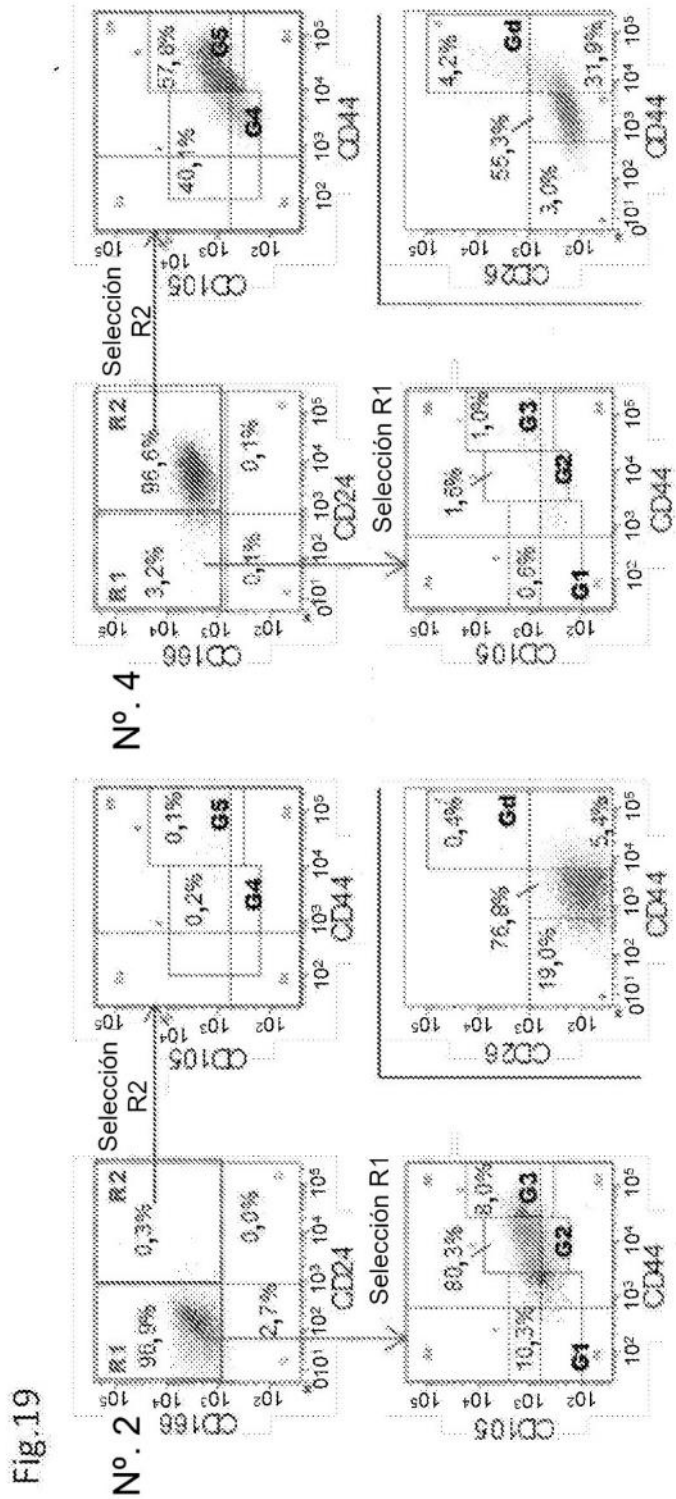
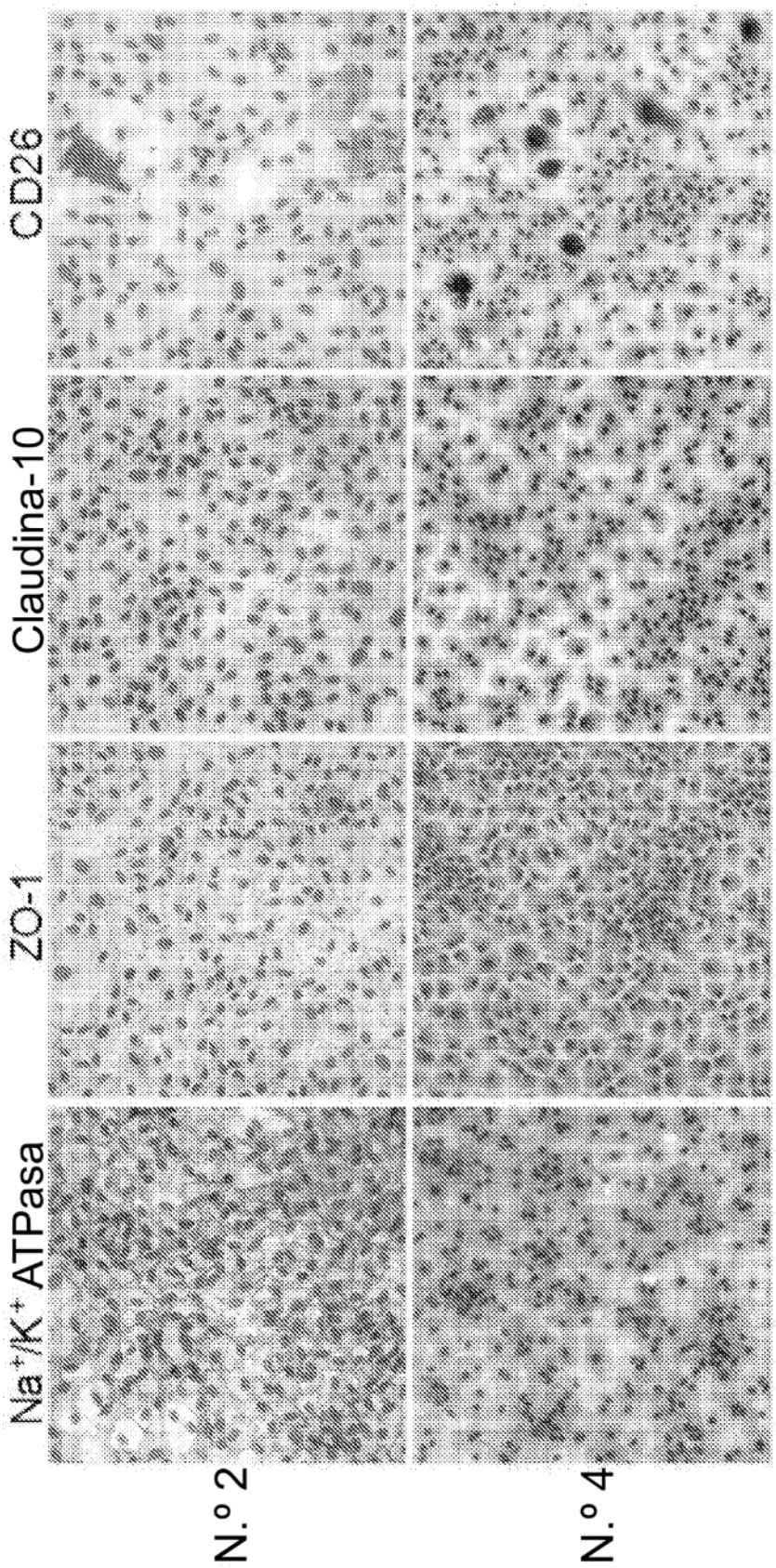

Nº. 2
Nº. 4
Selección R2
Selección R1
CD105
CD24
CD44
CD26
R1
R2
G1
G2
G3
G4
G5
Gd

Fig.19

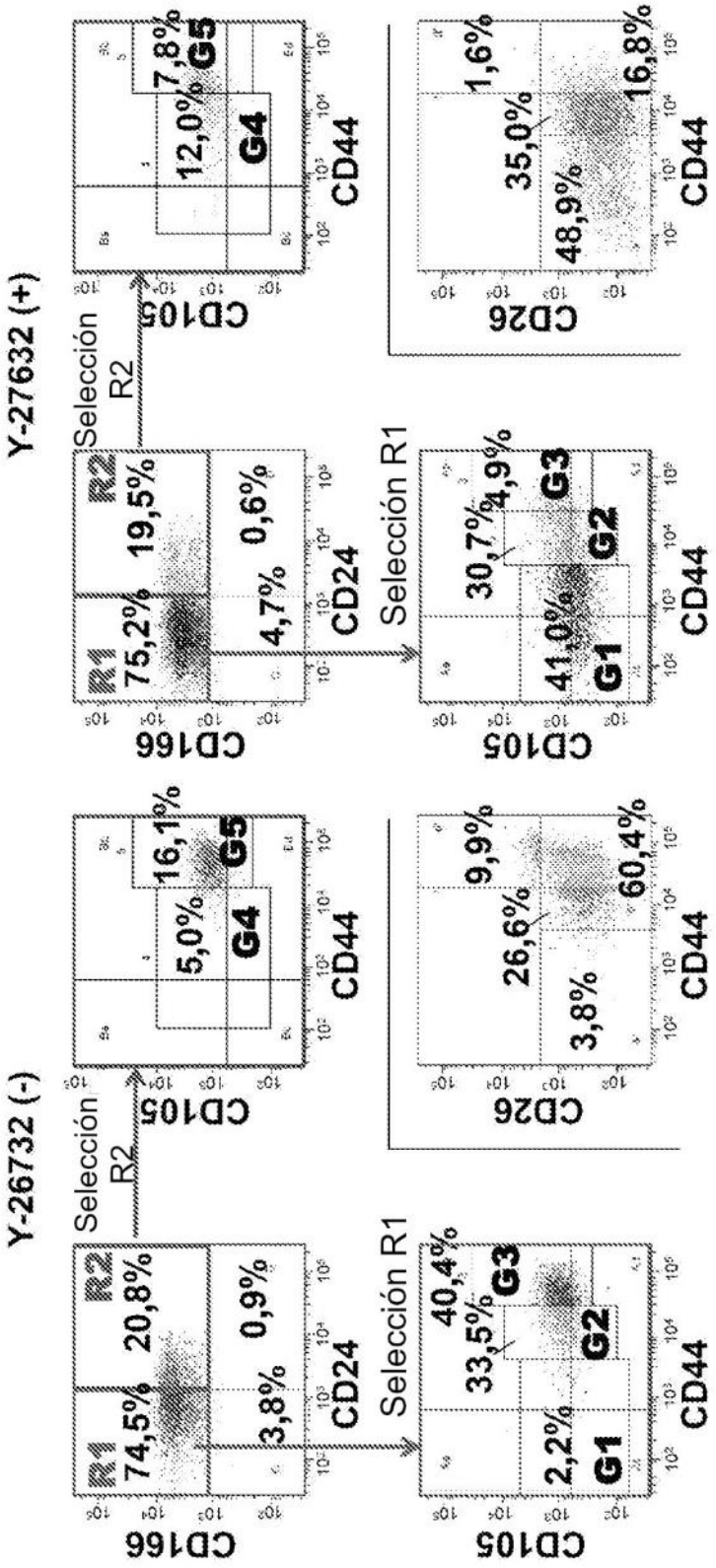
[Fig. 20]

Fig.20

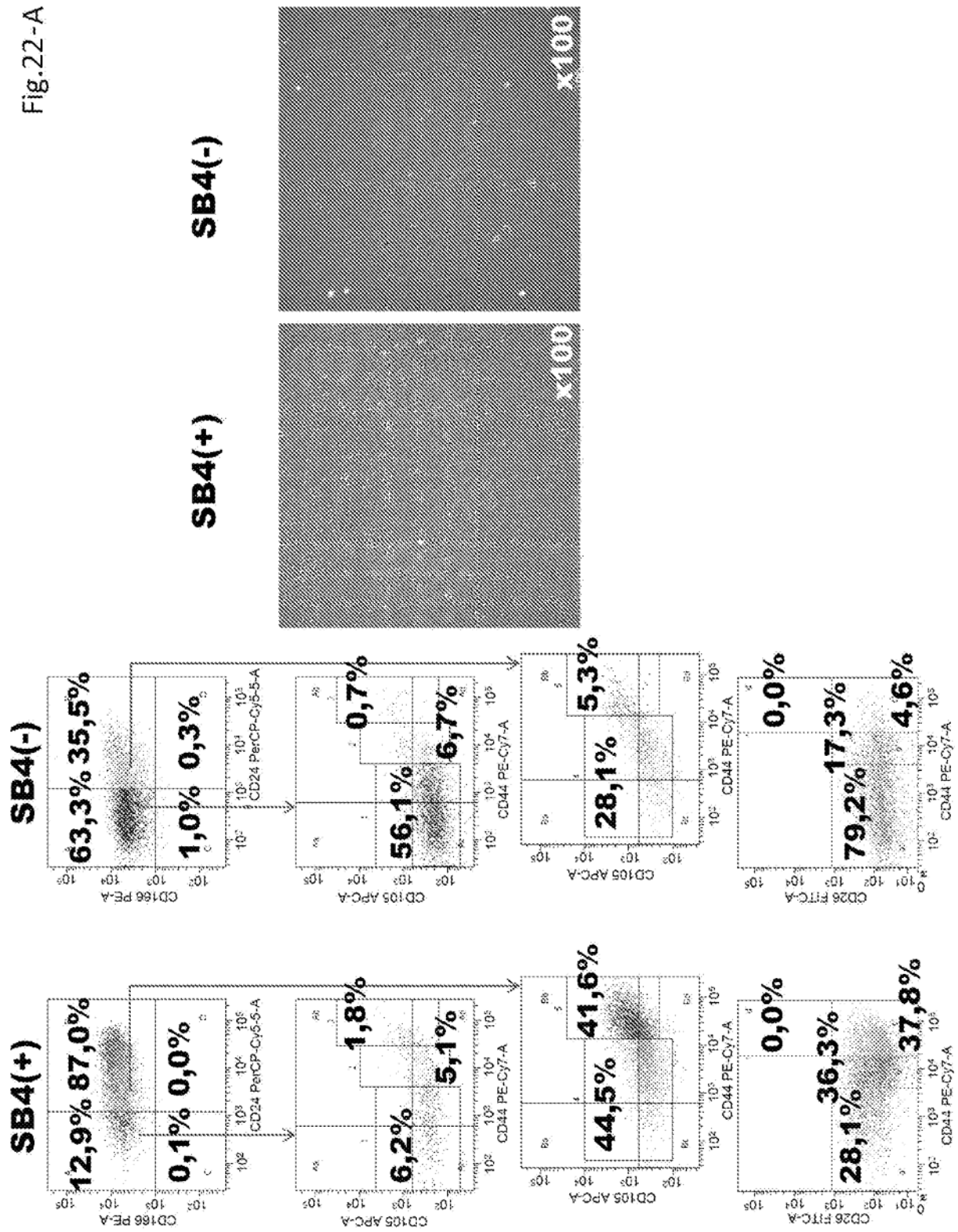


[Fig. 21]

Fig. 21


Y-27632 (+)
Y-26732 (-)
Selección R2
Selección R1
CD166
CD105
CD24
CD44
CD26
R1
R2
G1
G2
G3
G4
G5
75,2%
19,5%
4,7%
0,6%
74,5%
20,8%
3,8%
0,9%
41,0%
30,7%
4,9%
2,2%
33,5%
40,4%
5,0%
12,0%
7,8%
16,1%
48,9%
35,0%
16,8%
1,6%
3,8%
26,6%
9,9%
60,4%

[Fig. 22-A]


Fig.22-A
SB4(+)
SB4(-)
×100
×100
SB4(-)
63,3%
35,5%
1,0%
0,3%
0,7%
56,1%
6,7%
5,3%
28,1%
0,0%
79,2%
17,3%
4,6%
SB4(+)
12,9%
87,0%
0,1%
0,0%
1,8%
6,2%
5,1%
41,6%
44,5%
0,0%
36,3%
28,1%
37,8%
CD166 PE-A
CD24 PerCP-Cy5-5-A
CD105 APC-A
CD44 PE-Cy7-A
CD26 FITC-A

[Fig. 22-B]

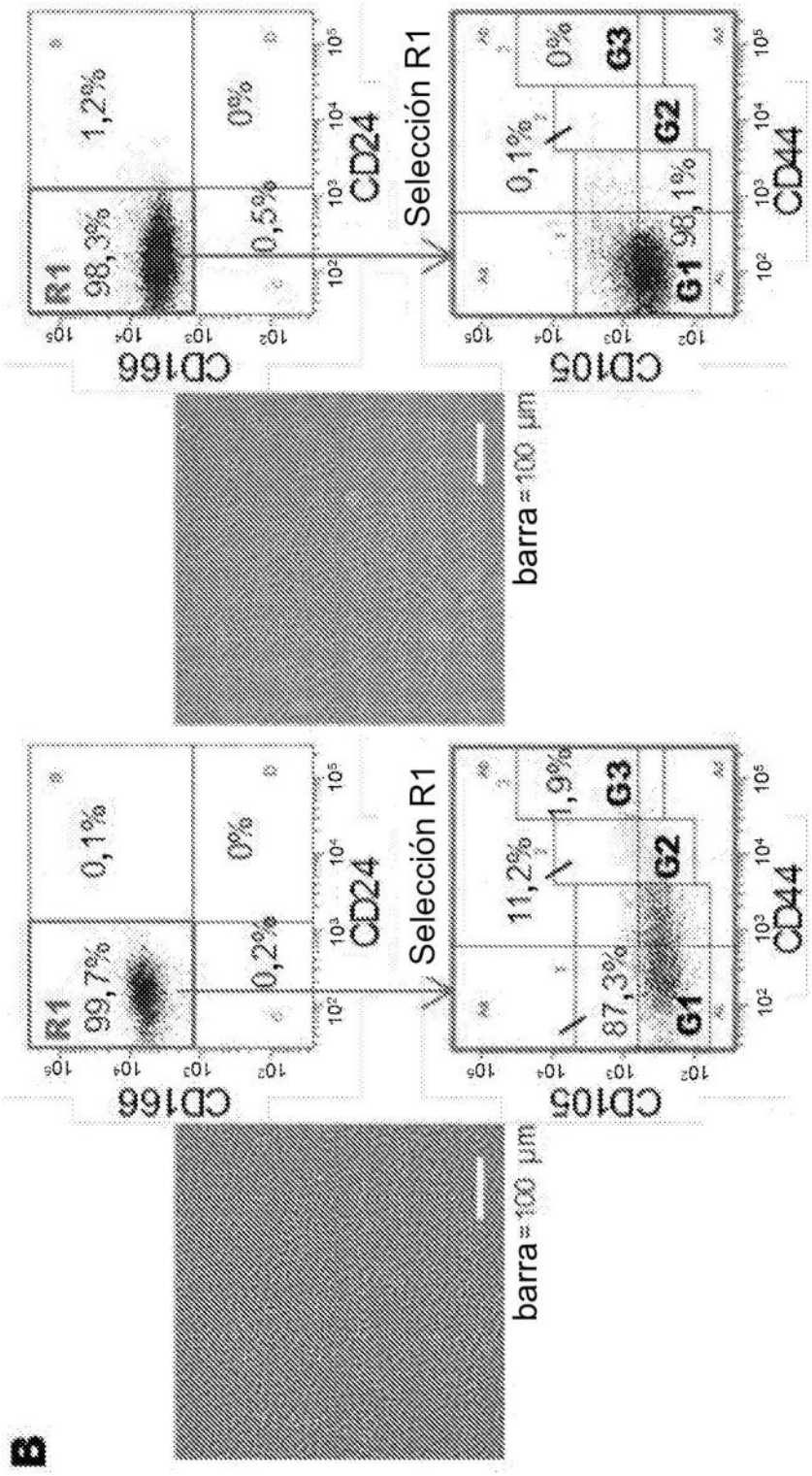
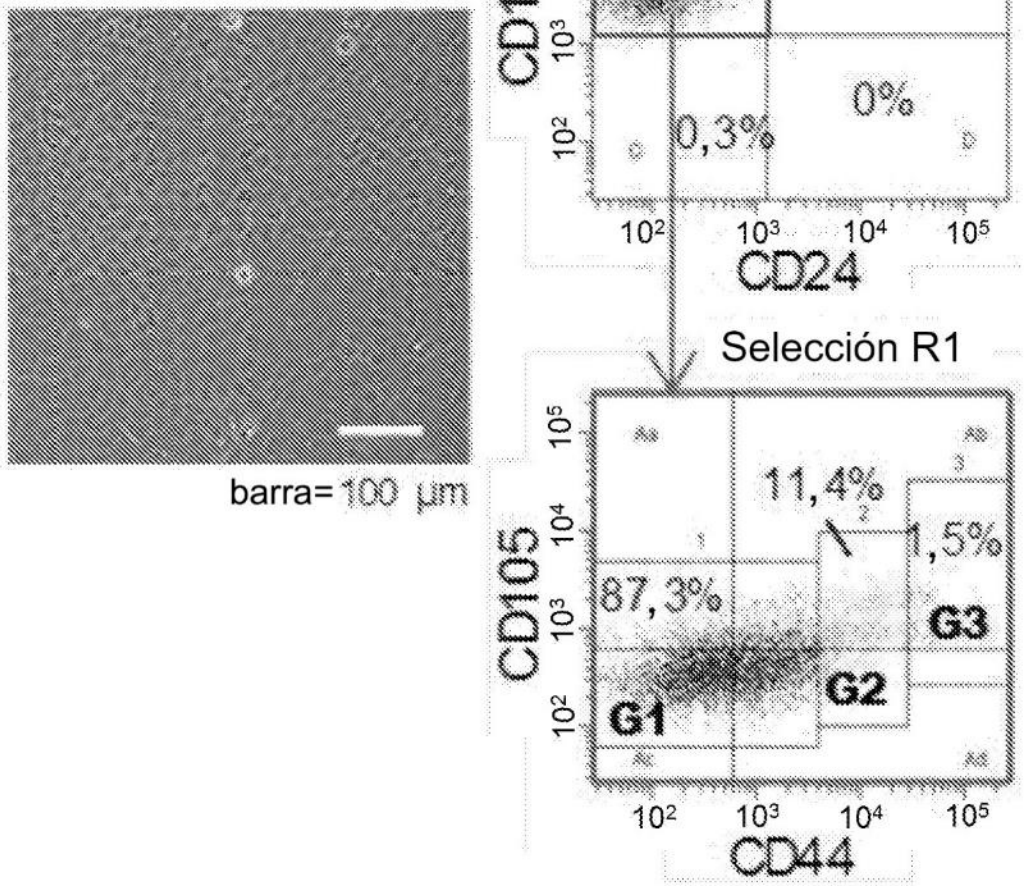


Fig.22-B

[Fig. 22-C]

Fig.22-C

C



[Fig. 22-D]

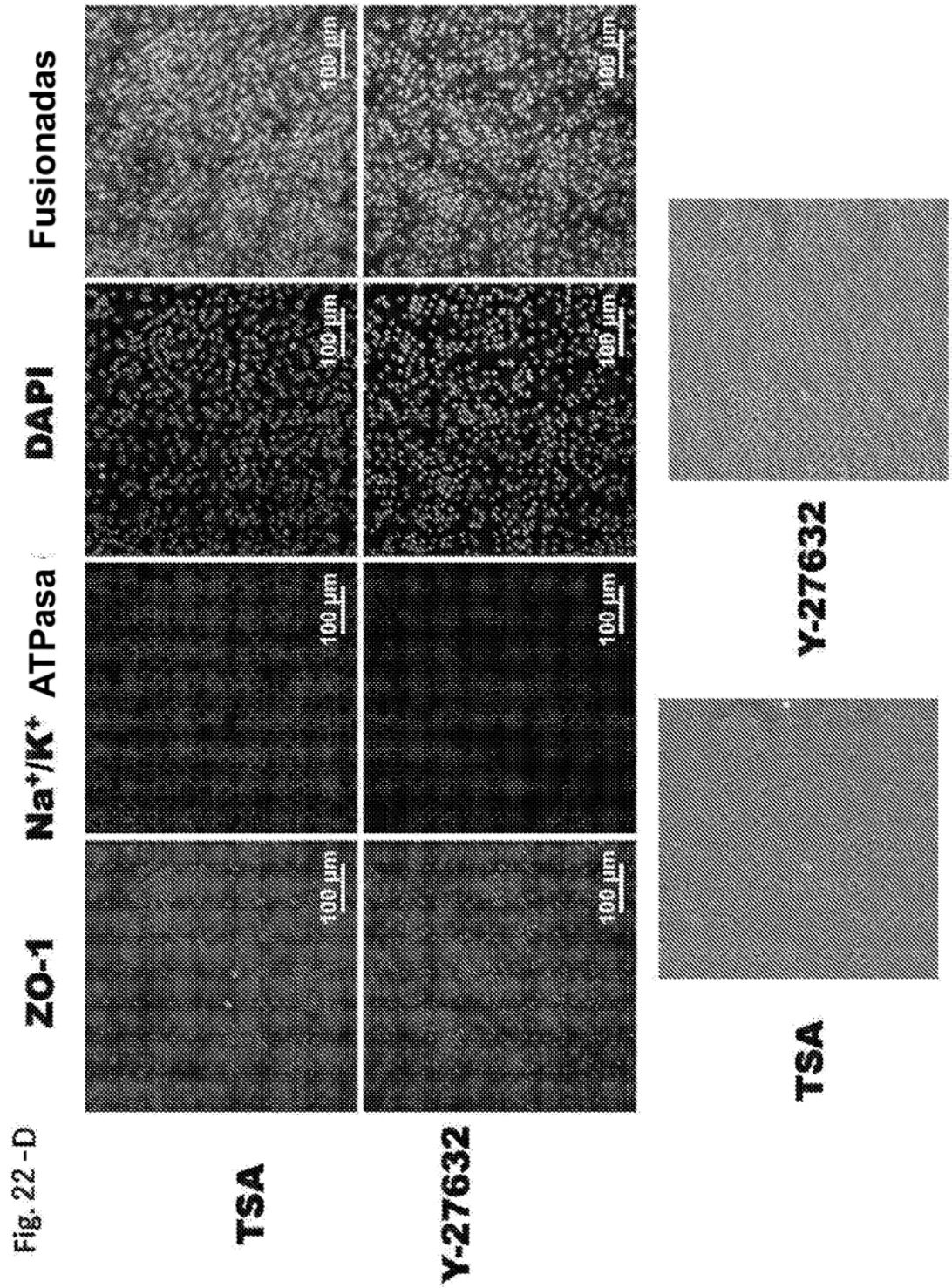


Fig. 22 -D

[Fig. 23]

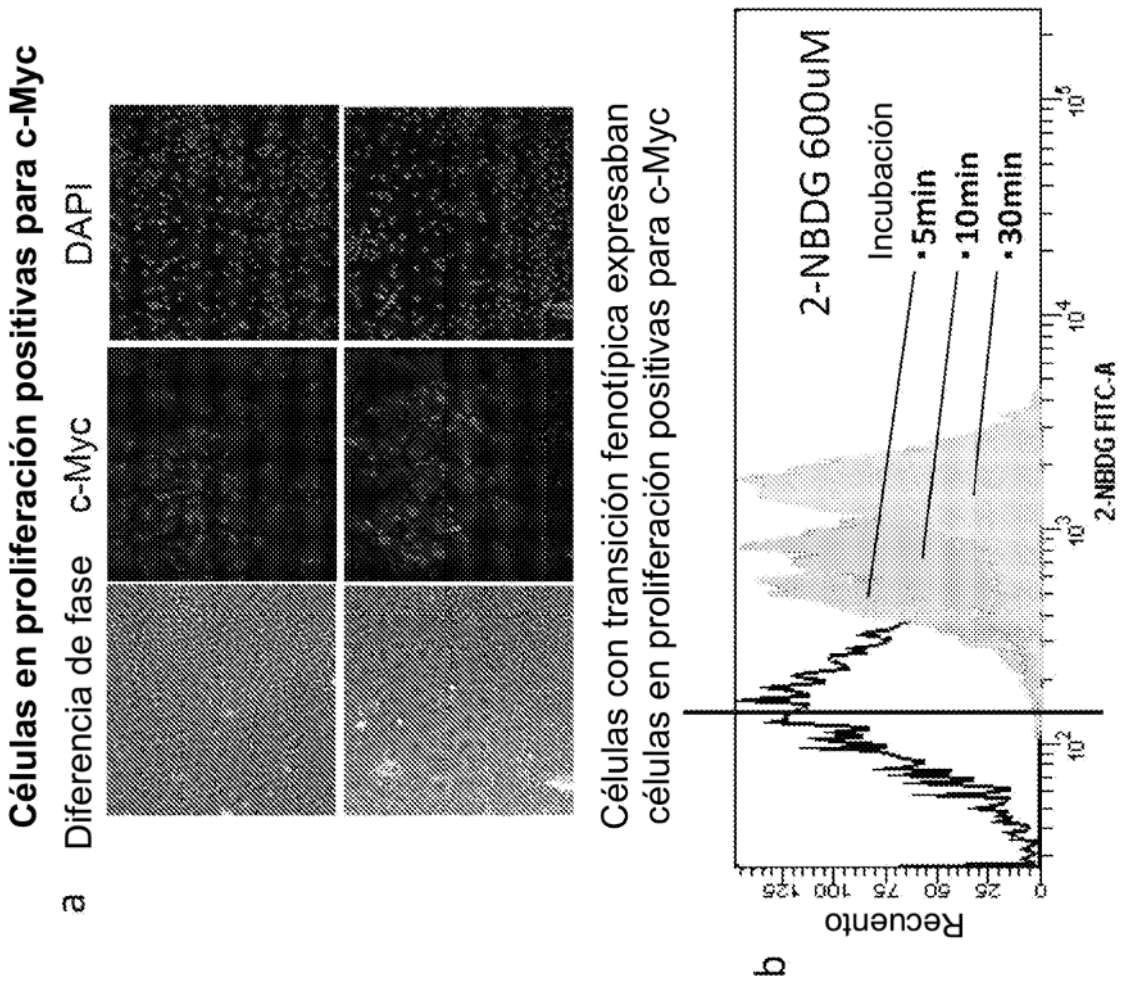

Células en proliferación positivas para c-Myc
a
Diferencia de fase
c-Myc
DAPI
Células con transición fenotípica expresaban células en proliferación positivas para c-Myc
b
Recuento
2-NBDG 600uM
Incubación
5min
10min
30min
2-NBDG FITC-A

Fig.23

[Fig. 24-A]

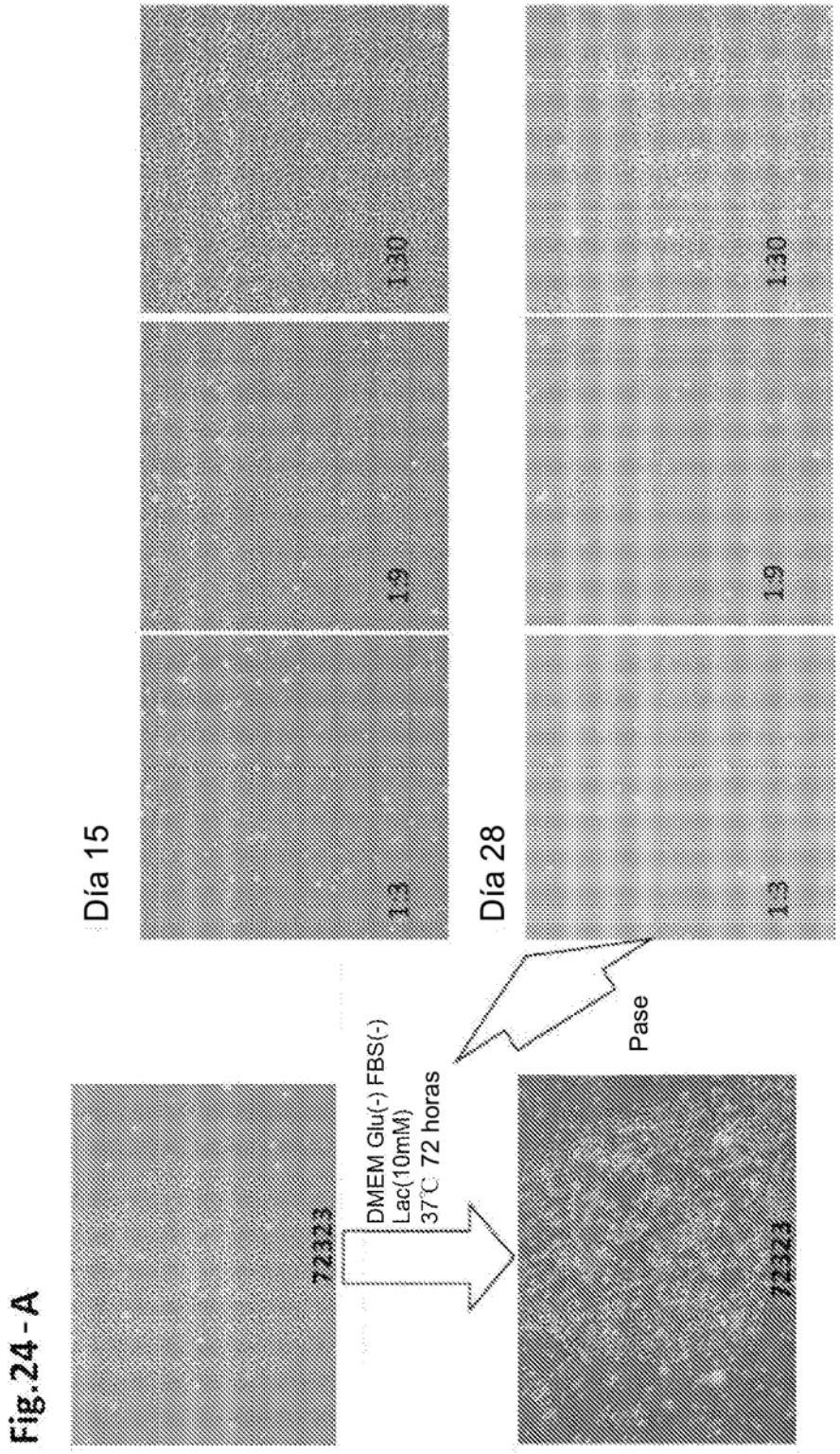
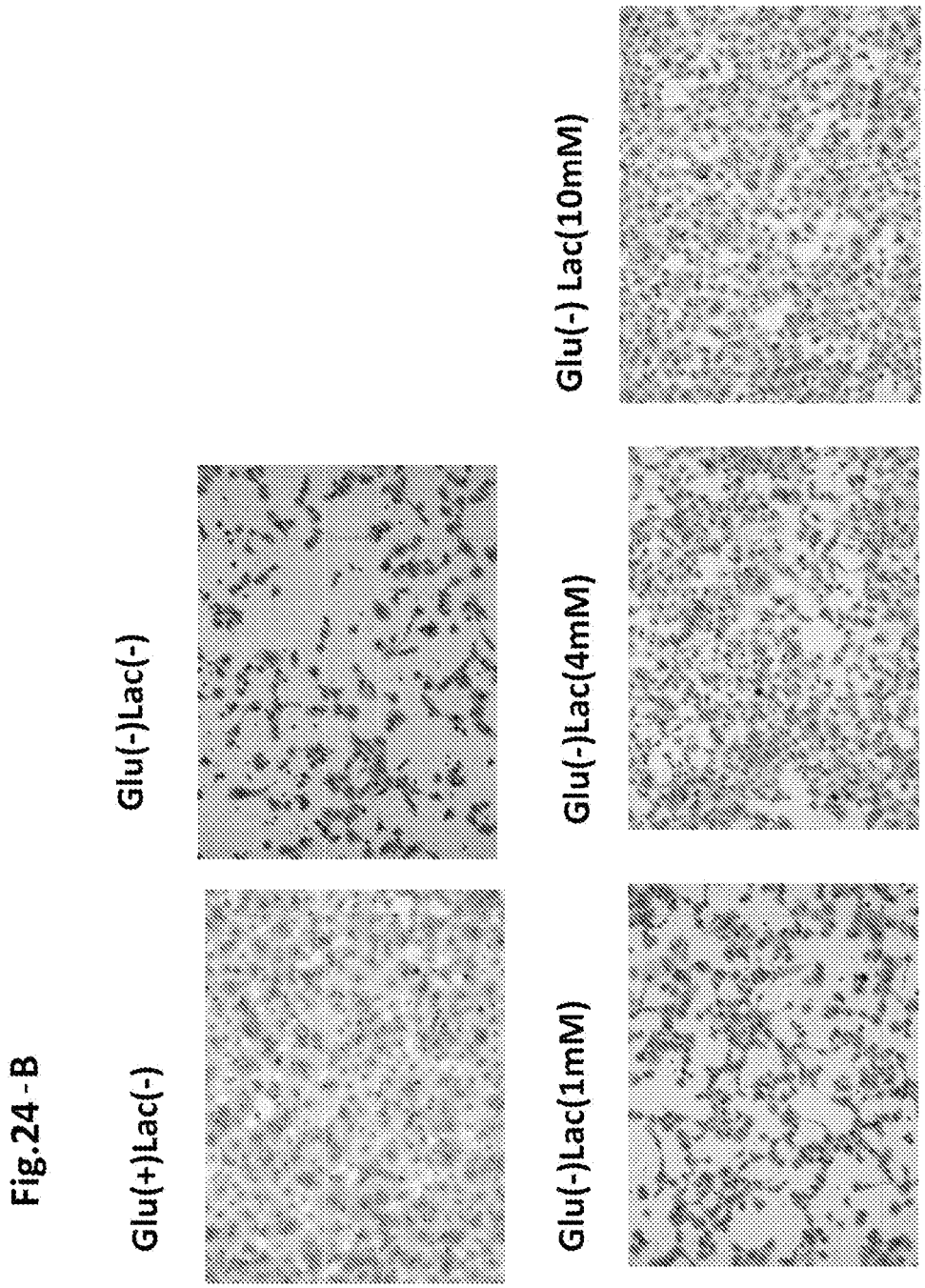


Fig.24-A

[Fig. 24-B]



[Fig. 25-A]

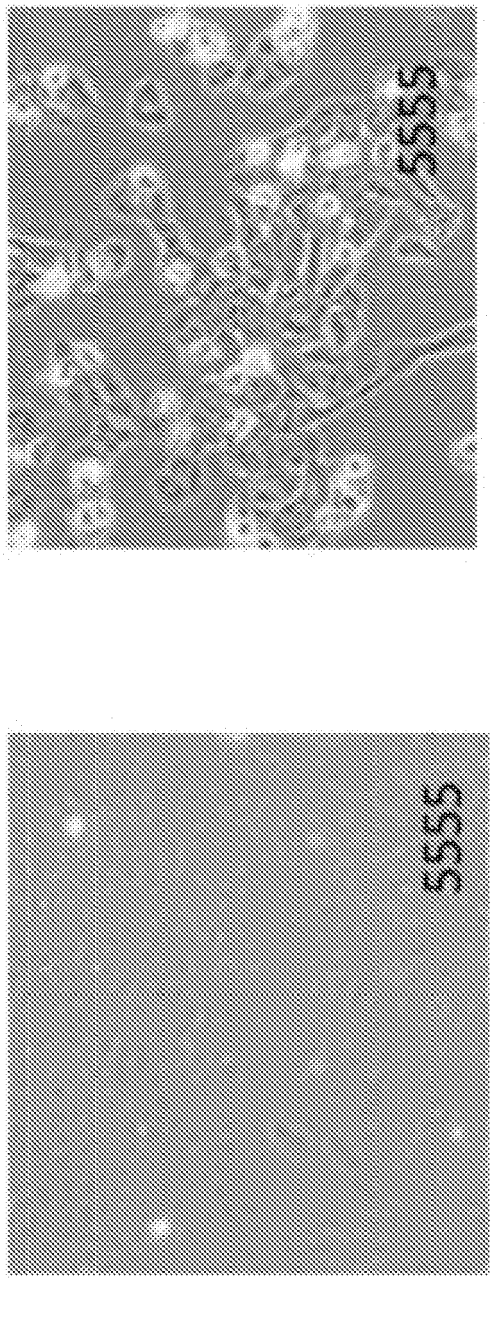
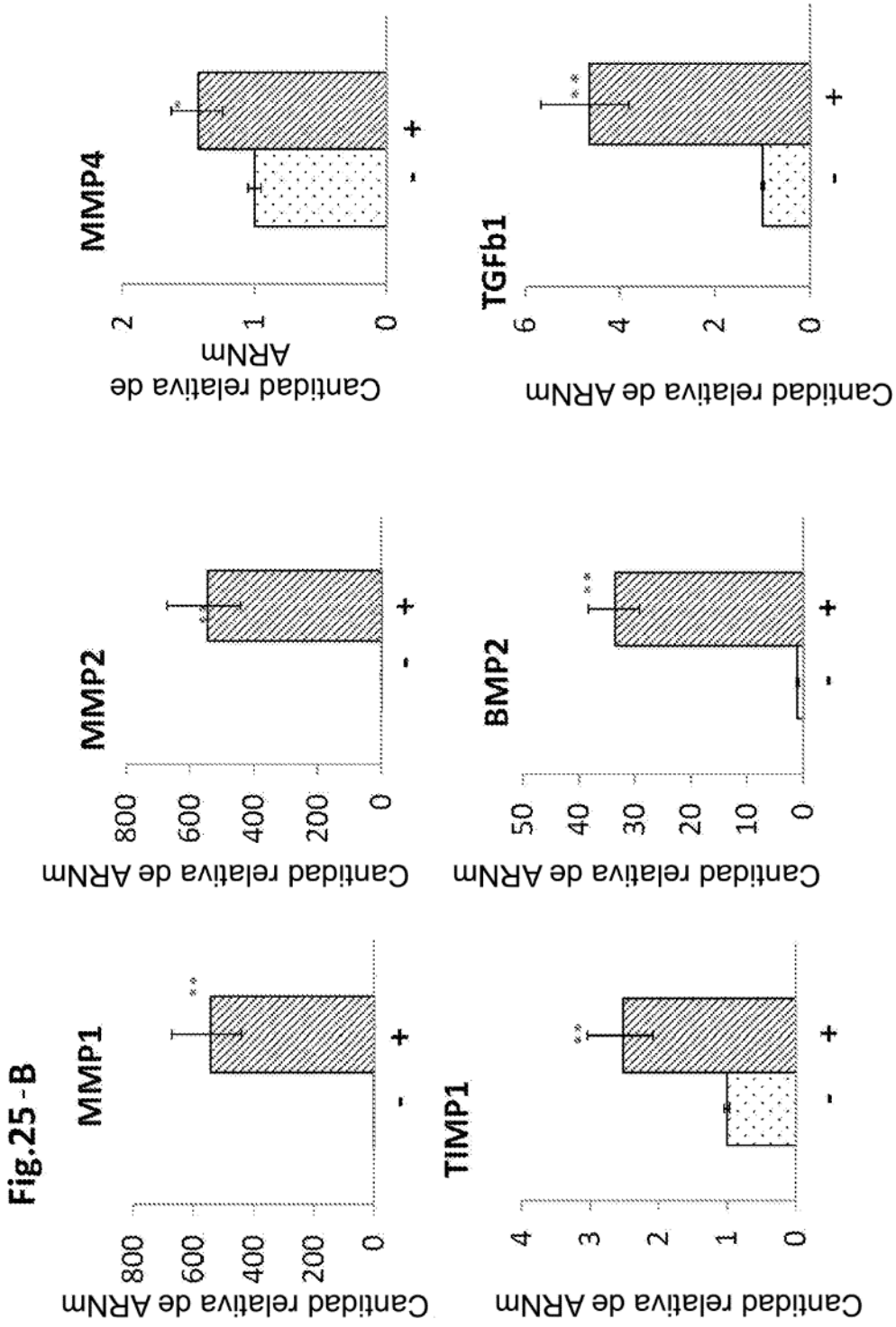
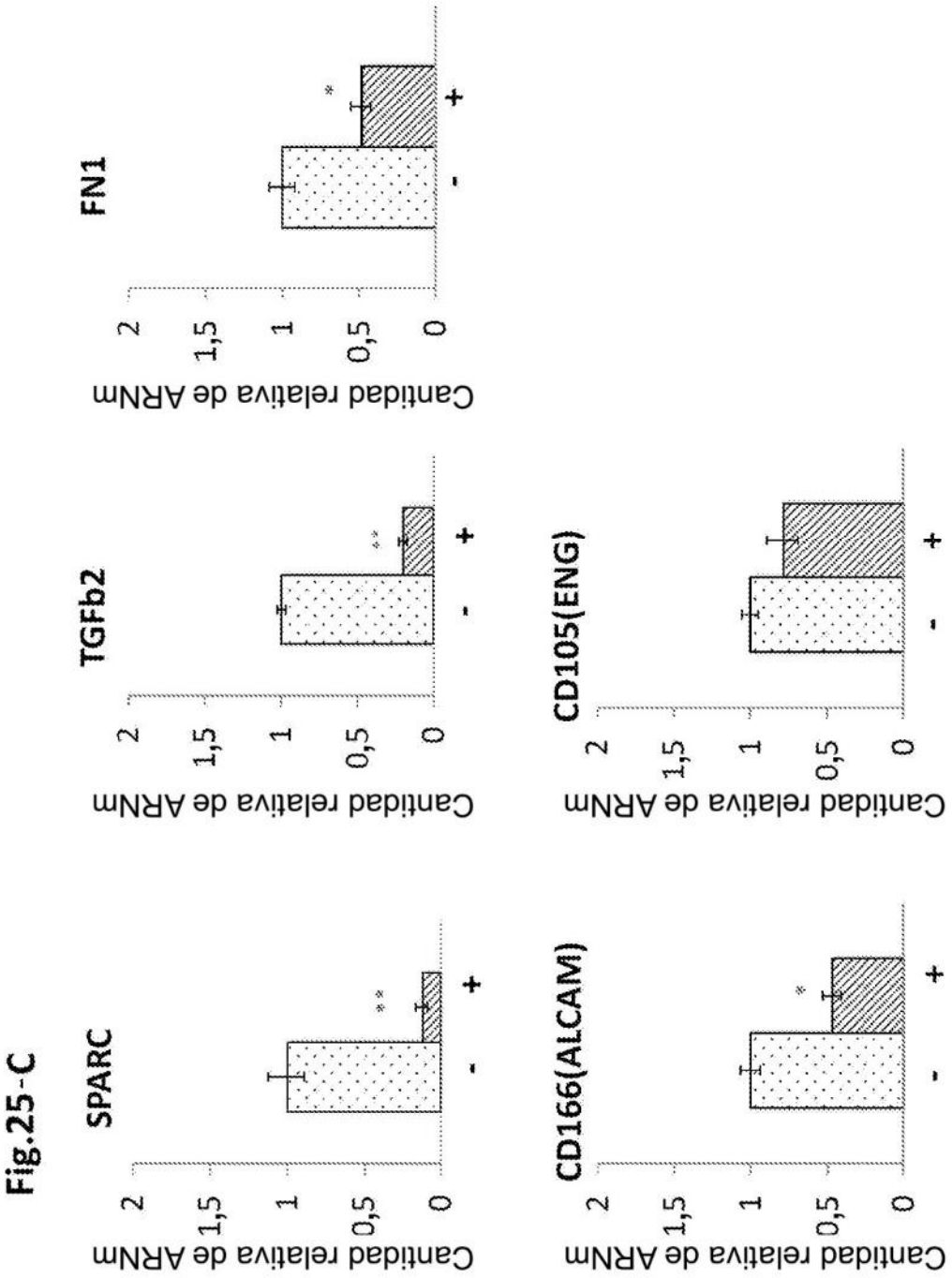


Fig.25-A

[Fig. 25-B]

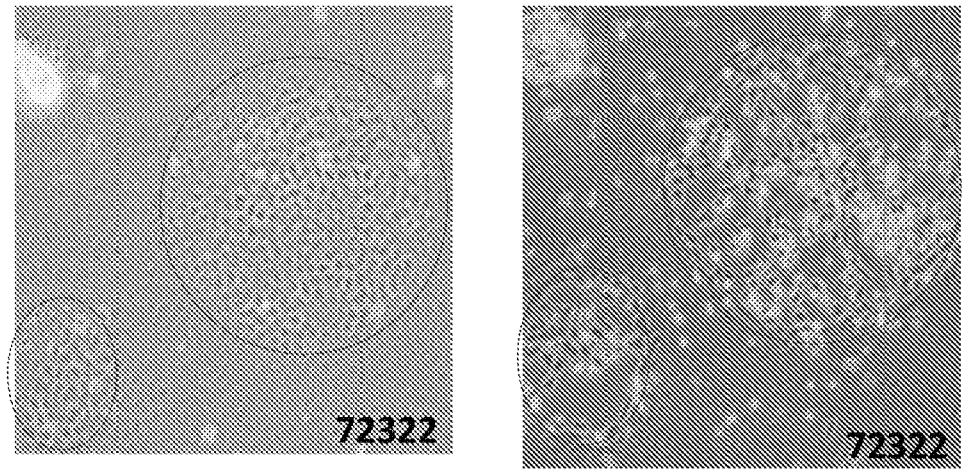

Fig.25-B
MMP1
MMP2
MMP4
TIMP1
BMP2
TGFb1
Cantidad relativa de ARNm
0
200
400
600
800
10
20
30
40
50
1
2
3
4
6
-
+

[Fig. 25-C]

