

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 527 444**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)
A61K 35/48 (2015.01)
A61K 35/44 (2015.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2008 PCT/IL2008/000556**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08129554**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2008 E 08738258 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **21.02.2018 EP 2147094**

(54) Título: **Células del epitelio pigmentario de la retina derivadas de células madre**

(30) Prioridad:

18.04.2007 US 907818 P

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

17.05.2018

(73) Titular/es:

**HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES & DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)
P.O. BOX 12000 KIRYAT HADASSAH
91120 JERUSALEM, IL**

(72) Inventor/es:

**IDELOSON, MASHA;
ALPER-PINUS, RUSLANA;
OBOLENSKY, ALEX;
BANIN, EYAL;
REUBINOFF, BENJAMIN y
HEMO, YITZCHAK**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

DESCRIPCIÓN

Células del epitelio pigmentario de la retina derivadas de células madre

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y a sistemas de producción de células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) diferenciadas y a usos terapéuticos de las células RPE así obtenidas.

10 Lista de la técnica relacionada

La siguiente lista es una lista de referencias que se consideran relevantes para describir el estado de la técnica en el campo de la invención.

- 15 (1) Strauss O., "The retinal pigment epithelium in visual function"; *Physiol. Rev.* 85: 845-881, 2005.
- (2) Lund R. D. et al., "Cell transplantation as a treatment for retinal disease"; *Prog Retin Eye Res* 20: 415-449, 2001.
- (3) Haruta M., "Embryonic stem cells: potential source for ocular repair"; *Semin Ophthalmol.* 20(1):17-23, 2005.
- (4) Haruta M. et al., "In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells"; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1020-1024,2004.
- 20 (5) Aoki H. et al., "Embryonic stem cells that differentiate into RPE cell precursors *in vitro* develop into RPE cell monolayers *in vivo*"; *Exp Eye Res.* 82(2):265-274, 2006.
- (6) Klimanskaya I. et al., "Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics"; *Cloning Stem Cells* 6(3):217-245, 2004.
- 25 (7) Lund R. D. et al., "Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats"; *Cloning Stem Cells* 8(3):189-199, 2006.
- (8) Publicación de la solicitud PCT Nº WO 06/070370.

30 Antecedentes de la invención

35 La disfunción, el daño y la pérdida de células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) son características destacadas de ciertas enfermedades y trastornos oculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), degeneraciones maculares hereditarias incluyendo la enfermedad de Best (la forma de aparición temprana de la distrofia macular viteliforme) y subtipos de retinitis pigmentosa (RP). Un posible tratamiento para dichas enfermedades es el trasplante de RPE (y fotorreceptores) en la retina de los afectados por las enfermedades. Se cree que la reposición de las células RPE mediante trasplante puede retrasar, detener o revertir la degeneración, mejorar la función de la retina y prevenir la ceguera derivada de dichas afecciones.

40 La mácula, la parte central de la retina, es responsable de la percepción de detalles visuales nítidos y del color, y es fundamental para muchas de nuestras tareas visuales diarias tales como el reconocimiento facial y la lectura. La mácula a menudo se ve afectada como parte del proceso patológico en las degeneraciones retinianas extendidas tales como la retinitis pigmentosa (RP), así como en diferentes enfermedades que se dirigen más específicamente a la región macular, tales como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y la enfermedad de Best. En muchas de estas enfermedades, la disfunción e insuficiencia primaria se produce en células del epitelio pigmentario 45 de la retina (RPE) que subyacen a los fotorreceptores.

50 Las células RPE altamente especializadas desempeñan un papel importante en la función fotorreceptora de apoyo: transportan activamente nutrientes desde los vasos de la coroides, participan en el reciclaje de la vitamina A, que es necesaria para los cromóforos de los fotorreceptores, y absorben y reciclan los segmentos externos de fotorreceptor desprendidos como parte del proceso de renovación normal de estas células¹.