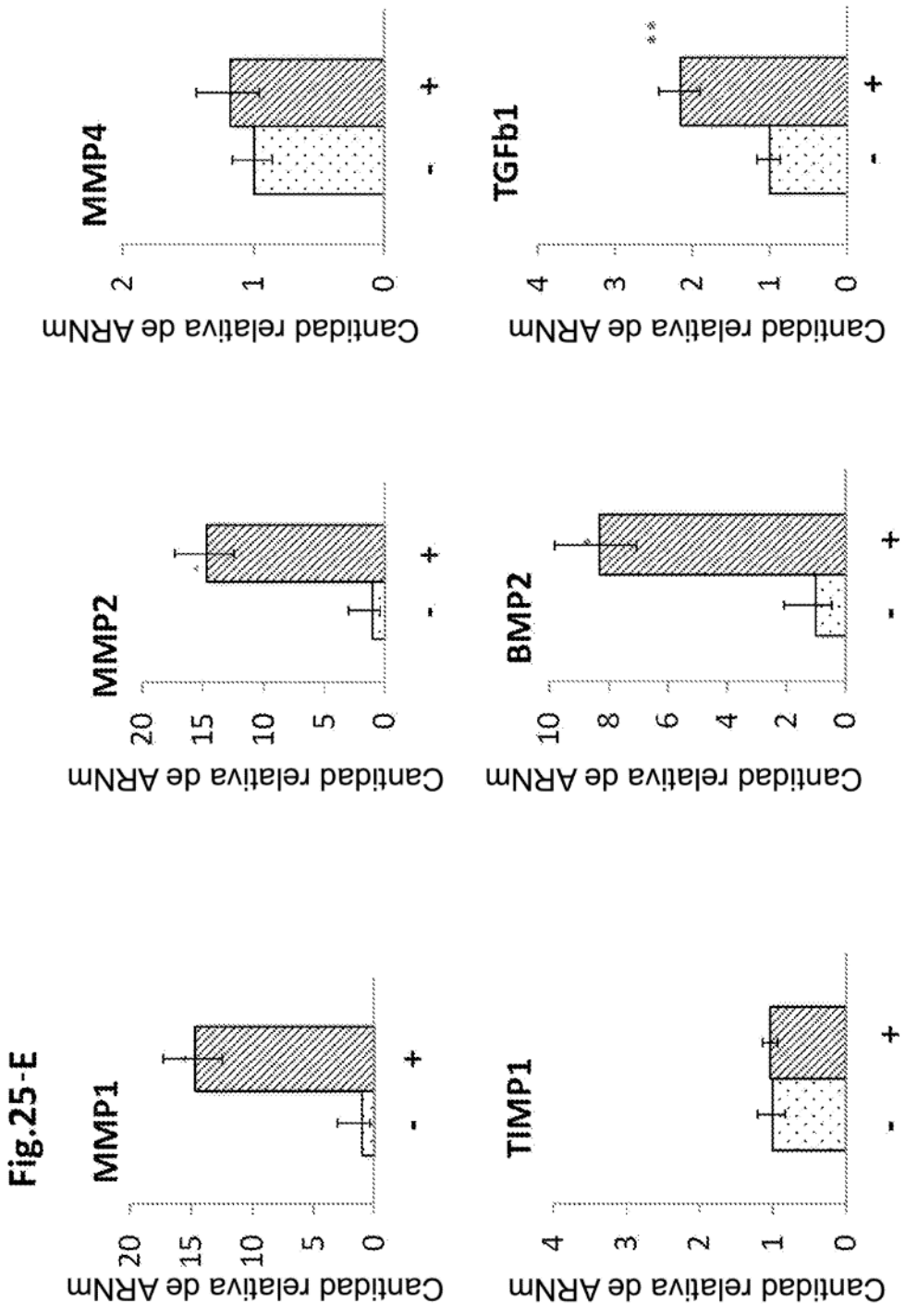

Fig.25-C
SPARC
TGFb2
FN1
CD166(ALCAM)
CD105(ENG)
Cantidad relativa de ARNm
2
1,5
1
0,5
0
-
+
*
**

[Fig. 25-D]

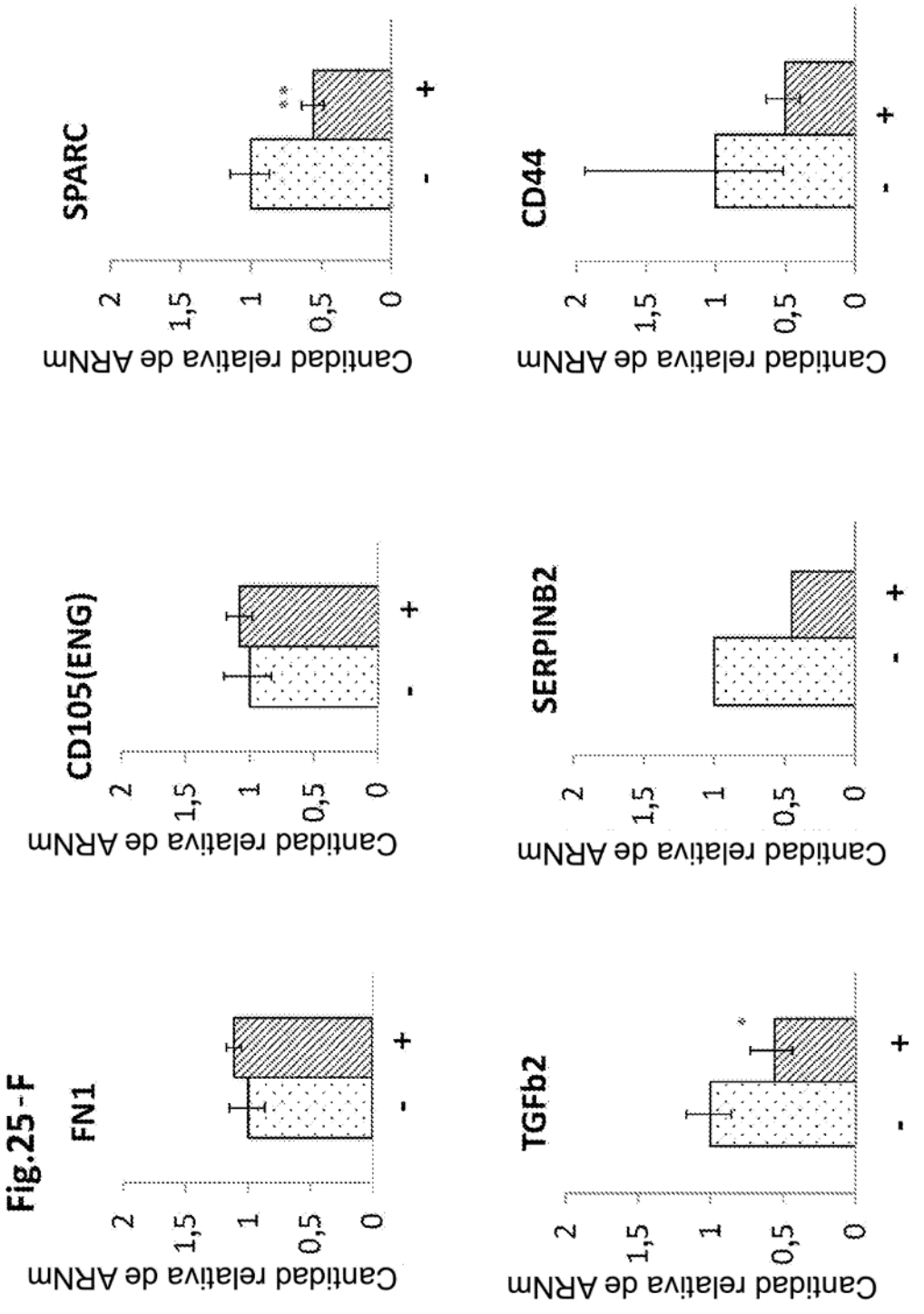
Fig.25-D



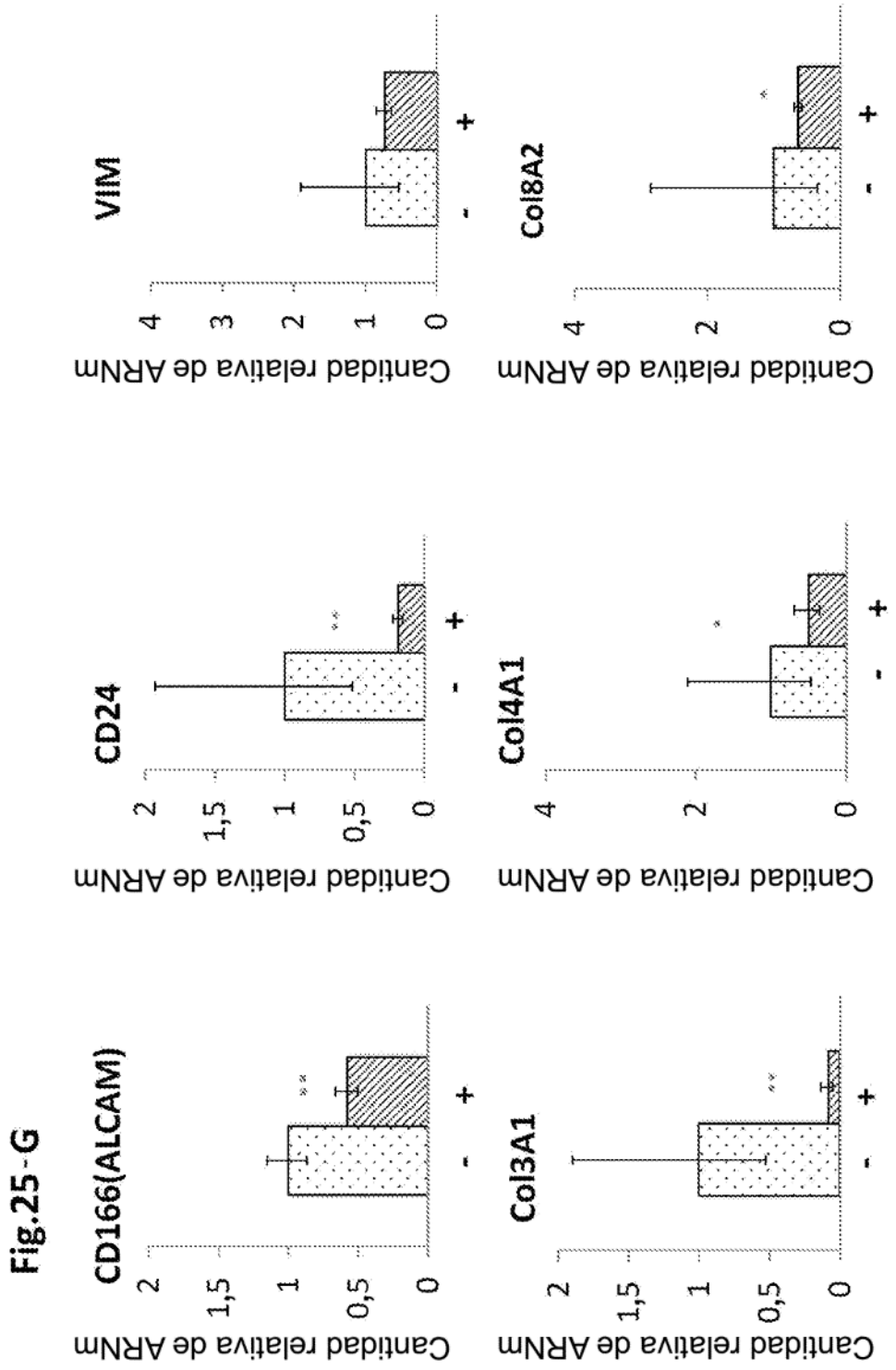
[Fig. 25-E]


Fig.25-E
MMP1
MMP2
MMP4
TIMP1
BMP2
TGFb1
Cantidad relativa de ARNm
0
5
10
15
20
1
2
3
4
6
8
-
+
**

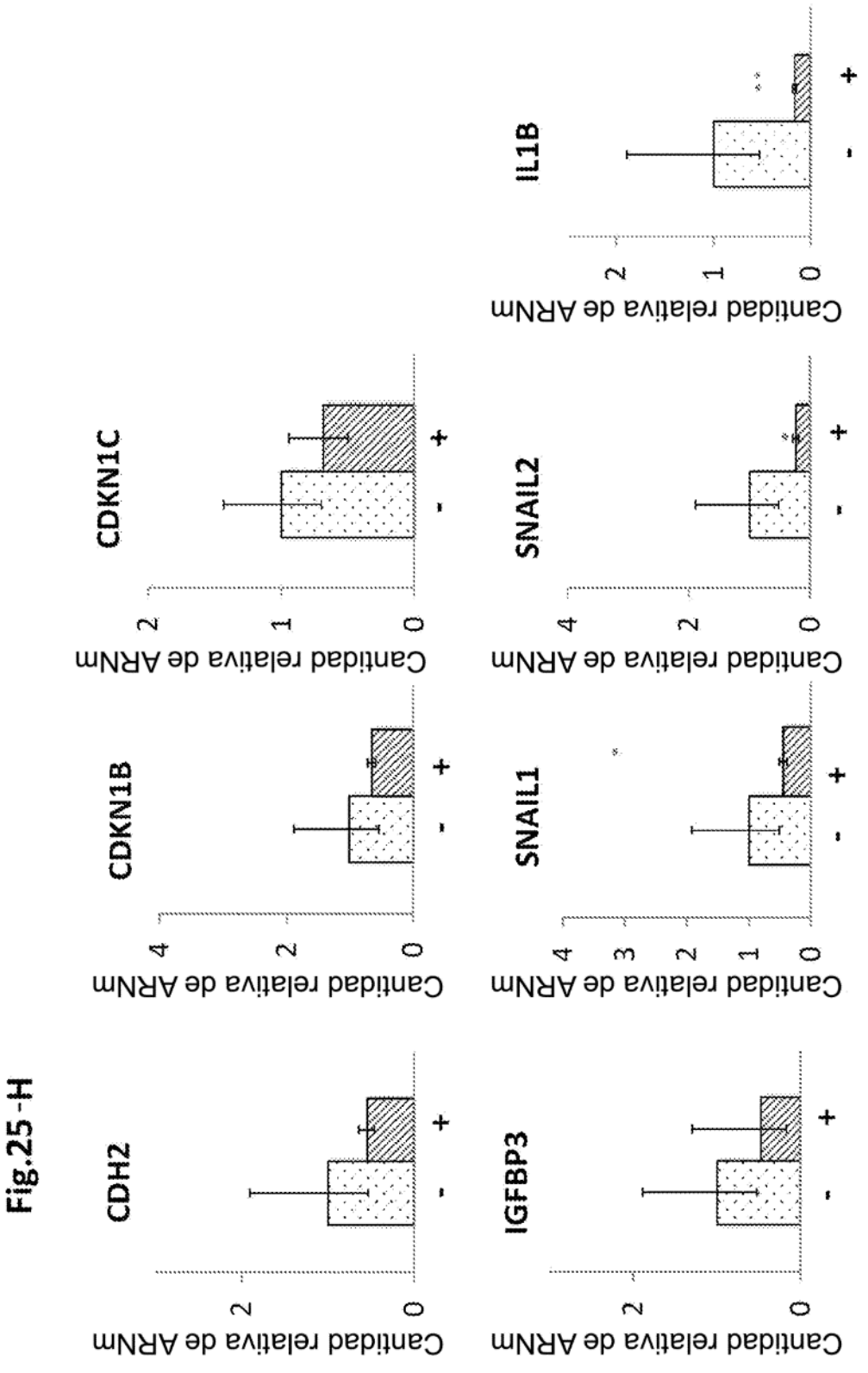
[Fig. 25-F]


Fig.25-F
FN1
CD105(ENG)
SERPINB2
TGFb2
SPARC
CD44
Cantidad relativa de ARNm
0
0,5
1
1,5
2
-
+
*
**

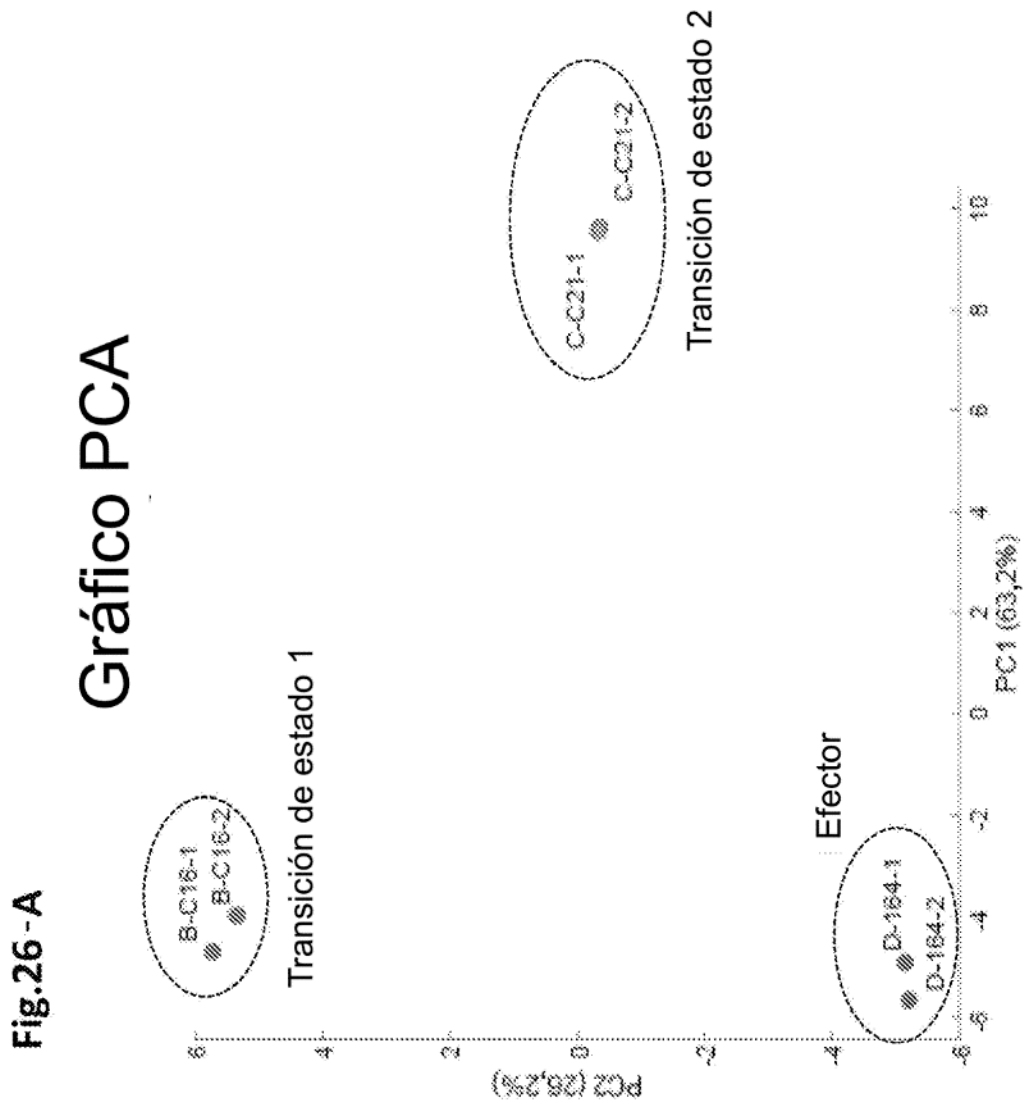
[Fig. 25-G]


Fig.25-G
CD166(ALCAM)
CD24
Col4A1
Col8A2
Col3A1
VIM
Cantidad relativa de ARNm
0
0,5
1
1,5
2
2
4
3
4
-
+
**
*

[Fig. 25-H]


Fig.25-H
CDH2
CDKN1B
CDKN1C
IGFBP3
SNAIL1
SNAIL2
IL1B
Cantidad relativa de ARNm
-
+

[Fig. 26-A]


Fig.26-A
Gráfico PCA
B-C16-1
B-C16-2
Transición de estado 1
C-C21-1
C-C21-2
Transición de estado 2
D-164-1
D-164-2
Efector
PC2 (26,2%)
PC1 (63,2%)

[Fig. 26-B]

Fig.26-B PCA (Cargas de factores: PC1)

- Correlación positiva con PC1: alto valor de transición de estado 2; 5 sustancias solo
- No correlacionado con PC1: bajo valor en el estado de transición 2; muchos aminoácidos

Cargas de factores (20 superiores)	PC1
Ácido úrico	1,3E-01
Ribosa 1-fosfato	8,5E-02
Acetoacetil CoA	8,4E-02
Ácido N-carbamoilaspártico	1,6E-02
β-Ala	2,6E-03
Dihidroxiacetona fosfato	-8,9E-03
Pro	-9,2E-03
Ácido isocítrico	-1,6E-02
Ribosa 5-fosfato	-2,0E-02
Ácido málico	-2,2E-02
Gliceraldehído 3-fosfato	-2,2E-02
Ácido fumárico	-2,5E-02
Carnitina	-2,7E-02
Ácido 2-oxoglutárico	-3,2E-02
Xilulosa 5-fosfato	-3,5E-02
HMG CoA	-5,1E-02
Malonil CoA	-5,4E-02
Ácido γ-aminobutírico	-5,5E-02
Ácido 2-oxoisovalérico	-5,9E-02
Glitatión (GSH)	-6,0E-02
...	...

Cargas de factores (20 inferiores)	PC1
...	...
Tyr	-1,3E-01
cAMP	-1,3E-01
GDP	-1,3E-01
$NADP^+$	-1,3E-01
Fructuosa 1-fosfato	-1,3E-01
NADH	-1,3E-01
Ácido 2-hidroxiglutárico	-1,3E-01
Glu	-1,3E-01
Xantina	-1,3E-01
CoA	-1,3E-01
His	-1,3E-01
Trp	-1,3E-01
Ser	-1,3E-01
Glicerol 3-fosfato	-1,3E-01
Gly	-1,3E-01
Ile	-1,3E-01
Thr	-1,3E-01
ATP	-1,3E-01
Fosfocreatina	-1,3E-01
Gln	-1,3E-01

[Fig. 26-C

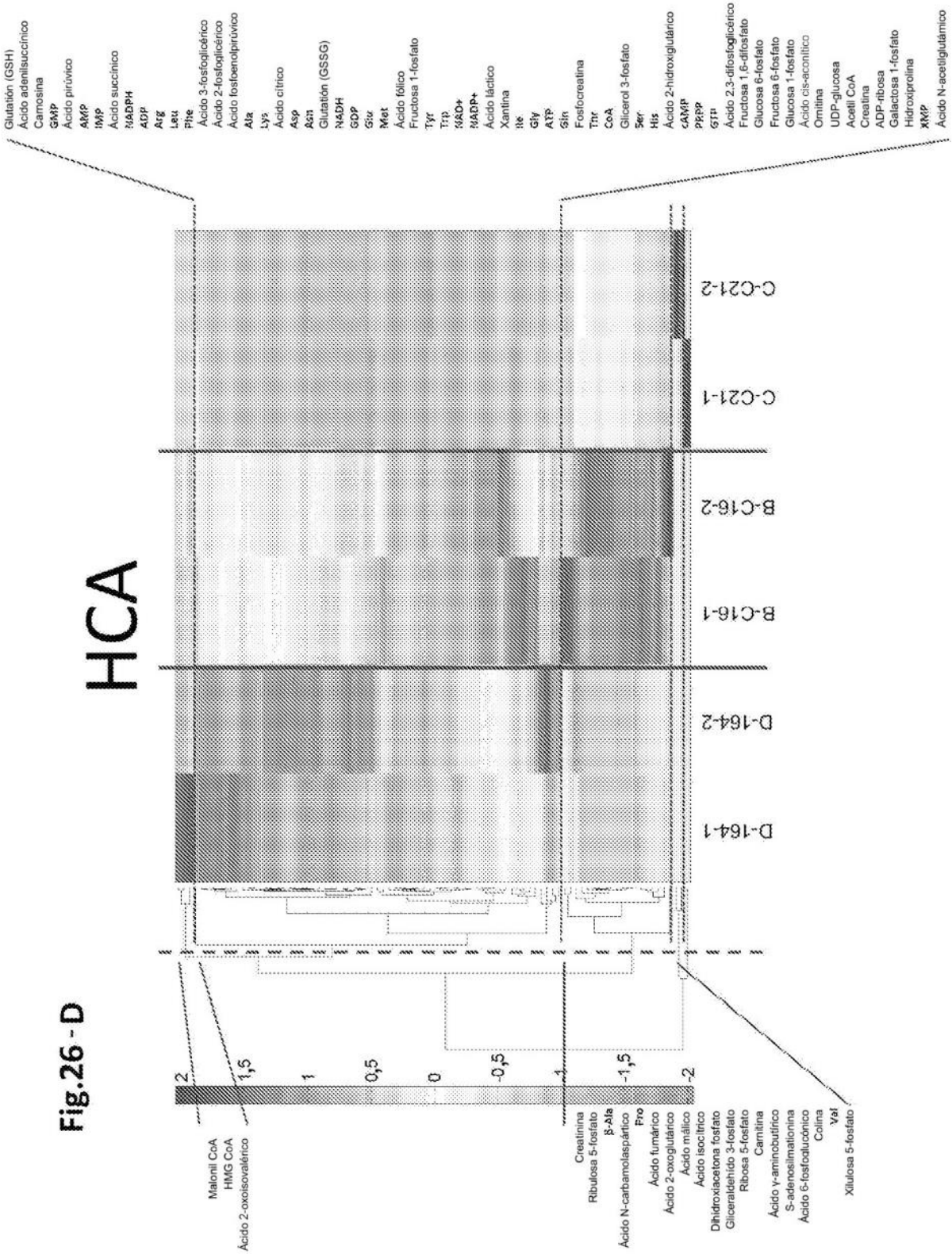
Fig.26-c PCA (Cargas de factores: PC2)

- Correlación positiva con PC2: Alto valor en la transición de estado 1; sustancia intermedia de PPP/TCA
- No correlacionado con PC2: bajo valor en el estado de transición 1; muchos aminoácidos; glucólisis posterior

Cargas de factores (20 superiores)	PC2
Dihidroxiacetona fosfato	2,1E-01
Ribosa 5-fosfato	2,1E-01
Ácido isocítrico	2,1E-01
Ácido N-carbamoilaspártico	2,0E-01
Gliceraldehído 3-fosfato	2,0E-01
Ácido málico	2,0E-01
Carnitina	2,0E-01
Ácido fumárico	2,0E-01
Pro	2,0E-01
Ácido 2-oxoglutárico	2,0E-01
β-Ala	1,9E-01
Ácido γ-aminobutírico	1,9E-01
S-adenosilmetionina	1,9E-01
Ácido 6-fosfoglucónico	1,8E-01
Colina	1,6E-01
Val	1,5E-01
Ácido cis-aconítico	1,3E-01
Creatinina	1,3E-01
Ribulosa 5-fosfato	1,3E-01
Glucosa 1-fosfato	1,2E-01
...	...

Cargas de factores (20 inferiores)	PC2
...	...
Ala	-6,5E-02
Met	-6,5E-02
Ácido cítrico	-7,4E-02
Asn	-7,4E-02
Ácido fosfoenolpirúvico	-7,5E-02
Ácido 2-fosfoglicérico	-7,7E-02
Lys	-7,8E-02
Phe	-8,0E-02
NADPH	-8,6E-02
Ácido 3-fosfoglicérico	-8,6E-02
Ácido succínico	-8,7E-02
Arg	-9,2E-02
ADP	-9,8E-02
AMP	-1,1E-01
Ácido pirúvico	-1,2E-01
IMP	-1,2E-01
GMP	-1,3E-01
Carnosina	-1,4E-01
Ácido adenilsuccínico	-1,5E-01
Glutatión (GSH)	-1,6E-01

[Fig. 26-D]


HCA
Fig.26 - D
C-C21-2
C-C21-1
B-C16-2
B-C16-1
D-164-2
D-164-1
Glutatión (GSH)
Ácido adenilsuccínico
Carnosina
GMP
Ácido pirúvico
AMP
IMP
Ácido succínico
NADPH
ADP
Arg
Leu
Phe
Ácido 3-fosfoglicérico
Ácido 2-fosfoglicérico
Ácido fosfoenolpirúvico
Ala
Lys
Ácido cítrico
Asp
Asn
Glutatión (GSSG)
NADH
GDP
Ser
Met
Ácido fólico
Fructosa 1-fosfato
Tyr
Trp
NAD+
NADP+
Ácido láctico
Xantina
Ile
Gly
ATP
Gln
Fosfocreatina
Thr
CoA
Glicerol 3-fosfato
Ser
His
Ácido 2-hidroxiglutárico
cAMP
PRPP
GTP
Ácido 2,3-difosfoglicérico
Fructosa 1,6-difosfato
Glucosa 6-fosfato
Fructosa 6-fosfato
Glucosa 1-fosfato
Ácido cis-aconítico
Ornitina
UDP-glucosa
Acetil CoA
Creatina
ADP-ribosa
Galactosa 1-fosfato
Hidroxiprolina
XMP
Ácido N-acetilglutámico
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
-1
-1,5
-2
Malonil CoA
HMG CoA
Ácido 2-oxoisovalérico
Creatinina
Ribulosa 5-fosfato
β-Ala
Ácido N-carbamoilaspártico
Pro
Ácido fumárico
Ácido 2-oxoglutárico
Ácido málico
Ácido isocítrico
Dihidroxiacetona fosfato
Gliceraldehído 3-fosfato
Ribosa 5-fosfato
Carnitina
Ácido γ-aminobutírico
S-adenosilmetionina
Ácido 6-fosfoglucónico
Colina
Val
Xilulosa 5-fosfato

[Fig. 26-E]

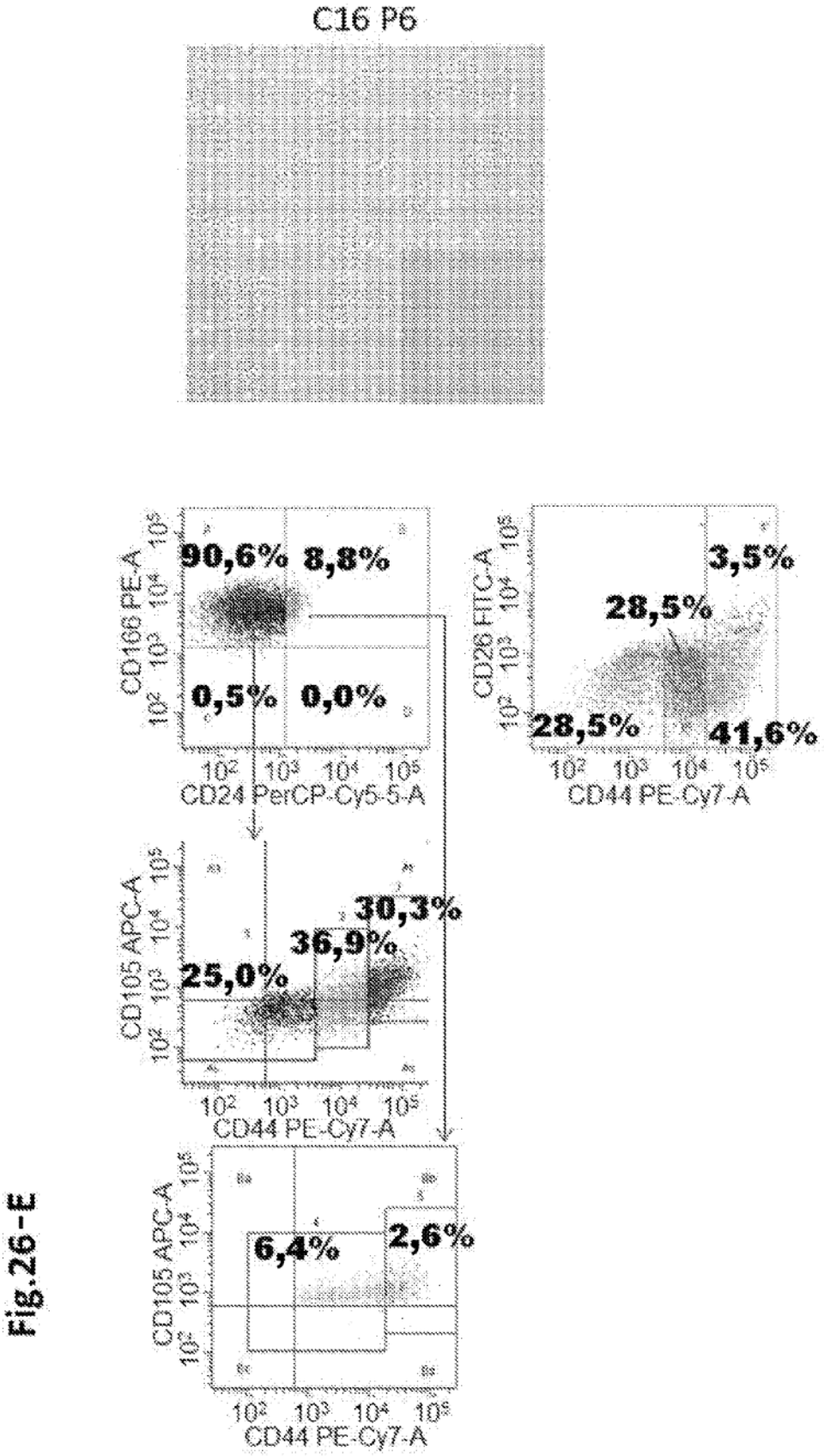


Fig.26-E

[Fig. 26-F]

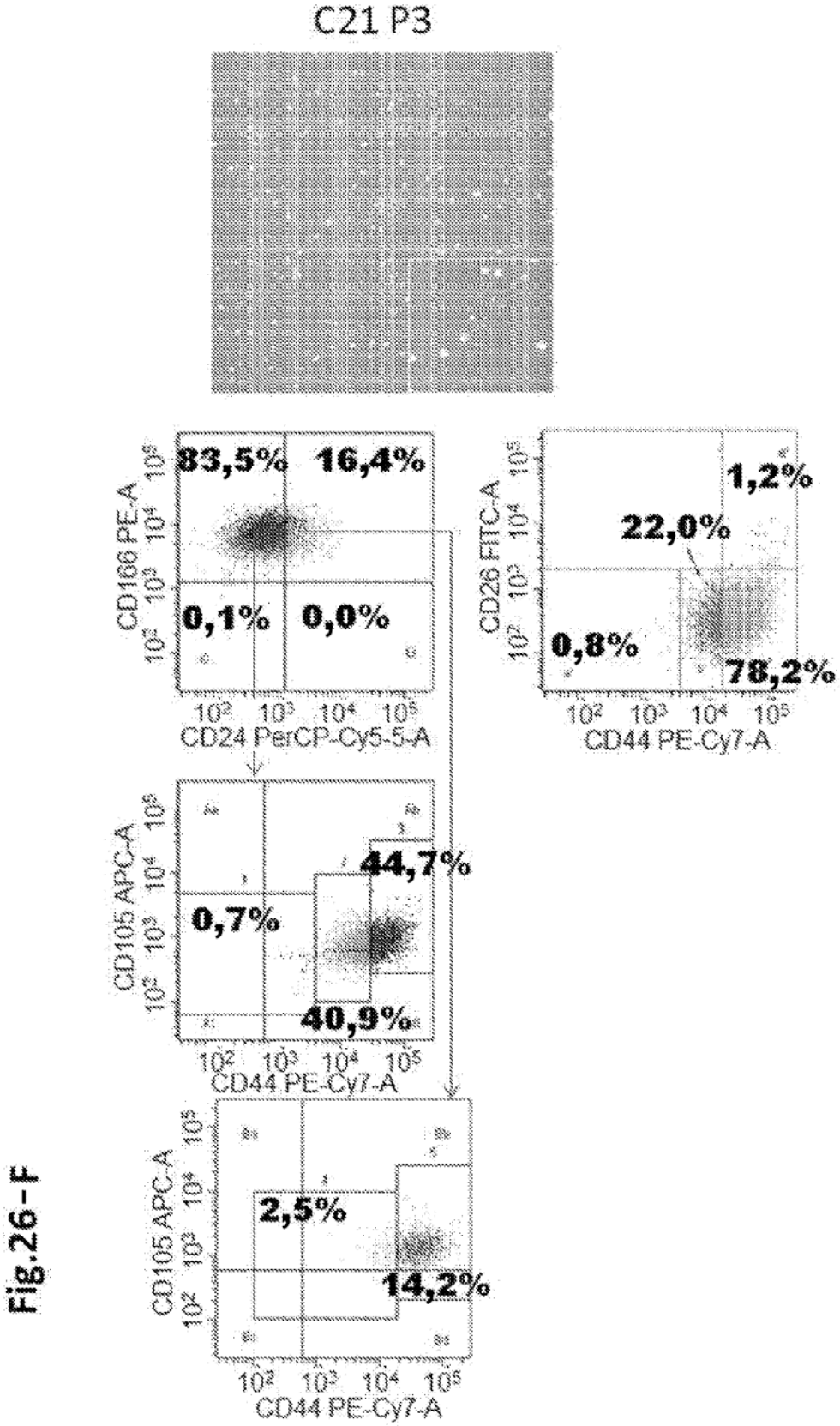


Fig.26-F

[Fig. 26-G]

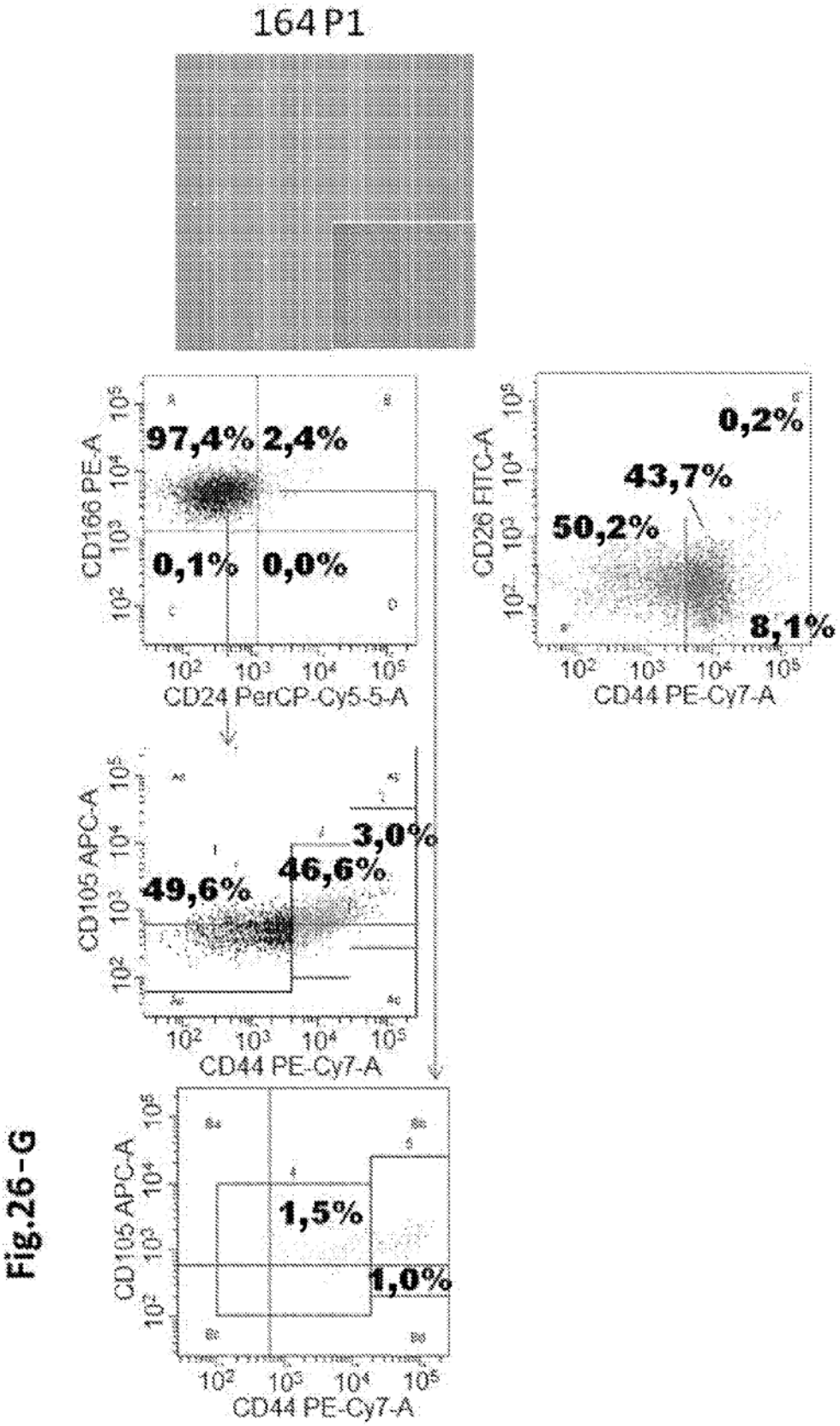


Fig.26-G

[Fig. 26-H]

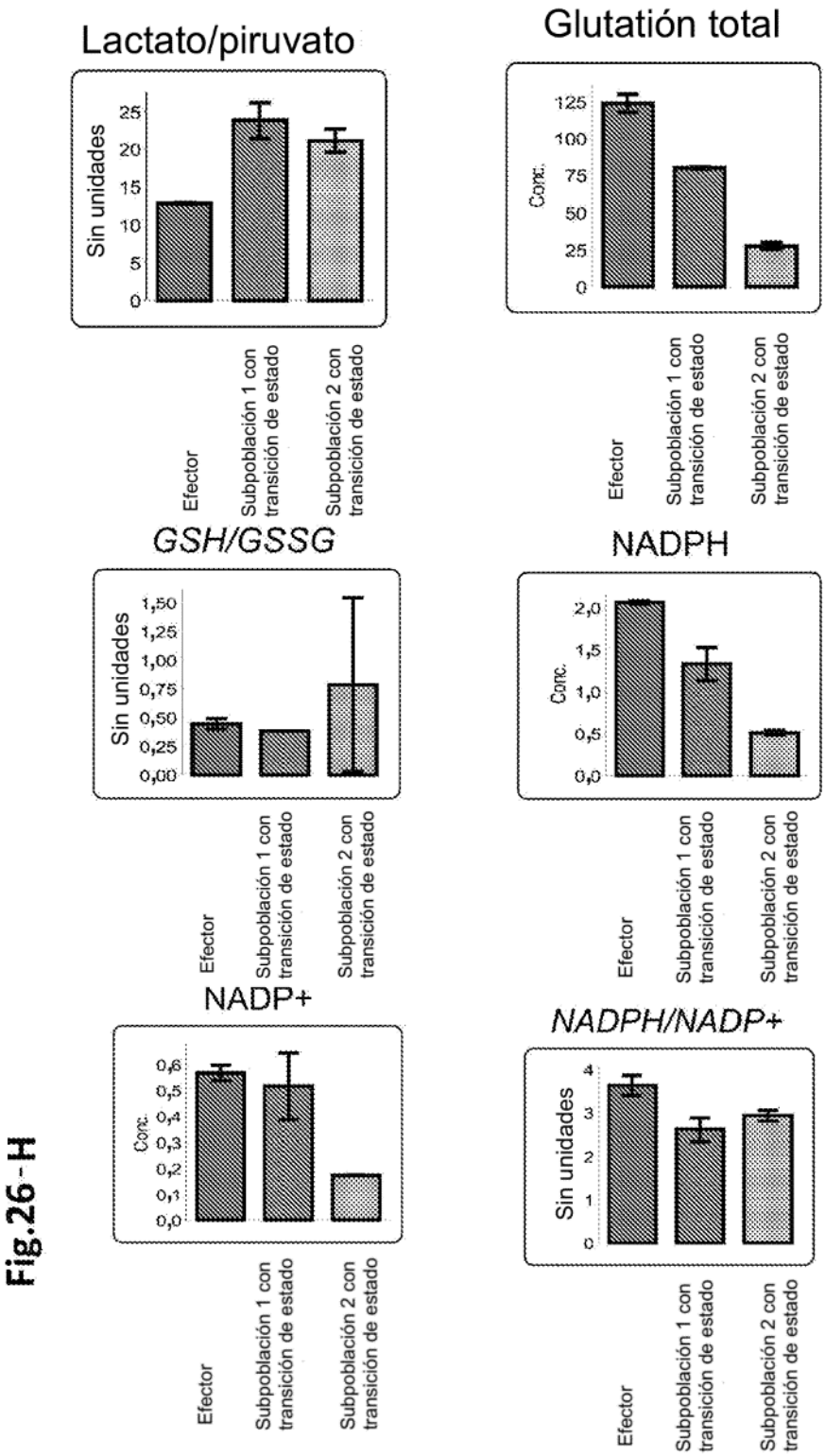
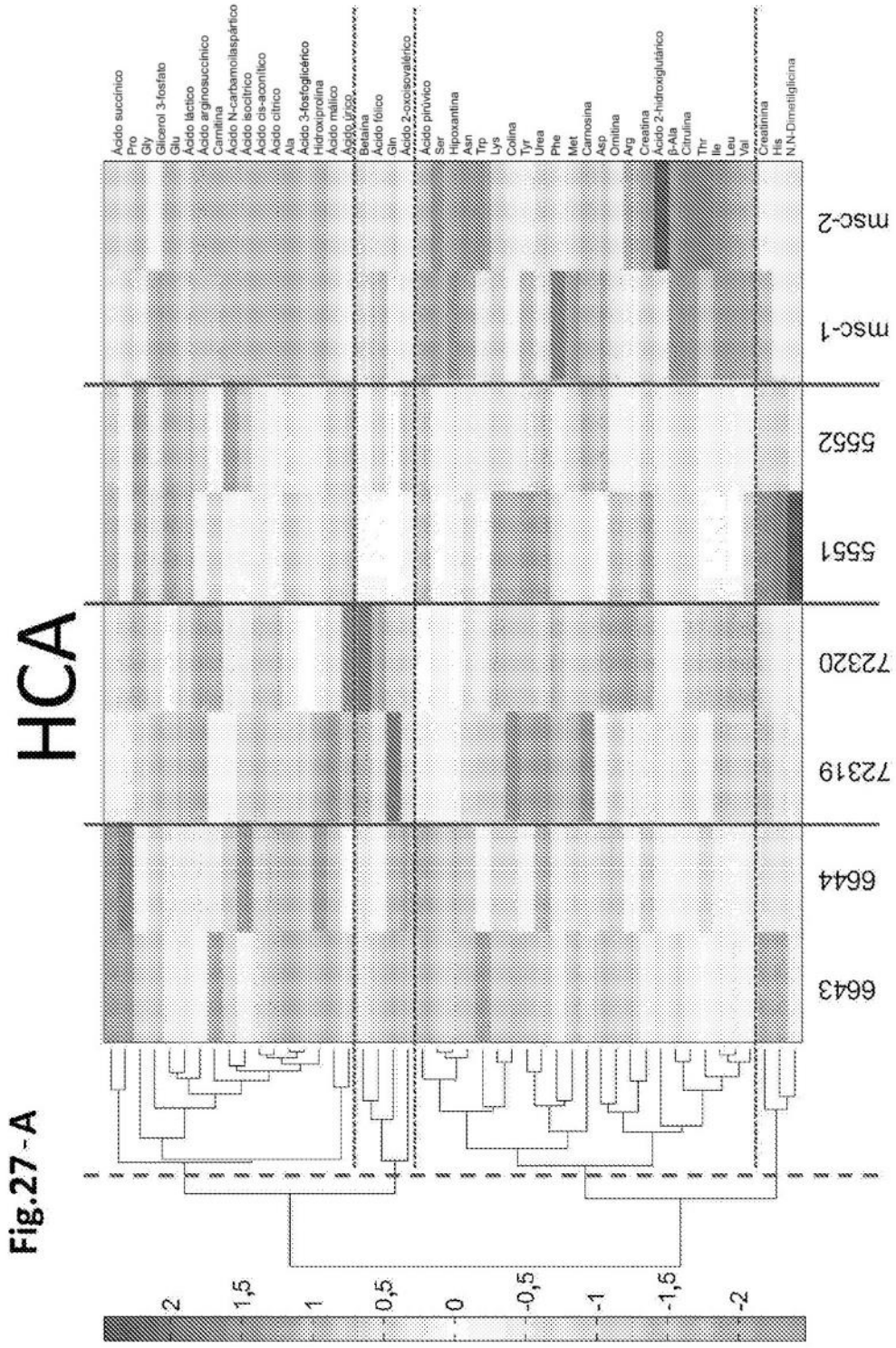


Fig.26-H

[Fig. 27-A]


HCA
Fig.27-A
Ácido succínico
Pro
Gly
Glicerol 3-fosfato
Glu
Ácido láctico
Ácido arginosuccínico
Carnitina
Ácido N-carbamoilaspártico
Ácido isocítrico
Ácido cis-aconítico
Ácido cítrico
Ala
Ácido 3-fosfoglicérico
Hidroxiprolina
Ácido málico
Betaína
Ácido fólico
Gln
Ácido 2-oxoisovalérico
Ácido pirúvico
Ser
Hipoxantina
Asn
Trp
Lys
Colina
Tyr
Urea
Phe
Met
Carnosina
Asp
Ornitina
Arg
Creatina
Ácido 2-hidroxiglutárico
β-Ala
Citrulina
Thr
Ile
Leu
Val
Creatinina
His
N,N-Dimetilglicina
msc-2
msc-1
5552
5551
72320
72319
6644
6643
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
-1
-1,5
-2

[Fig. 27-B]