55 En los subtipos de RP, la enfermedad de Best y la AMD, la insuficiencia de las RPE conduce, en última instancia, a la pérdida de visión y ceguera. La sustitución de estas células es una posible intervención terapéutica², pero la obtención de dichas células de donantes o embriones humanos es difícil. Las células madre embrionarias humanas (hESC) pueden servir como posible fuente donante ilimitada de células RPE, siempre que se puedan dilucidar los medios para dirigir su diferenciación en células RPE funcionales³. Ya se han descrito métodos para dirigir la diferenciación de las hESC en cultivos altamente enriquecidos en células precursoras neuronales (NP) (Reubinoff B. E. et al., "Neuronal progenitors from human embryonic stem cells"; *Nat Biotechnol* 19: 1134-1140, 2001; Itsykson P. et al., "Derivation of neuronal precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin"; *Mol Cell Neurosci.* 30(1):24-36, 2005). Además, se ha demostrado el potencial de las hESC para dar lugar a células de la retina tanto *in vitro* como *in vivo* tras el trasplante en el espacio subretiniano de roedores (Banin E. et al., "Retinal Incorporation and Differentiation of Neuronal Precursors Derived from Human Embryonic Stem Cells"; *Stem Cells* 24(2):246-257, 2006).

65 Se ha demostrado el potencial de las ESC murinas y de primate no humano para diferenciarse en células RPE, y sobrevivir y atenuar la degeneración de la retina después del trasplante^{4,5}. Se ha observado la diferenciación

espontánea de las células hESC en células RPE. Sin embargo, la eficacia del proceso de diferenciación fue baja, requiriéndose un tiempo de diferenciación considerable y obteniéndose solo un bajo porcentaje (<1 %) de agrupaciones que contenían células RPE tras 4-8 semanas de diferenciación. Además, aunque se observó una mejor función de la retina en ratas RCS tras el trasplante subretiniano de estas células RPE, no se demostró la función de las células transplantadas como auténticas células RPE maduras, y este efecto se podría relacionar con un efecto trófico inespecífico del RPE^{6,7,9,10}.

También se ha demostrado recientemente que es posible dirigir las células hESC para que se diferencien de forma reproducible en células RPE, produciéndose la diferenciación dirigida en lugar de espontánea de las hESC en células RPE en presencia de nicotinamida (NA)⁸.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de inducción de la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes humanas en el epitelio pigmentario de la retina (RPE), método que comprende:

- a. cultivar células madre pluripotentes humanas en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con nicotinamida (NA) durante al menos dos semanas para generar células en diferenciación; y
- b. cultivar dichas células en diferenciación en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de transformación β (TGF β), mediante lo que dichas células madre pluripotentes humanas son inducidas a la diferenciación en células RPE.

Se proporciona un cultivo celular que comprende células RPE obtenidas mediante la diferenciación dirigida de las hSC en presencia de uno o más miembros de la superfamilia de TGF β . Preferentemente, las células RPE son células RPE diferenciadas terminalmente (maduras) obtenidas mediante el método desvelado en el presente documento. Como se mostrará en el presente documento, dichas células RPE presentan varios rasgos característicos que son diferentes de los obtenidos cuando las hSC se diferencian de forma espontánea en células RPE. Preferentemente, las células RPE son capaces de responder a la señalización de TGF β durante su diferenciación.

Se desvela un método de trasplante de células RPE derivadas de células hSC en el ojo de un sujeto, obteniéndose dichas células RPE por diferenciación dirigida de dichas células hSC, método que comprende

- (a) proporcionar un cultivo celular que comprende las células hSC;
- (b) cultivar dicho cultivo celular en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con uno o más miembros de la superfamilia de TGF β , mediante lo que dichas hSC son inducidas a diferenciarse en células RPE;
- (c) recoger de dicho cultivo celular células RPE; y
- (d) trasplantar dichas células RPE en el ojo de dicho sujeto.