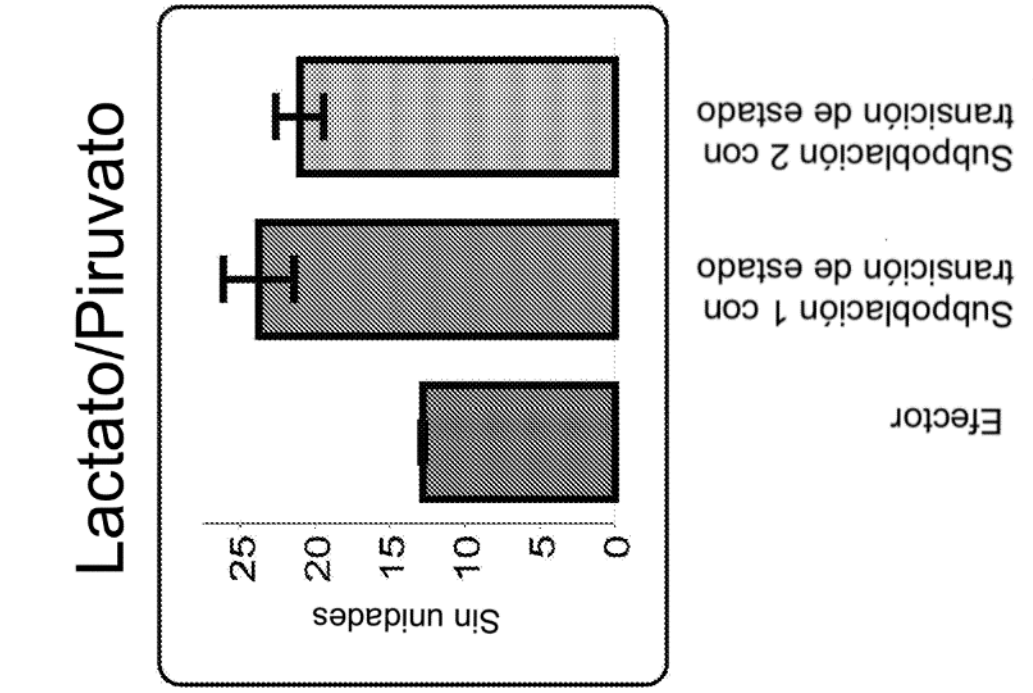


Fig.27-B

[Fig. 27-C]

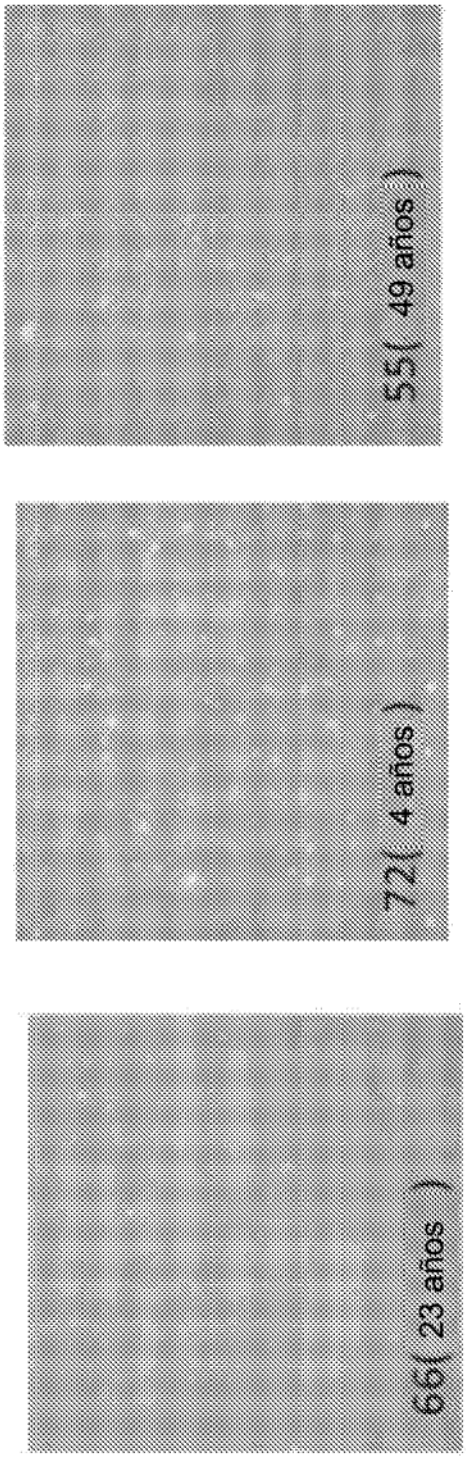


Fig.27-C

[Fig. 28-A]

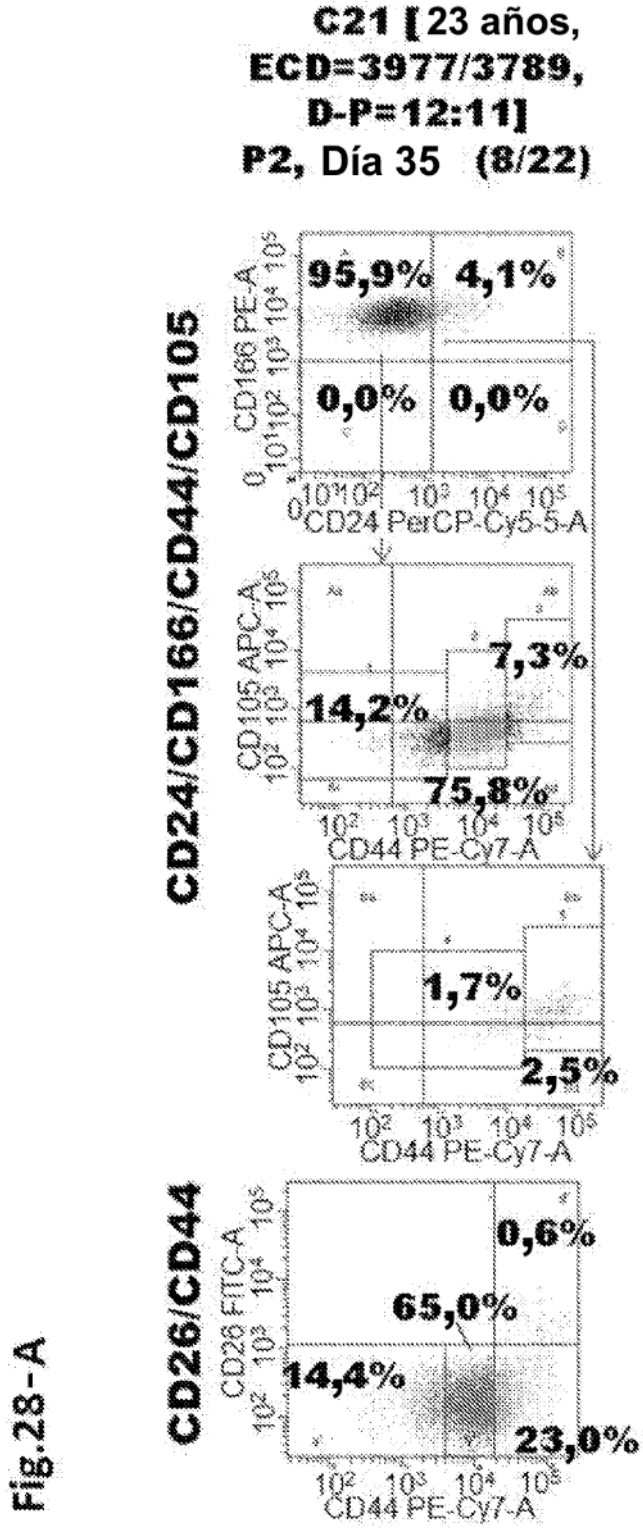


Fig.28-A

Células efectoras = 14,2%
Semicalificadas = 75,8%
Efectoras + semicalificadas = 90,0%

[Fig. 28-B]

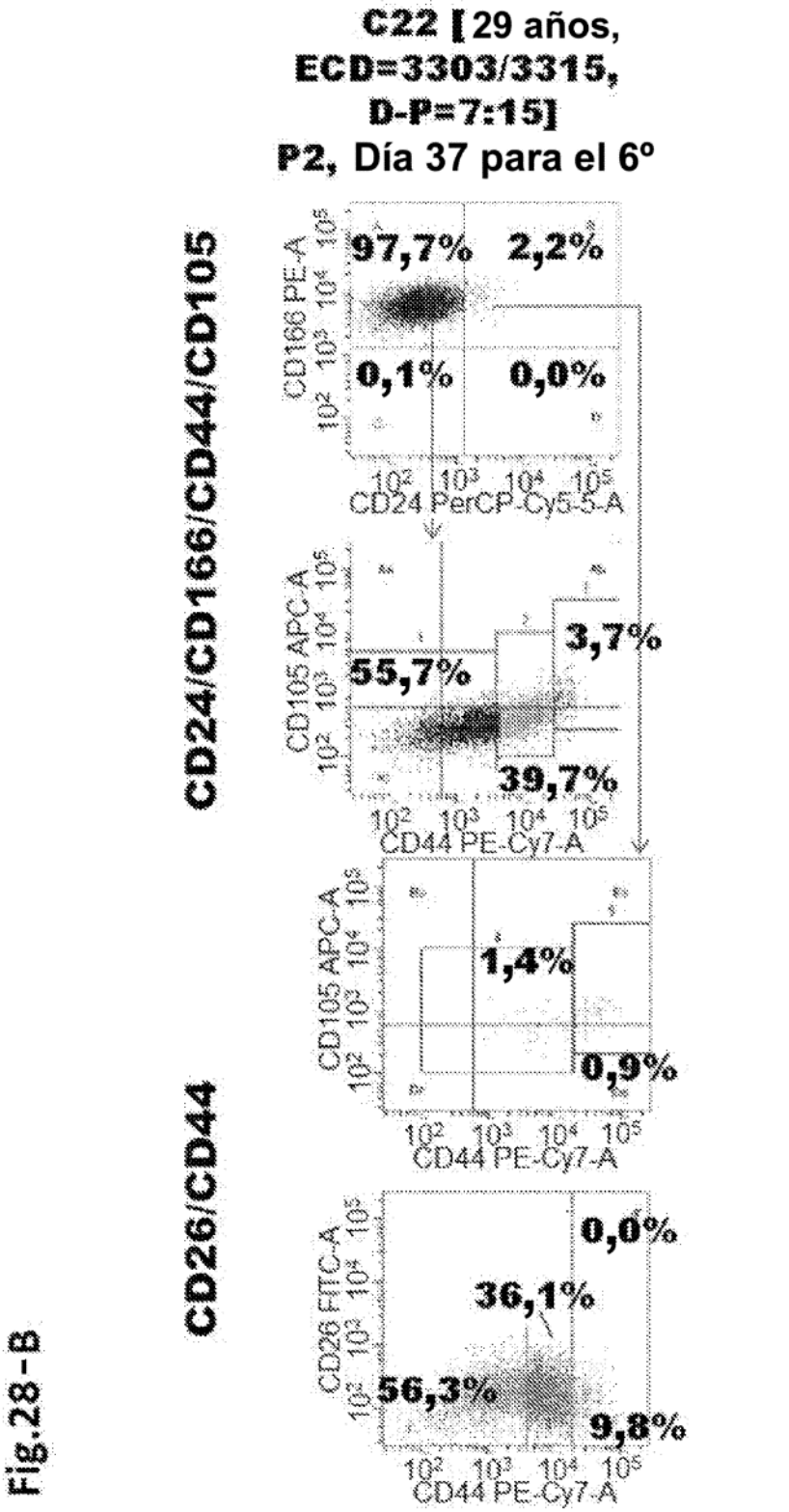


Fig.28-B

Células efectoras = 55,7%
Semicalificadas = 39,7%
Efectoras + semicalificadas = 95,4%

[Fig. 28-C]

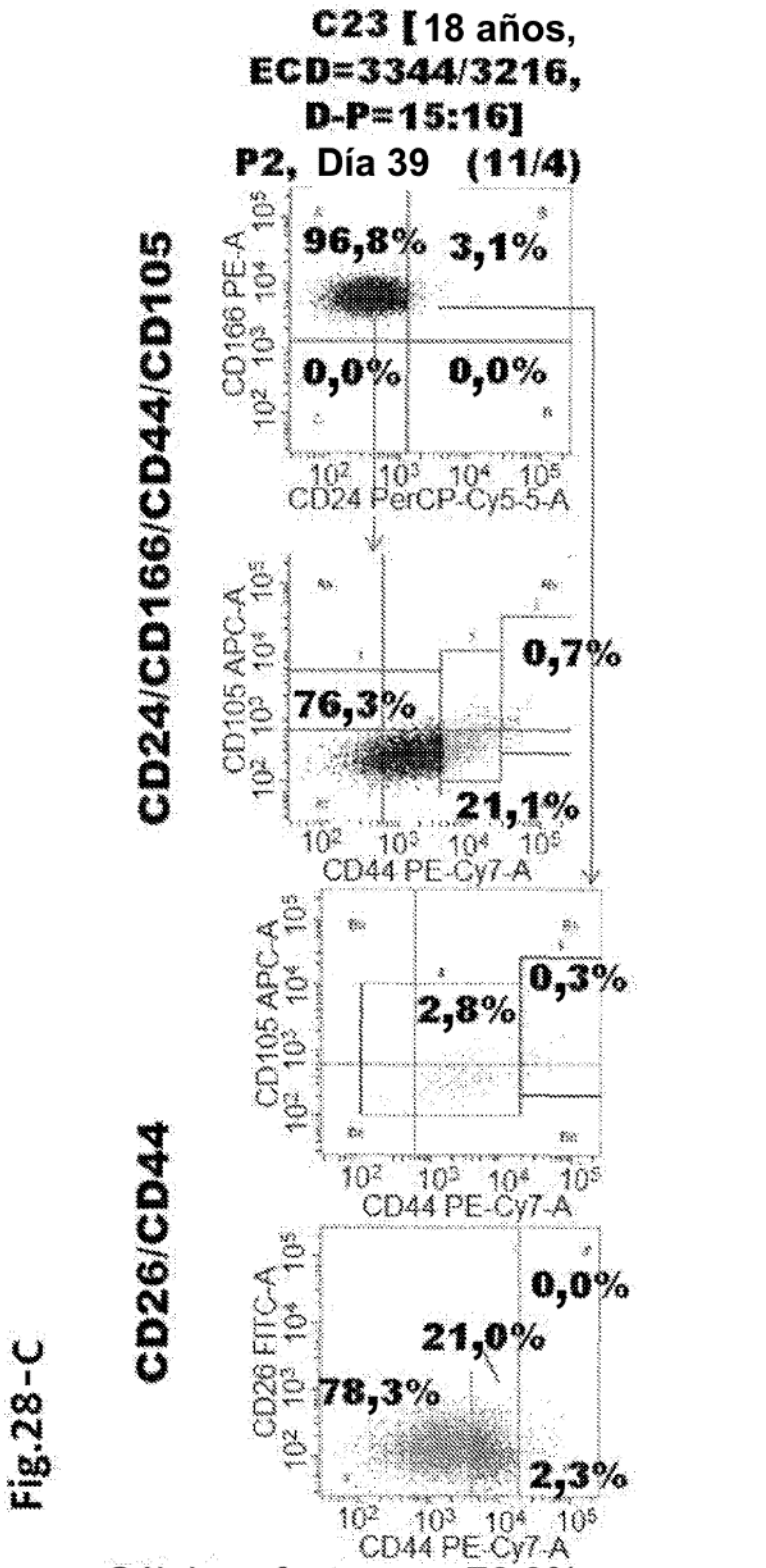


Fig.28-C

Células efectoras = 76,3%
Semicalificadas = 21,1%
Efectoras + semicalificadas = 97,4%

[Fig. 28-D]

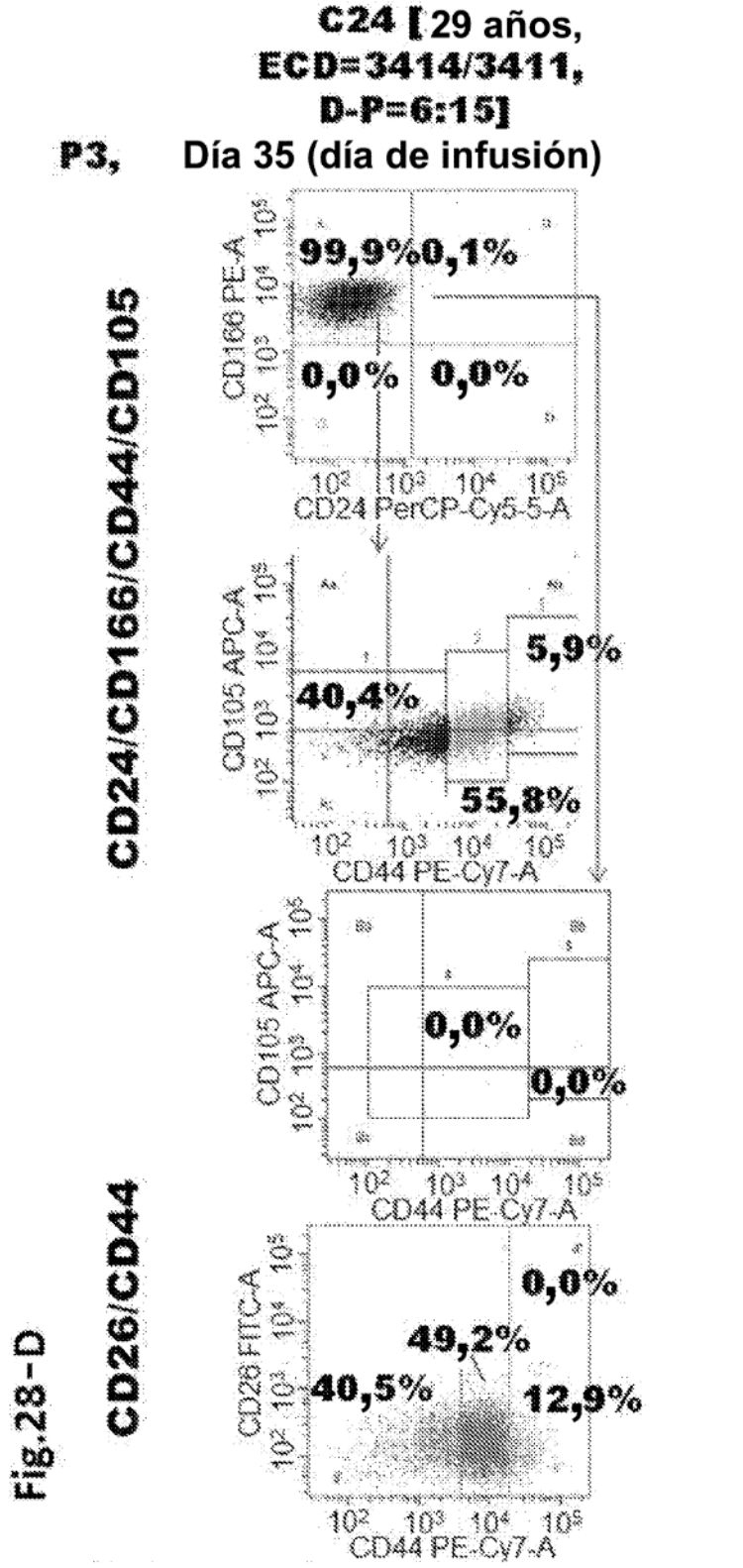
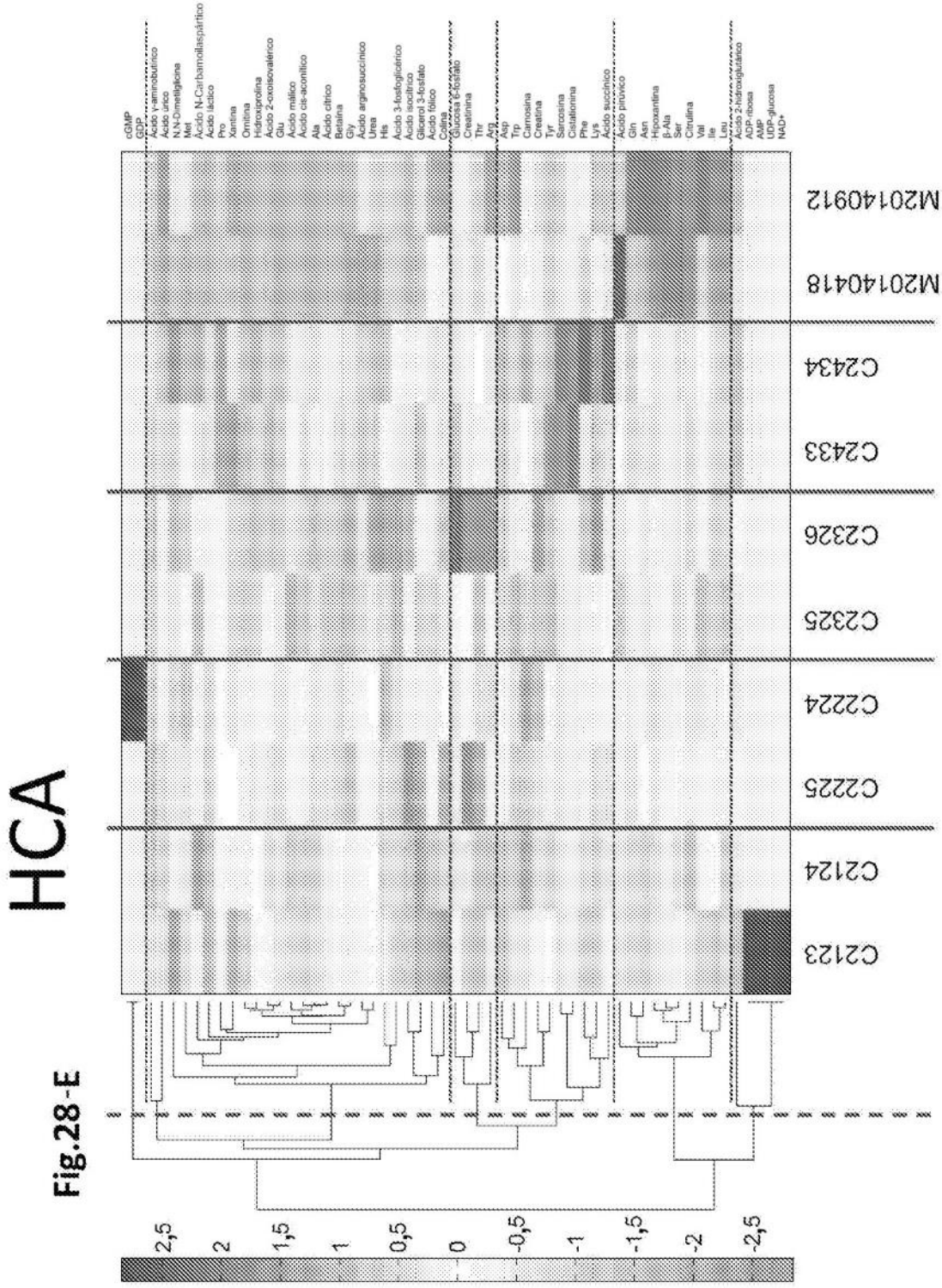


Fig.28-D

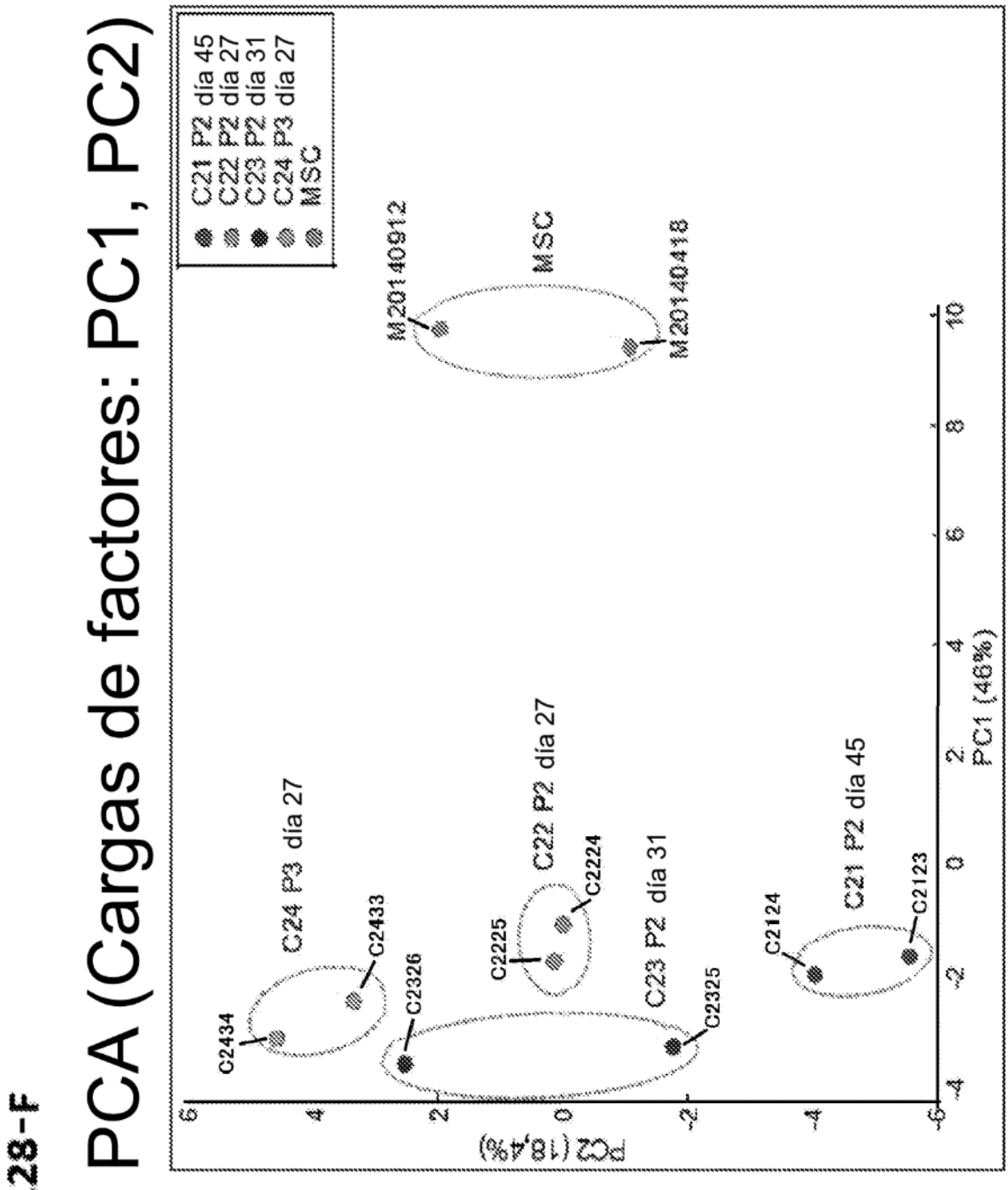
Células efectoras = 40,4%
Semicalificadas = 55,8%
Efectoras + semicalificadas = 96,2%

[Fig. 28-E]


HCA
Fig.28-E
cGMP
GDP
Ácido γ-aminobutírico
Ácido úrico
N,N-Dimetilglicina
Met
Ácido N-Carbamoilaspártico
Ácido láctico
Pro
Xantina
Ornitina
Hidroxiprolina
Ácido 2-oxoisovalérico
Glu
Ácido málico
Ácido cis-aconítico
Ala
Ácido cítrico
Betaína
Gly
Ácido argininosuccínico
Urea
His
Ácido 3-fosfoglicérico
Ácido isocítrico
Glicerol 3-fosfato
Ácido fólico
Colina
Creatinina
Thr
Arg
Asp
Trp
Carnosina
Creatina
Tyr
Sarcosina
Cistationina
Phe
Lys
Ácido succínico
Ácido pirúvico
Gln
Asn
Hipoxantina
β-Ala
Ser
Citrulina
Val
Ile
Leu
Ácido 2-hidroxiglutárico
ADP-ribosa
ATP
UDP-glucosa
NAD+
M20140912
M20140418
C2434
C2433
C2326
C2325
C2224
C2225
C2124
C2123
2,5
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
-1
-1,5
-2
-2,5

[Fig. 28-F]

Fig.28-F



[Fig. 28-G]

Fig.28-G PCA (Cargas de factores: PC1, PC2)

- Correlacionados positivamente con P1: alto valor en msc; muchos aminoácidos
- Correlacionados negativamente con P1: bajo valor en msc: sustancia intermedia de TCA, ácido láctico, etc.
- Correlacionados positivamente con PC2: alto valor en C24, bajo valor en C21; muchos aminoácidos, etc.
- Correlacionados negativamente con PC2: bajo valor en C24, alto valor en C21; sustancia intermedia de TCA, ácido láctico, etc.

Cargas de factores (más altos→)	PC1
β-Ala	1,9E-01
Ser	1,9E-01
Hipoxantina	1,8E-01
Ile	1,7E-01
Leu	1,7E-01
Citrulina	1,6E-01
Asn	1,6E-01
Ácido pirúvico	1,6E-01
Val	1,4E-01
Gln	1,4E-01
Trp	1,1E-01
Ácido 2-hidroxiglutárico	9,2E-02
Arg	6,6E-02
Asp	4,8E-02
Carnosina	1,1E-02
Creatina	-3,2E-03
Sarcosina	-8,7E-03
Tyr	-1,4E-02
cGMP	-1,5E-02
GDP	-1,5E-02
UDP-glucosa	-2,3E-02
ADP-ribosa	-2,3E-02
AMP	-2,3E-02
NAD^+	-2,3E-02
Thr	-2,6E-02
Ácido úrico	-2,9E-02
Ácido γ-aminobutírico	-3,3E-02
Cistationina	-5,7E-02
Ácido succínico	-6,2E-02
...	...

Cargas de factores (más altos→)	PC2
Asp	2,9E-01
Phe	2,5E-01
Sarcosina	2,2E-01
Tyr	2,2E-01
Lys	2,2E-01
Creatina	2,0E-01
Cistationina	2,0E-01
Carnosina	2,0E-01
Gln	1,9E-01
Trp	1,8E-01
Arg	1,8E-01
Thr	1,7E-01
Asn	1,6E-01
His	1,4E-01
Creatinina	1,4E-01
Urea	1,0E-01
Pro	9,6E-02
Ácido succínico	8,9E-02
Glucosa 6-fosfato	7,9E-02
Hidroxiprolina	7,8E-02
Ácido arginosuccínico	7,4E-02
Ácido úrico	6,2E-02
N,N-dimetilglicina	5,9E-02
Ácido pirúvico	5,8E-02
Ácido γ-aminobutírico	5,8E-02
Hipoxantina	5,1E-02
Ácido 2-oxoisovalérico	4,8E-02
Betaína	4,0E-02
Gly	3,2E-02
...	...

Cargas de factores (→más bajos)	PC2
...	...
Met	3,0E-02
Ácido 3-fosfoglicérico	2,8E-02
β-Ala	2,3E-02
Glu	2,1E-02
Citrulina	1,9E-02
Ser	1,8E-02
Val	1,8E-02
Ornitina	1,7E-02
cGMP	-3,5E-04
GDP	-3,5E-04
Ácido N-carbamoilaspártico	-1,2E-02
Ala	-2,4E-02
Ácido cítrico	-2,8E-02
Xantina	-3,1E-02
Ácido cis-aconítico	-4,9E-02
Colina	-7,3E-02
Ácido láctico	-7,6E-02
Ácido málico	-8,6E-02
Ácido isocítrico	-9,4E-02
Ile	-9,9E-02
Leu	-1,1E-01
ADP-ribosa	-1,9E-01
AMP	-1,9E-01
UDP-glucosa	-1,9E-01
NAD^+	-1,9E-01
Glicerol 3-fosfato	-1,9E-01
Ácido 2-hidroxiglutárico	-2,1E-01
Ácido fólico	-2,2E-01

[Fig. 28-H]

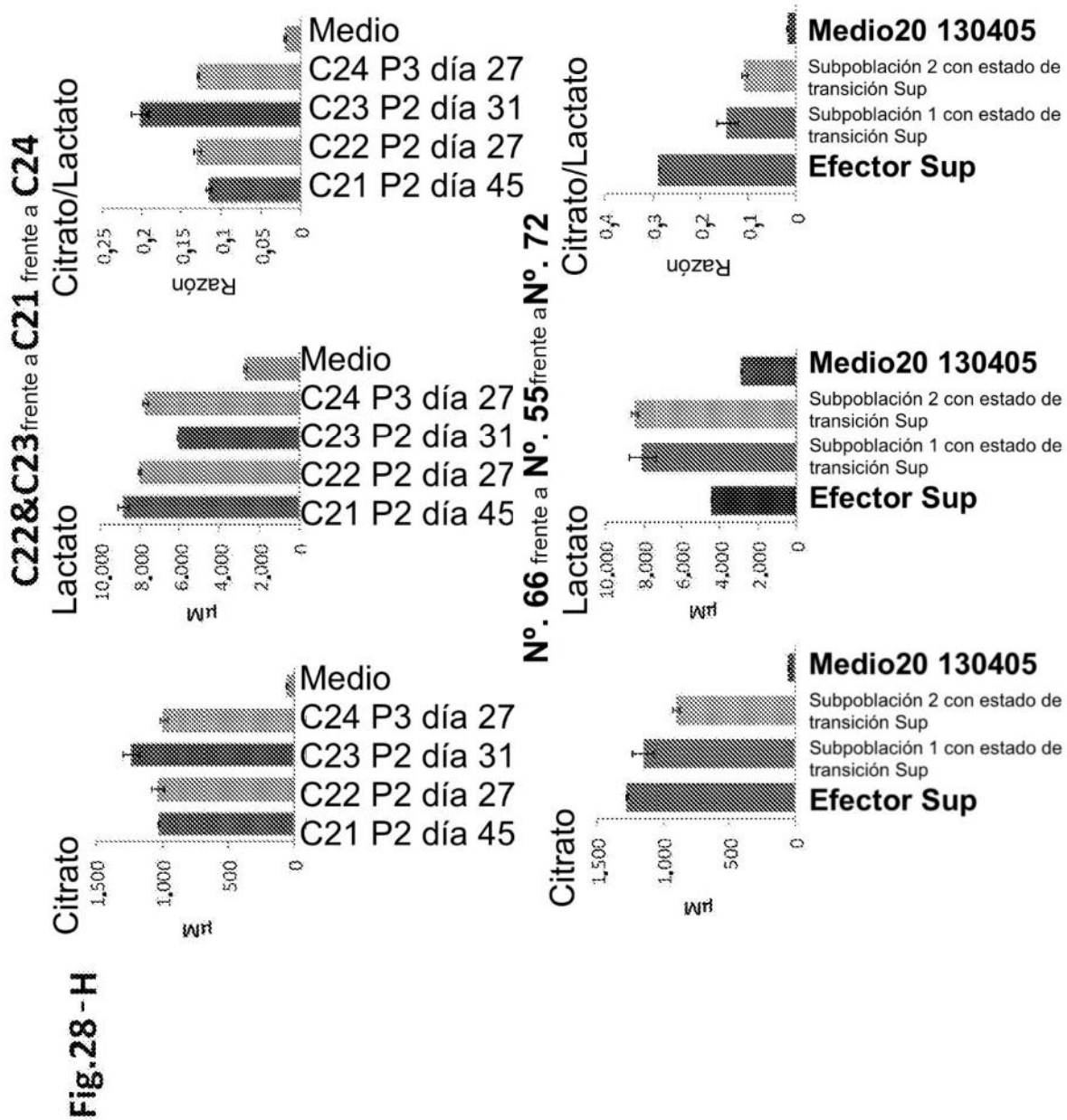


Fig.28-H

[Fig. 29-A]

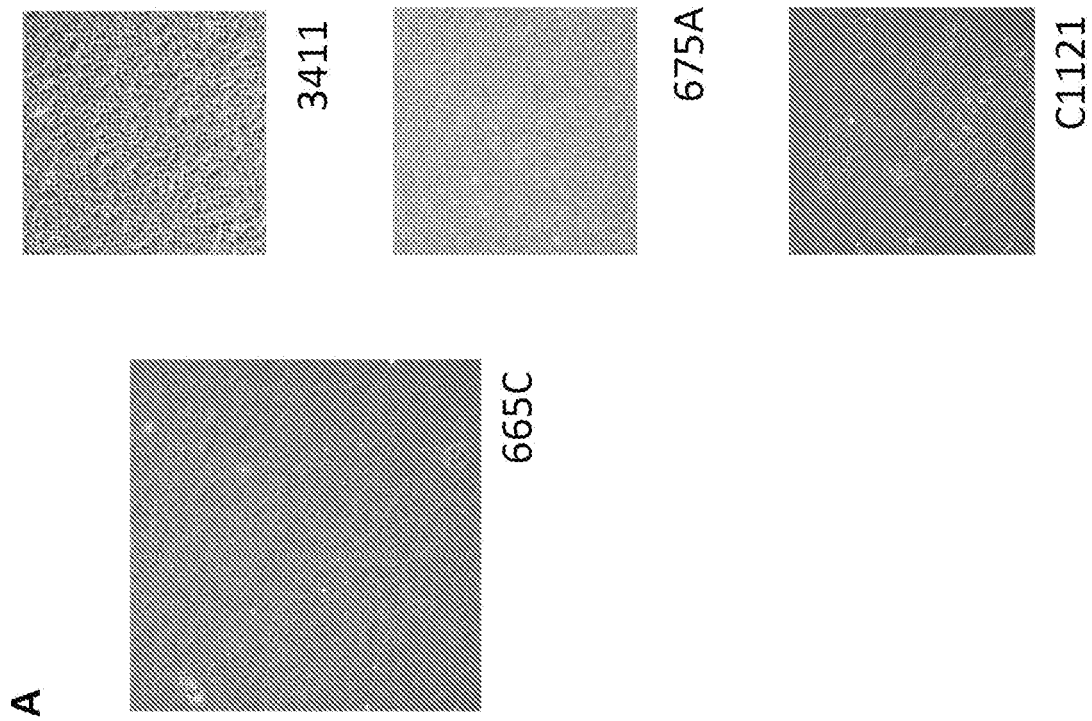
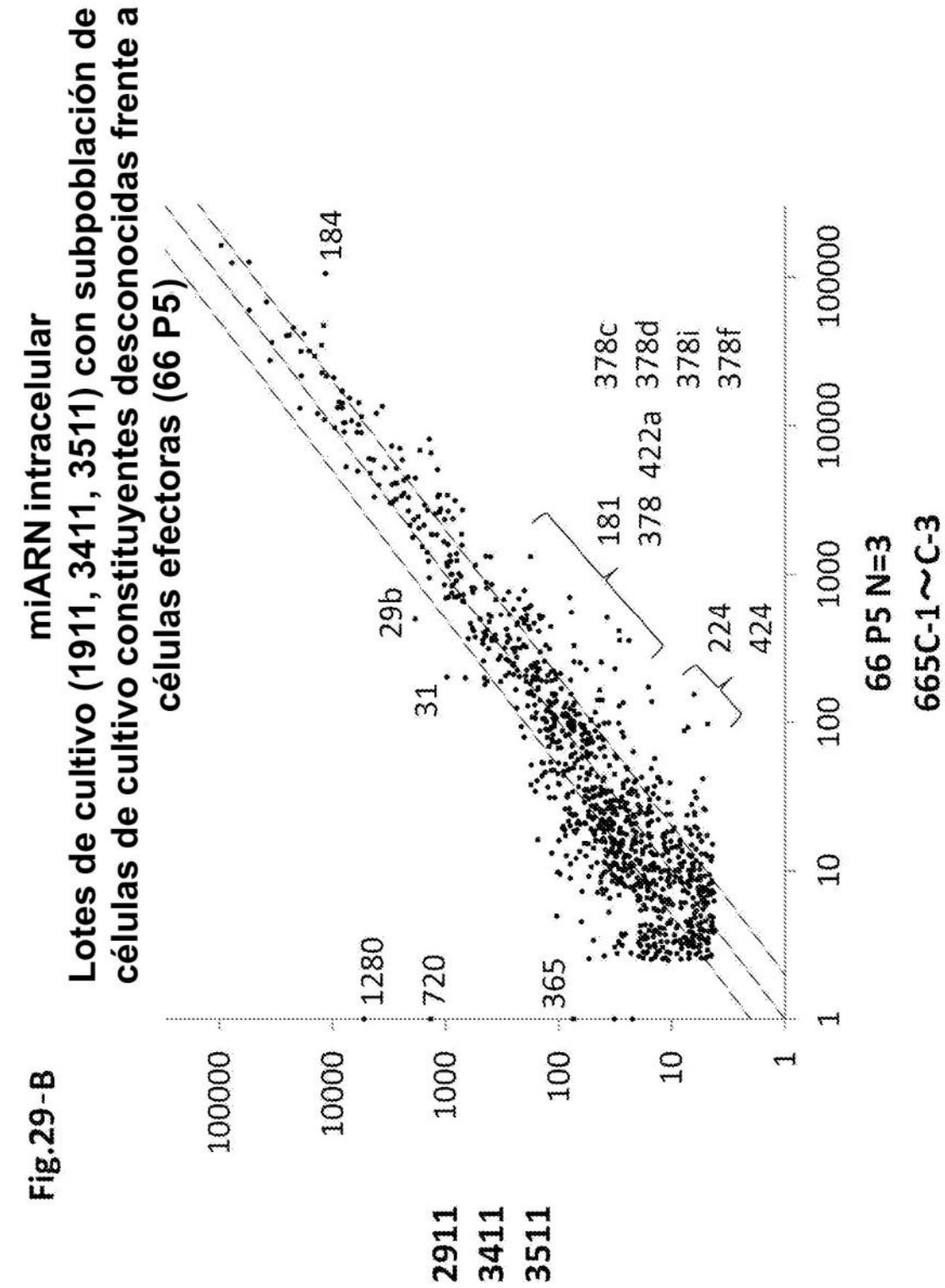
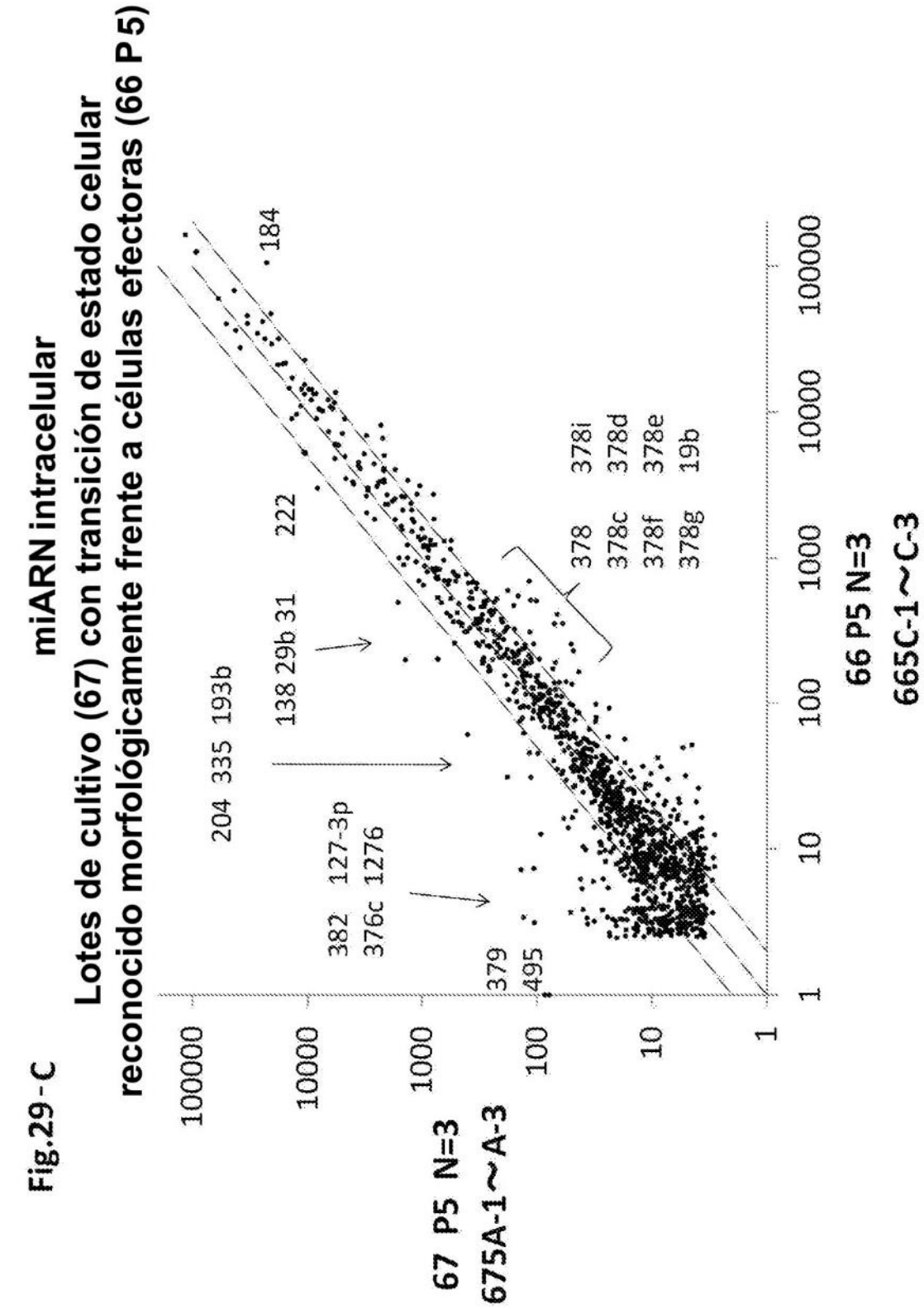


Fig.29-A

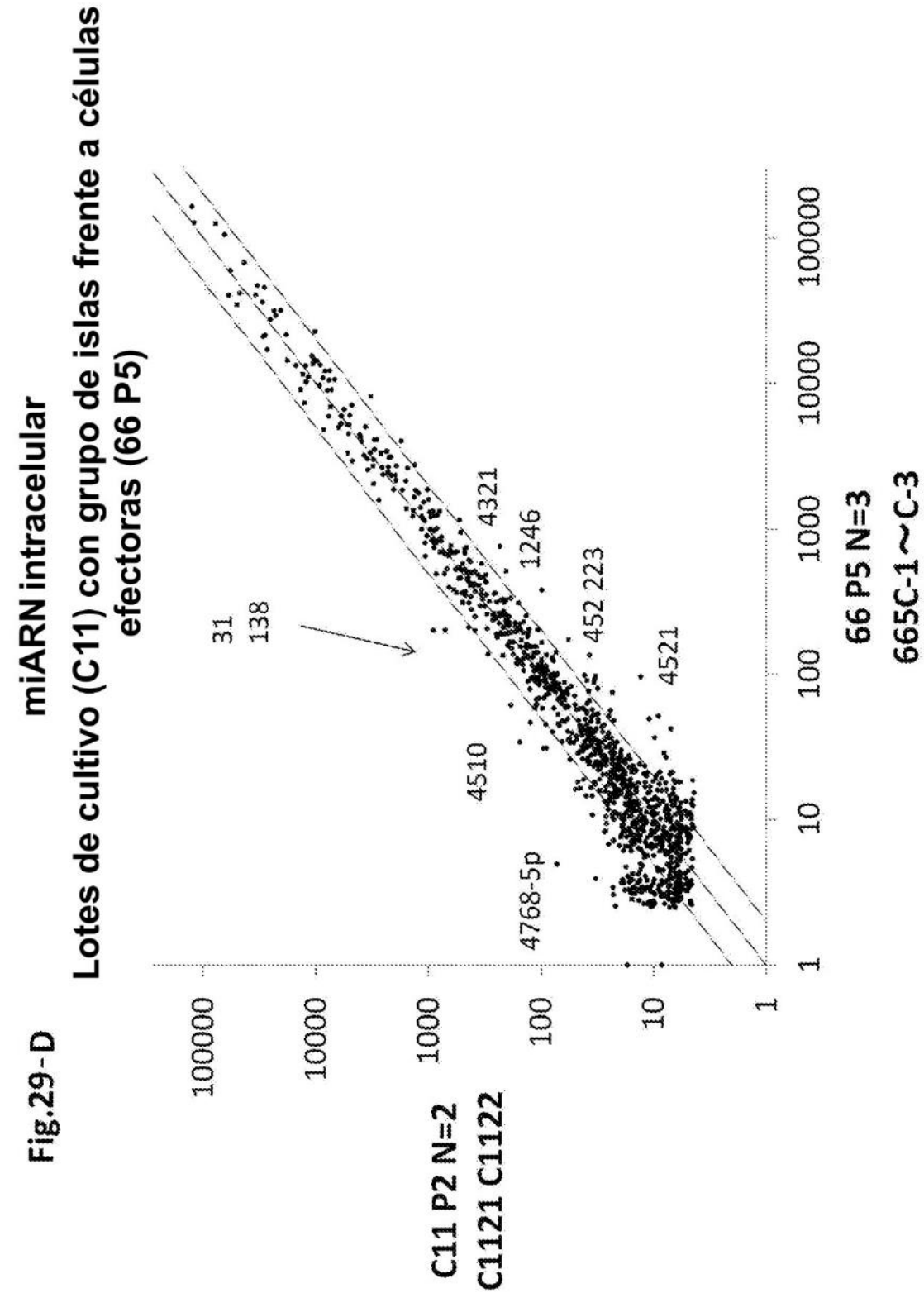
[Fig. 29-B]


Fig.29-B
miARN intracelular
Lotes de cultivo (1911, 3411, 3511) con subpoblación de células de cultivo constituyentes desconocidas frente a células efectoras (66 P5)
2911
3411
3511
100000
10000
1000
100
10
1
1280
720
365
184
29b
31
181
378
422a
378c
378d
378i
378f
224
424
1
10
100
1000
10000
100000
66 P5 N=3
665C-1～C-3

[Fig. 29-C]


Fig.29-C
miARN intracelular
Lotes de cultivo (67) con transición de estado celular reconocido morfológicamente frente a células efectoras (66 P5)
67 P5 N=3
675A-1～A-3
66 P5 N=3
665C-1～C-3
100000
10000
1000
100
10
1
204 335 193b
138 29b 31
222
184
382 127-3p
376c 1276
379
495
378 378i
378c 378d
378f 378e
378g 19b

[Fig. 29-D]