Se proporciona un sistema de cultivo celular que comprende células RPE derivadas de células hSC trasplantables obtenidas mediante la diferenciación dirigida de dichas células hSC. Las células RPE trasplantadas presentaron uno o más parámetros indicativos de que dichas células trasplantadas son funcionales en el ojo de dicho sujeto. La funcionalidad de las células RPE trasplantadas se muestra por su capacidad de absorción de segmentos externos de fotorreceptor desprendidos en paralelo a la mejora de la función retiniana.

Las células hSC del sistema de cultivo de los métodos desvelados en el presente documento son células hSC en diferenciación, es decir, una población de hSC esencialmente en un estado no diferenciado, o en las que al menos parte de dichas células han sido inducidas a someterse a las etapas iniciales de la diferenciación dirigida y, a veces, la mayoría de dichas células ha sido inducida a someterse a las etapas iniciales de la diferenciación dirigida. De acuerdo con una realización, la etapa inicial de la diferenciación se consigue exponiendo previamente las células a NA, aunque las etapas iniciales de diferenciación también se producirán cuando las células no diferenciadas se expongan conjuntamente a NA y al uno o más miembros de la superfamilia de TGF β . Sin quedar ligados a teoría alguna, se postula que la exposición previa a NA (previa a la incubación con el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β) estimula a las células hacia la diferenciación dirigida (en contraposición con la diferenciación espontánea) en células RPE con morfología específica del RPE, como se describe más adelante.

De acuerdo con una realización preferida, las hSC pluripotentes son células madre embrionarias humanas (hESC).

De acuerdo con una realización, el cultivo de células en un medio que comprende uno o más miembros de la superfamilia de TGF β tiene lugar al menos dos semanas después de que las células hSC hayan iniciado la diferenciación, la diferenciación dirigida, preferentemente dirigida por NA.

Se desvela un método de tratamiento o prevención en un sujeto de una enfermedad o un trastorno de la retina que comprende la disfunción, lesión y/o pérdida del epitelio pigmentario de la retina, método que comprende el trasplante intraocular a dicho sujeto de células RPE derivadas de hSC, obteniéndose las células RPE mediante la inducción de las hSC hacia la diferenciación dirigida. Las células RPE trasplantables se obtienen preferentemente mediante el

5 método desvelado en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

10 Para entender la invención y demostrar cómo se puede llevar a cabo en la práctica, a continuación, se describirá una realización preferida, únicamente a modo de ejemplo no limitante, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

15 Figuras 1A-1E: PCR en tiempo real que analiza la expresión de marcadores de RPE en presencia de NA. Se indujo la diferenciación de células hESC cultivándolas como agrupaciones en flotación libre. A las 6 semanas de diferenciación, el nivel de expresión de los marcadores de RPE MiTF-A (Fig. 1A) y RPE65 (Fig. 1B) había aumentado significativamente en presencia de NA. El análisis de PCR en tiempo real en puntos temporales secuenciales demostró el aumento progresivo de los niveles de expresión de MiTF-A (Fig. 1C) y RPE65 (Fig. 1D) a lo largo del tiempo en presencia de NA. Se demostró la expresión de transcripciones adicionales de marcadores de RPE incluyendo bestrofina, CRALBP y MerTK mediante el análisis de RT-PCR de las agrupaciones pigmentadas sembradas (Fig. E). +/- indica la presencia o ausencia, respectivamente, de la transcriptasa inversa.

20 Figuras 2A-2F: El efecto inductor de la diferenciación de RPE de NA no depende de una determinada composición del medio. Micrografías de campo oscuro de las agrupaciones de hESC en diferenciación 12 semanas en medio KO (Fig. 2A) o en medio neurobasal suplementado con N₂, que se sustituye tras 1 semana con DMEM/F12 suplementado con B27 (medio NN) (Fig. 2C). En ambos medios, NA aumentó la diferenciación hacia células pigmentadas (Fig. 2B, D), aunque el tamaño de las agrupaciones de hESC diferenciadas y su número total fue menor con medio NN (las flechas blancas marcan las zonas pigmentadas de los grupos en diferenciación). En el nivel de ARN, en ambos medios, la suplementación con NA mejoró el nivel de expresión de MiTF-A y RPE65 (Fig. 2E y F; respectivamente).