Fig.29-D
miARN intracelular
Lotes de cultivo (C11) con grupo de islas frente a células efectoras (66 P5)
C11 P2 N=2
C1121 C1122
66 P5 N=3
665C-1～C-3
100000
10000
1000
100
10
1
1
10
100
1000
10000
100000
31
138
4510
4768-5p
4321
1246
452 223
4521

[Fig. 30-A]

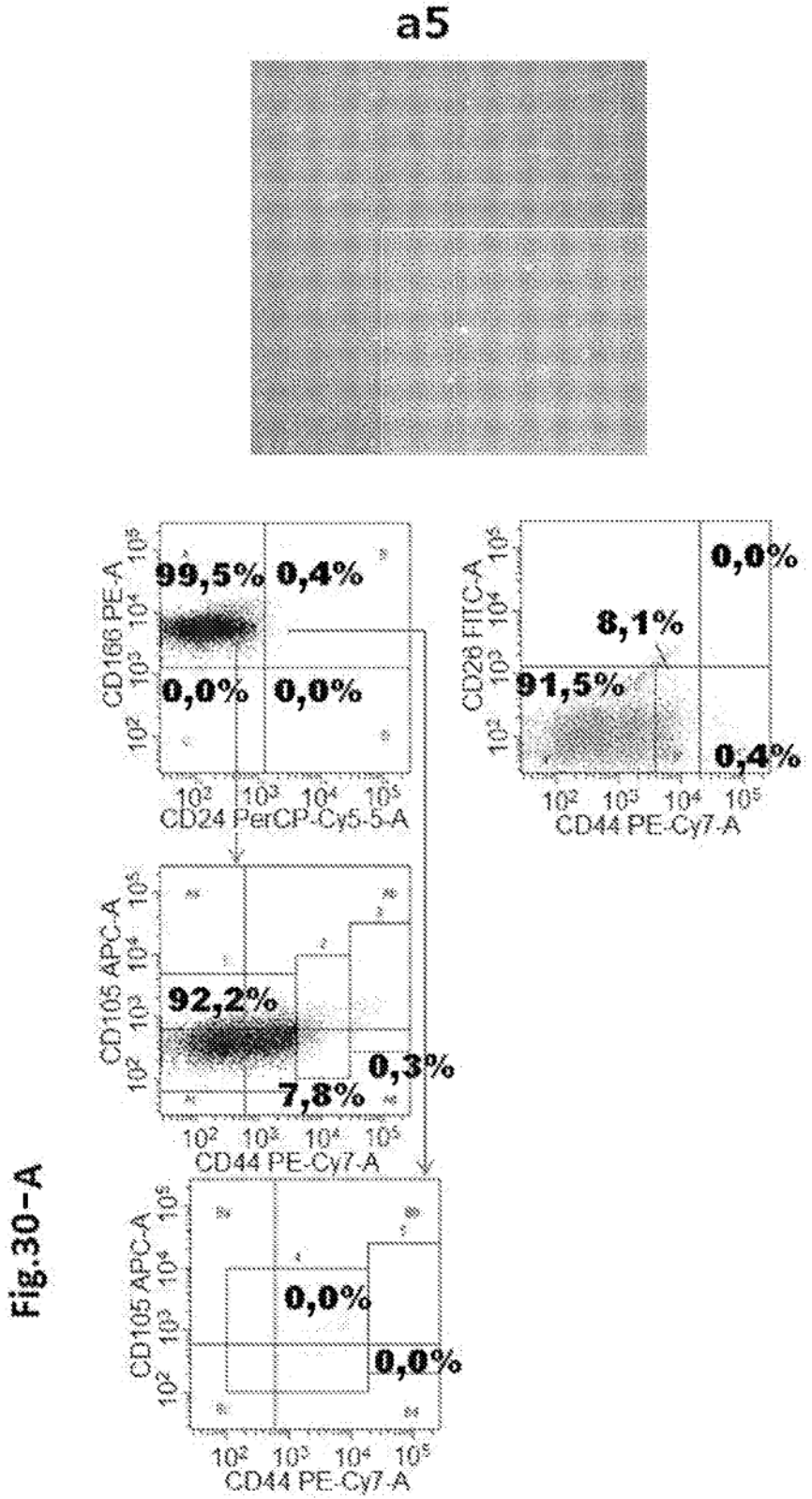


Fig.30-A

[Fig. 30-B]

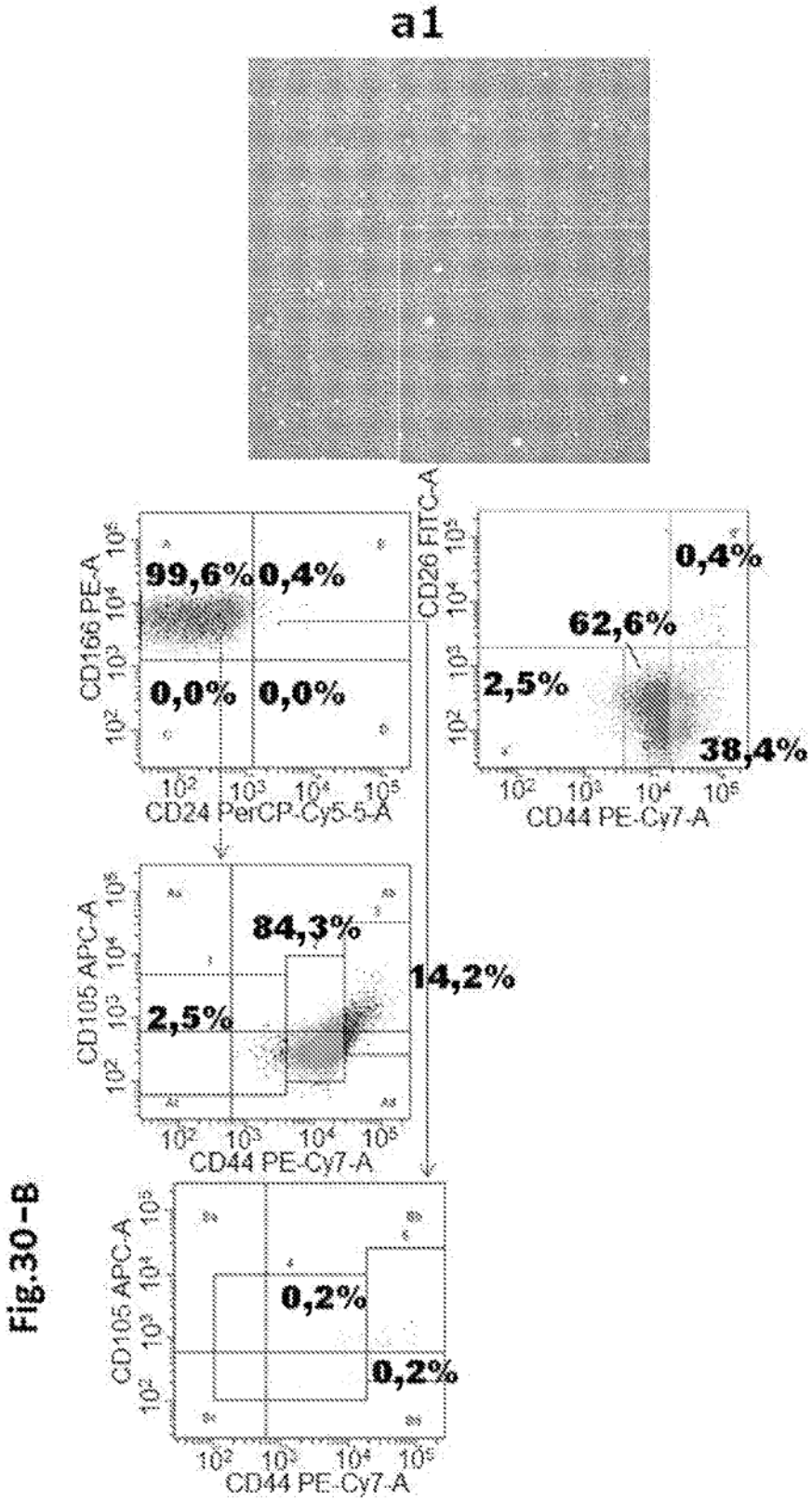


Fig.30-B

[Fig. 30-C]

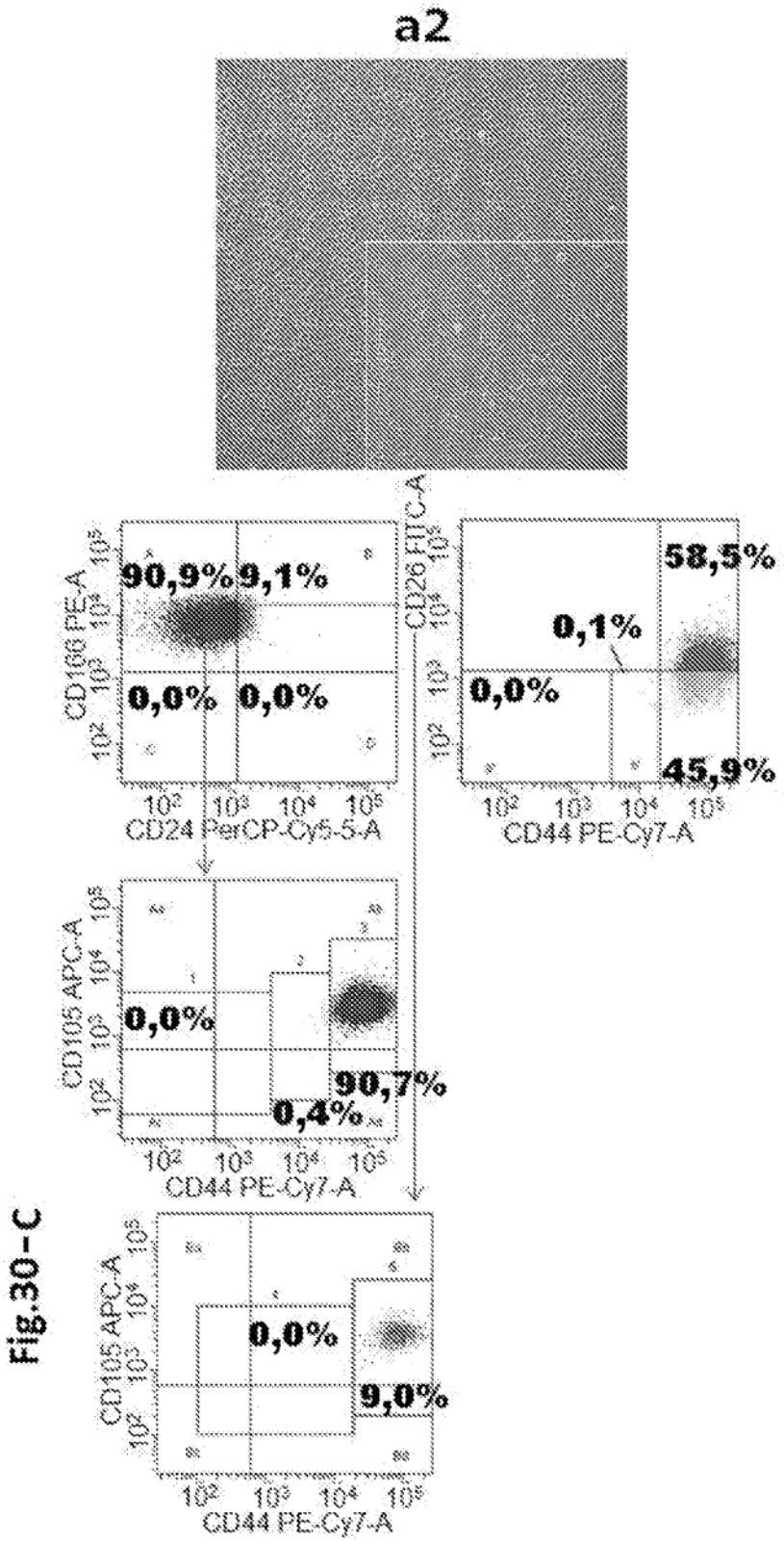


Fig.30-C

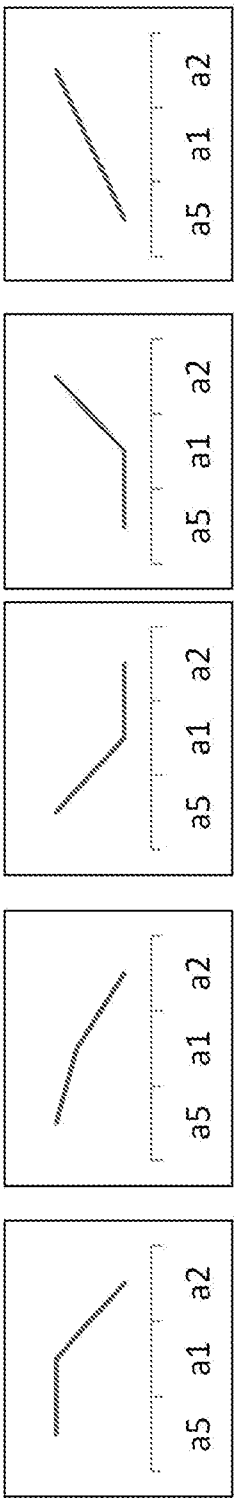
[Fig. 31-A]

Fig.31-A

Nombre	CD44- a5 P1 a	CD44+~ ++ a1 P3	CD44+++ a2 P2
miR-378a-3p	375,4	270,4	80,4
miR-378a-5p	24,8	20,7	14,0
miR-378b	22,1	15,6	8,5
miR-378c	216,7	145,7	26,1
miR-378d	190,2	126,6	20,3
miR-378e	141,1	94,8	17,2
miR-378f	185,0	109,4	24,1
miR-378g	140,3	94,3	22,6
miR-378h	8,7	9,7	6,4
miR-378i	257,5	154,9	30,8
miR-378j	3,8	2,4	1,8

[Fig. 31-B]

Fig.31-B



A	B	C	D	E
23a-3p/23b-3p/23c 27a-3p/27b-3p 181a-5p/181b-5p/181c-5p/181d-5p	30a-3p/30a-5p/30b-5p 30c-5p/30e-3p/30e-5p 130a-3p/130b-3p 378a-3p/378c/378d/378e 378f/378h/378i 184/148a-3p	34a-5p/34b-5p	29a-3p/29b-3p 199a-3p/199a-5p/199b-5p 143-3p	31-3p/31-5p 193a-3p/193b-3p 138-5p

[Fig. 32-A]

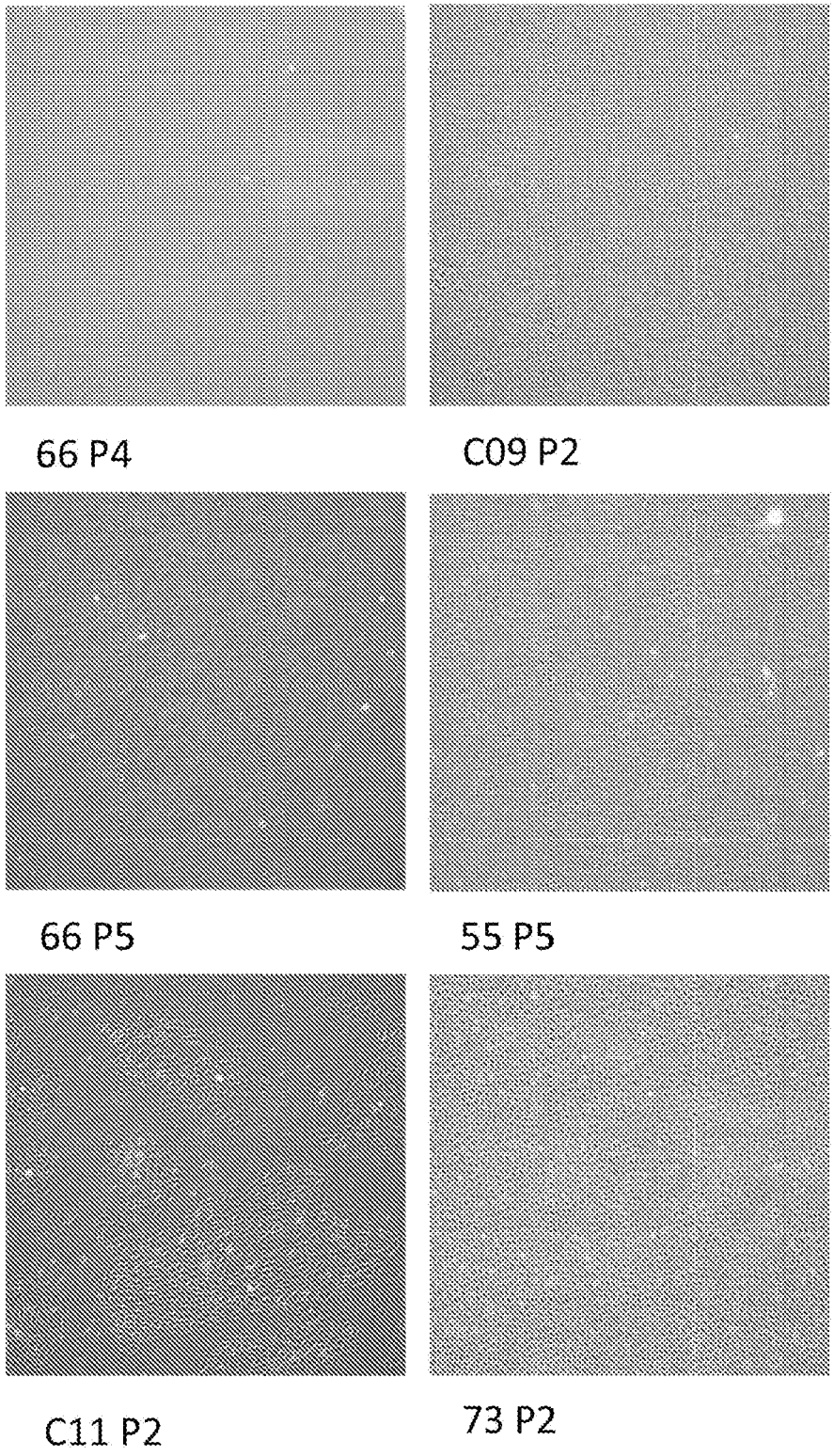


Fig.32-A

[Fig. 32-B]

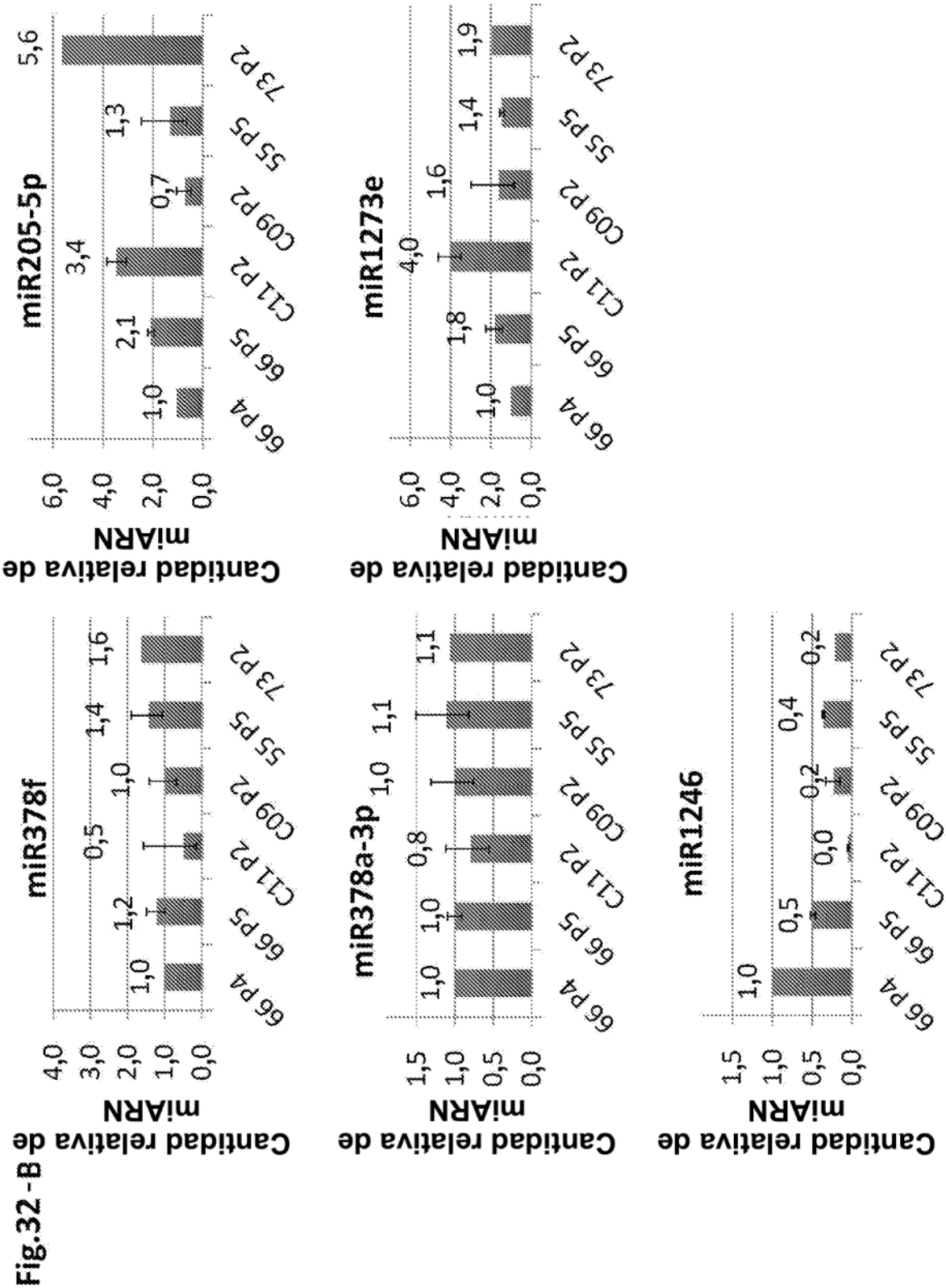
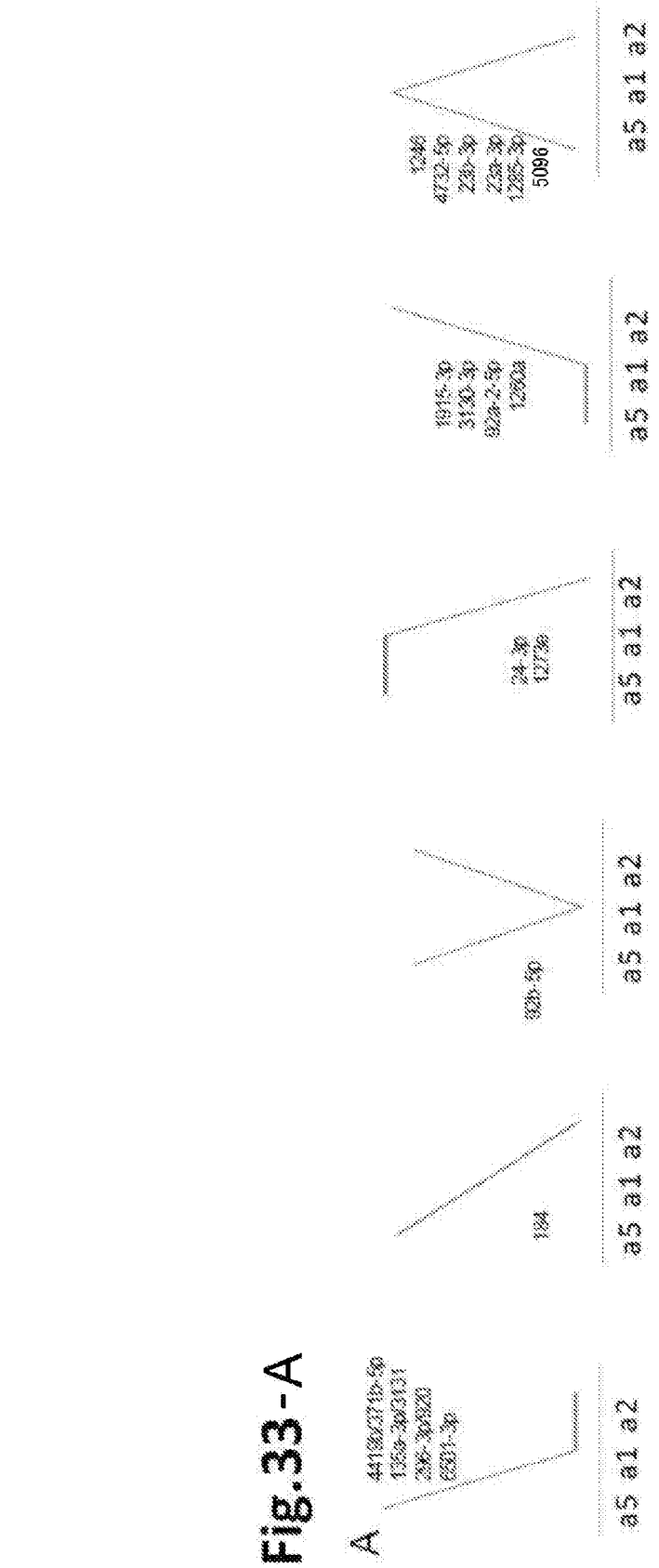


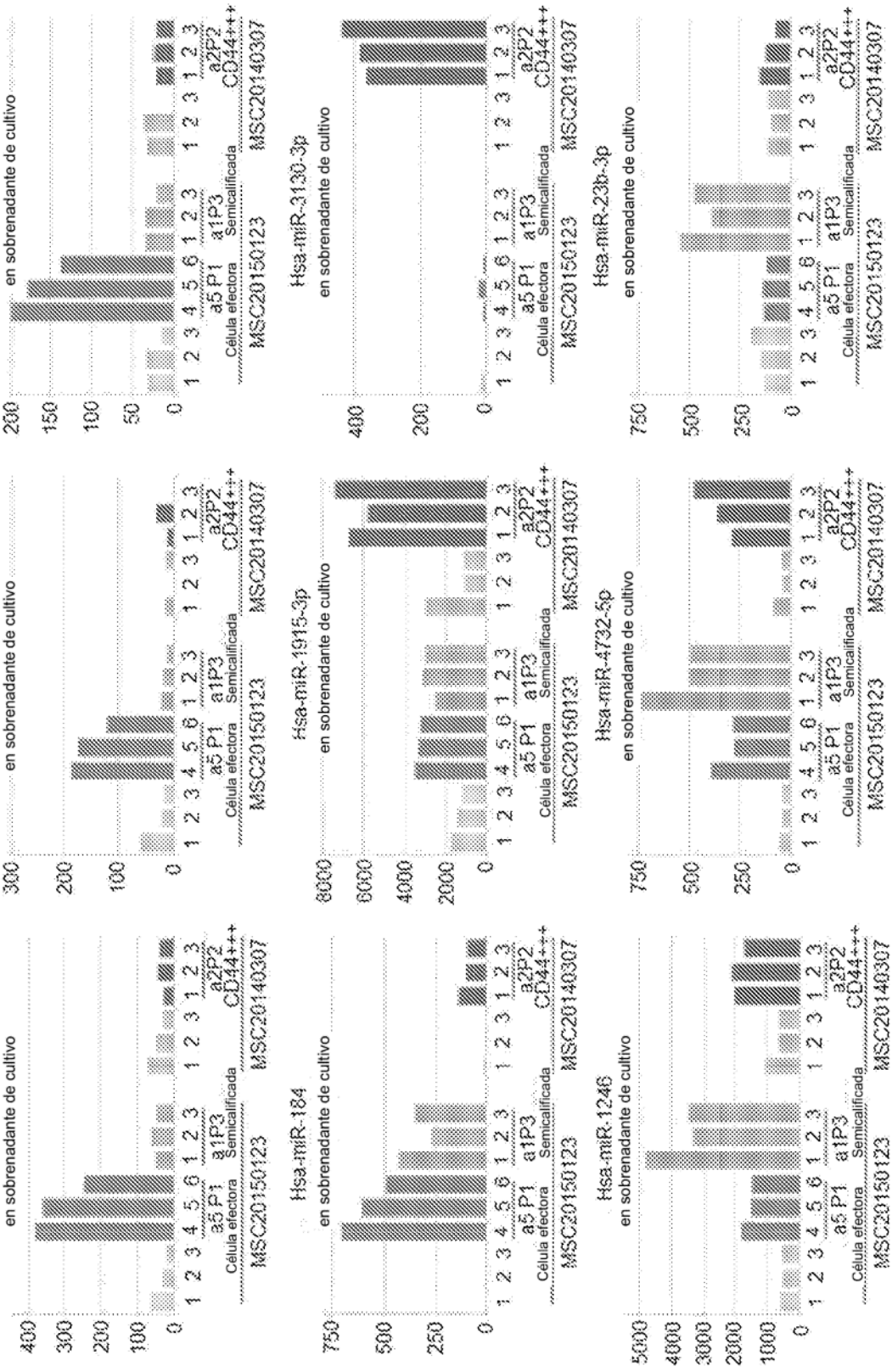
Fig.32-B

[Fig. 33-A]



[Fig. 33-B]

Fig.33-B



[Fig. 34-A]

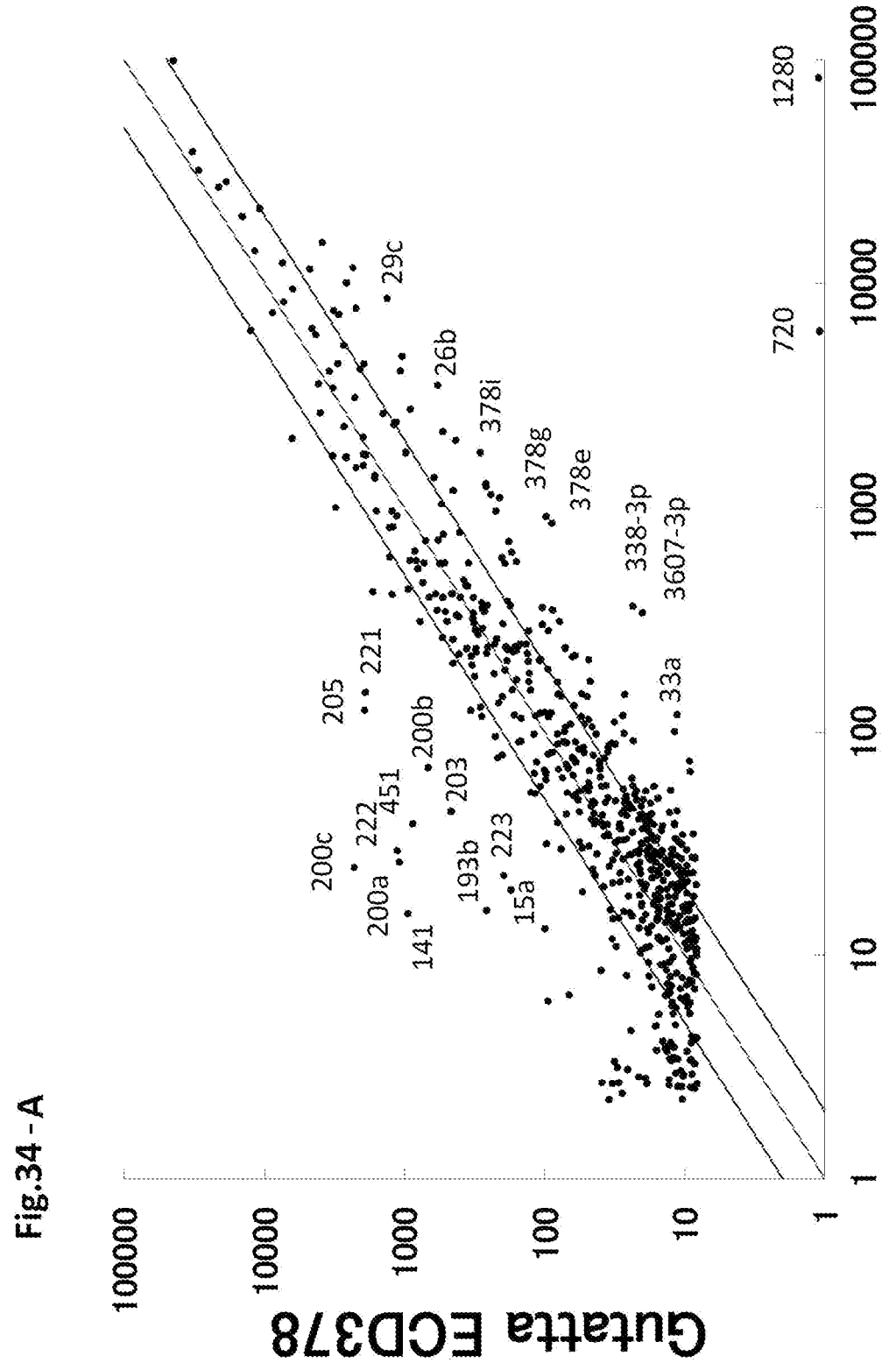
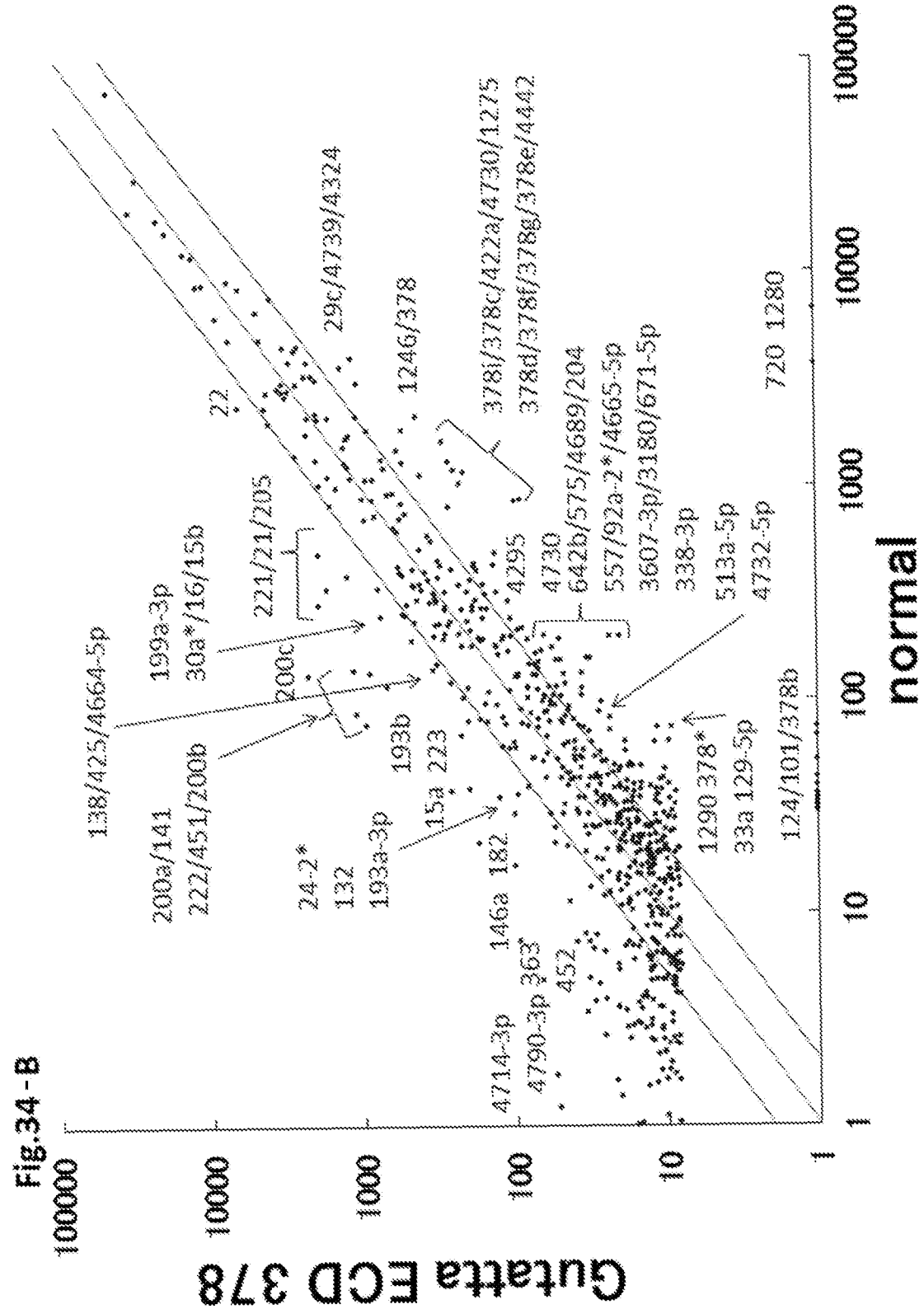


Fig.34 - A

[Fig. 34-B]


Fig.34-B
Gutatta FCD 378
normal
100000
10000
1000
100
10
1
1
10
100
1000
10000
100000
138/425/4664-5p
200a/141
222/451/200b
199a-3p
30a*/16/15b
200c
221/21/205
22
29c/4739/4324
1246/378
378i/378c/422a/4730/1275
378d/378f/378g/378e/4442
4295
4730
642b/575/4689/204
557/92a-2*/4665-5p
3607-3p/3180/671-5p
338-3p
513a-5p
4732-5p
720 1280
24-2*
132
193a-3p
193b
15a 223
182
146a
4714-3p
4790-3p 363*
452
1290 378*
33a 129-5p
124/101/378b

[Fig. 34-C]

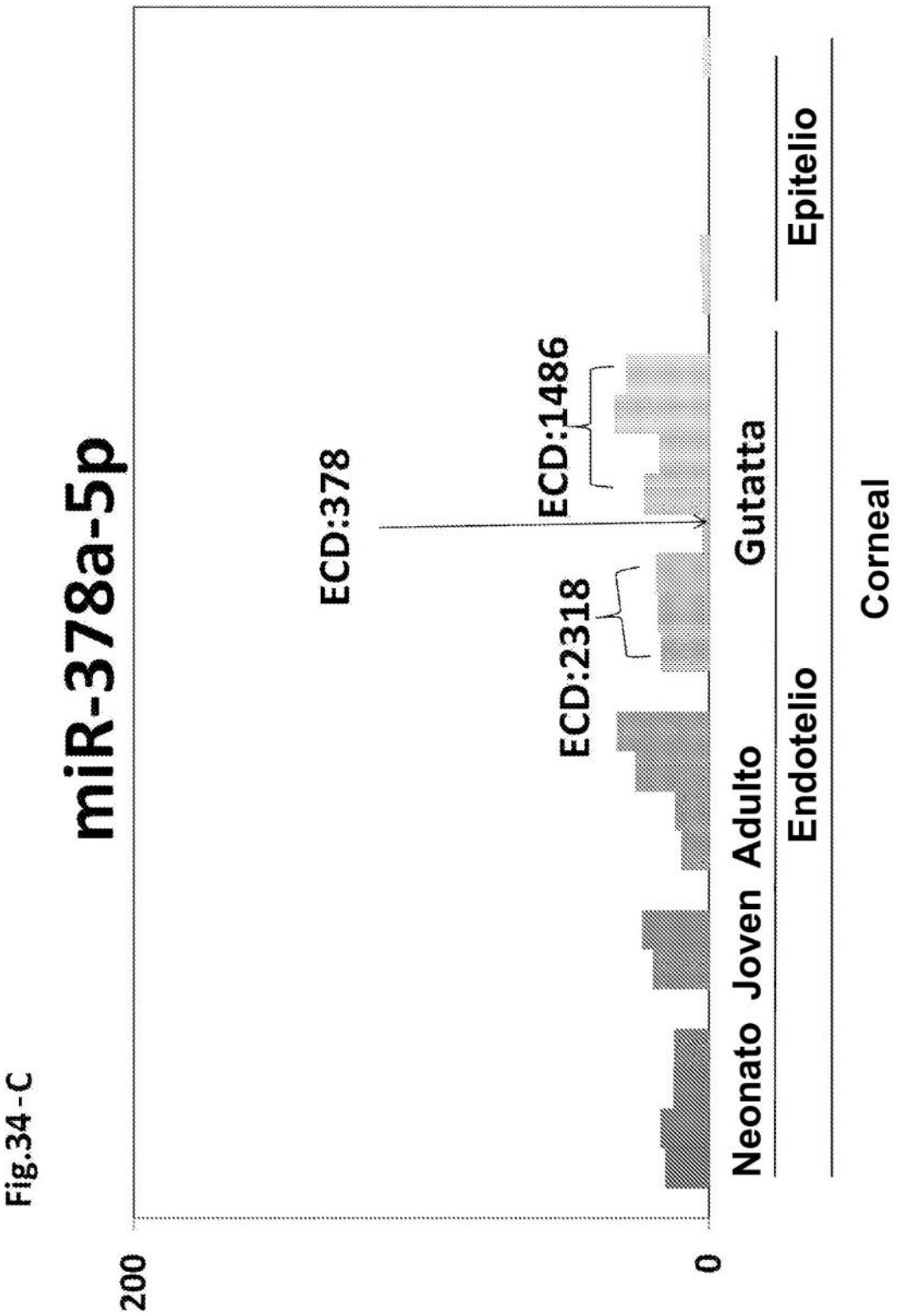


Fig.34-C

[Fig. 34-D]

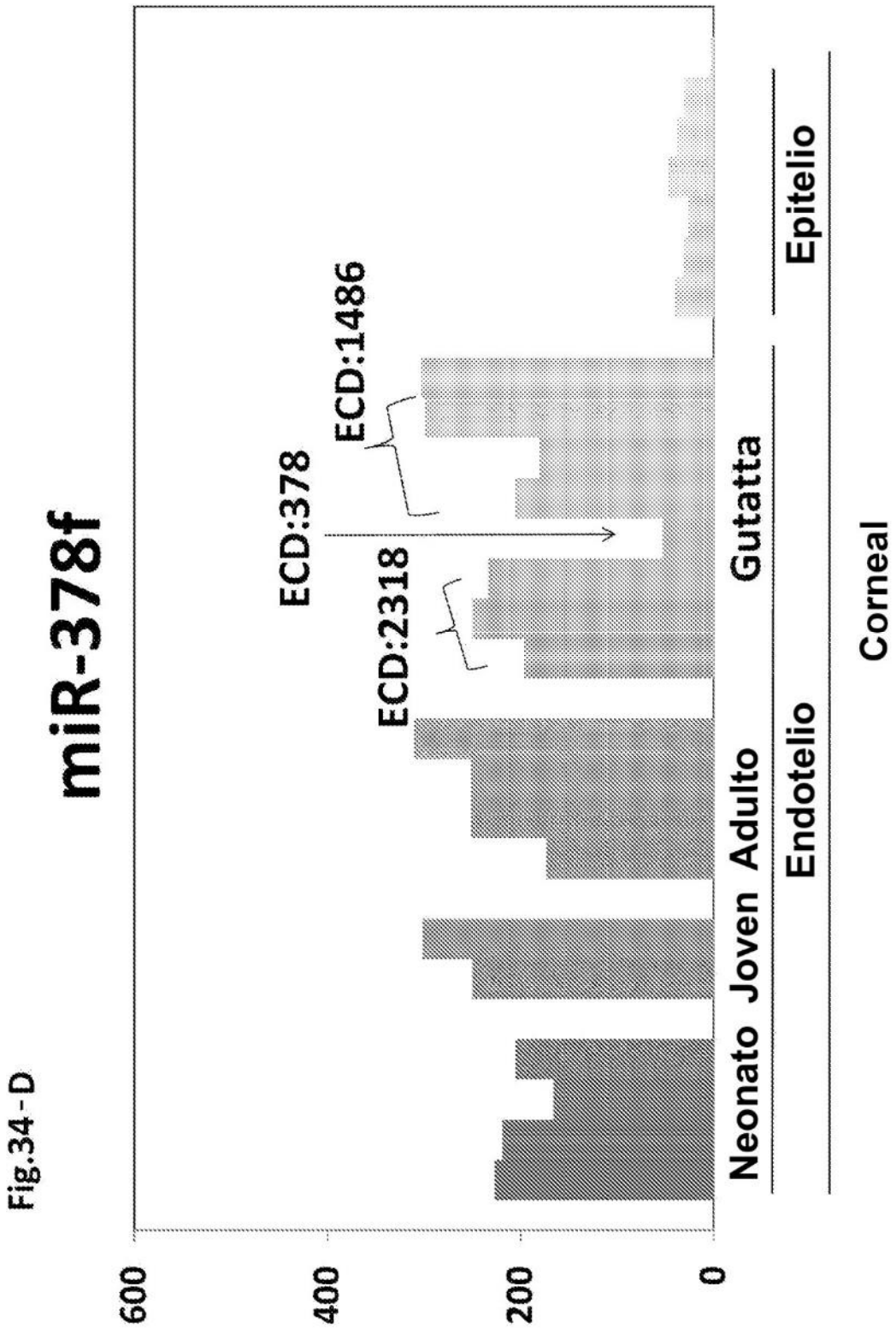


Fig.34-D

[Fig. 34-E]

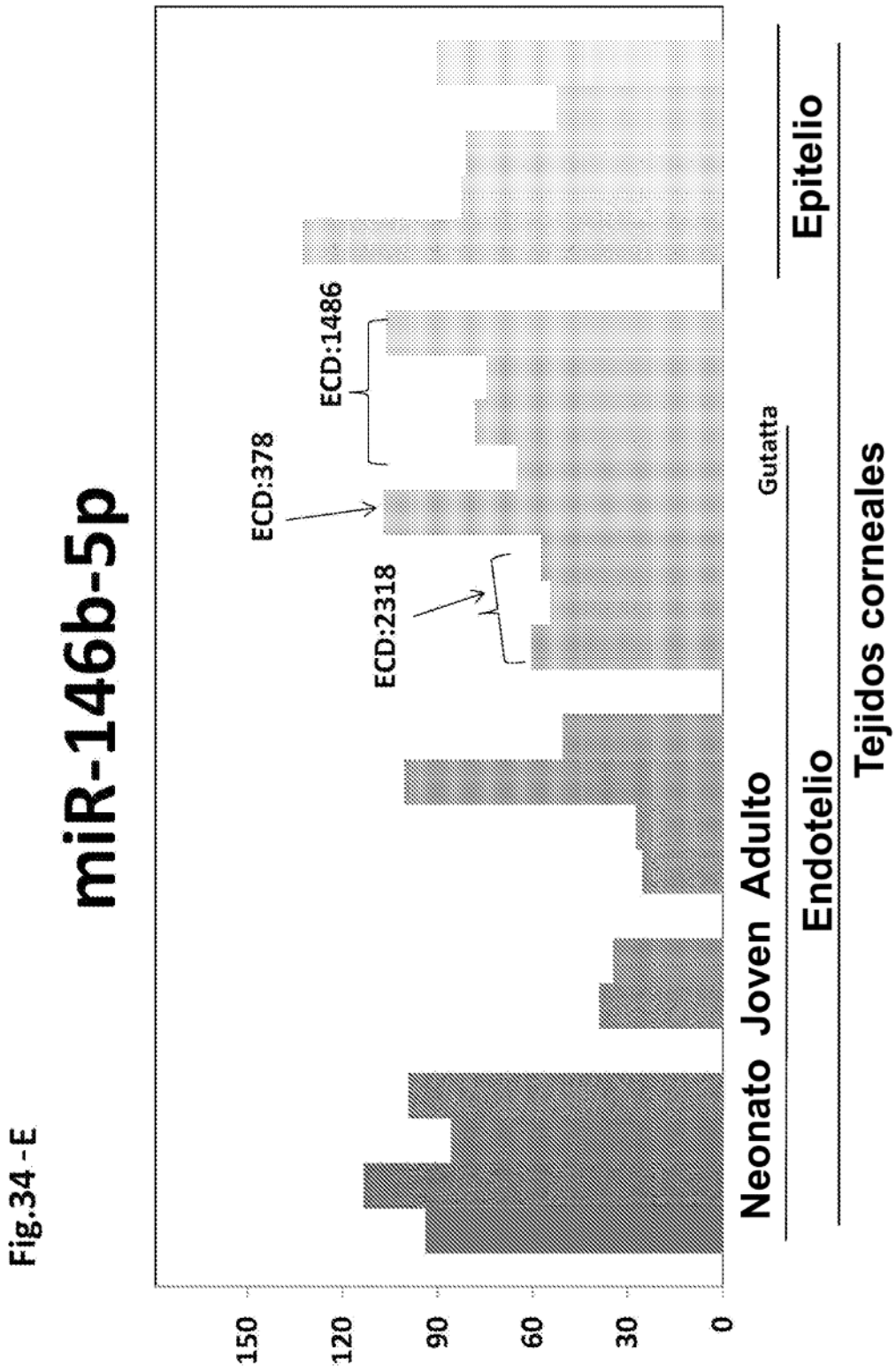


Fig.34-E

[Fig. 34-F]

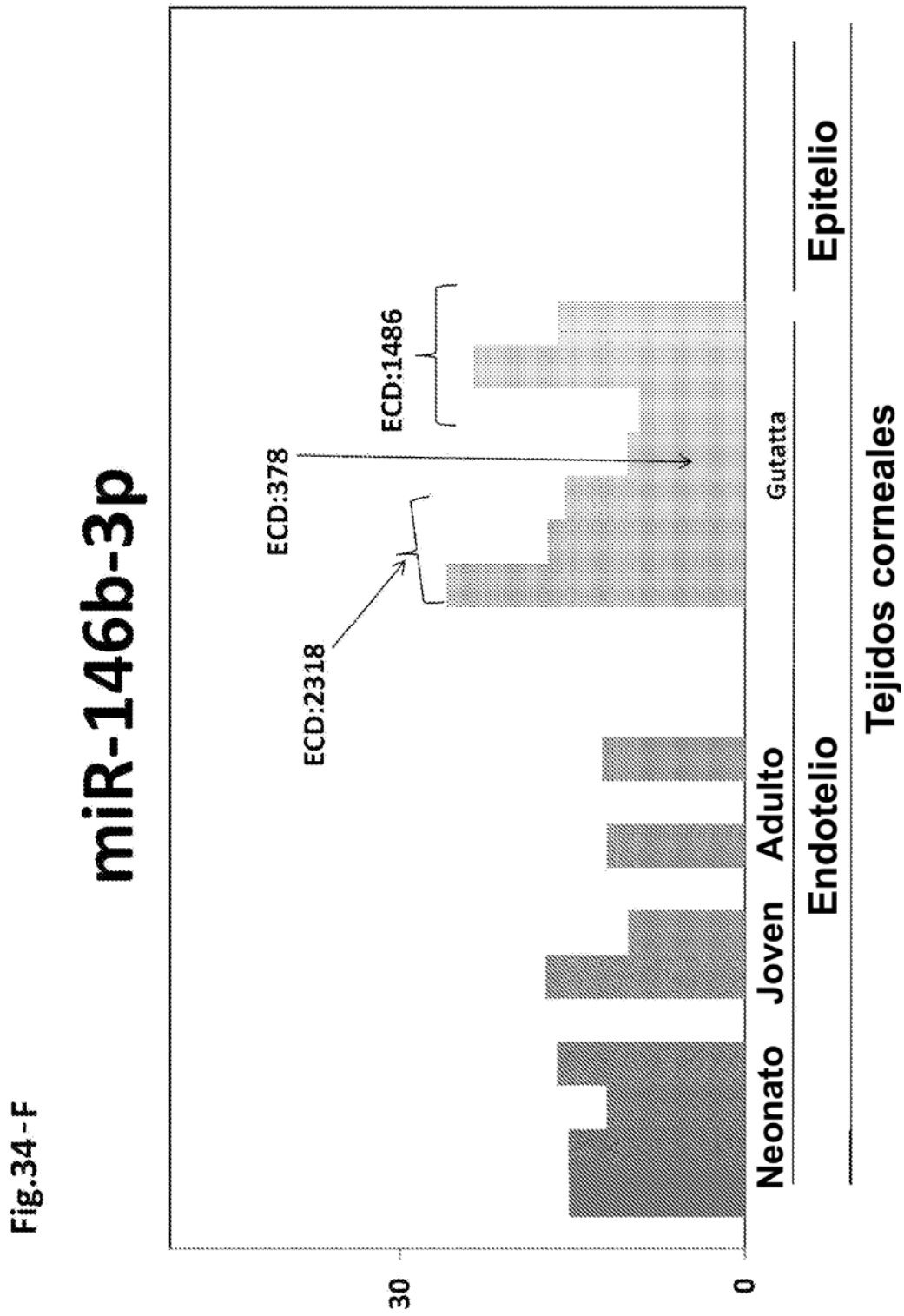


Fig.34-F

[Fig. 34-G]

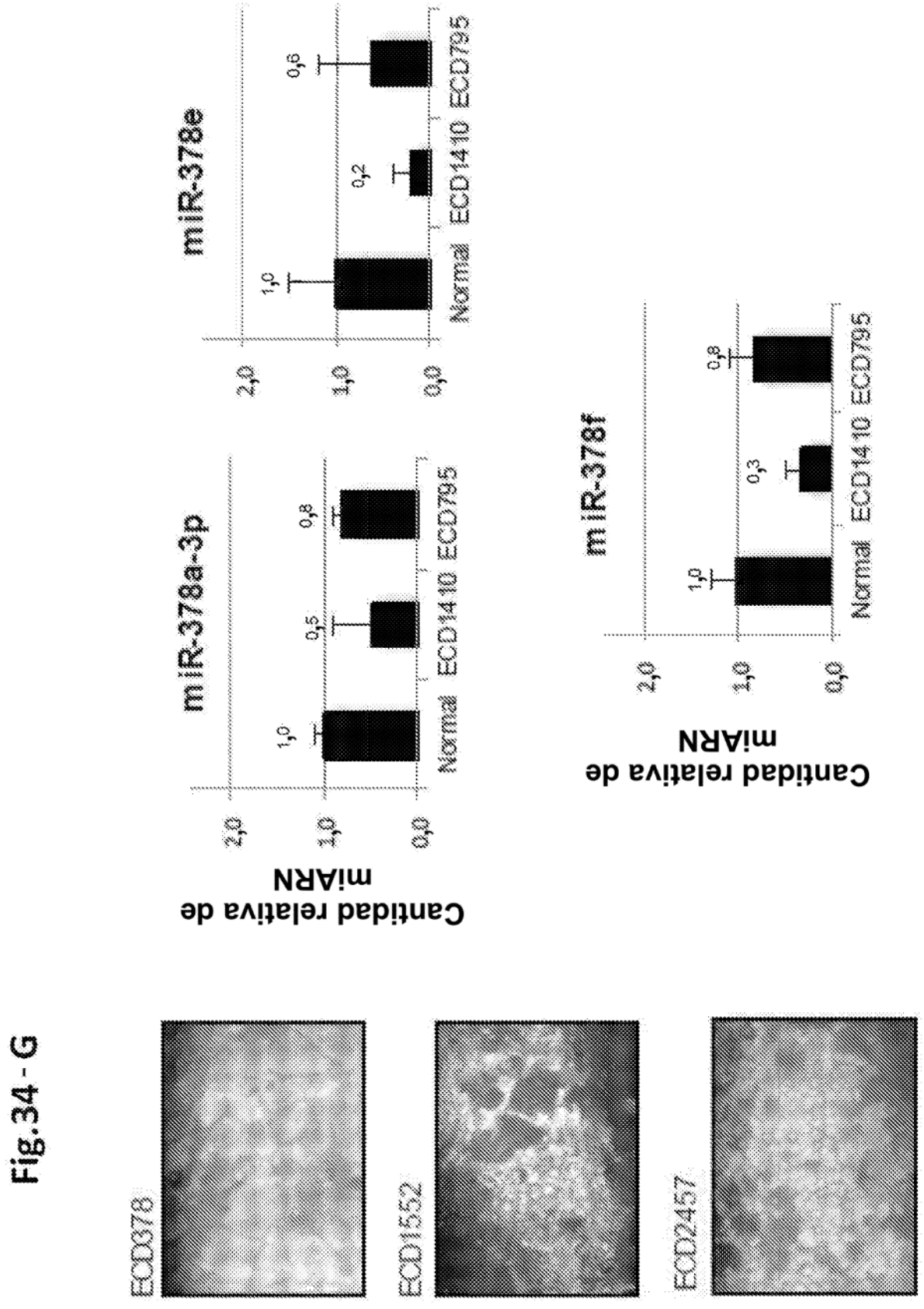
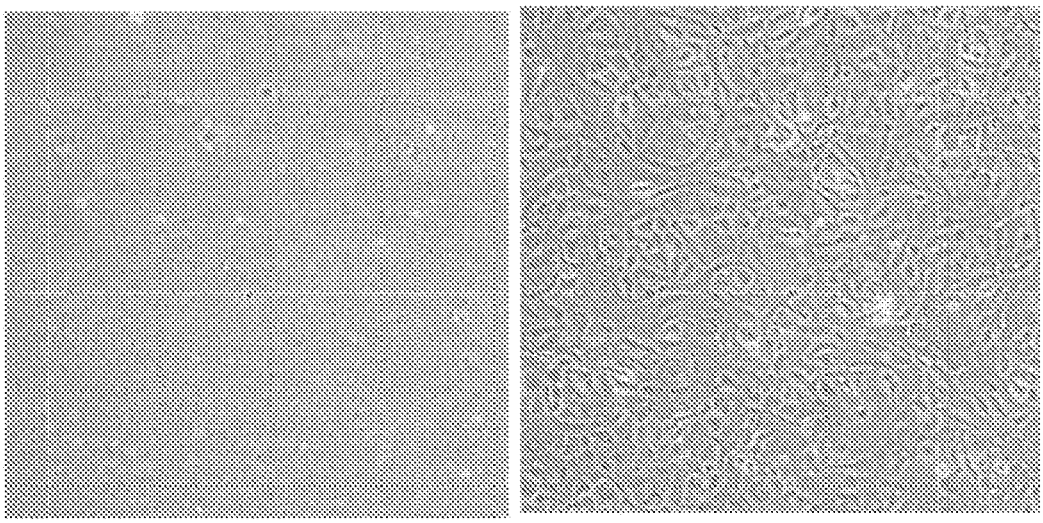


Fig.34-G

[Fig. 35-A]

Fig.35-A



[Fig. 35-B]

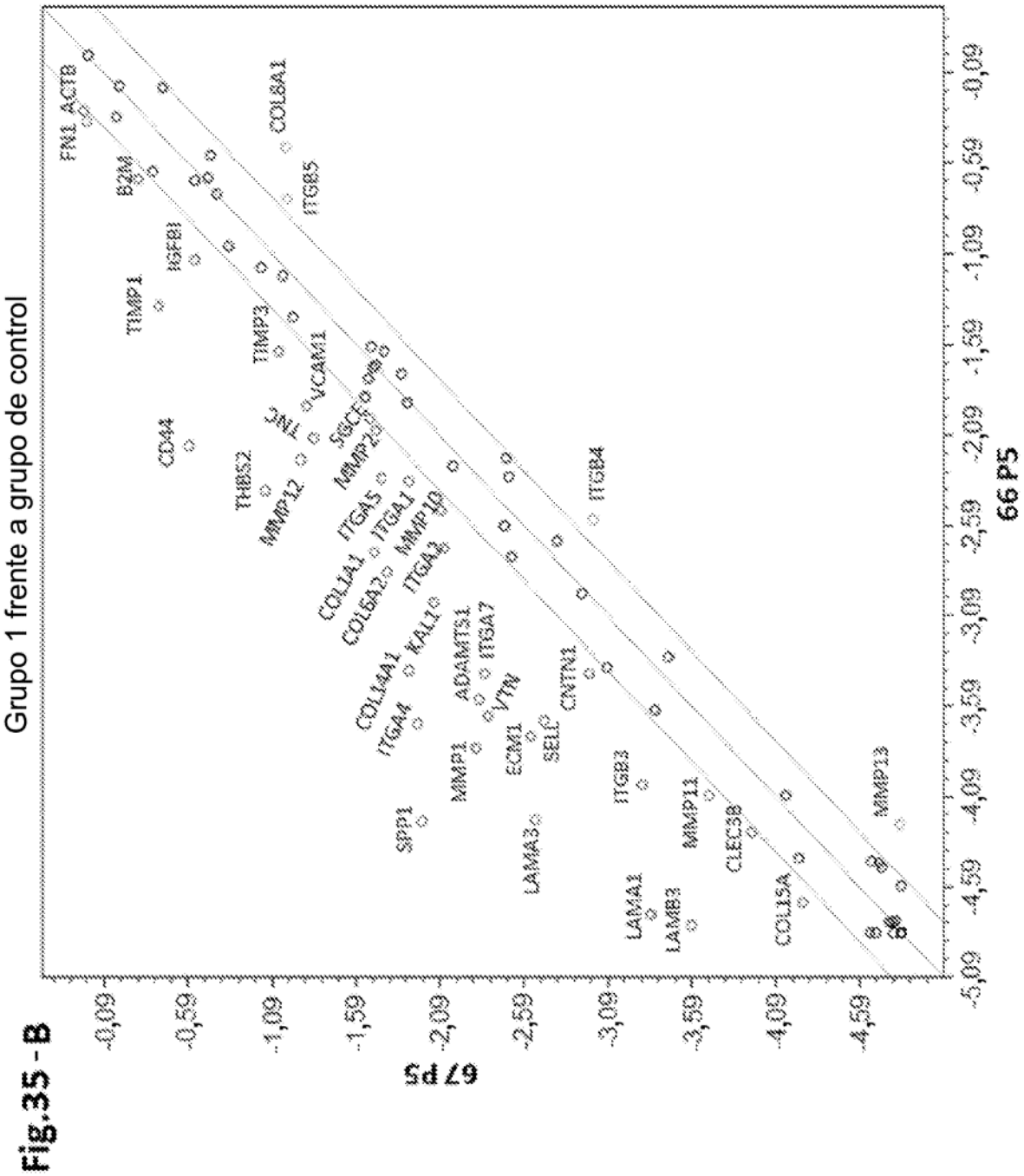


Fig.35-B

[Fig. 35-C]

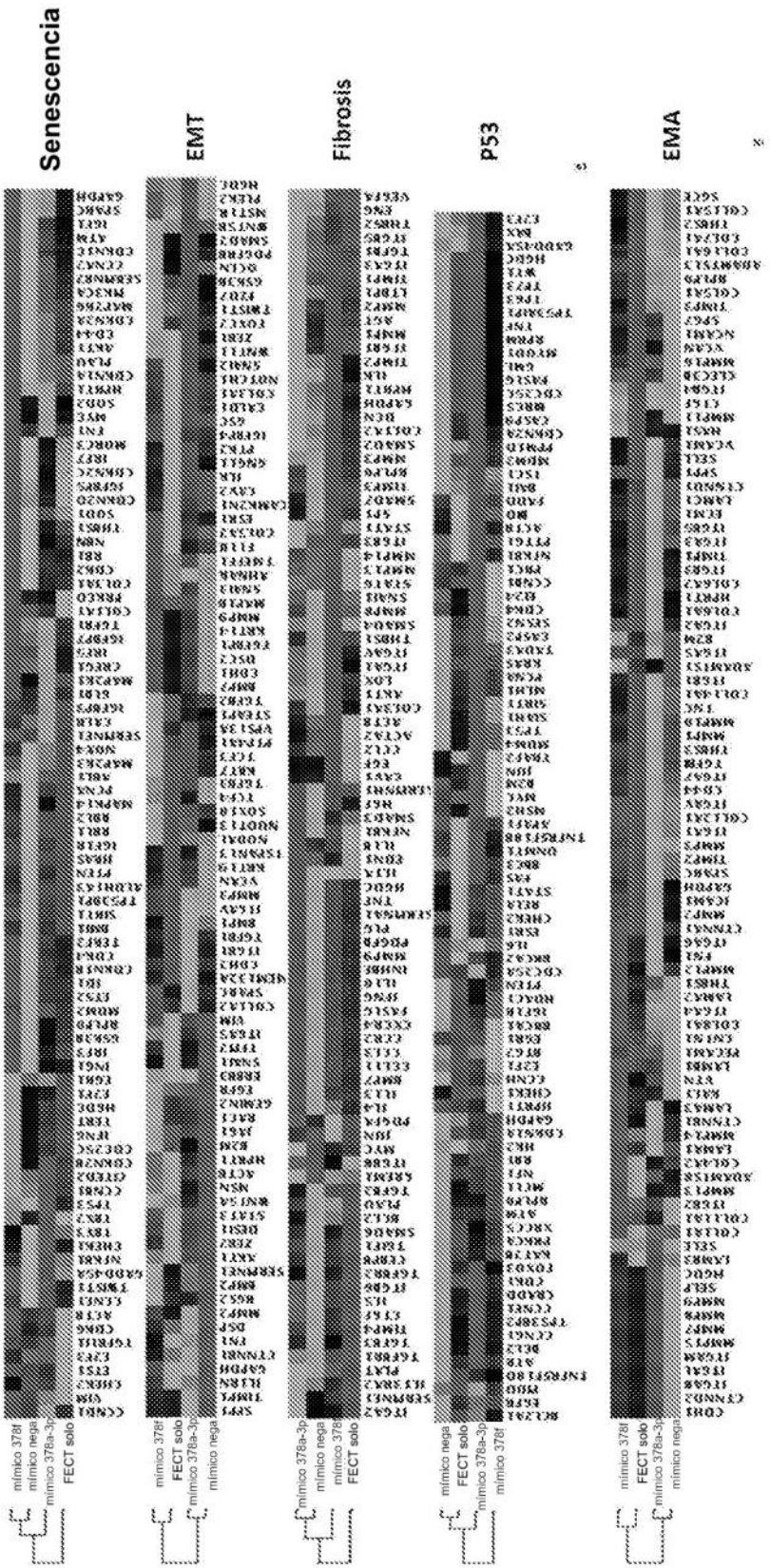
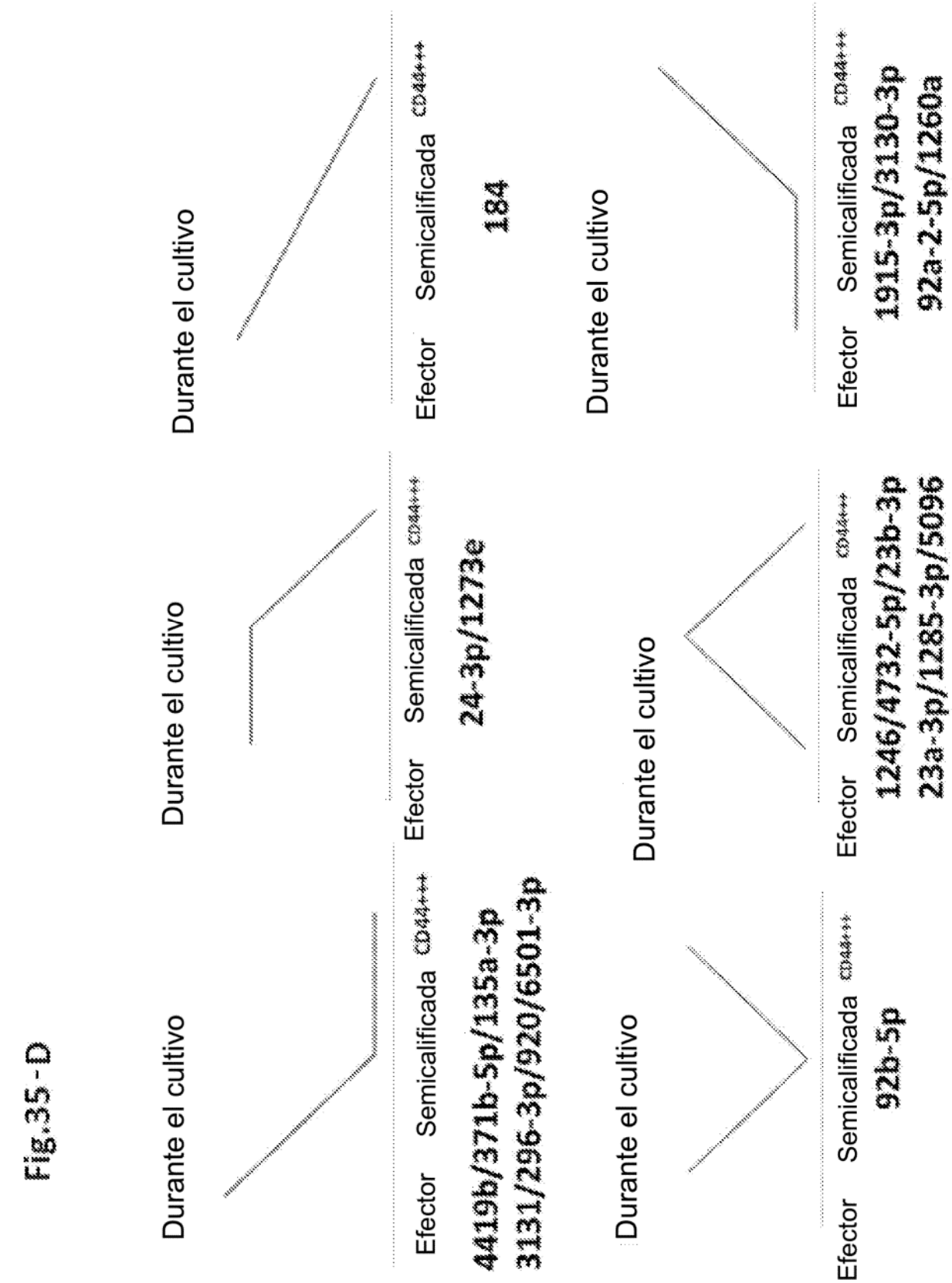


Fig.35-C

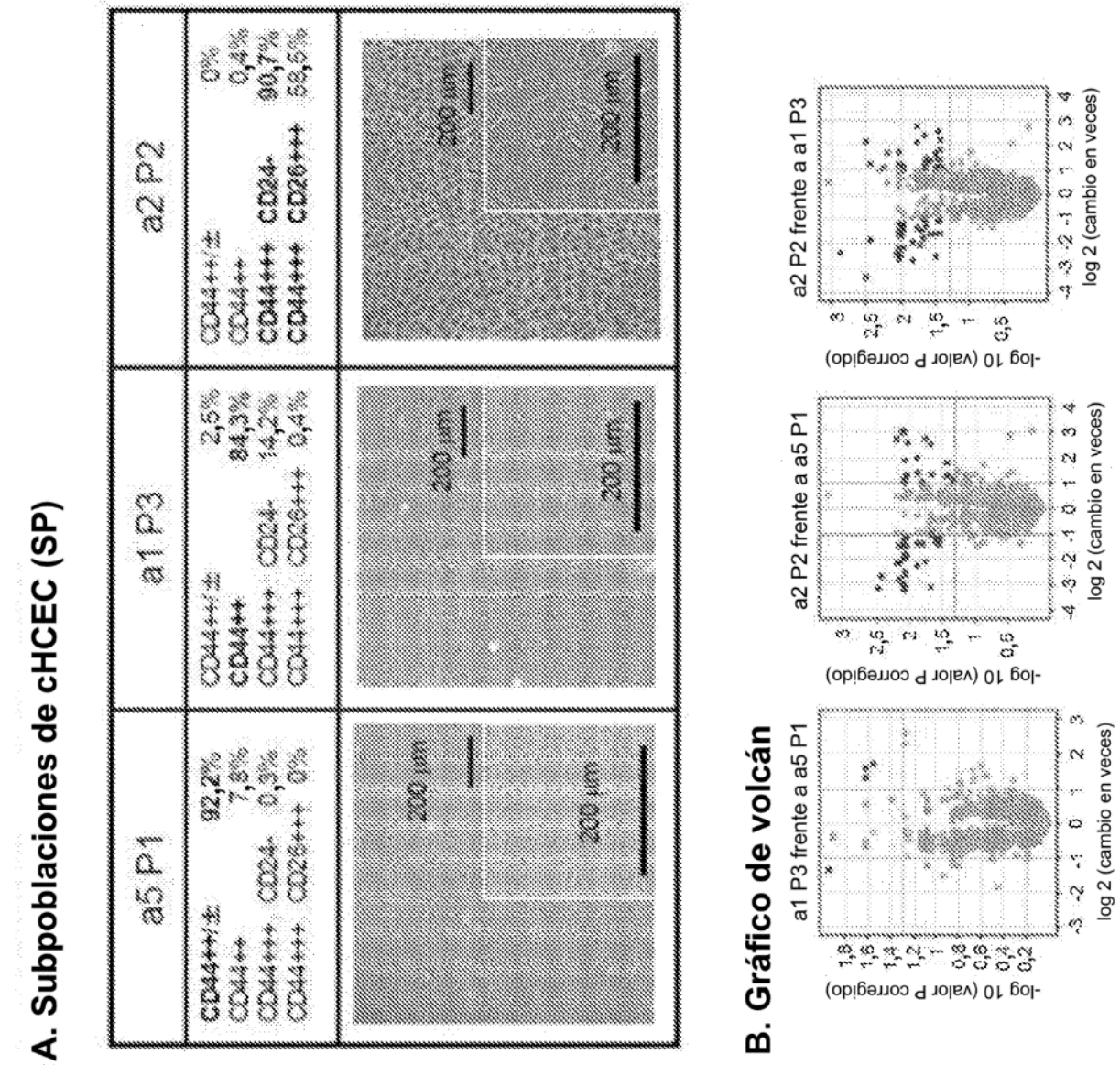
[Fig. 35-D]

Fig.35-D



[Fig. 35-E]

Fig.35-E



[Fig. 36]

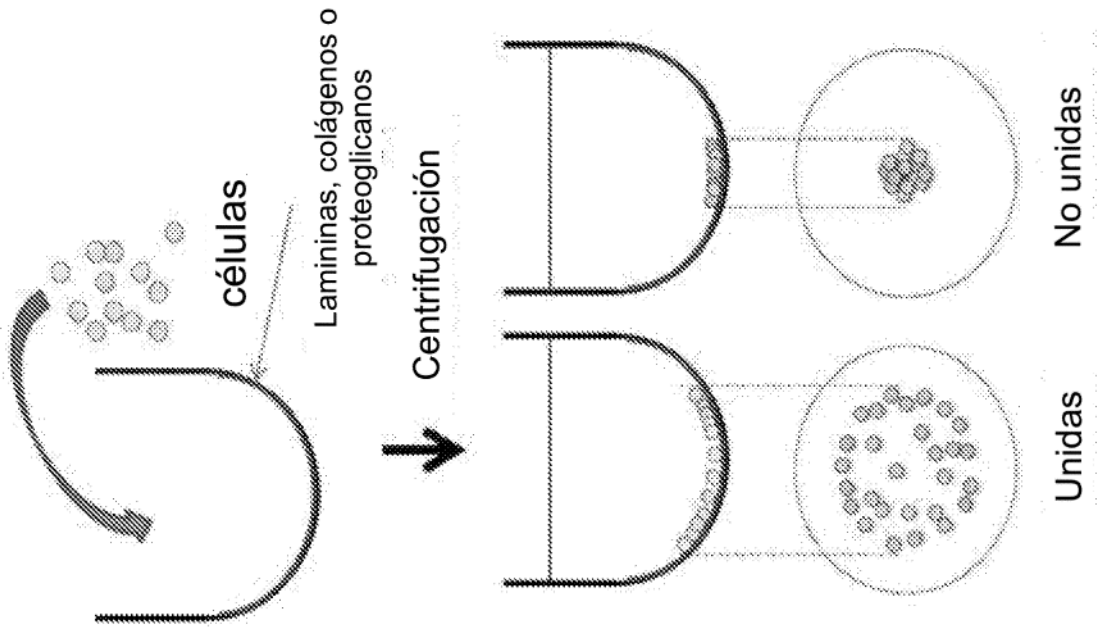

células
Lamininas, colágenos o proteoglicanos
Centrifugación
No unidas
Unidas

Fig.36

[Fig. 37]

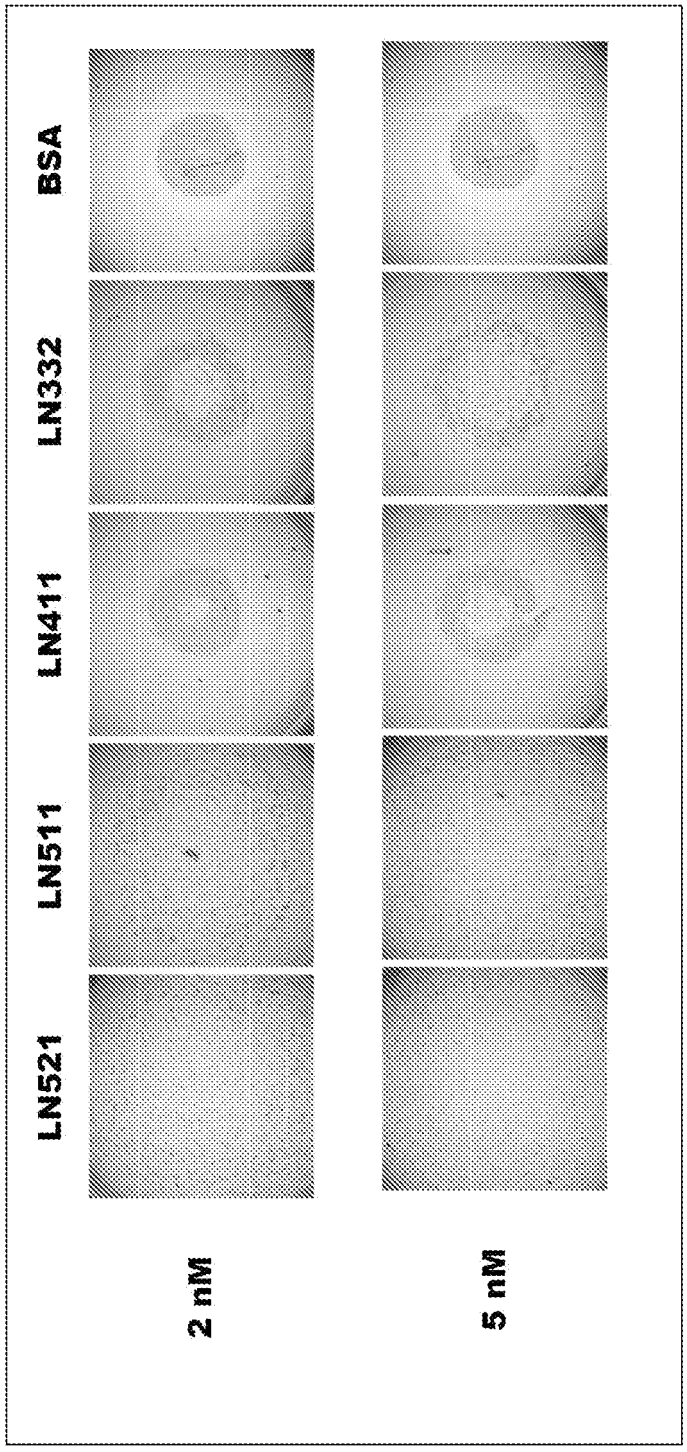


Fig.37

[Fig. 38]

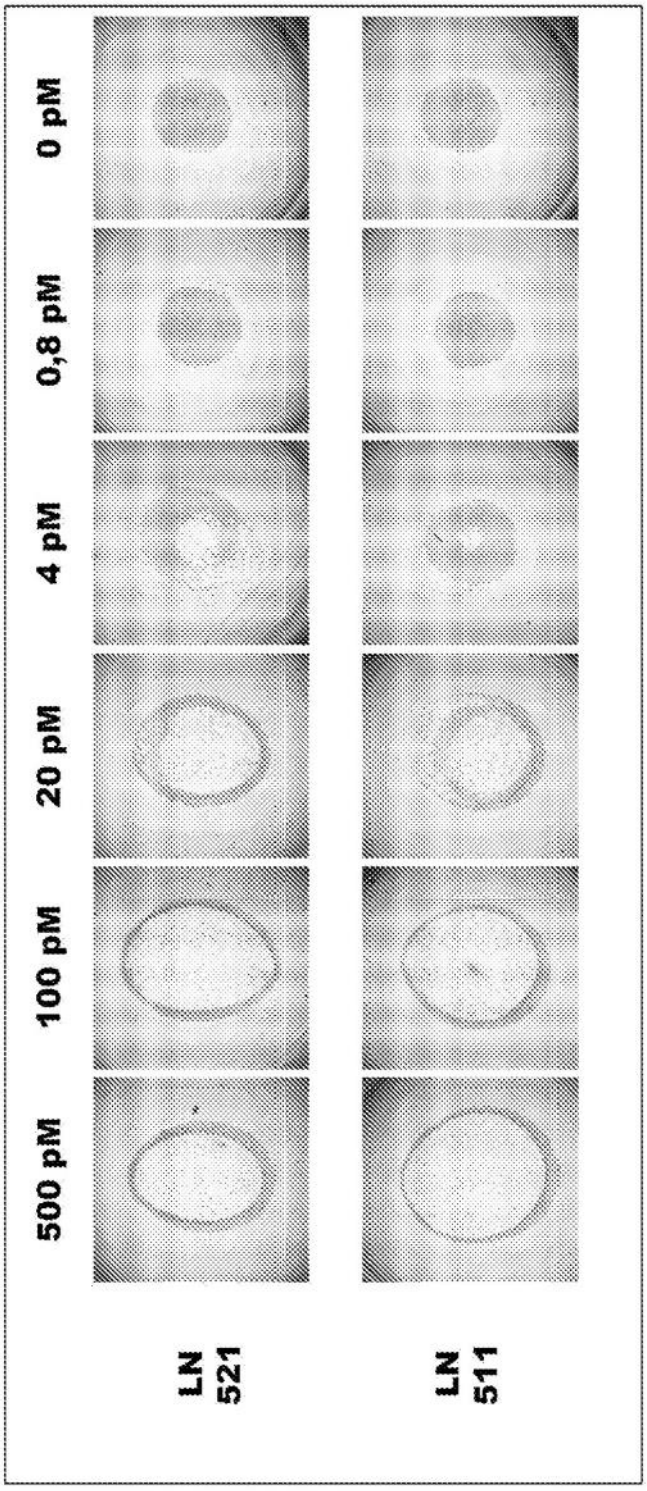


Fig.38

[Fig. 39]

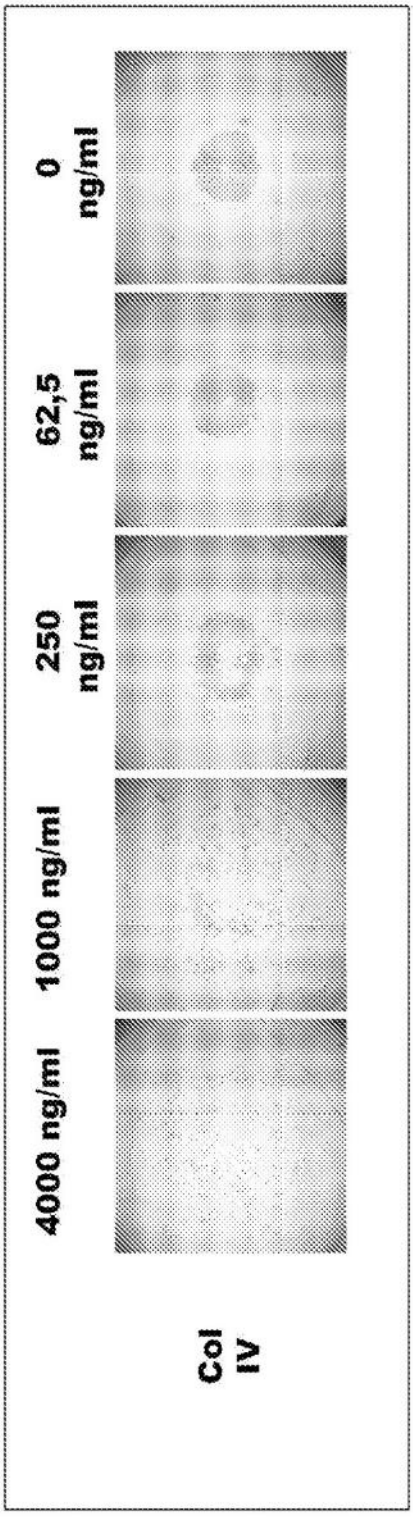


Fig.39

[Fig. 40]

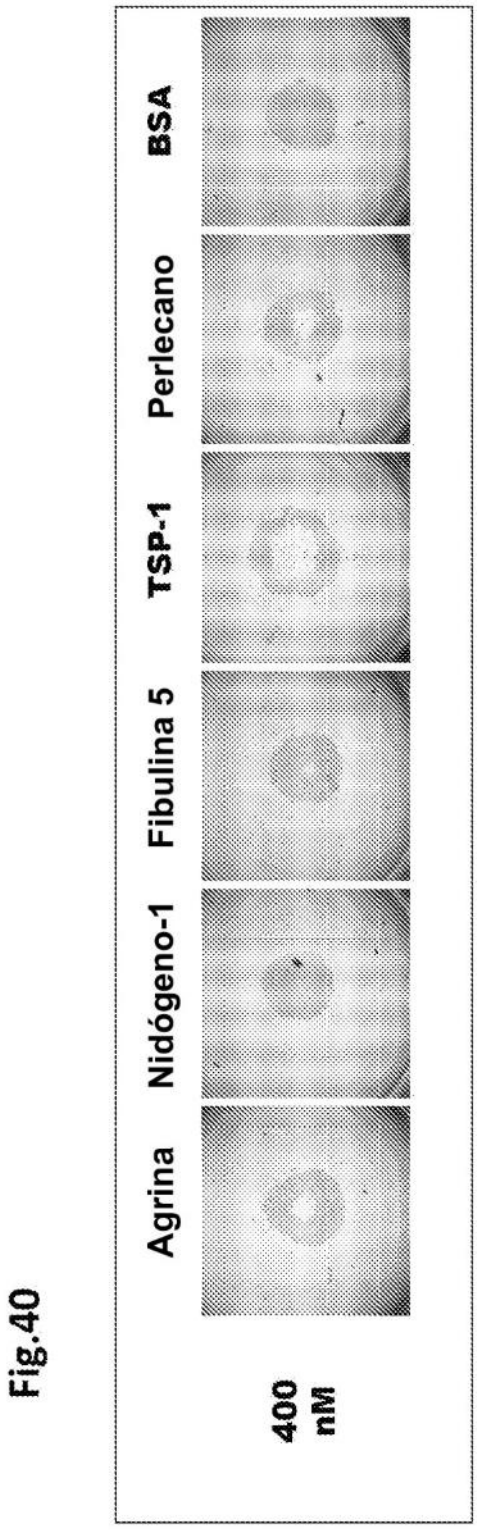
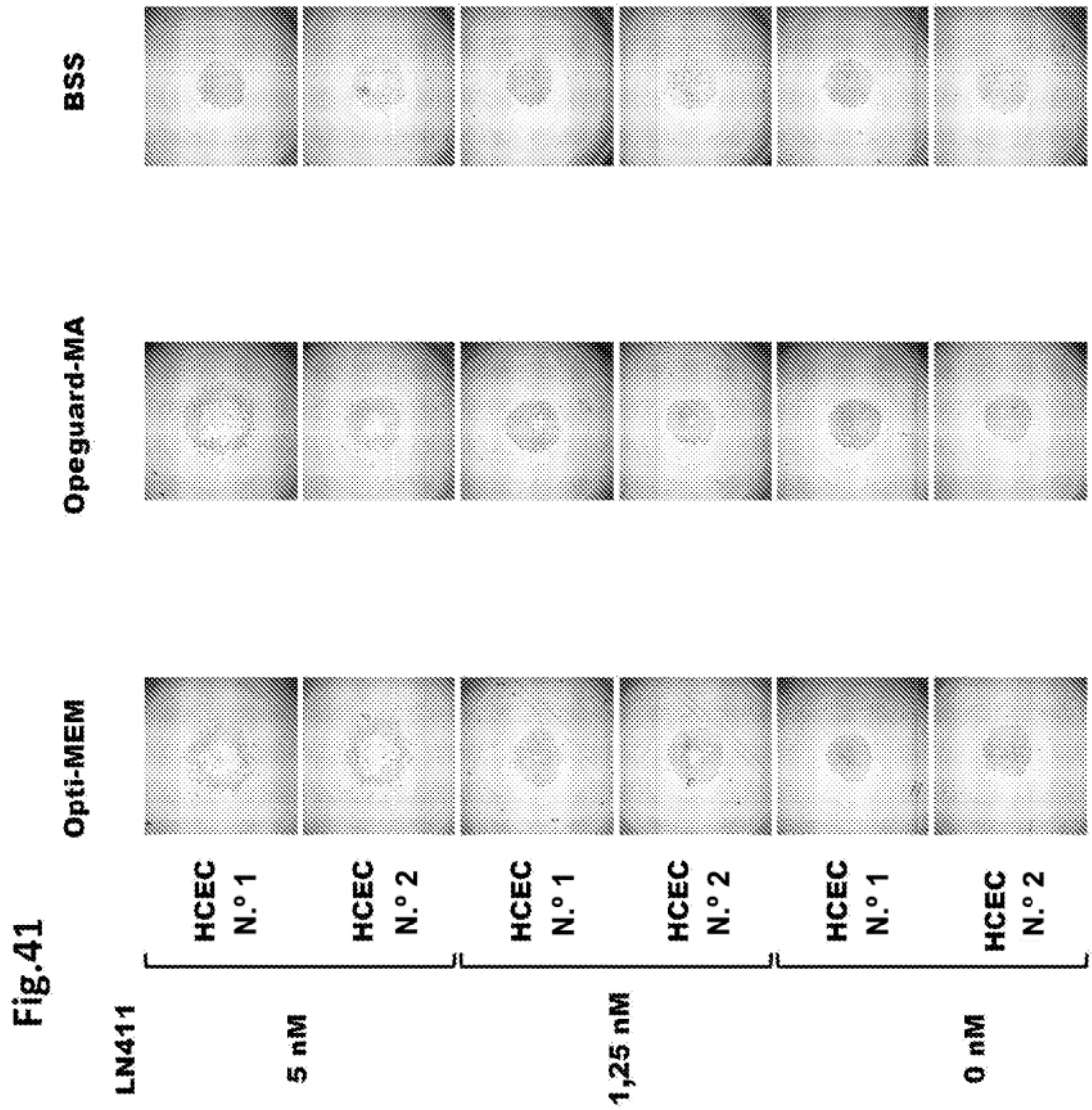


Fig.40

[Fig. 41]


Fig.41
Opti-MEM
Opeguard-MA
BSS
LN411
5 nM
1,25 nM
0 nM
HCEC N.º 1
HCEC N.º 2
HCEC N.º 1
HCEC N.º 2
HCEC N.º 1
HCEC N.º 2

[Fig. 42]

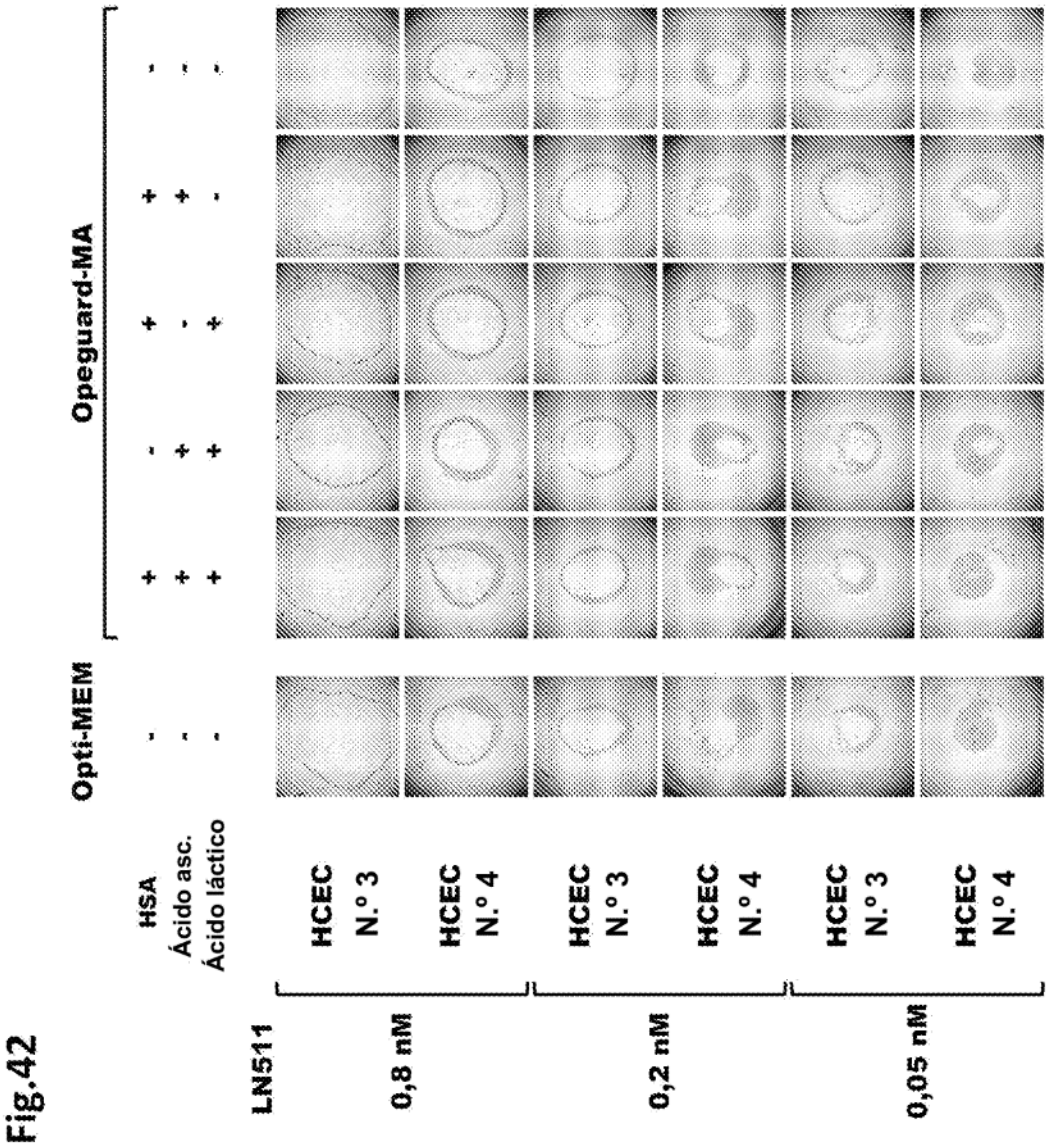

Opti-MEM
Opeguard-MA
HSA
Ácido asc.
Ácido láctico
LN511
0,8 nM
0,2 nM
0,05 nM
HCEC N.º 3
HCEC N.º 4
HCEC N.º 3
HCEC N.º 4
HCEC N.º 3
HCEC N.º 4

Fig.42

[Fig. 43]

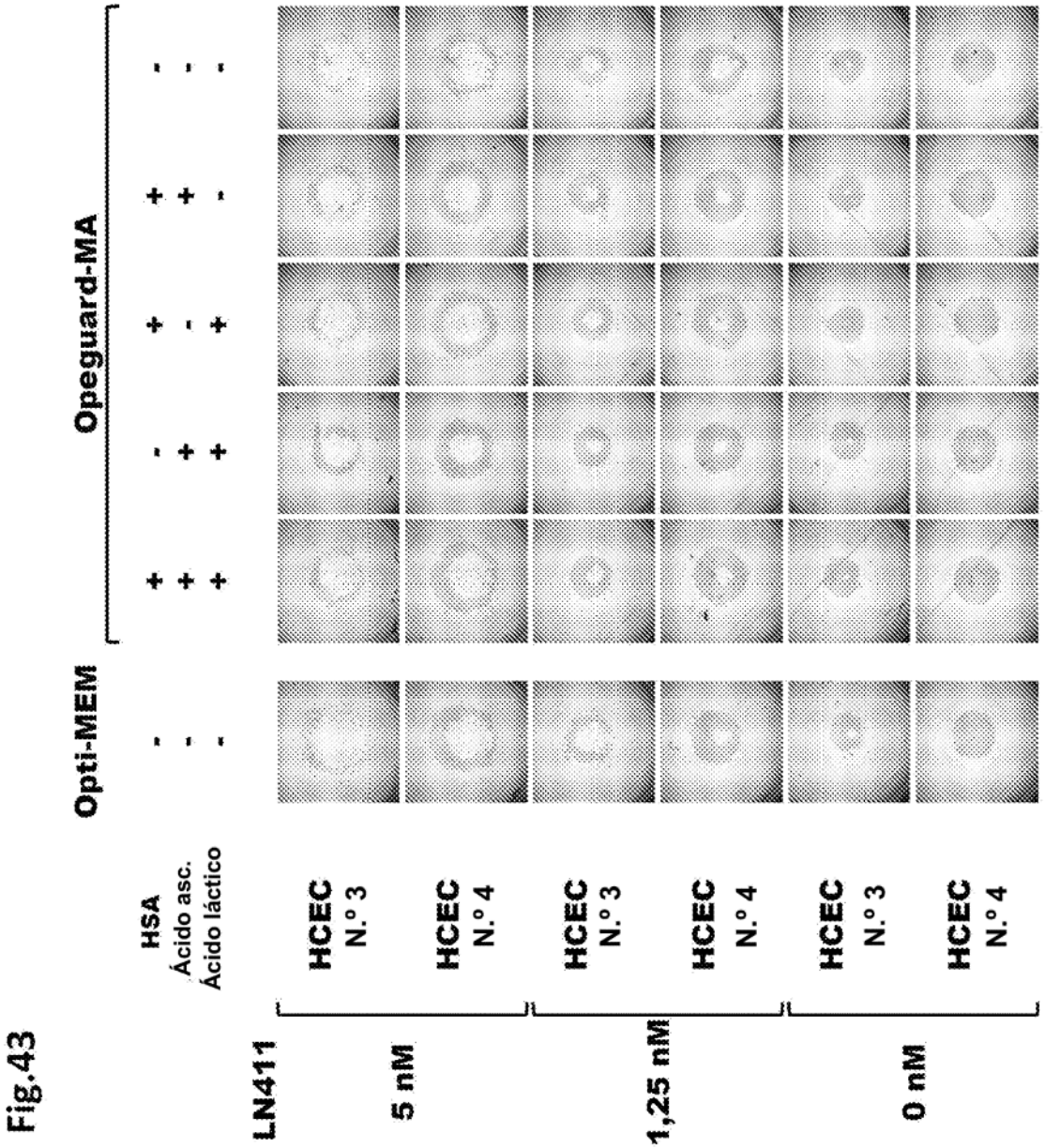
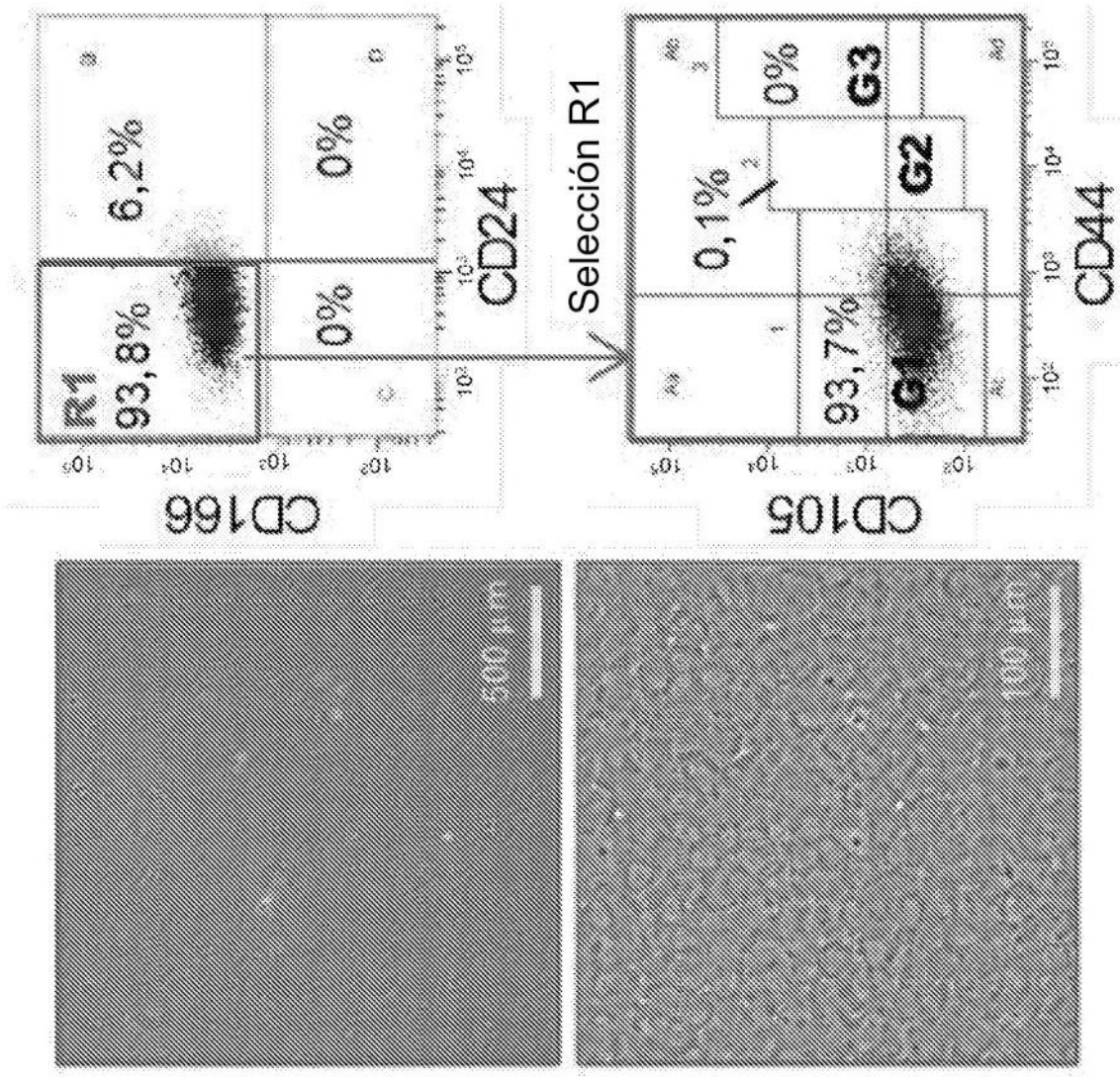

Opti-MEM
Opeguard-MA
HSA
Ácido asc.
Ácido láctico
LN411
5 nM
1,25 nM
0 nM
HCEC N.º 3
HCEC N.º 4
HCEC N.º 3
HCEC N.º 4
HCEC N.º 3
HCEC N.º 4

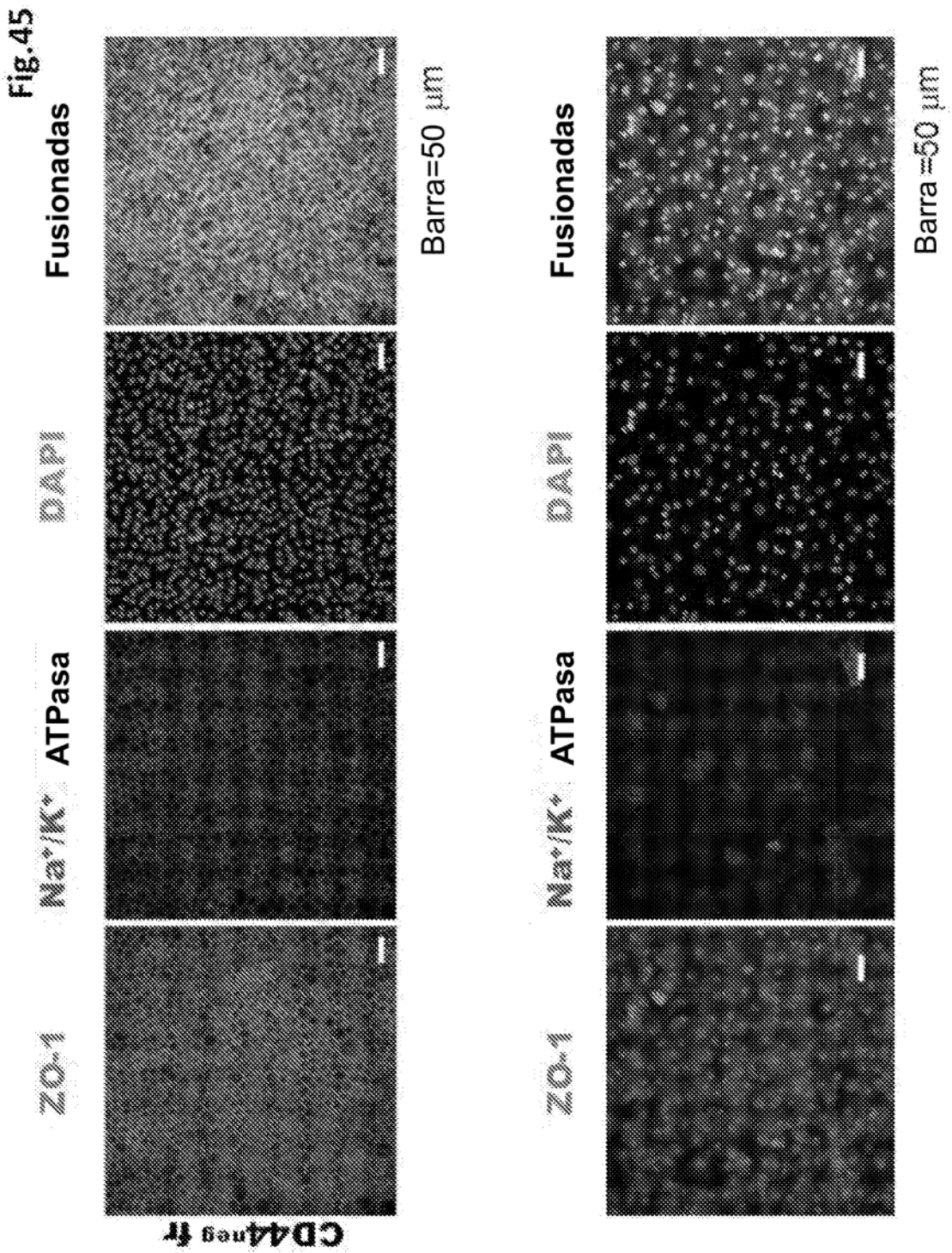
Fig.43

[Fig. 44]

Fig.44

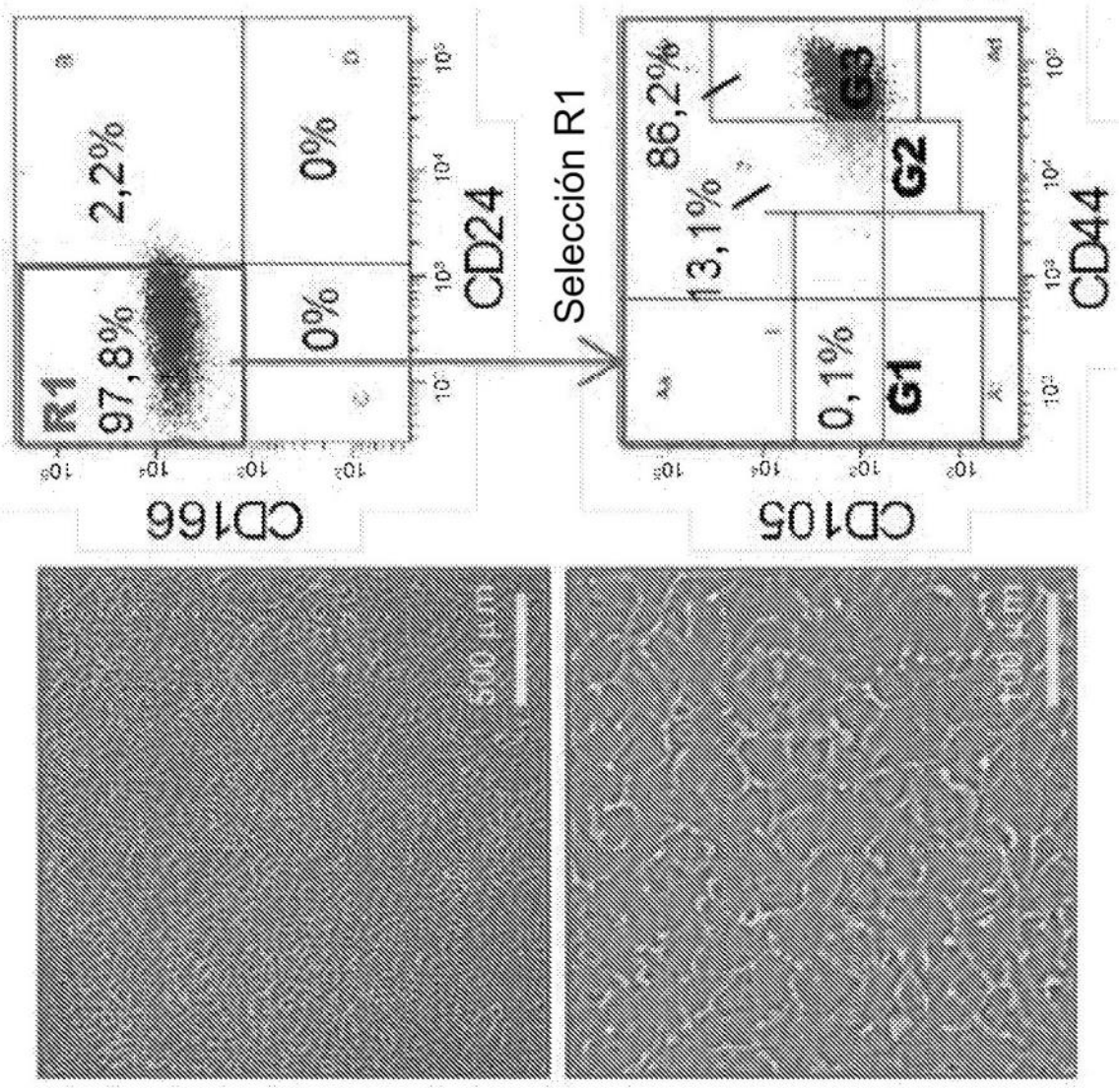

R1
93,8%
6,2%
0%
0%
CD24
CD166
Selección R1
0,1%
0%
G3
G2
G1
93,7%
CD44
CD105
500 µm
100 µm

[Fig. 45]

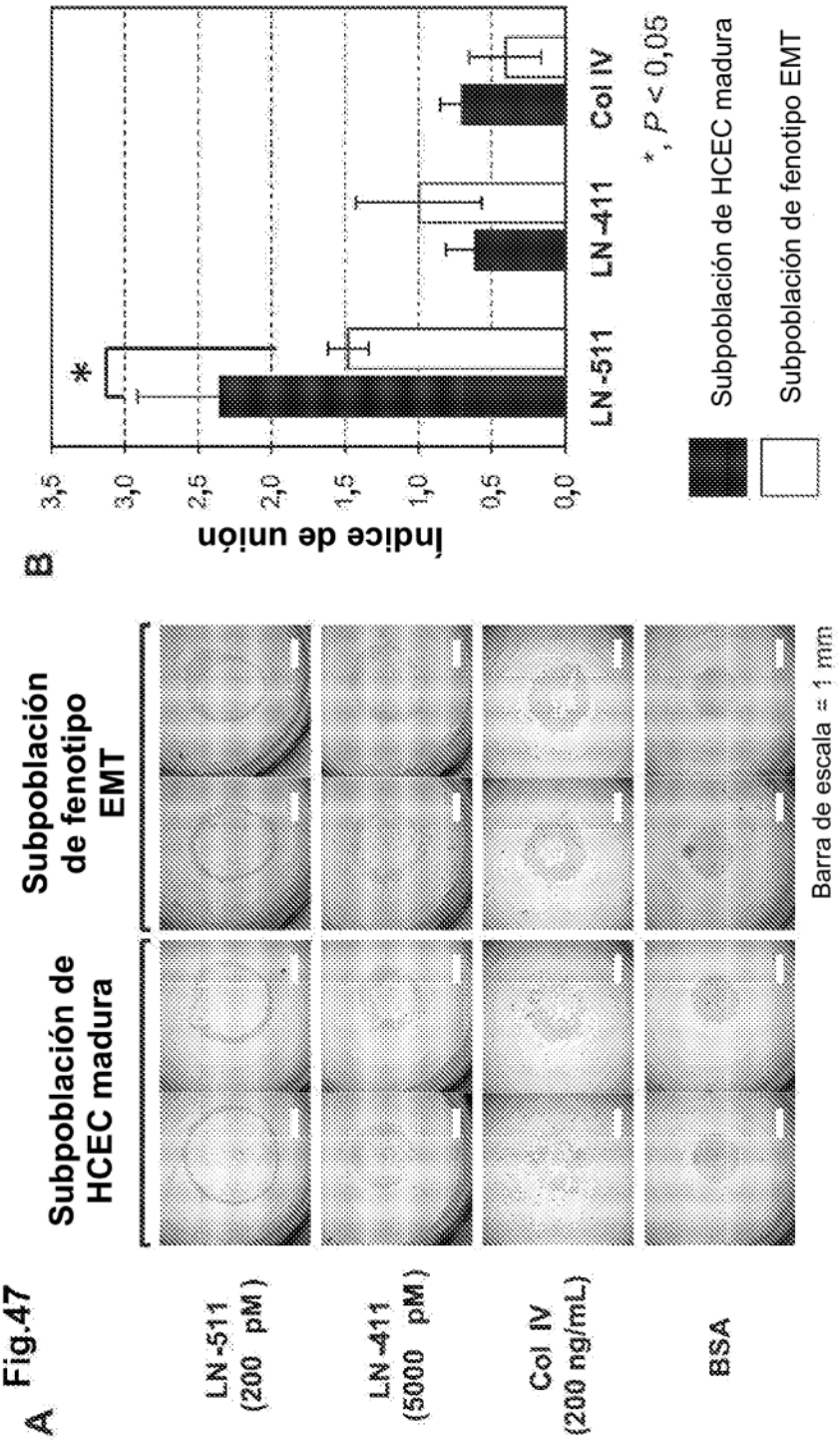

Fig.45
CD44neg fr
ZO-1
Na+/K+ ATPasa
DAPI
Fusionadas
Barra=50 µm
ZO-1
Na+/K+ ATPasa
DAPI
Fusionadas
Barra =50 µm

[Fig. 46]

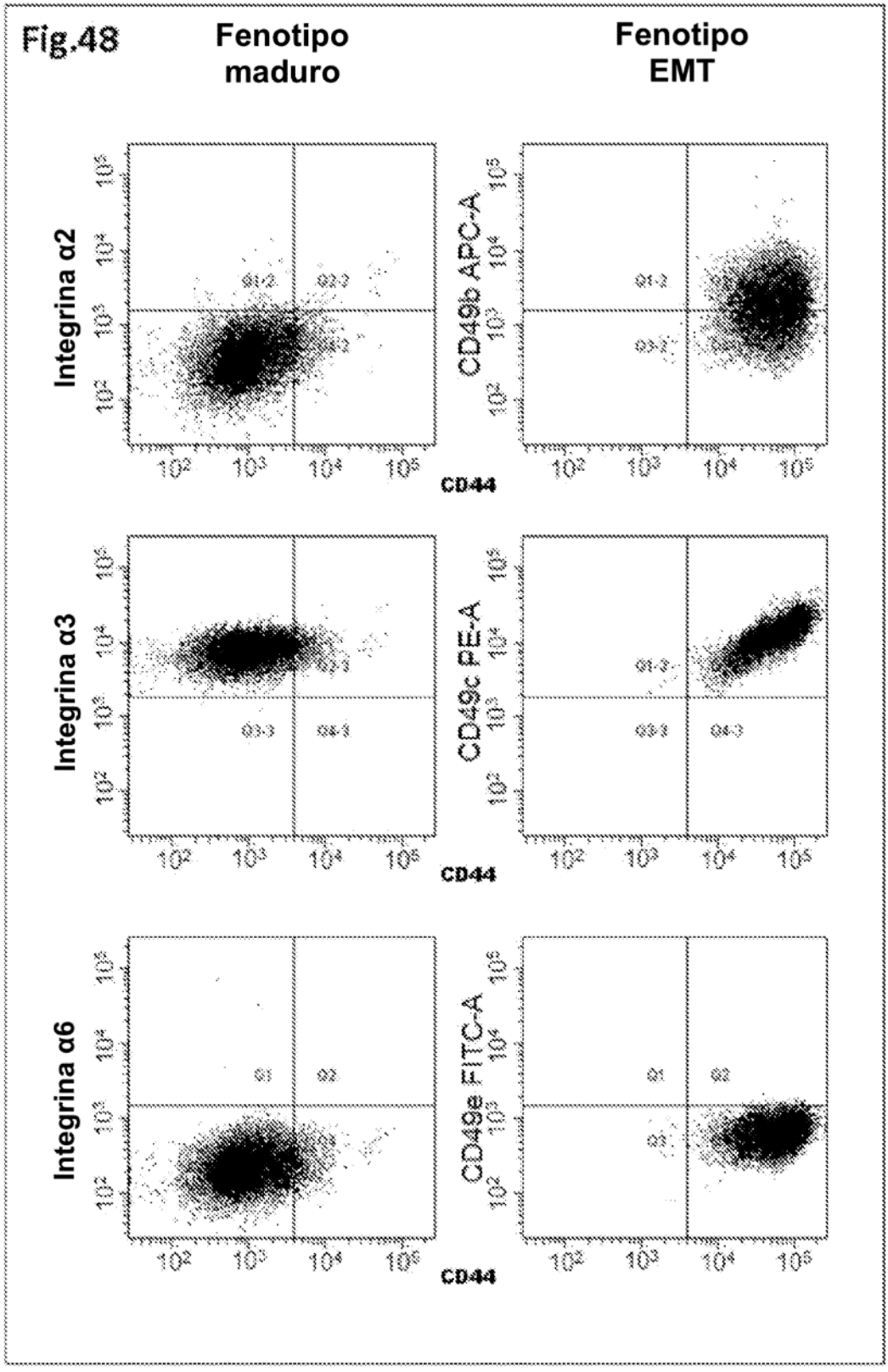
Fig.46


CD24
CD166
R1
97,8%
2,2%
0%
0%
Selección R1
CD44
CD105
G1
G2
G3
0,1%
13,1%
86,2%
500 µm
100 µm

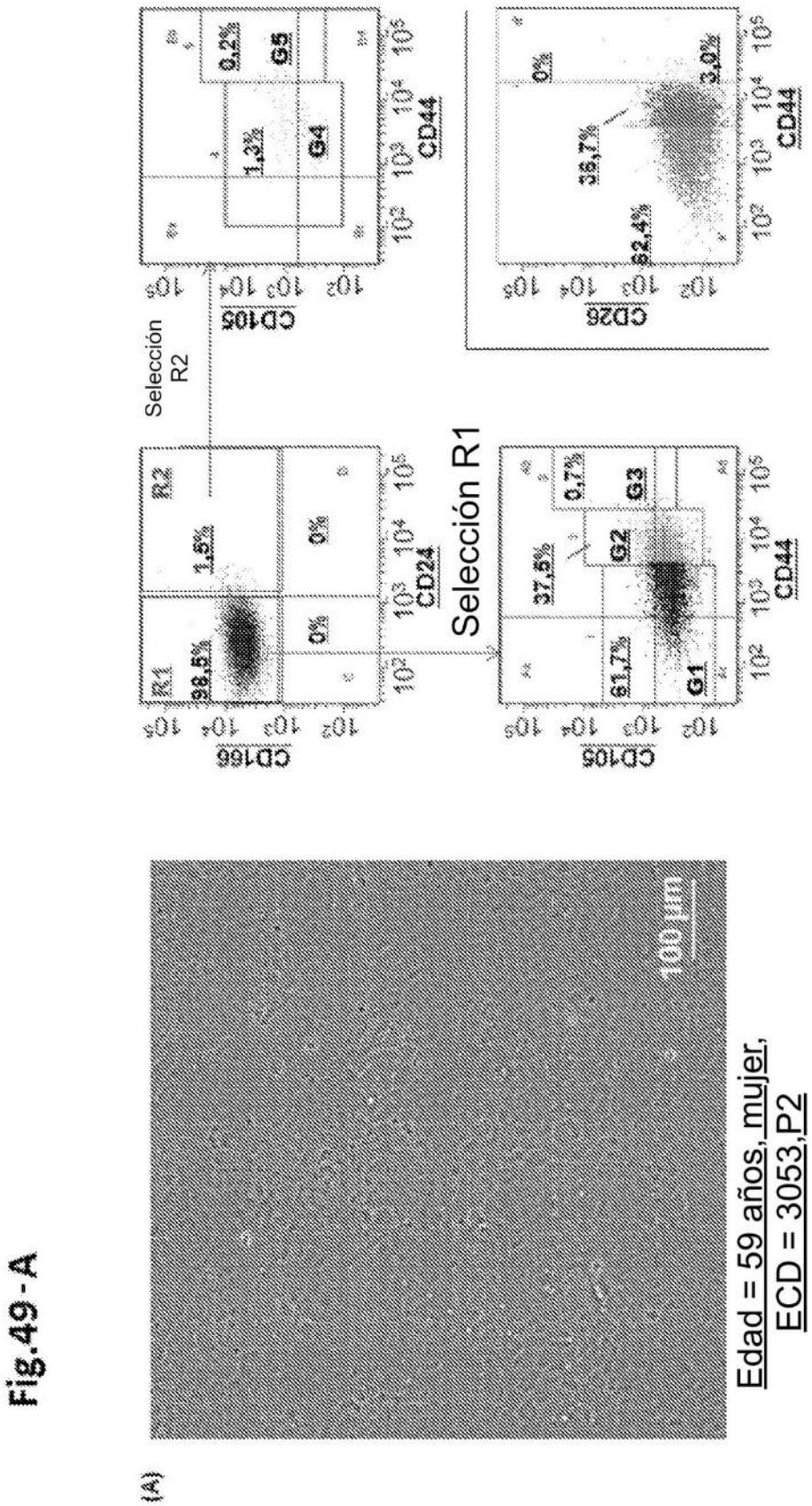
[Fig. 47]


Fig.47
A
Subpoblación de HCEC madura
Subpoblación de fenotipo EMT
LN-511 (200 pM)
LN-411 (5000 pM)
Col IV (200 ng/mL)
BSA
Barra de escala = 1 mm
B
Índice de unión
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
LN-511
LN-411
Col IV
*, P < 0,05
Subpoblación de HCEC madura
Subpoblación de fenotipo EMT

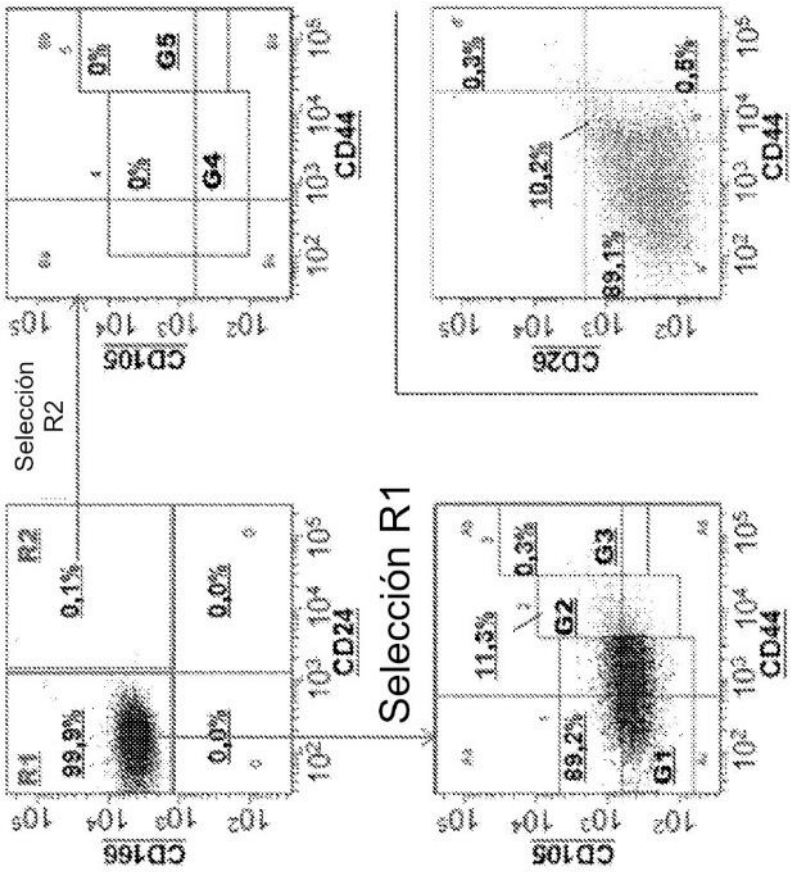
[Fig. 48]


Fig.48
Fenotipo maduro
Fenotipo EMT
Integrina α2
CD49b APC-A
Integrina α3
CD49c PE-A
Integrina α6
CD49e FITC-A
CD44

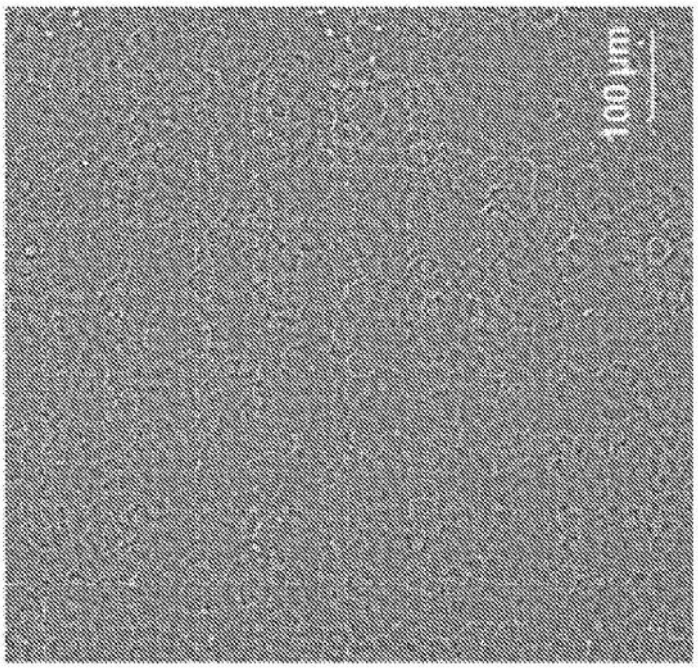
[Fig. 49-A]


Fig.49-A
(A)
100 µm
Edad = 59 años, mujer,
ECD = 3053,P2
CD166
CD24
R1
R2
98,5%
1,5%
0%
0%
Selección R2
CD105
CD44
G1
G2
G3
G4
G5
61,7%
37,5%
0,7%
1,3%
0,2%
Selección R1
CD26
82,4%
16,7%
0%
3,0%

[Fig. 49-B]



(B)

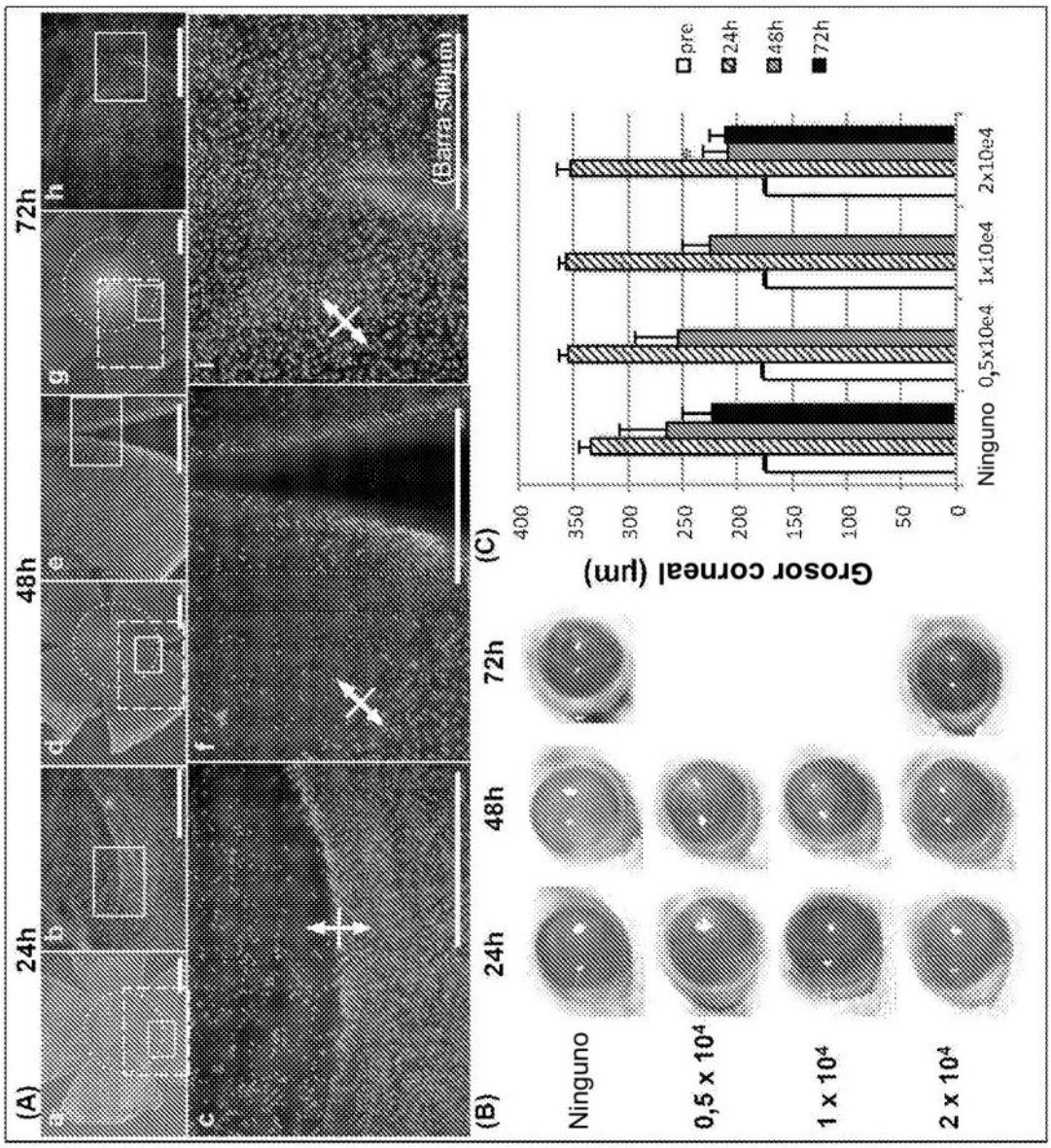


Edad = 29 años, hombre,
ECD = 3014/3072,P3

Fig.49-B

[Fig. 50]

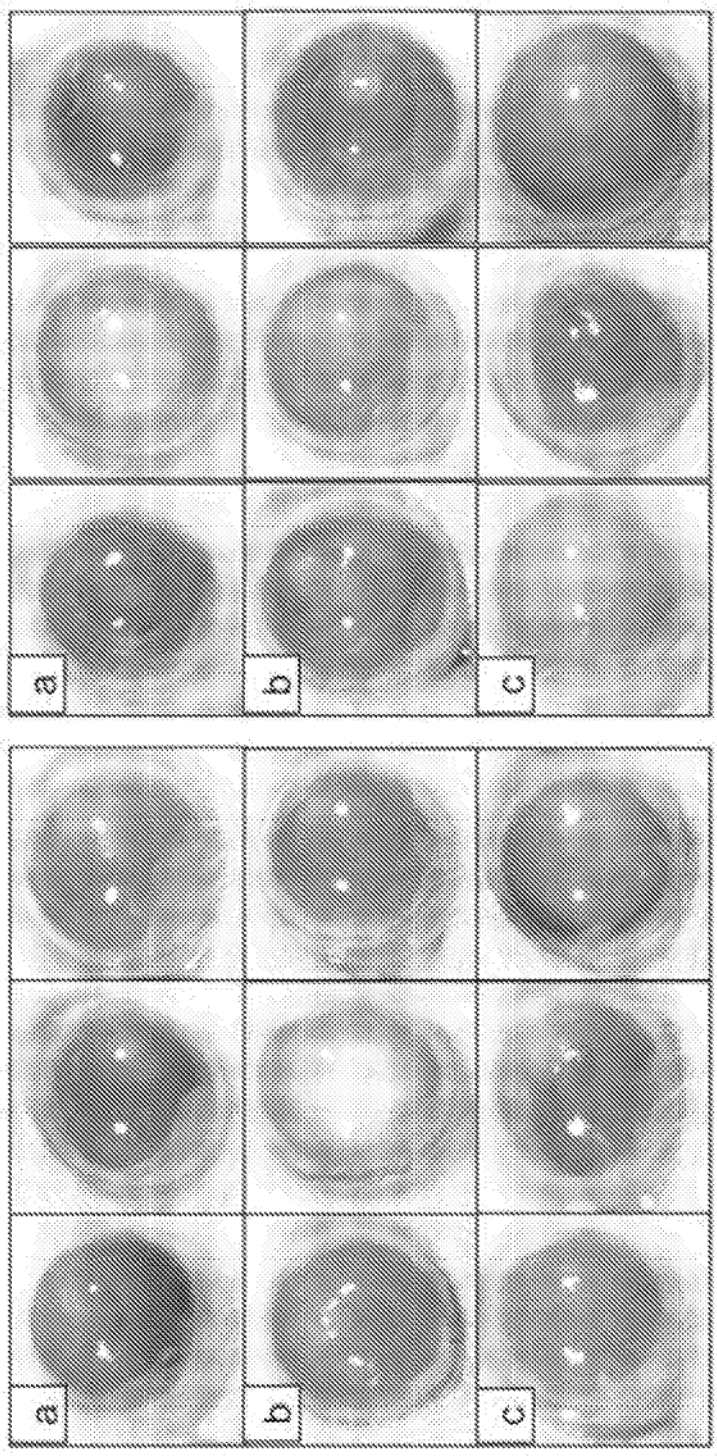
Fig.50


(A)
24h
48h
72h
(B)
24h
48h
72h
Ninguno
0,5 x 10⁴
1 x 10⁴
2 x 10⁴
(C)
Grosor corneal (µm)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
pre
24h
48h
72h
Ninguno
0,5x10e4
1x10e4
2x10e4
(Barra 500µm)

[Fig. 51]

Fig.51

Grupo examinado (A) a) Subpoblación A inyección de OptiMEM (Y-) (N=3) (II) a) Subpoblación A inyección de OptiMEM (Y-) (N=3)
b) Subpoblación A inyección de Opeguard MA (Y-) (N=3) b) Subpoblación A inyección de Opeguard F (Y-) (N=3)
c) Opeguard MA (Y-) solo (N=3) c) Opeguard F (Y-) solo (N=3)



[Fig. 52]

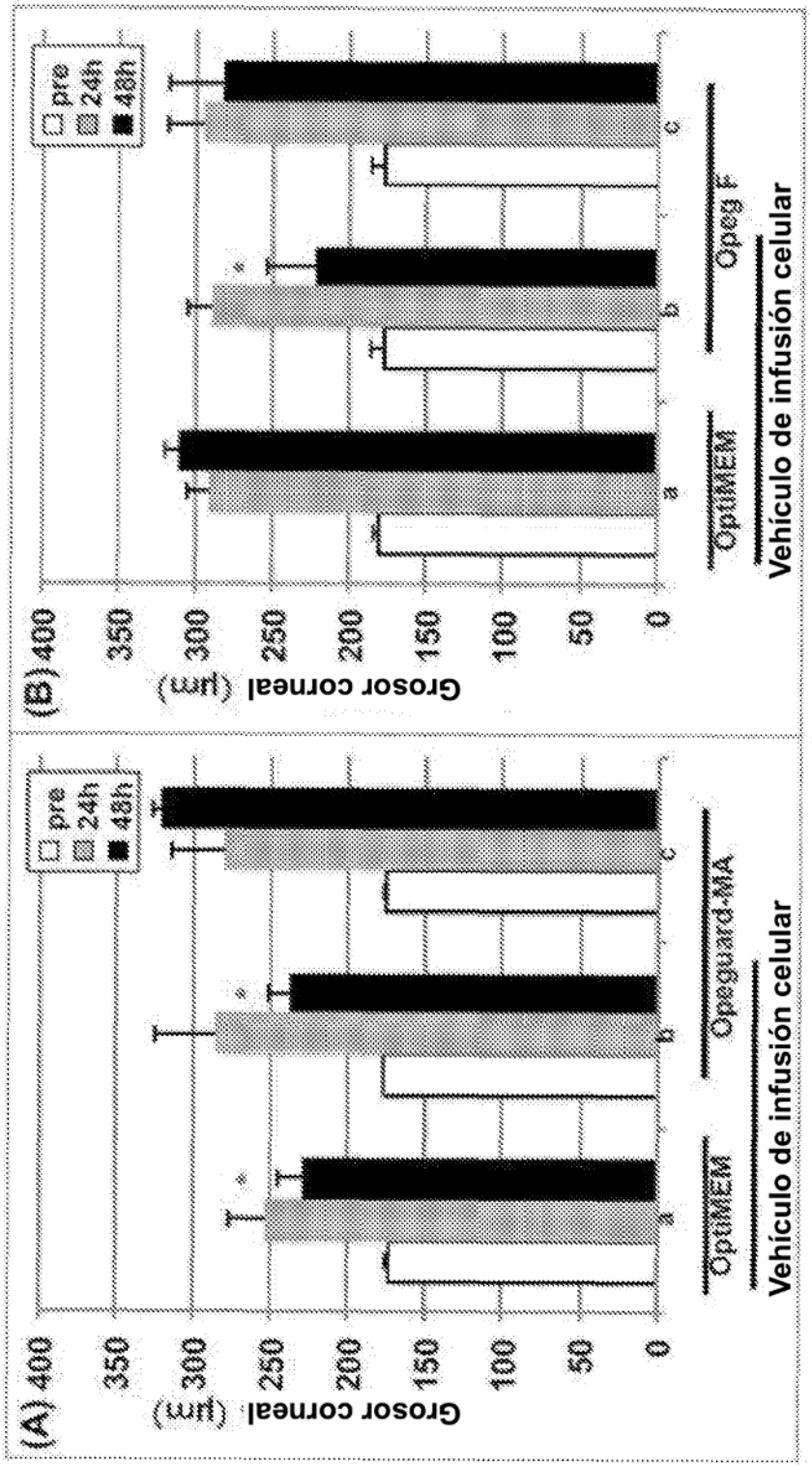

(A)
(B)
Grosor corneal (μm)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
pre
24h
48h
OptiMEM
Opeguard-MA
Opeg F
Vehículo de infusión celular
a
b
c
*

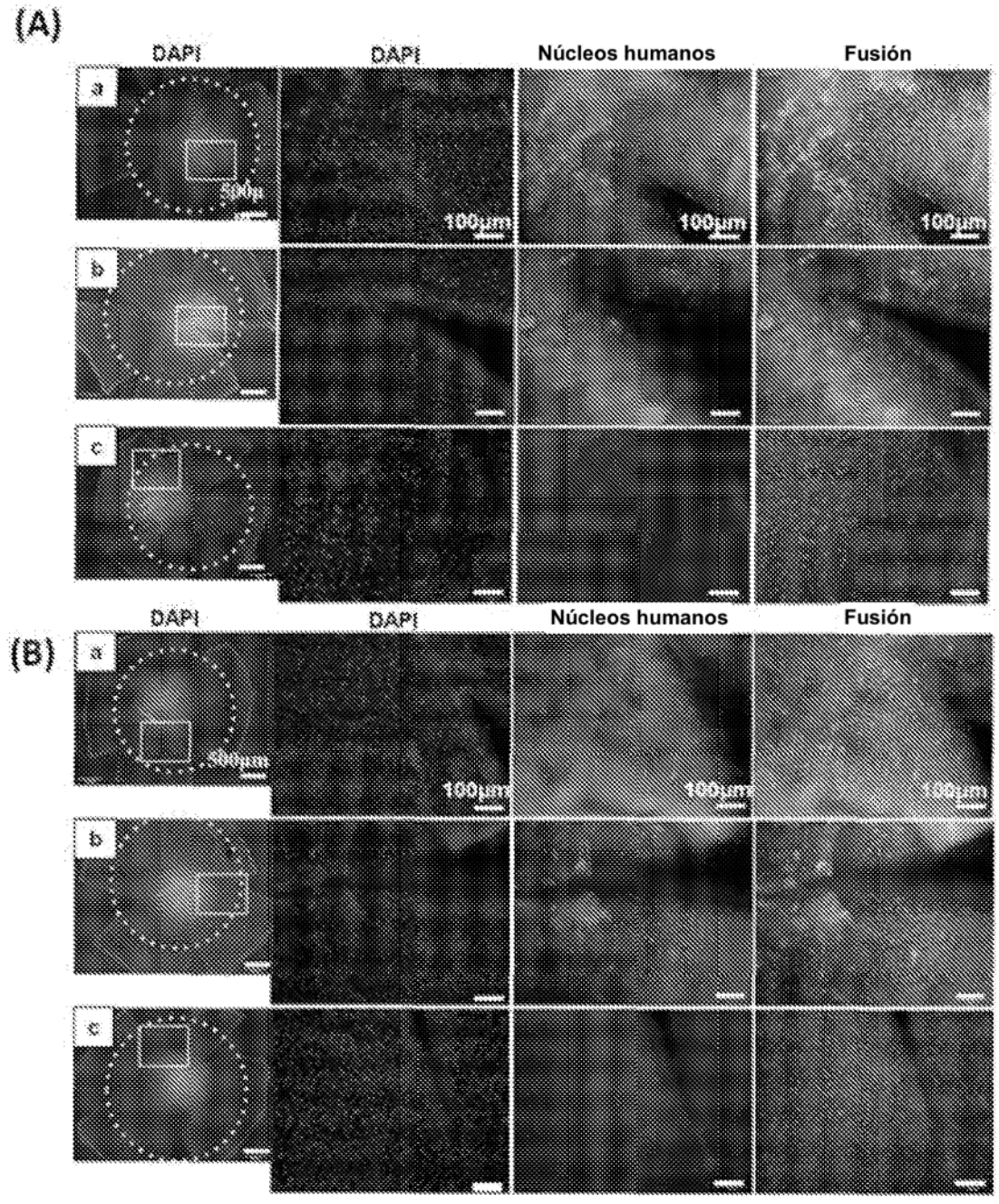
Fig.52

[Fig. 53]

Fig.53

Grupo examinado (A) a) Subpoblación A inyección de OptiMEM (Y-) (N=3)
b) Subpoblación A inyección de Opeguard MA (Y-) (N=3)
c) Opeguard MA (Y-) solo (N=3)

(B) a) Subpoblación A inyección de OptiMEM (Y-) (N=3)
b) Subpoblación A inyección de Opeguard F (Y-) (N=3)
c) Opeguard F (Y-) solo (N=3)



[Fig. 54-A(a)]

Fig. 54–A(a)

(a) Tejido fresco: endotelio frente a epitelio

ARNm		Endotelio						Epitelio					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	
Endotelio	1	1,00											
	2	0,99	1,00										
	3	0,97	0,97	1,00									
	4	0,96	0,97	1,00	1,00								
	5	0,97	0,97	0,98	0,98	1,00							
	6	0,96	0,97	0,98	0,98	0,99	1,00						
Epitelio	1	0,61	0,61	0,64	0,62	0,60	0,60	1,00					
	2	0,58	0,59	0,60	0,59	0,57	0,57	0,99	1,00				
	3	0,58	0,59	0,62	0,61	0,58	0,58	0,98	0,98	1,00			
	4	0,61	0,62	0,65	0,64	0,61	0,61	0,98	0,97	0,99	1,00		
	5	0,65	0,65	0,69	0,68	0,66	0,65	0,94	0,94	0,94	0,95	1,00	

ARNm		63 años		20 años		12 años		7M	3D	
		10	11	8	9	12	13	18	20	21
63 años	10	1,00								
	11	1,00	1,00							
20 años	8	0,97	0,96	1,00						
	9	0,97	0,97	0,99	1,00					
12 años	12	0,98	0,98	0,97	0,97	1,00				
	13	0,98	0,98	0,96	0,97	0,99	1,00			
7M	18	0,95	0,94	0,95	0,95	0,95	0,94	1,00		
3D	20	0,90	0,89	0,92	0,91	0,91	0,89	0,96	1,00	
	21	0,90	0,89	0,91	0,90	0,90	0,89	0,96	0,99	1,00

microARN		Endotelio						Epitelio					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	
Endotelio	1	1,00											
	2	0,98	1,00										
	3	0,95	0,97	1,00									
	4	0,97	0,98	1,00	1,00								
	5	0,99	0,98	0,98	0,99	1,00							
	6	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00						
Epitelio	1	0,95	0,97	0,97	0,97	0,97	0,96	0,97	1,00				
	2	0,95	0,98	0,97	0,97	0,95	0,97	1,00	1,00				
	3	0,94	0,96	0,97	0,97	0,95	0,96	1,00	0,99	1,00			
	4	0,94	0,97	0,97	0,97	0,95	0,96	1,00	1,00	0,99	1,00		
	5	0,73	0,68	0,72	0,73	0,78	0,73	0,77	0,74	0,78	0,73	1,00	

miARN		63 años		20 años		12 años		7M	3D	
		10	11	8	9	12	13	18	20	21
63 años	10	1,00								
	11	1,00	1,00							
20 años	8	0,95	0,97	1,00						
	9	0,97	0,98	0,98	1,00					
12 años	12	0,98	0,99	0,99	0,98	1,00				
	13	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00			
7M	18	0,98	0,99	0,98	1,00	0,99	1,00	1,00		
3D	20	0,97	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	
	21	0,96	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00

[Fig. 54-A(b)]

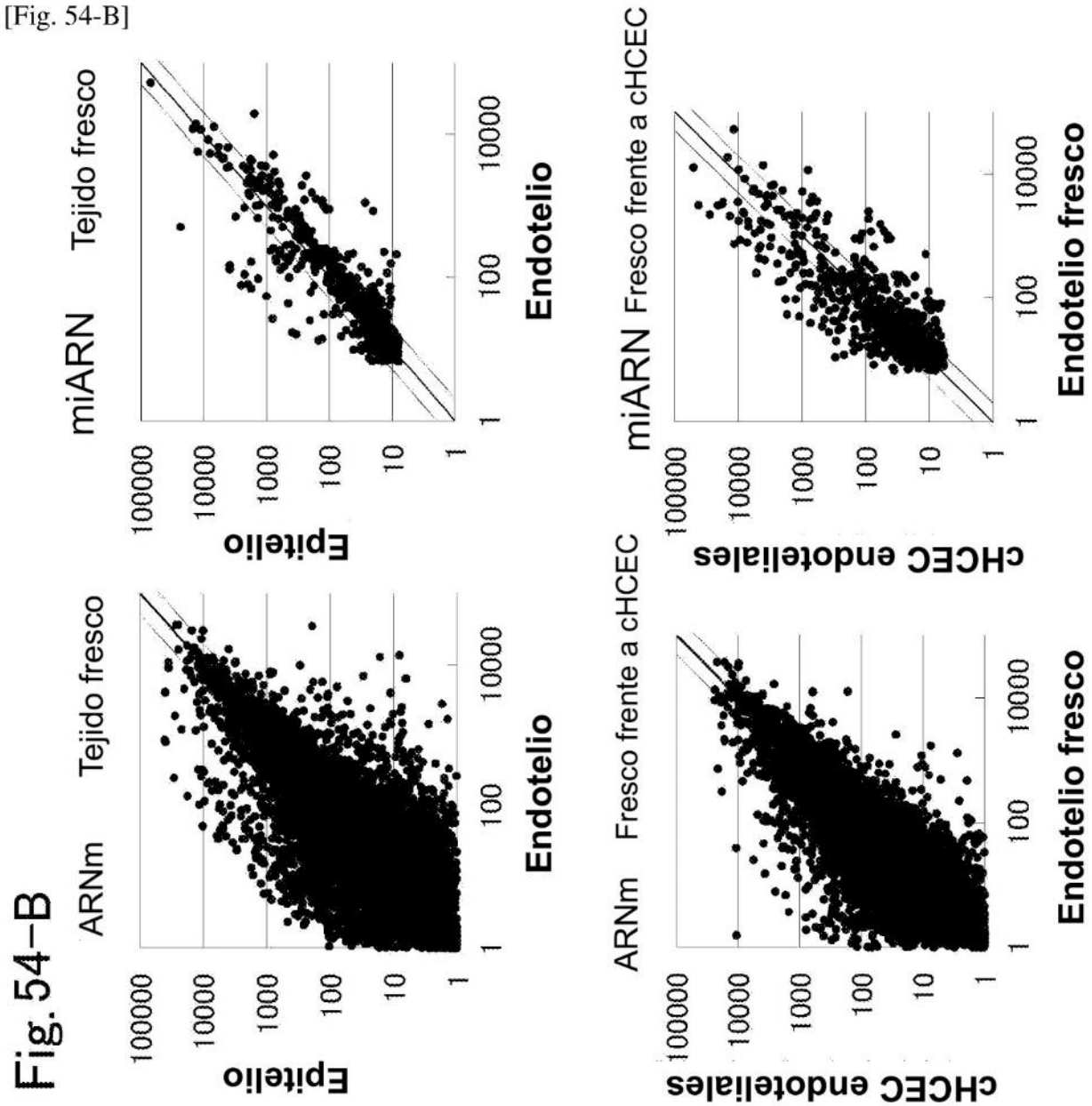
Fig. 54-A(b)

(b) Tejido endotelial fresco frente a HCEC cultivadas

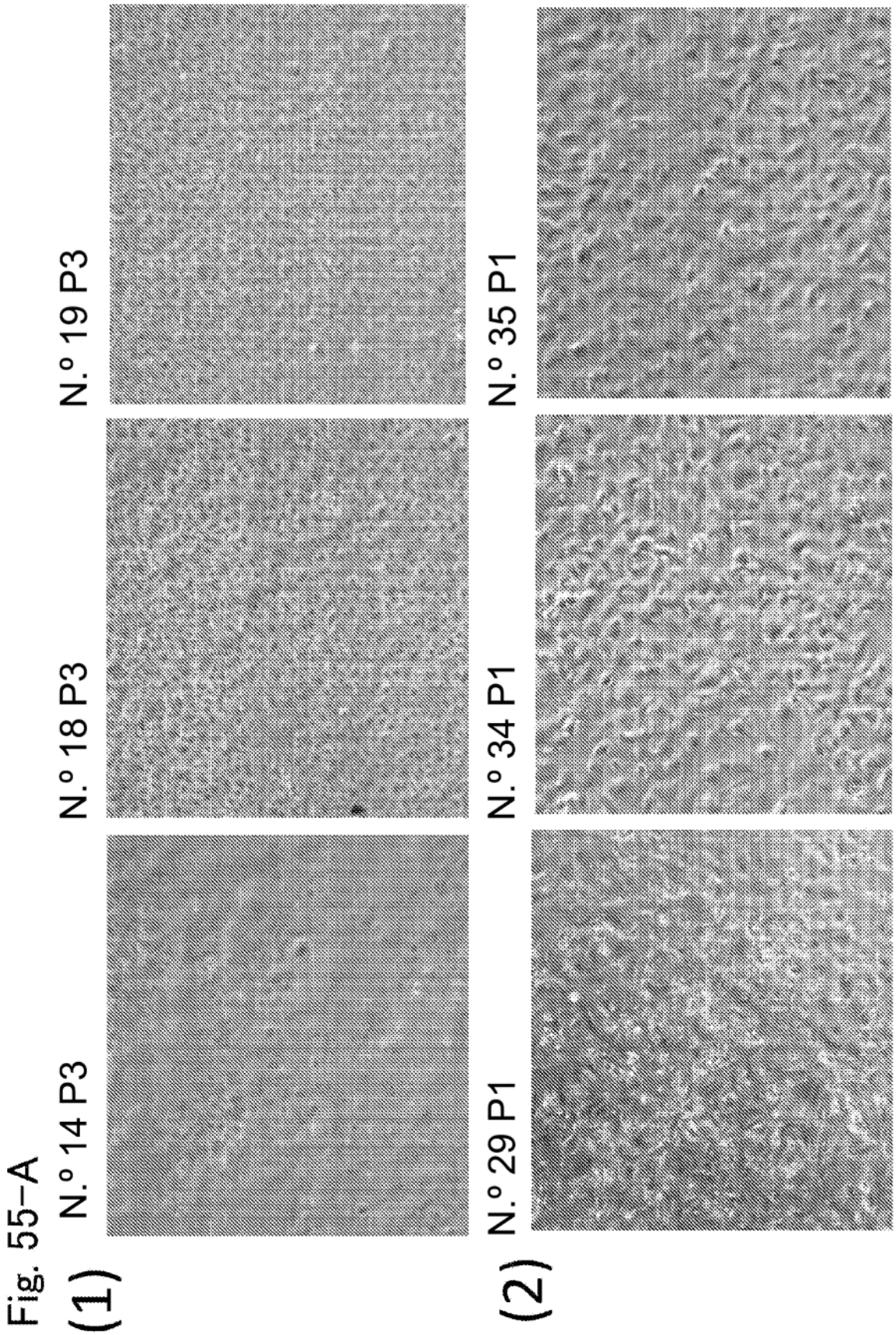
ARNm			Fresco						Cultivo	
									Normal	Transición de estado
			1	2	3	4	5	6	Nº.19 Nº.14 Nº.18	Nº.29 Nº.34 Nº.35
Fresco		1	1,00							
		2	0,99	1,00						
		3	0,97	0,97	1,00					
		4	0,96	0,97	1,00	1,00				
		5	0,97	0,97	0,98	0,98	1,00			
		6	0,96	0,97	0,98	0,98	0,99	1,00		
Cultivo	Normal	Nº.19	0,76	0,75	0,78	0,77	0,77	0,76	1,00	
		Nº.14	0,80	0,80	0,81	0,80	0,80	0,79	0,95	1,00
		Nº.18	0,72	0,72	0,74	0,73	0,72	0,72	0,93	0,97 1,00
	Transición de estado	Nº.29	0,71	0,71	0,74	0,73	0,72	0,72	0,93	0,93 0,94 1,00
		Nº.34	0,64	0,64	0,66	0,65	0,64	0,65	0,86	0,86 0,93 0,92 1,00
		Nº.35	0,71	0,71	0,72	0,71	0,71	0,71	0,89	0,90 0,95 0,92 0,98 1,00

microARN			Fresco						Cultivo	
									Normal	Transición de estado
			1	2	3	4	5	6	Nº.19 Nº.14 Nº.18	Nº.29 Nº.34 Nº.35
Fresco		1	1,00							
		2	0,98	1,00						
		3	0,95	0,97	1,00					
		4	0,97	0,98	1,00	1,00				
		5	0,99	0,98	0,98	0,99	1,00			
		6	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		
Cultivo	Normal	Nº.19	0,55	0,52	0,57	0,53	0,58	0,57	1,00	
		Nº.14	0,39	0,36	0,43	0,39	0,44	0,43	0,97	1,00
		Nº.18	0,45	0,42	0,48	0,44	0,49	0,48	0,99	0,99 1,00
	Transición de estado	Nº.29	0,56	0,56	0,60	0,55	0,58	0,59	0,97	0,92 0,95 1,00
		Nº.34	0,38	0,36	0,41	0,36	0,41	0,41	0,98	0,98 0,99 0,95 1,00
		Nº.35	0,37	0,33	0,40	0,35	0,41	0,40	0,97	0,99 0,99 0,93 0,99 1,00

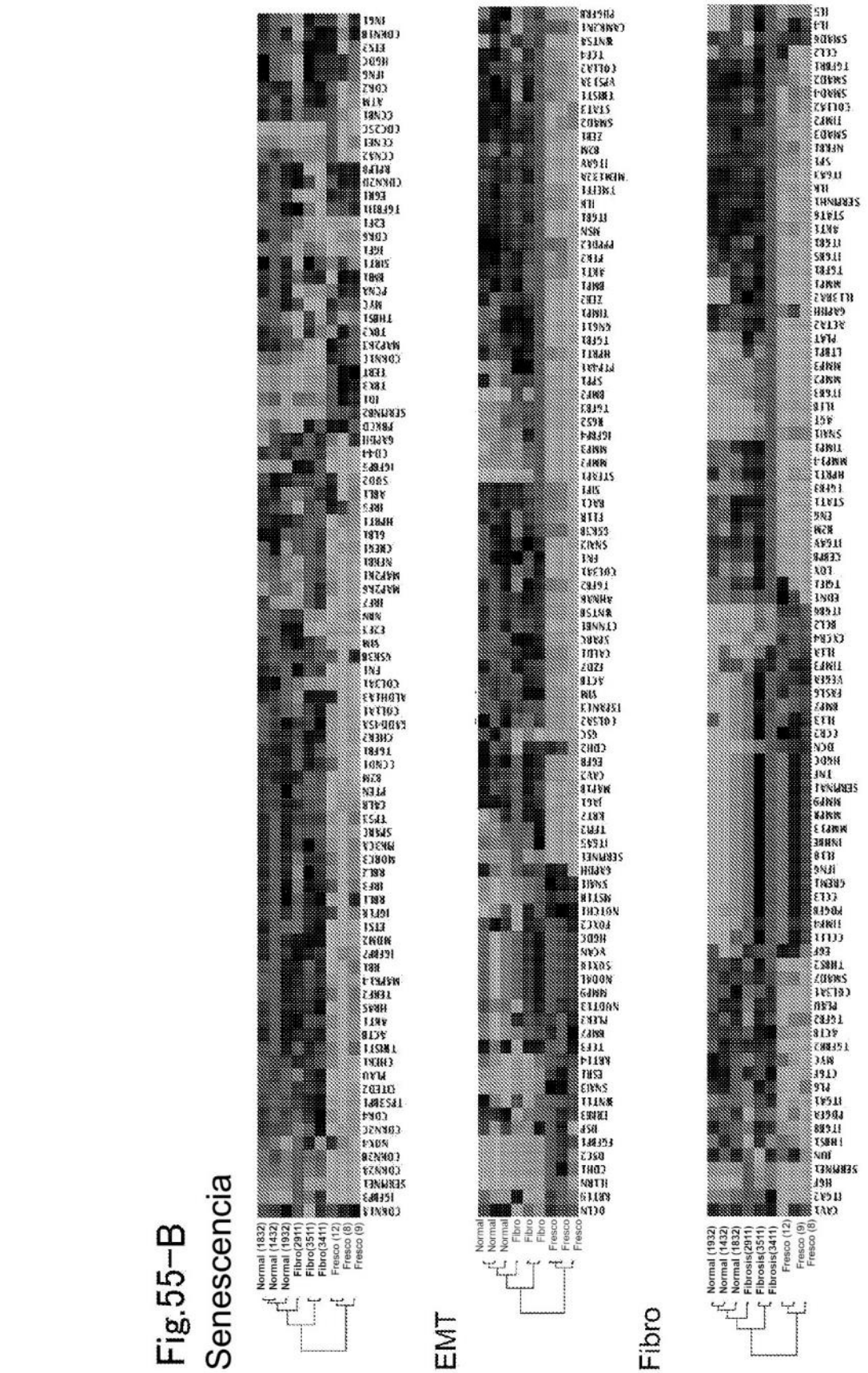
[Fig. 54-B]


Fig. 54-B
ARNm
Tejido fresco
Epitelio
Endotelio
miARN
Tejido fresco
Epitelio
Endotelio
ARNm
Fresco frente a cHCEC
cHCEC endoteliales
Endotelio fresco
miARN
Fresco frente a cHCEC
cHCEC endoteliales
Endotelio fresco
100000
10000
1000
100
10
1
1
100
10000

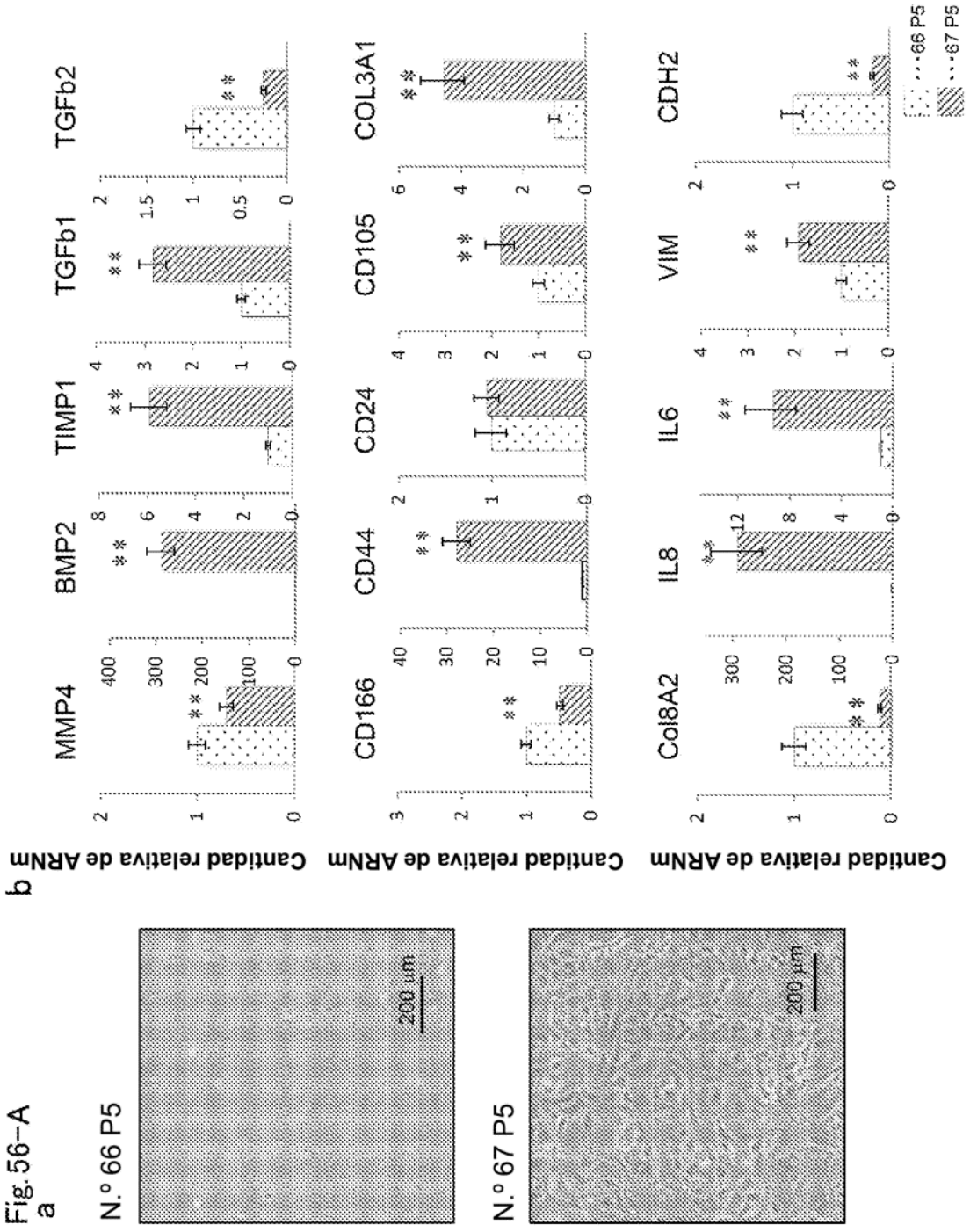
[Fig. 55-A]



[Fig. 55-B]


Fig.55-B
Senescencia
Normal (1832)
Normal (1432)
Normal (1932)
Fibro(2911)
Fibro(3511)
Fibro(3411)
Fresco (12)
Fresco (8)
Fresco (9)
EMT
Normal
Normal
Normal
Fibro
Fibro
Fibro
Fresco
Fresco
Fresco
Fibro
Normal (1932)
Normal (1432)
Normal (1832)
Fibrosis(2911)
Fibrosis(3511)
Fibrosis(3411)
Fresco (12)
Fresco (9)
Fresco (8)

[Fig. 56-A]


Fig. 56–A
a
N.º 66 P5
N.º 67 P5
200 µm
b
MMP4
BMP2
TIMP1
TGFb1
TGFb2
CD166
CD44
CD24
CD105
COL3A1
Col8A2
IL8
IL6
VIM
CDH2
Cantidad relativa de ARNm
···66 P5
···67 P5

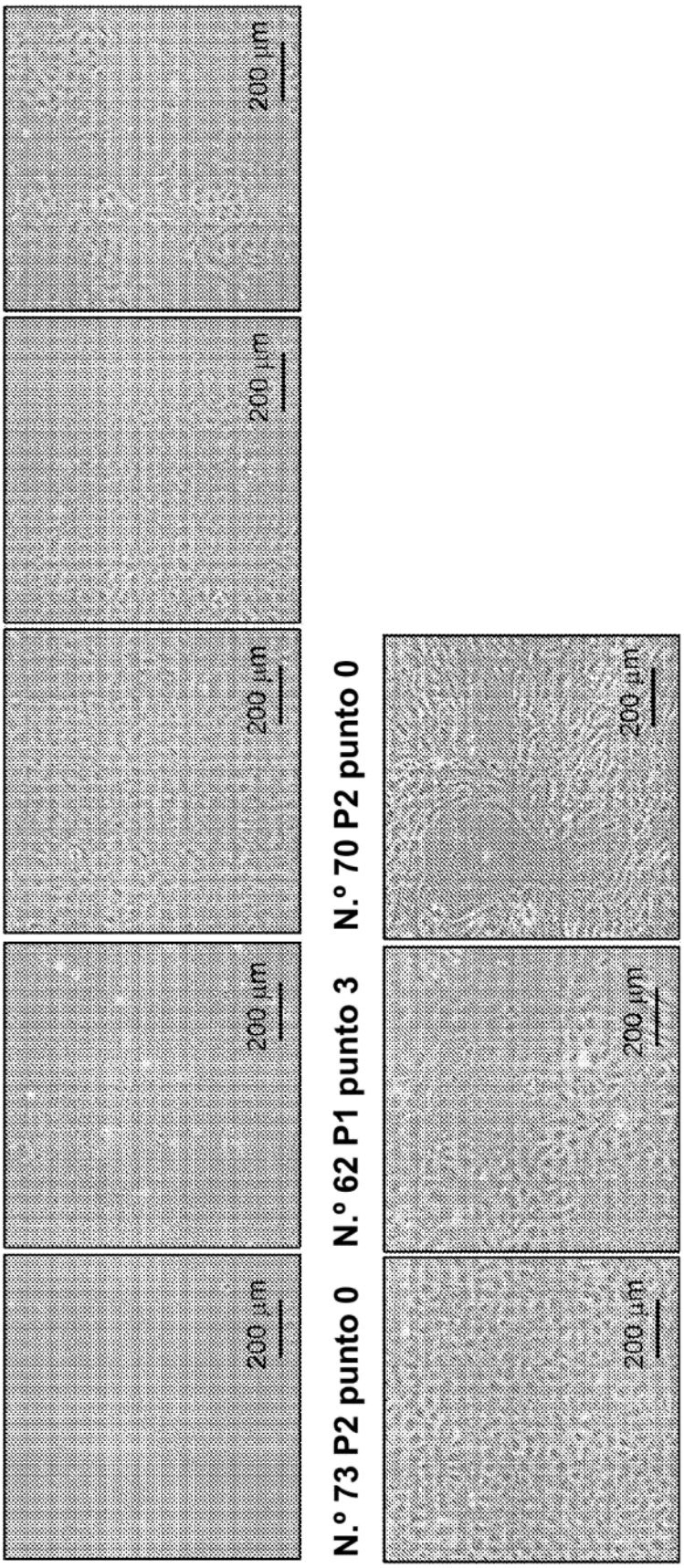
[Fig. 56-B]

Fig. 56-B
c

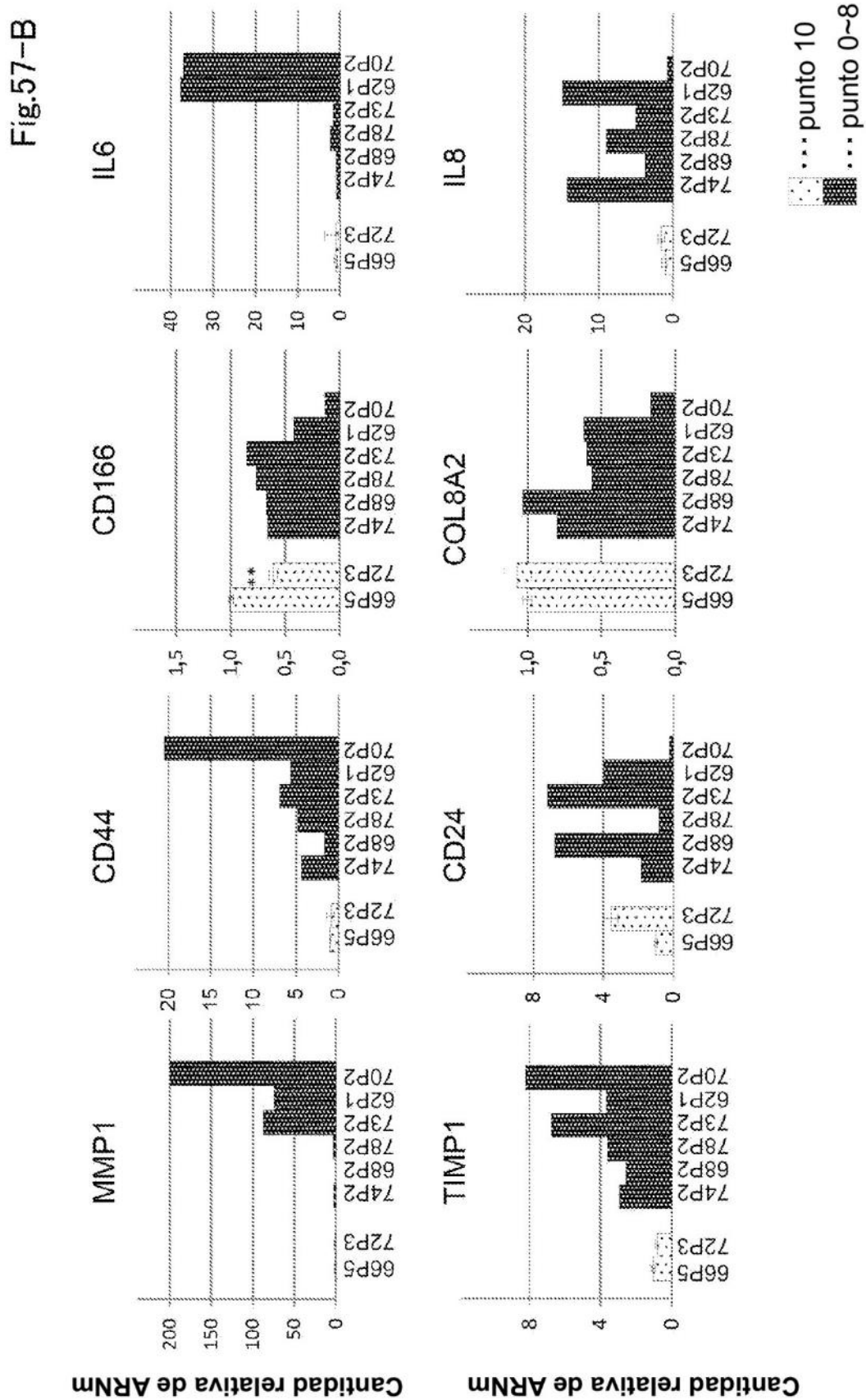
Niveles de expresión no aclarados de ARNm con y sin CST	Bajos niveles de expresión de ARNm en todas las cHCEC	Altos niveles de expresión de ARNm en cHCEC excelentes	Altos niveles de expresión de ARNm en cHCEC con CST		Casi todos los niveles de expresión altos de ARNm en cHCEC con CST, algo bajos
CD166	MMP9	COL4A1	MMP1	CD44	MMP4
IGFBP7	SPP1	COL4A2	MMP2	COL3A1	CD105
	STEAP1	COL8A1	TIMP1	IL6	CD24
	IL33	COL8A2	BMP2	IL8	VIM
	TSLP	CDH2	IL13RA2	HGF	CD166
	CDH1	TGFβ2	TGFβ1	THBS2	
				IGFBP3	

[Fig. 57-A]

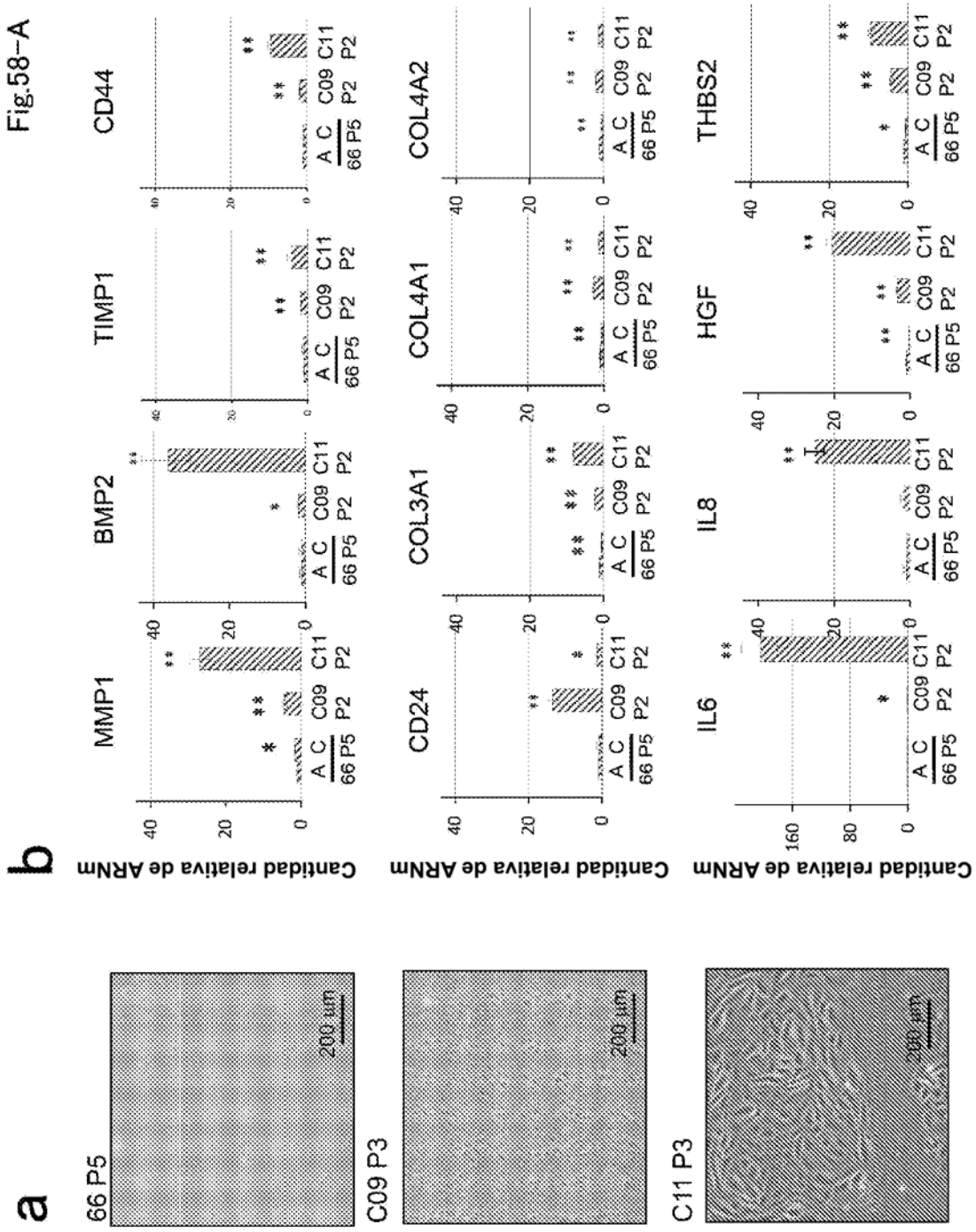
Fig.57-A



[Fig. 57-B]


Fig.57-B
MMP1
CD44
CD166
IL6
TIMP1
CD24
COL8A2
IL8
66P5
72P3
74P2
68P2
78P2
73P2
62P1
70P2
Cantidad relativa de ARNm
Cantidad relativa de ARNm
punto 10
punto 0~8

[Fig. 58-A]


Fig.58-A
a
66 P5
C09 P3
C11 P3
200 µm
b
Cantidad relativa de ARNm
MMP1
BMP2
TIMP1
CD44
CD24
COL3A1
COL4A1
COL4A2
IL6
IL8
HGF
THBS2
A C
66 P5
C09 P2
C11 P2

[Fig. 58-B]

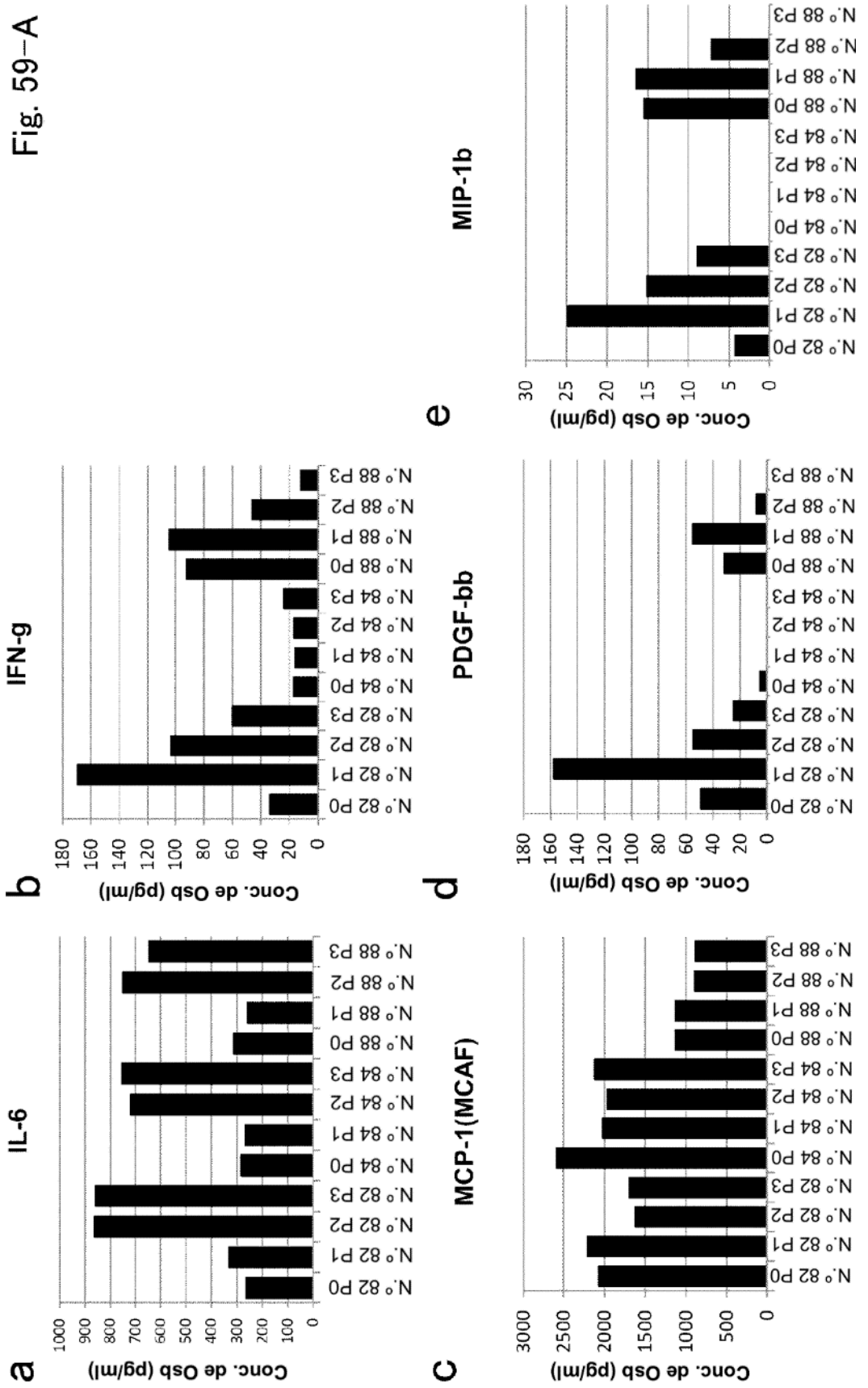
Fig.58-B

C

66	C9	C11		C9 .C11
COL8A1	COL4A1	MMP1	IL6	CD44
COL8A2	COL4A2	MMP2	IL8	COL3A1
CDH2	CD24	TIMP1	IGFBP3	HGF
TGFβ2		BMP2	TGFβ1	THBS2
		IL13RA2		

[Fig. 59-A]

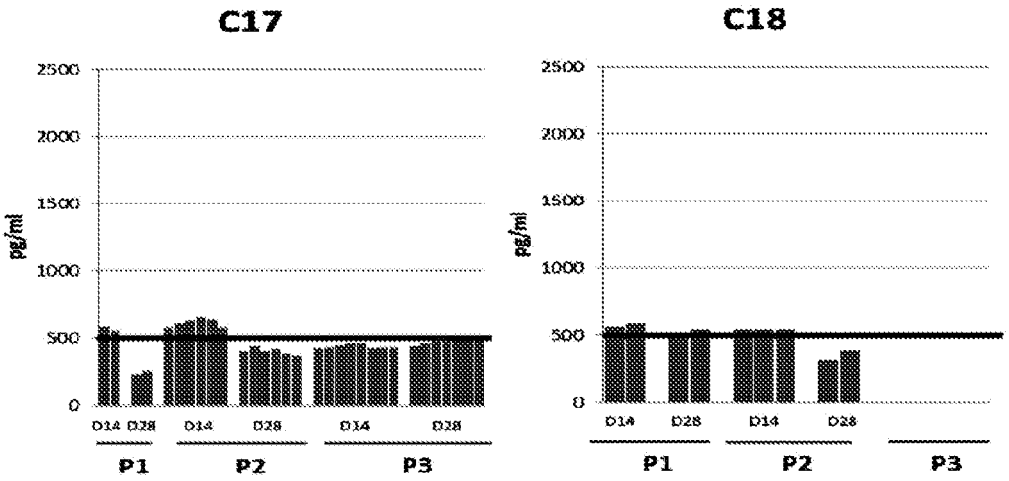
Fig. 59-A



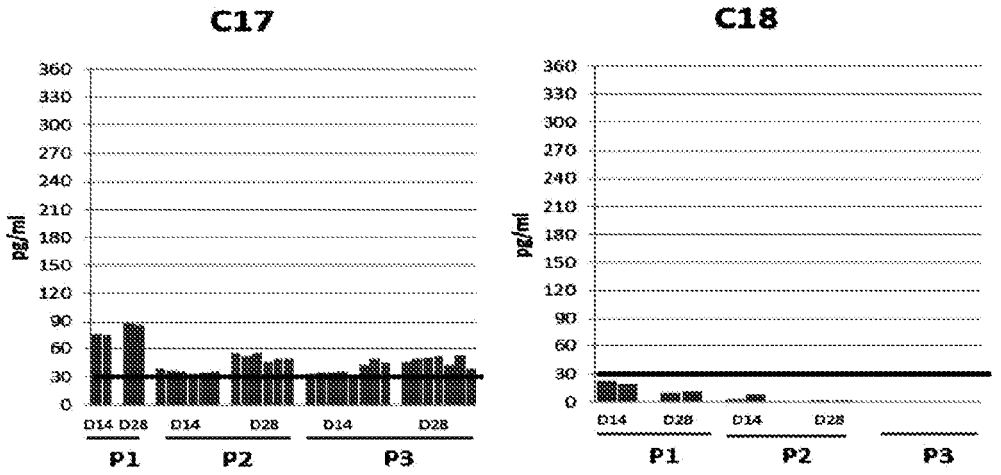
[Fig. 59-B]

Fig. 59–B

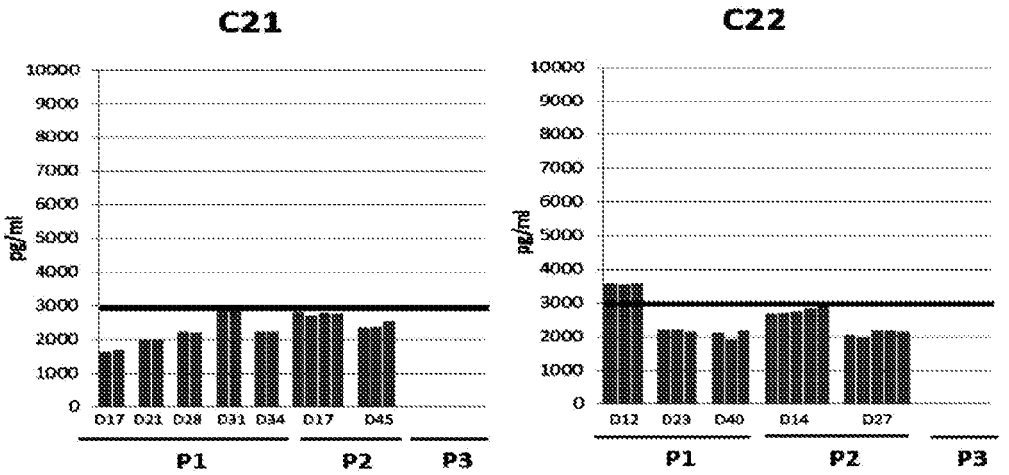
IL-8



PDGF-bb



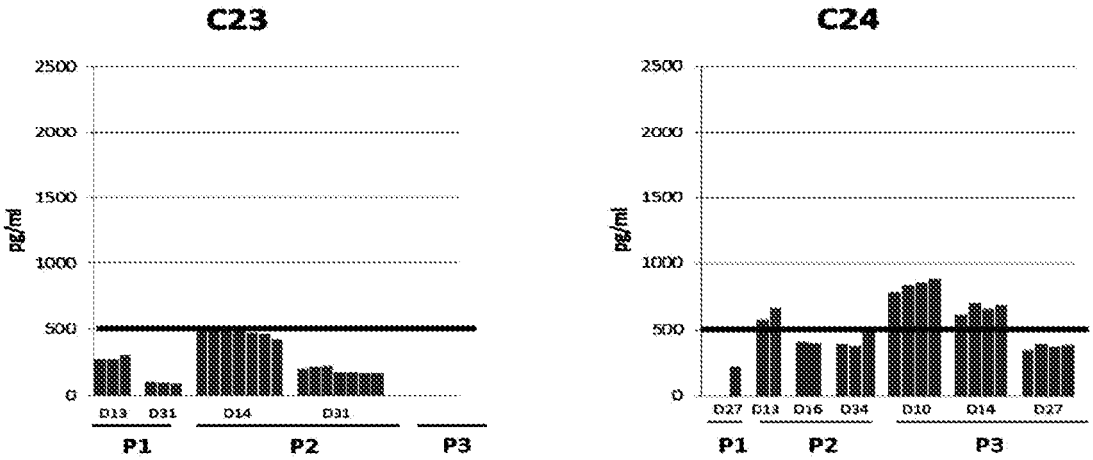
MCP-1



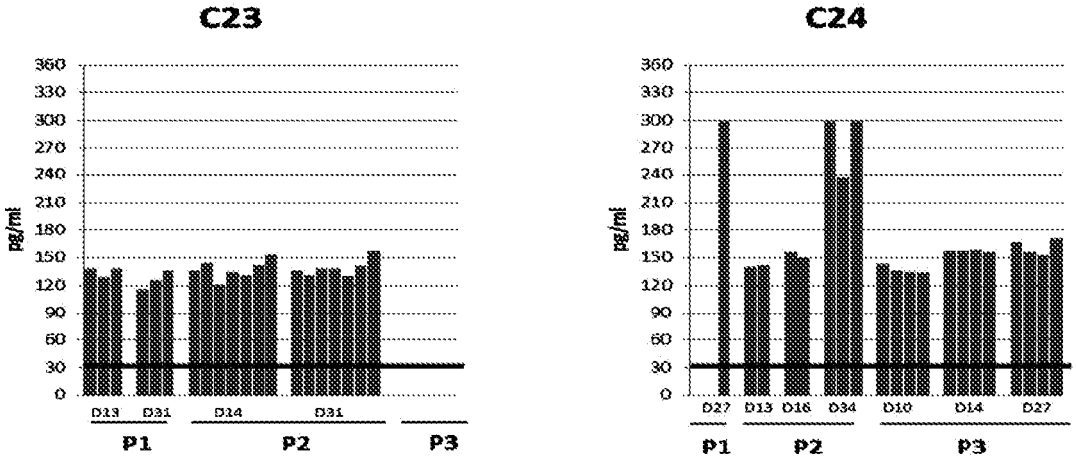
[Fig. 59-C]

Fig. 59-C

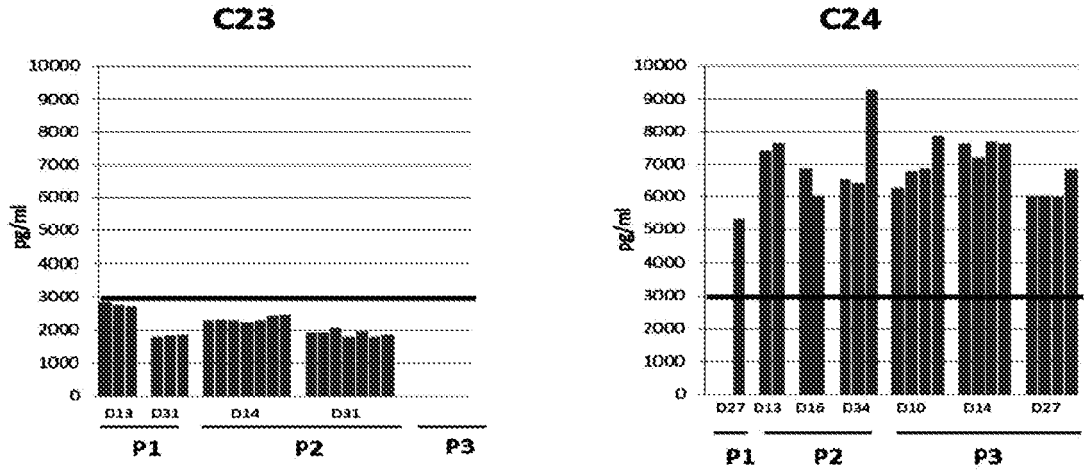
IL-8



PDGF-bb

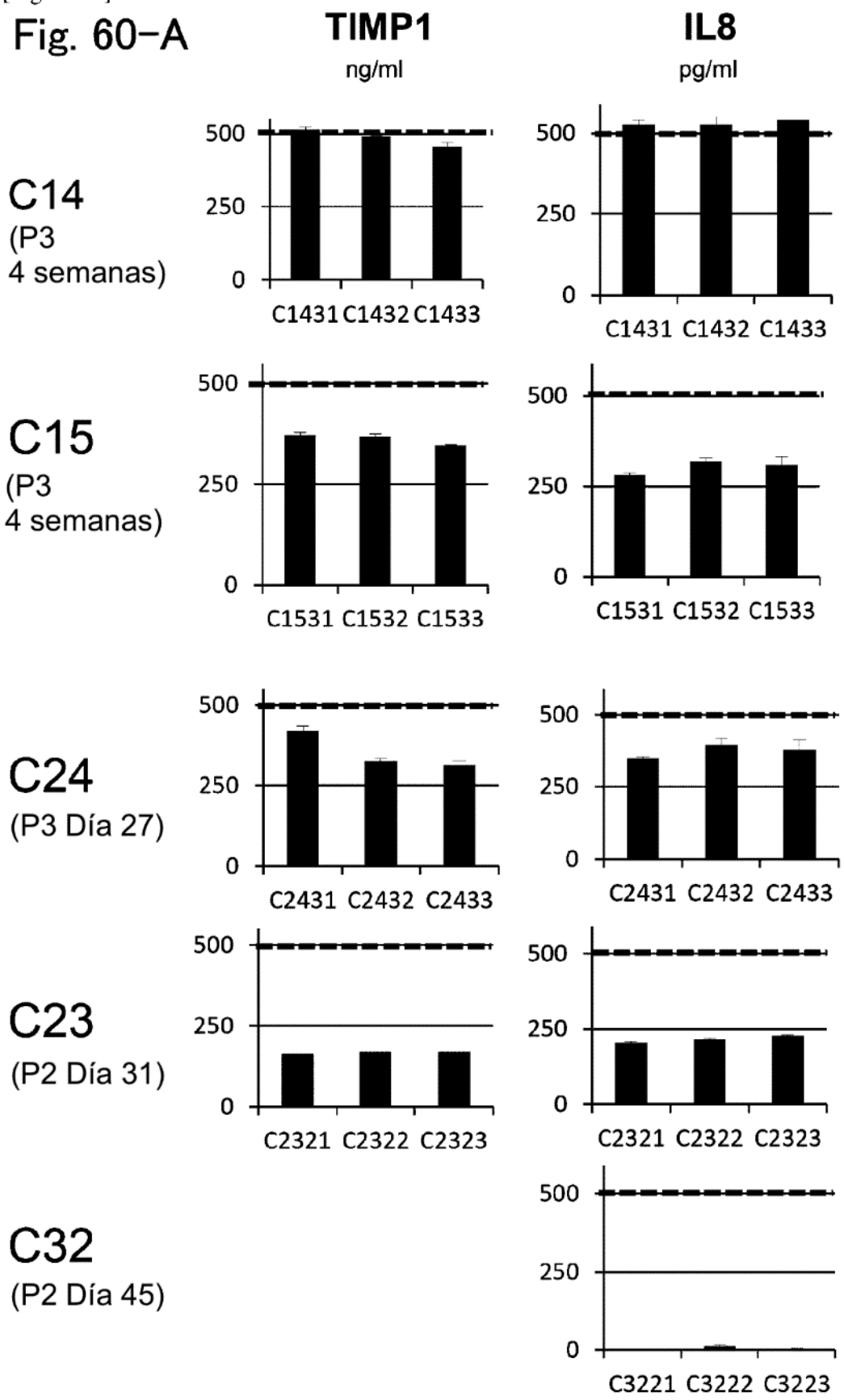


MCP-1



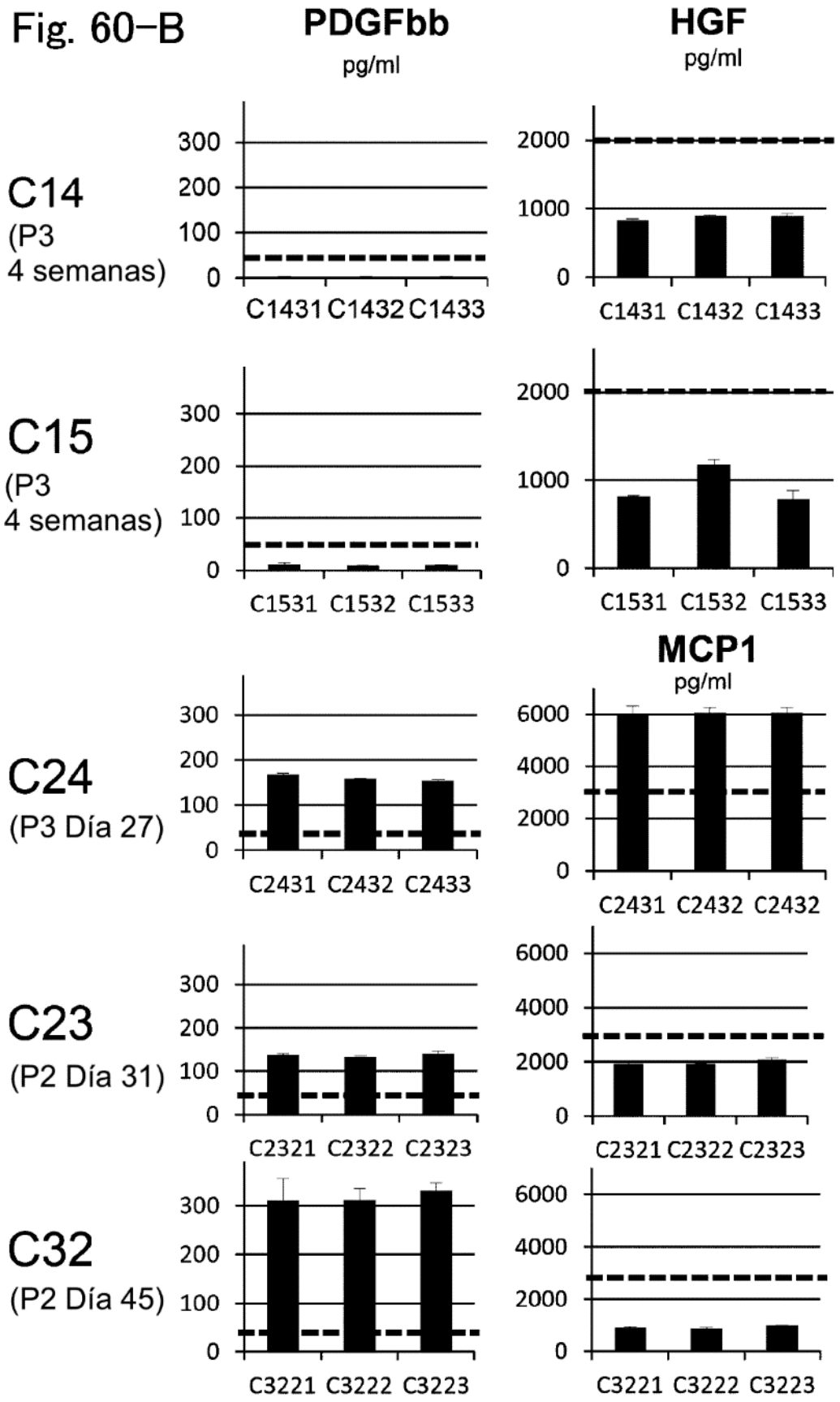
[Fig. 60-A]

Fig. 60−A

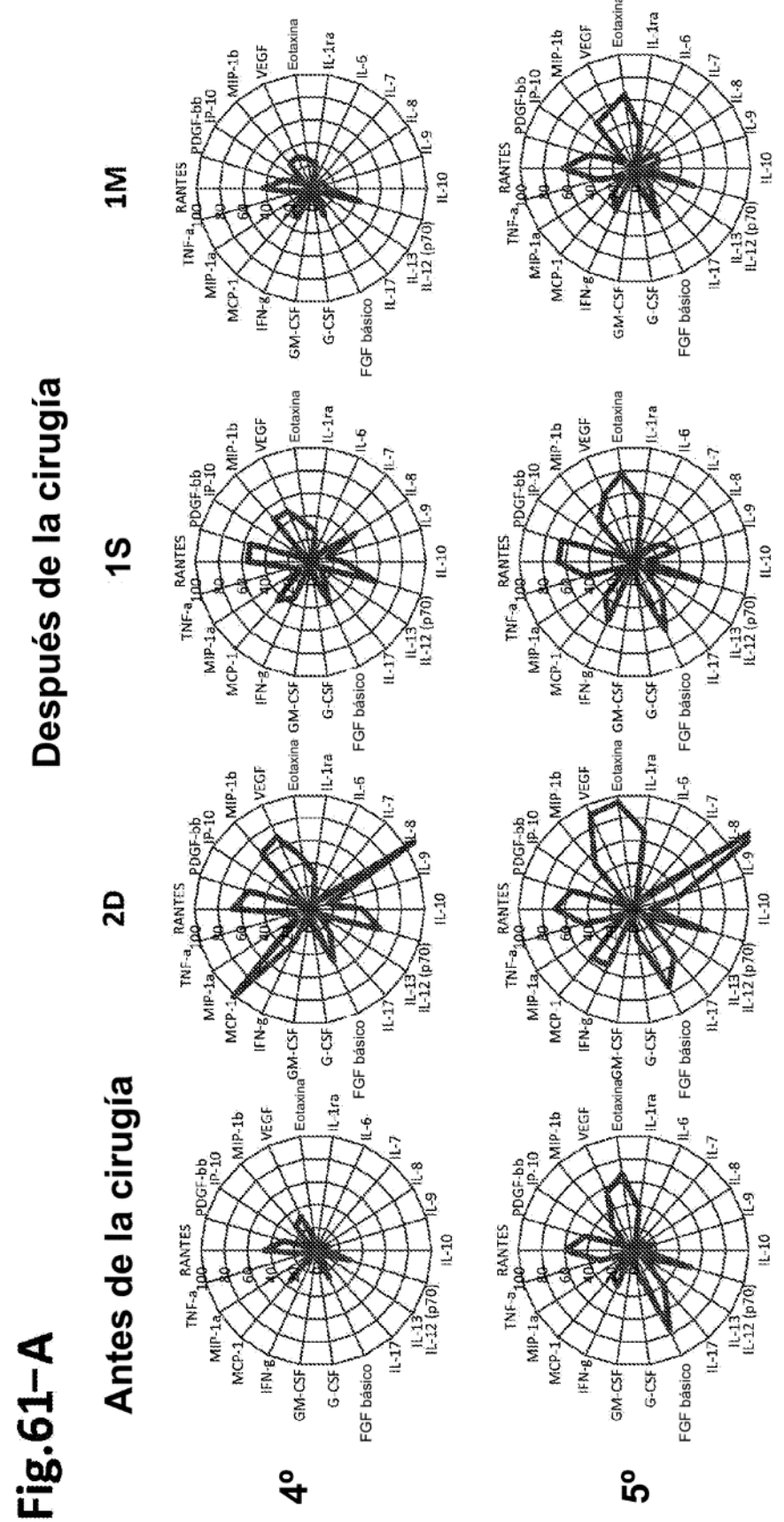


[Fig. 60-B]

Fig. 60−B

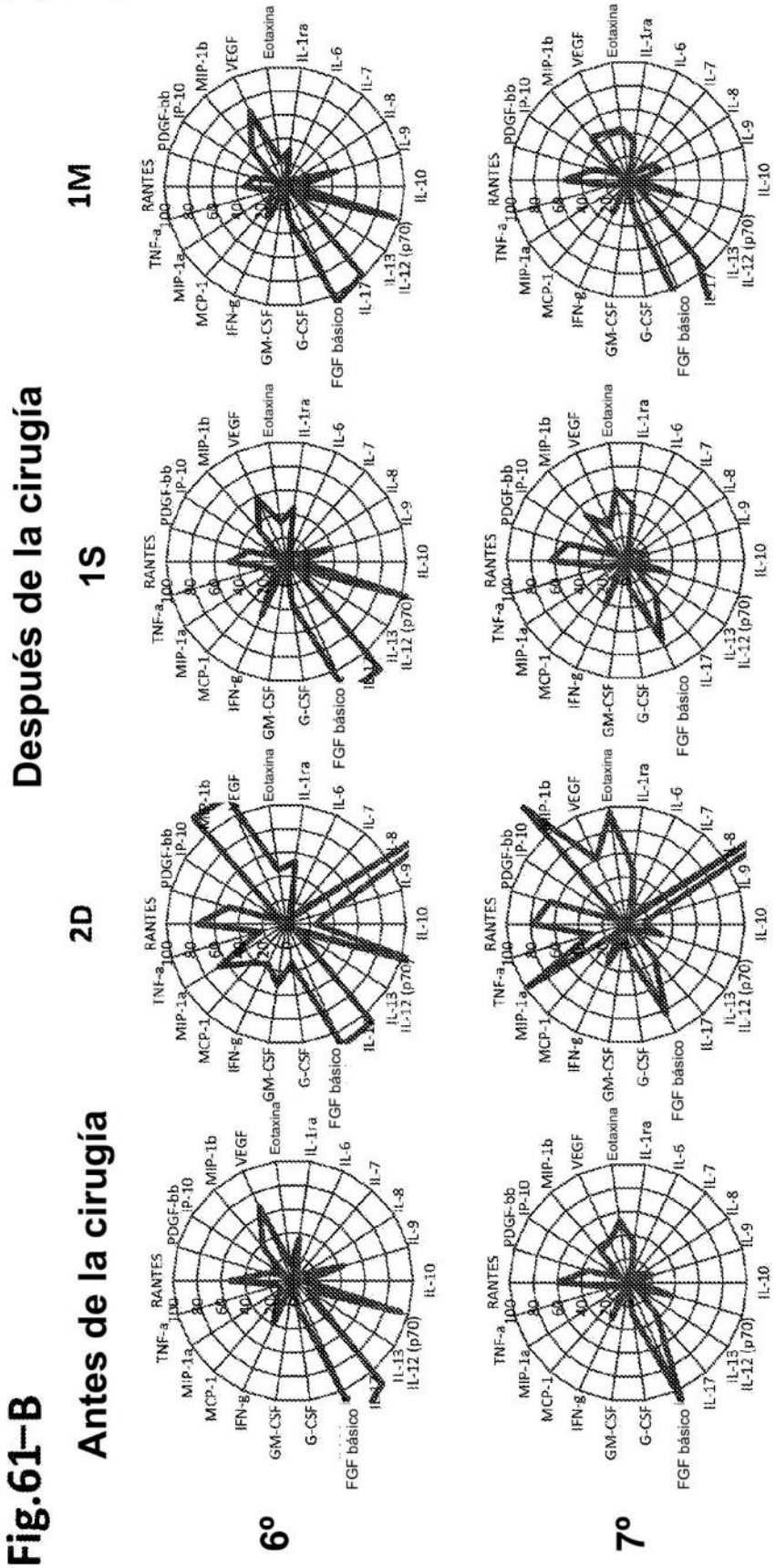


[Fig. 61-A]


Fig.61-A
Antes de la cirugía
Después de la cirugía
2D
1S
1M
4º
5º
TNF-a
RANTES
PDGF-bb
IP-10
MIP-1b
VEGF
Eotaxina
IL-1ra
IL-6
IL-7
IL-8
IL-9
IL-10
IL-12 (p70)
IL-13
IL-17
FGF básico
G-CSF
GM-CSF
IFN-g
MCP-1
MIP-1a

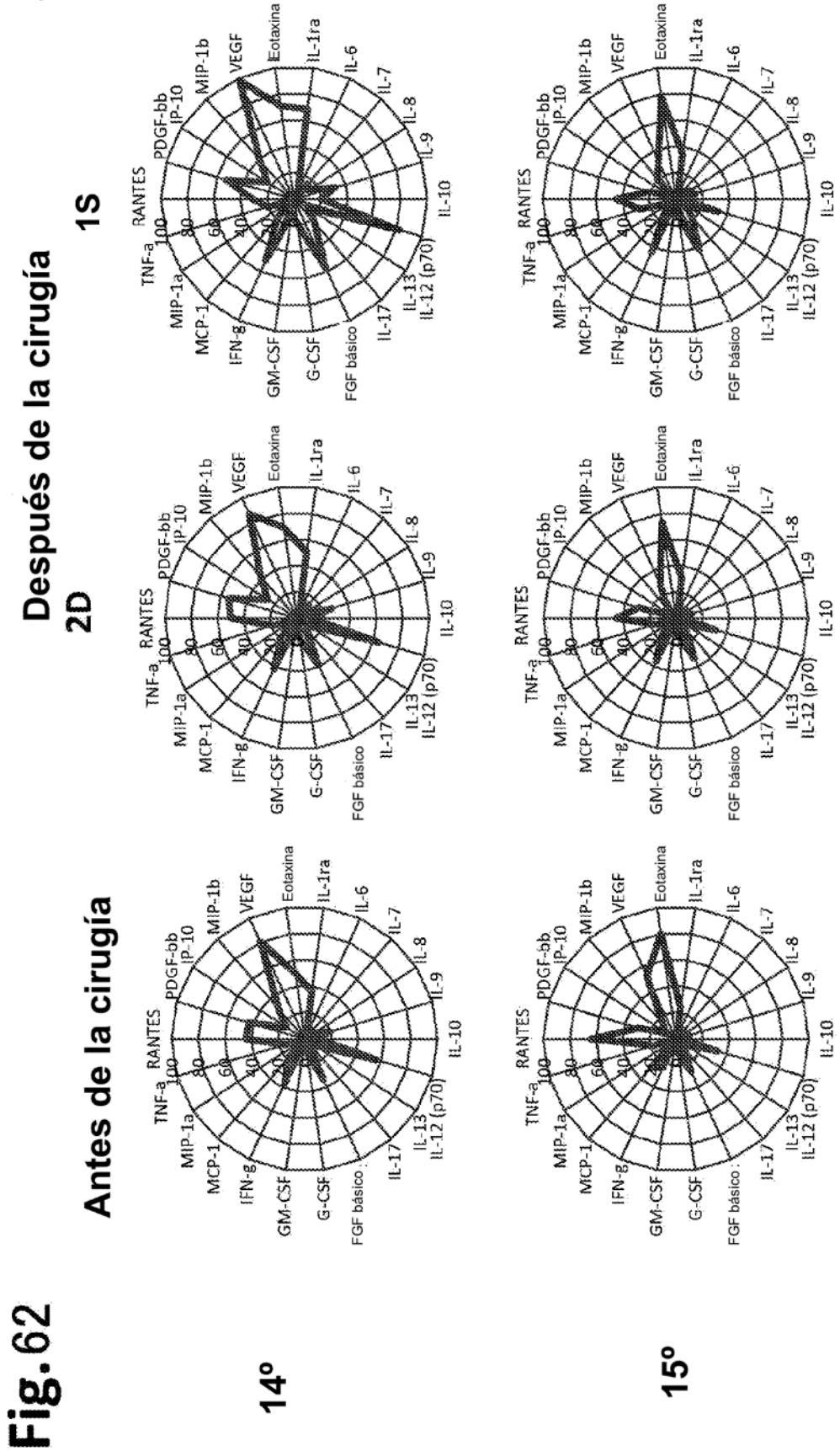
[Fig. 61-B]

Fig.61–B

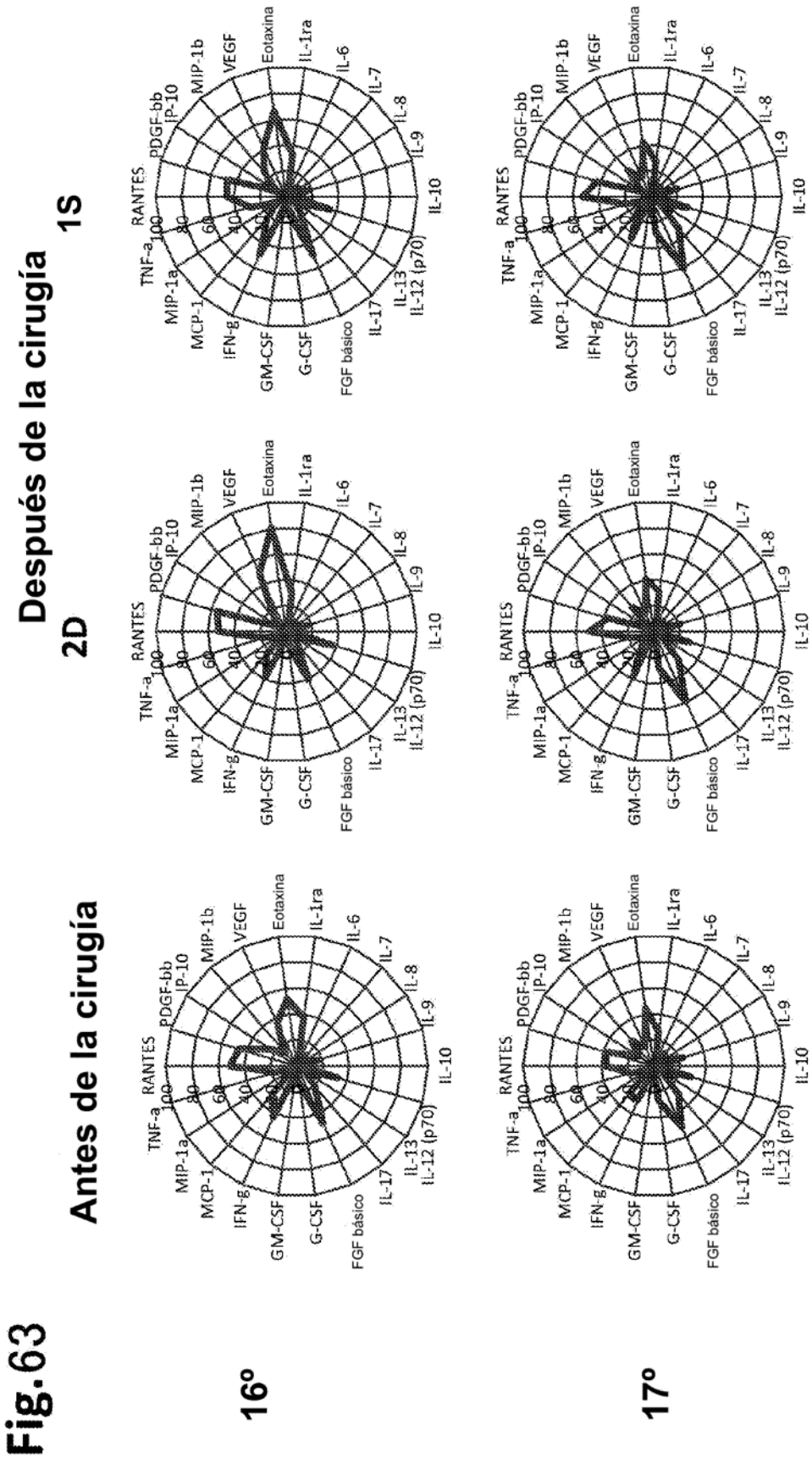


[Fig. 62]

Fig. 62


Antes de la cirugía
Después de la cirugía
1S
2D
14º
15º
TNF-a
RANTES
PDGF-bb
IP-10
MIP-1b
VEGF
Eotaxina
IL-1ra
IL-6
IL-7
IL-8
IL-9
IL-10
IL-12 (p70)
IL-13
IL-17
FGF básico
G-CSF
GM-CSF
IFN-g
MCP-1
MIP-1a
100
80
60
40
20

[Fig. 63]


Fig.63
Antes de la cirugía
Después de la cirugía
16º
17º
2D
1S
TNF-a
RANTES
PDGF-bb
IP-10
MIP-1b
VEGF
Eotaxina
IL-1ra
IL-6
IL-7
IL-8
IL-9
IL-10
IL-12 (p70)
IL-13
IL-17
FGF básico
G-CSF
GM-CSF
IFN-g
MCP-1
MIP-1a

[Fig. 64-A]

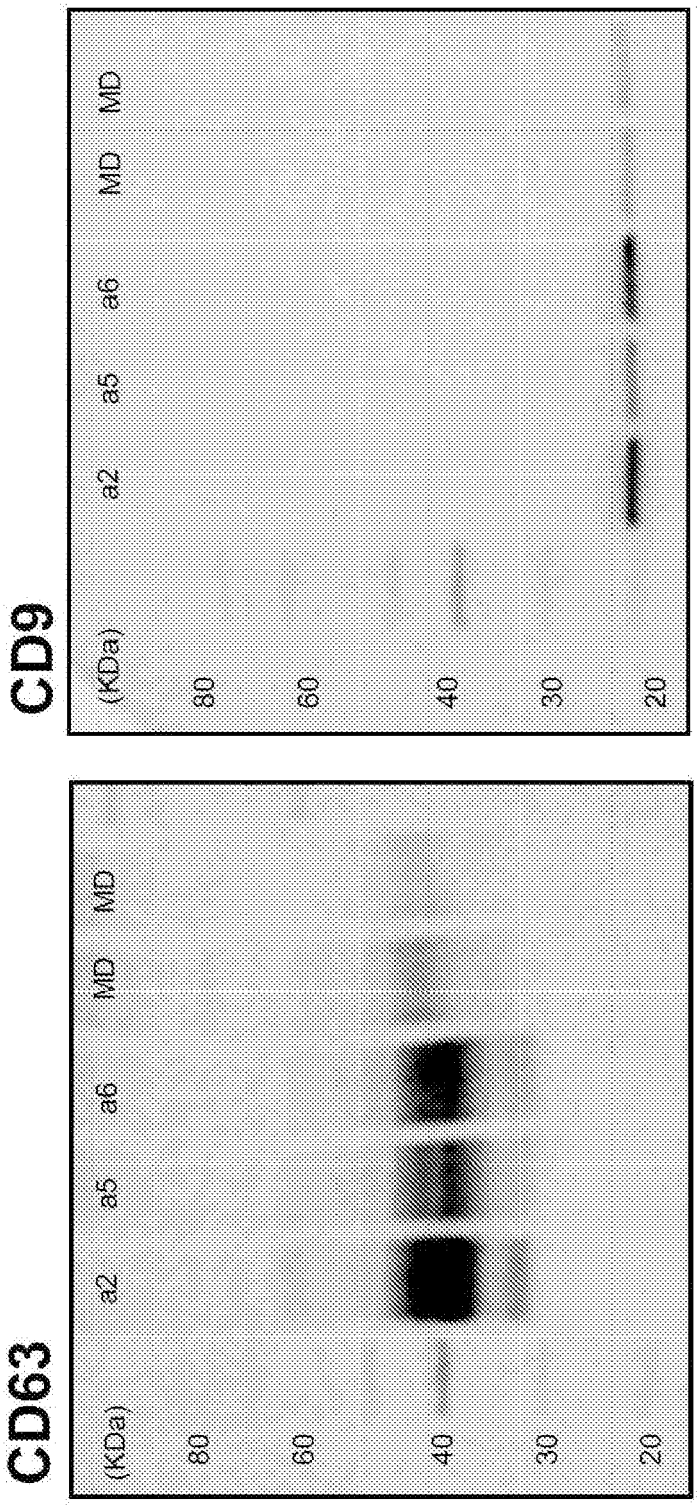
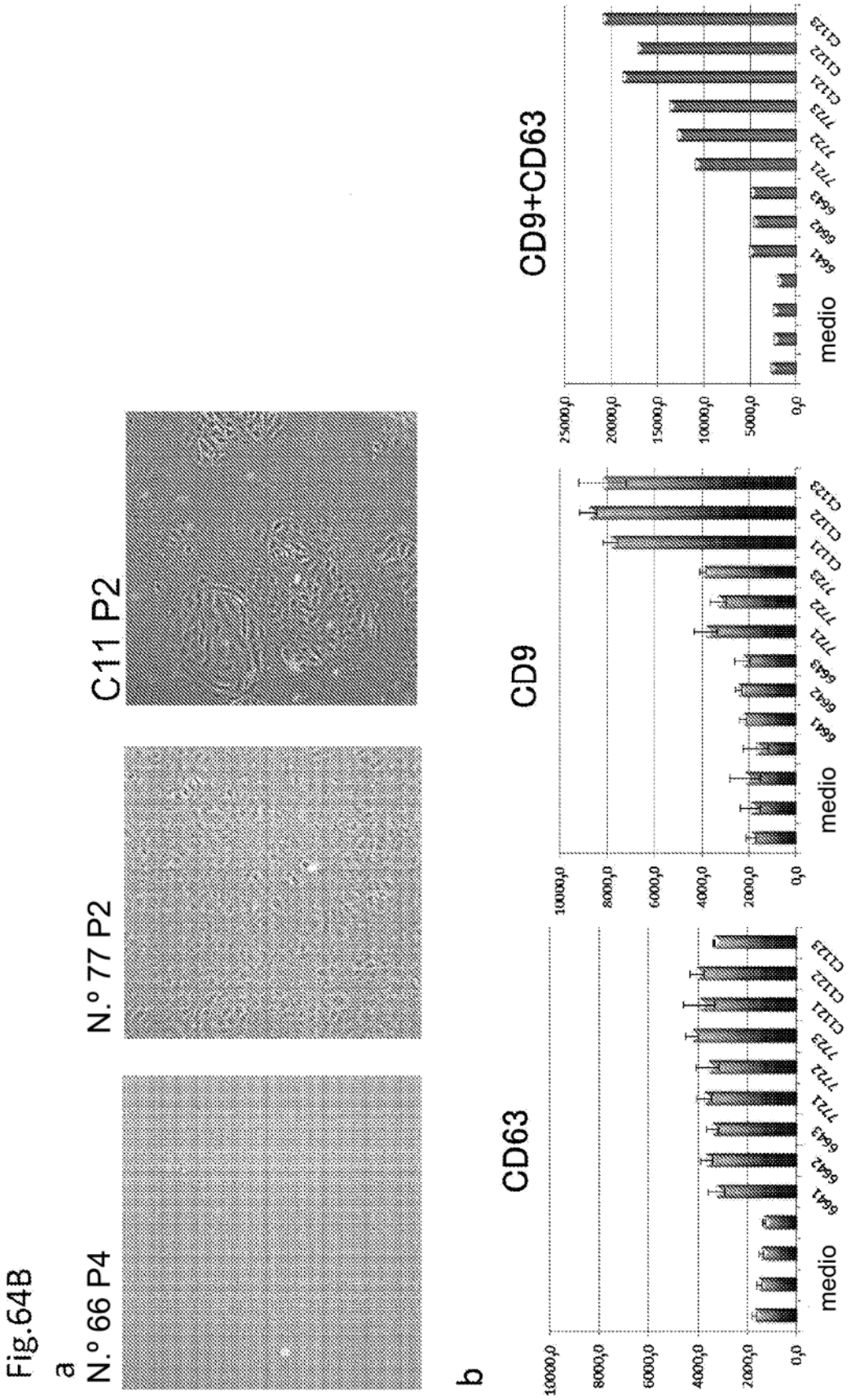
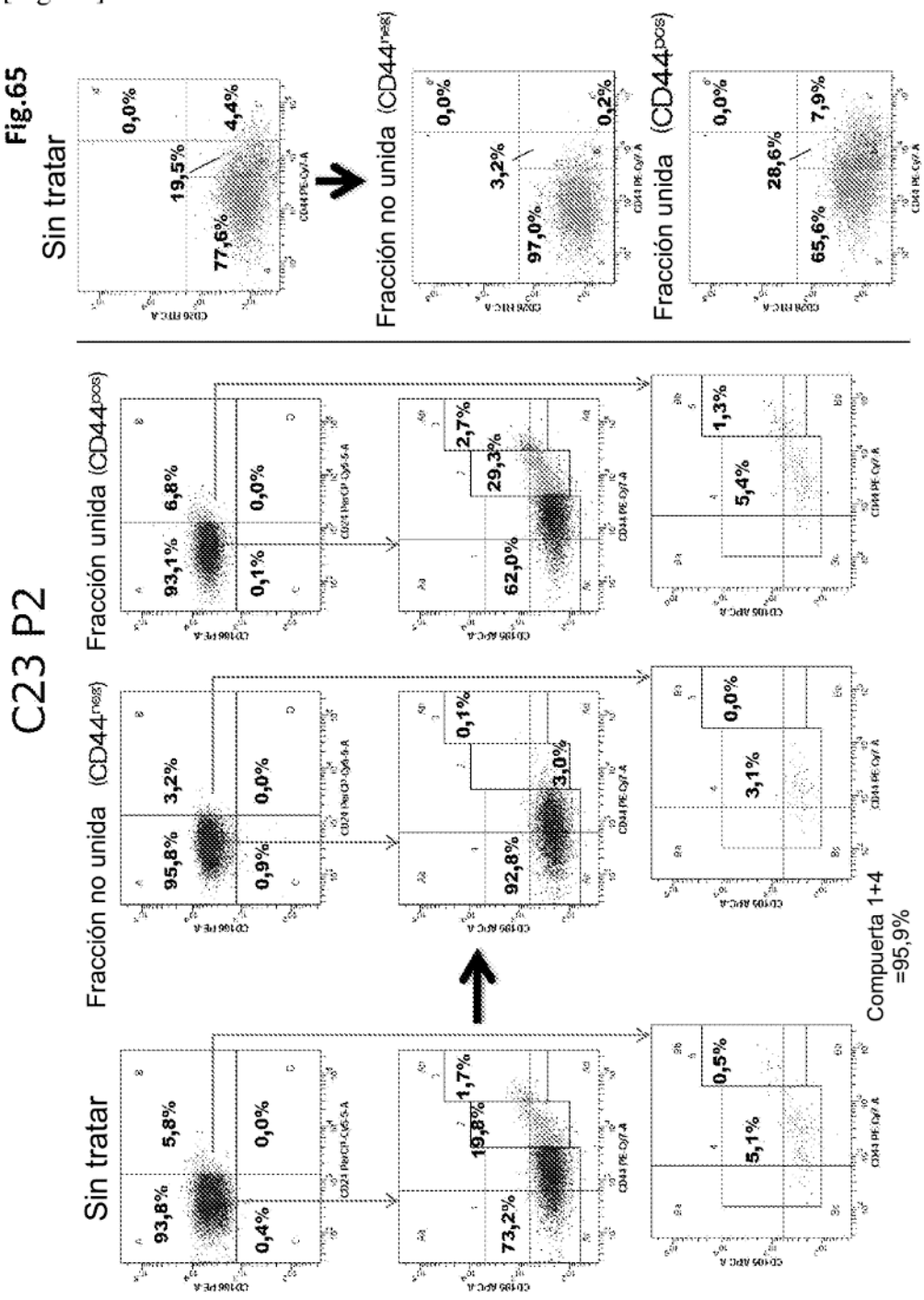


Fig. 64-A

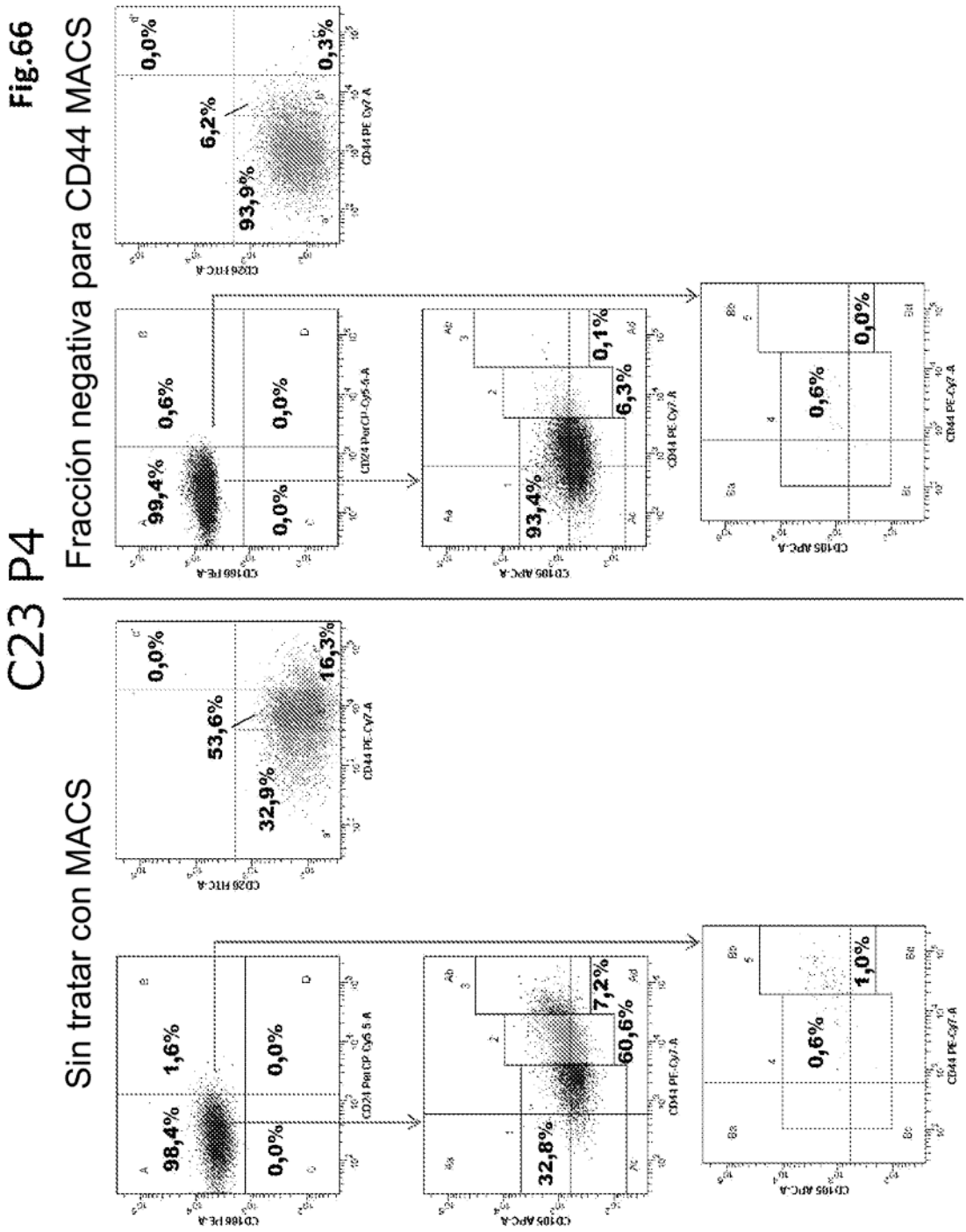
[Fig. 64-B]


Fig.64B
a
N.º 66 P4
N.º 77 P2
C11 P2
b
CD63
CD9
CD9+CD63
medio
664.1
664.2
664.3
772.1
772.2
772.3
C12.1
C12.2
C12.3
10000,0
8000,0
6000,0
4000,0
2000,0
0,0
25000,0
20000,0
15000,0
10000,0
5000,0

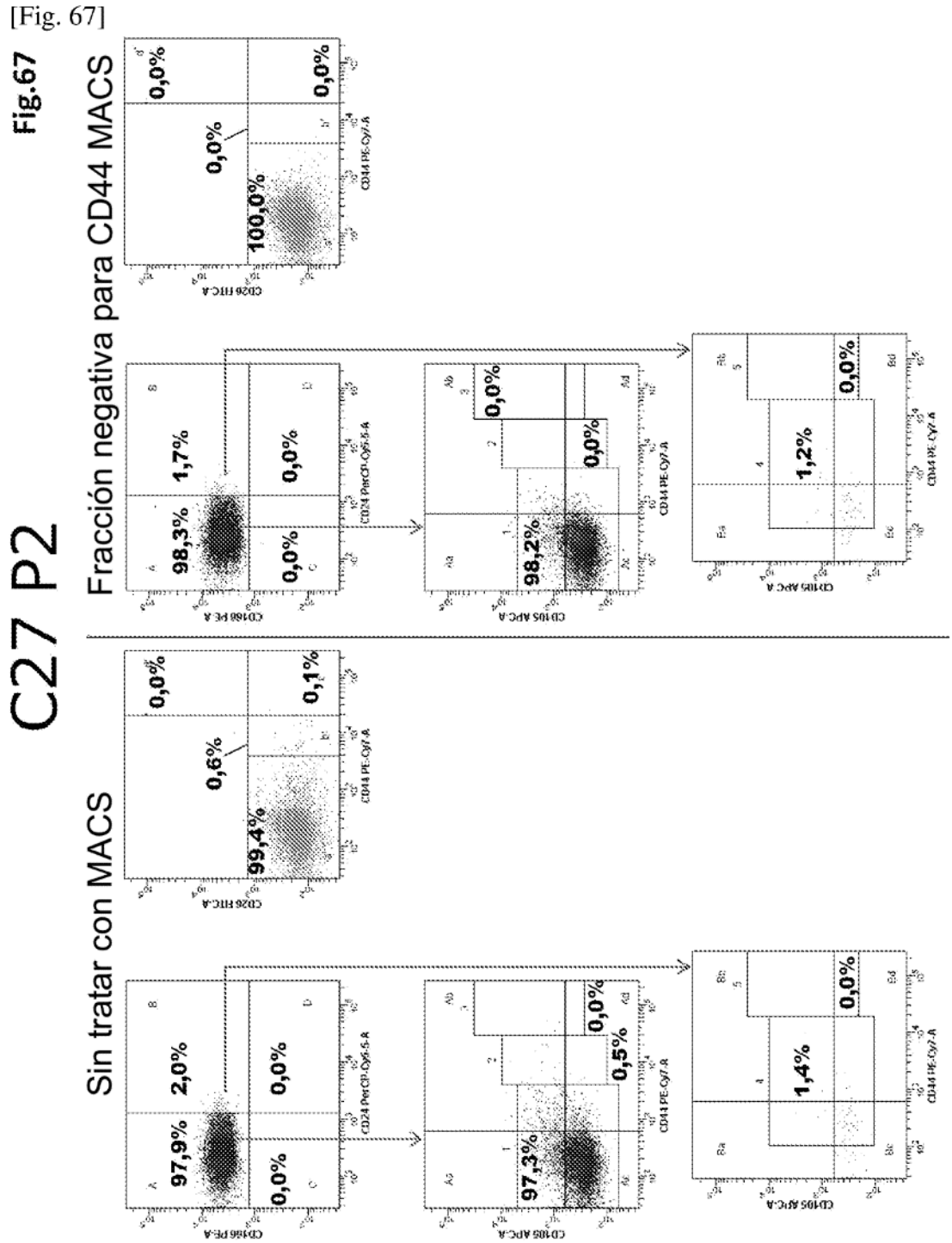
[Fig. 65]


Fig.65
C23 P2
Sin tratar
Fracción no unida (CD44neg)
Fracción unida (CD44pos)
Compuerta 1+4
=95,9%

[Fig. 66]

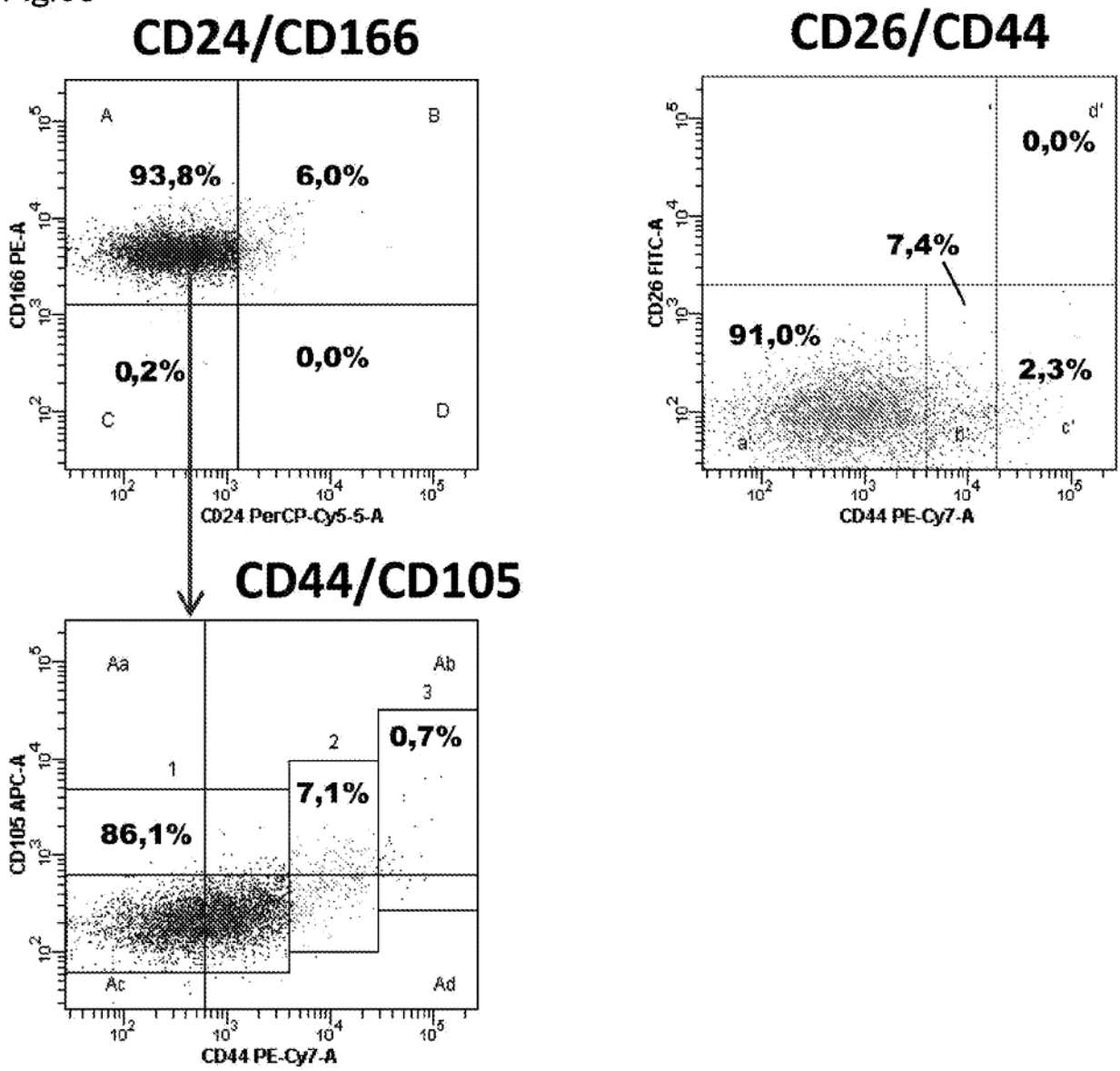

Fig.66
C23 P4
Fracción negativa para CD44 MACS
Sin tratar con MACS
0,0%
6,2%
93,9%
0,3%
99,4%
0,6%
0,0%
0,0%
0,0%
93,4%
6,3%
0,1%
0,6%
0,0%
0,0%
53,6%
32,9%
16,3%
98,4%
1,6%
0,0%
0,0%
32,8%
60,6%
7,2%
0,6%
1,0%
CD26 FITC-A
CD24 PerCP-Cy5-5-A
CD44 PE-Cy7-A
CD105 APC-A

[Fig. 67]


Fig.67
C27 P2
Fracción negativa para CD44 MACS
Sin tratar con MACS
0,0%
100,0%
0,0%
0,0%
98,3%
1,7%
0,0%
0,0%
98,2%
0,0%
0,0%
1,2%
0,0%
0,0%
99,4%
0,6%
0,1%
0,0%
97,9%
2,0%
0,0%
0,0%
97,3%
0,5%
0,0%
1,4%
0,0%

[Fig. 68]

Fig.68


CD24/CD166
A
B
93,8%
6,0%
0,2%
0,0%
C
D
CD166 PE-A
CD24 PerCP-Cy5-5-A
CD26/CD44
d'
0,0%
7,4%
91,0%
2,3%
a
b
c'
CD26 FITC-A
CD44 PE-Cy7-A
CD44/CD105
Aa
Ab
3
2
0,7%
1
7,1%
86,1%
Ac
Ad
CD105 APC-A
CD44 PE-Cy7-A

[Fig. 69]

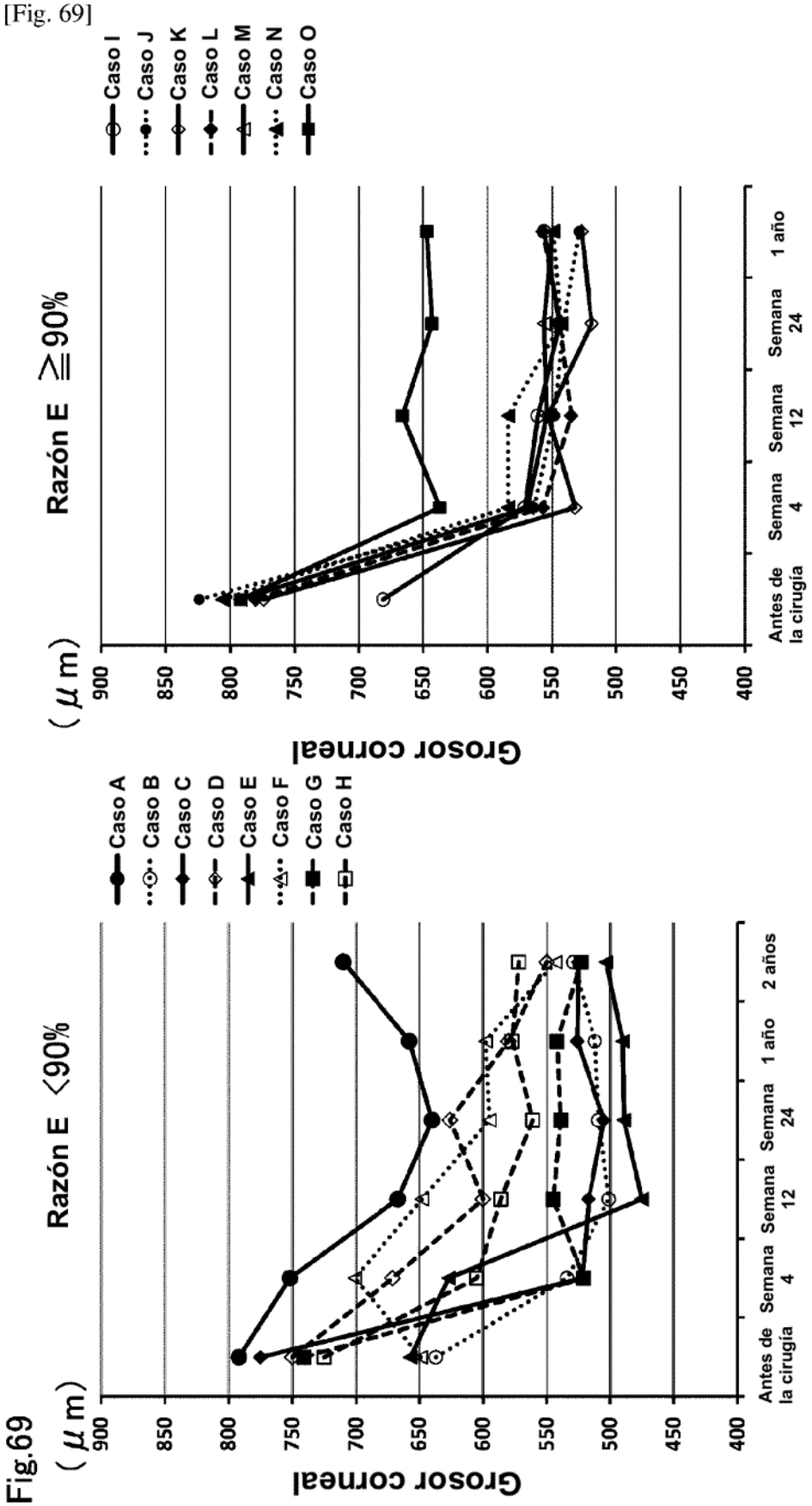

Razón E ≧90%
Caso I
Caso J
Caso K
Caso L
Caso M
Caso N
Caso O
Grosor corneal
(μ m)
900
850
800
750
700
650
600
550
500
450
400
Antes de la cirugia
Semana 4
Semana 12
Semana 24
1 año
Razón E <90%
Caso A
Caso B
Caso C
Caso D
Caso E
Caso F
Caso G
Caso H
Grosor corneal
(μ m)
Antes de la cirugia
Semana 4
Semana 12
Semana 24
1 año
2 años

Fig.69

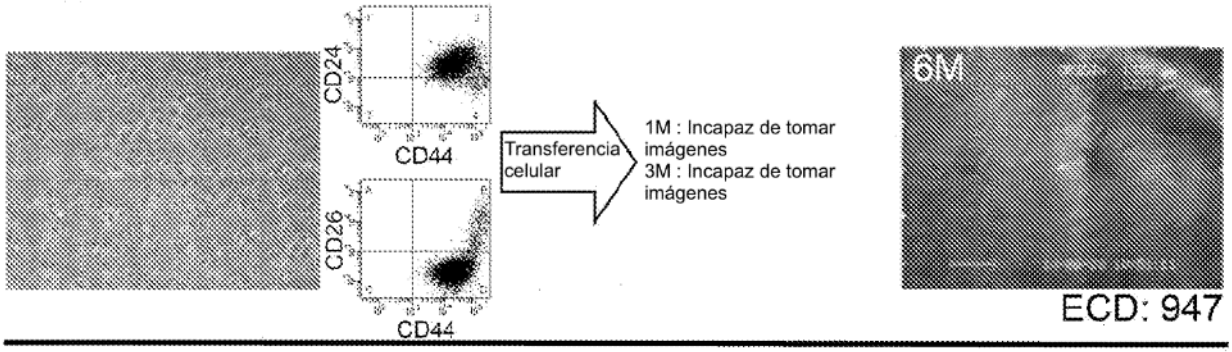
[Fig. 70]

Calidad celular (razón E) y célula endotelial corneal después de la cirugía de infusión celular

Fig.70

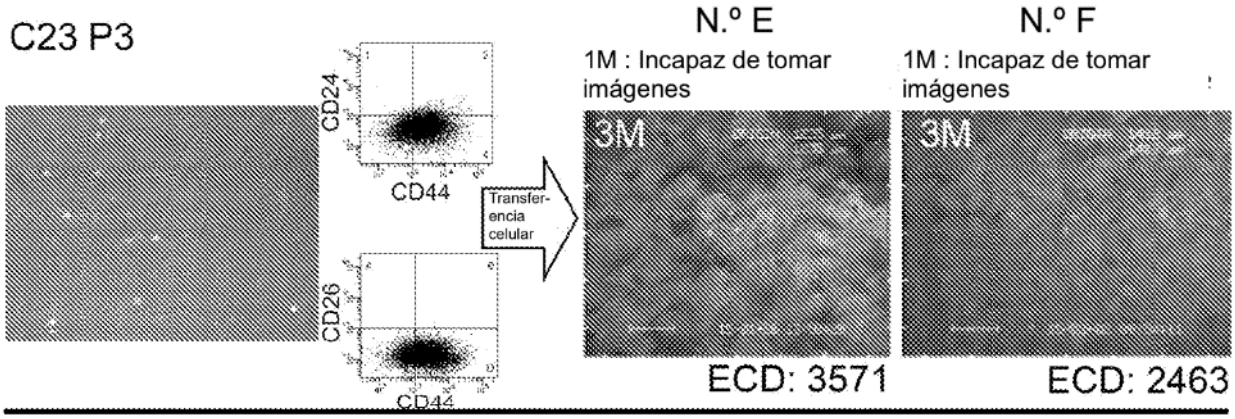
Cirugía de trasplante mediante método convencional

C15 P3



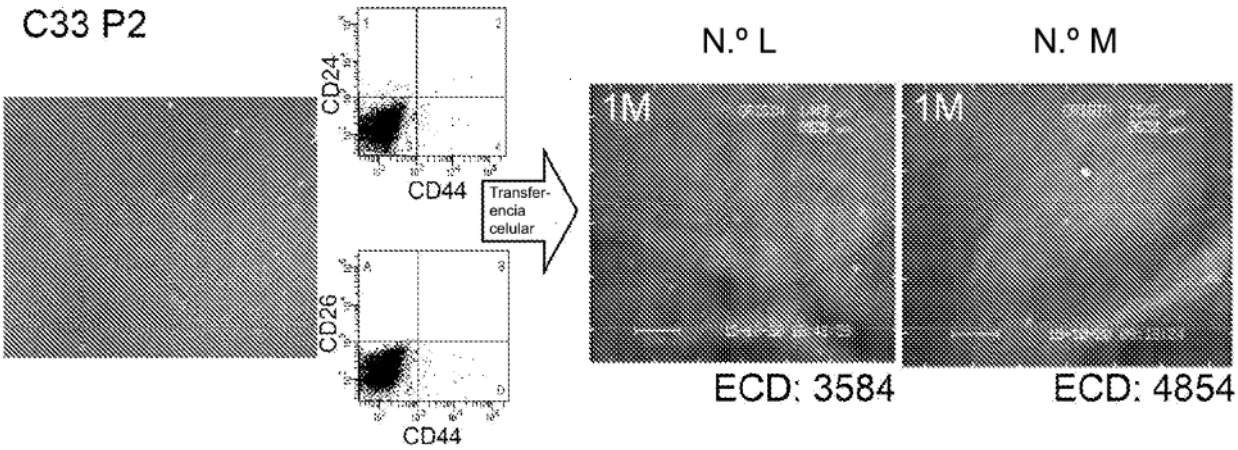
Cirugía de trasplante mediante la presente invención

C23 P3



Cirugía de trasplante mediante la presente invención

C33 P2



[Fig. 71]

Fig.71 QAV libre de urdimbres: Superioridad de la terapia de inyección celular sobre la heterotopía corneal