25 Figuras 3A-3L: Las células que expresan melanina en las agrupaciones en flotación libre de hESC son células RPE putativas. Micrografía de campo oscuro de agrupaciones en flotación libre de hESC en diferenciación con zonas definidas altamente enriquecidas en células pigmentadas (Fig. 3A). Imágenes de fluorescencia (Fig. 3B) y de contraste de fases (Fig. 3C) de las células pigmentadas tras la disociación y la siembra que son inmunorreactivas con anti Otx2 y MiTF. Se muestra una micrografía de campo oscuro de agrupaciones en diferenciación tras la siembra que ilustra zonas pigmentadas confinadas (Fig. 3D). Imagen de contraste de fase de las células de las zonas pigmentadas que tienen características morfológicas típicas de las células RPE (Fig. 3E). Tinciones de inmunofluorescencia indirecta que muestran que estas células expresan marcadores de células RPE, incluyendo MiTF (Fig. 3F), ZO-1 (Fig 3G), Bestrofina (Fig 3H), RPE65 (Fig. 3I) y CRALBP (Fig 3J). Tras la disociación, la siembra a baja densidad y el cultivo, las células pigmentadas pierden pigmentación y adquieren morfología de tipo fibroide (Imagen de contraste de fase) (Fig. 3K). Tras un nuevo cultivo prolongado y la proliferación en cultivos de alta densidad, las células vuelven a adquirir la morfología y la pigmentación características de las células RPE (Fig. 3L).

30 Figuras 4A-4E: La activina A induce la diferenciación de RPE. Se permitió la diferenciación de células ESC humanas en forma de agrupaciones en flotación libre durante 6 semanas en ausencia o presencia de activina A, que se suplementó tras la primera semana de diferenciación. Las micrografías de campo oscuro de las agrupaciones muestran que la activina A aumentó significativamente el porcentaje de agrupaciones que incluían células pigmentadas (Fig. 4A, B) (las flechas blancas marcan las zonas pigmentadas de las agrupaciones en diferenciación y los bordes de las zonas pigmentadas de algunas de las agrupaciones están marcados por líneas discontinuas). En presencia de activina A, los bordes de las zonas pigmentadas están mejor delimitados con respecto a las zonas circundantes no pigmentadas del interior de las agrupaciones. Además, las células pigmentadas son más oscuras en presencia de activina A (Fig. 4B). A nivel del ARN, el análisis de PCR en tiempo real mostró que la expresión de RPE65 (Fig. 4D) y bestrofina (Fig. 4E) mejora significativamente en presencia de la activina A. La expresión de MiTF-A no fue modificada por el tratamiento con activina A (Fig. 4C).

35 Figuras 5A-5G: BMP y TGF β 3 tienen un papel en la diferenciación de RPE. Se indujo la diferenciación de ESC humanas en forma de agrupaciones en flotación libre durante 6 semanas. La diferenciación espontánea en células pigmentadas se observó con poca frecuencia (Fig. 5A), pero aumentó significativamente al suplementar el medio con NA (Fig. 5B, imágenes de campo oscuro del extremo izquierdo y de la izquierda; las flechas blancas marcan las zonas pigmentadas de las agrupaciones en diferenciación). La suplementación del medio con nogina bloqueó la diferenciación en células pigmentadas tanto en ausencia (Fig. 5D) como en presencia de NA (Fig. 5C). A nivel del ARN, el análisis de PCR en tiempo real mostró que la nogina redujo los niveles de expresión de MiTF-A tanto en presencia como en ausencia de NA (Fig. 5E). Cuando se añadió TGF β 3 al medio de cultivo durante la diferenciación de las agrupaciones de hESC en presencia de NA, aumentaron significativamente los niveles de expresión de MiTF-A (Fig. 5F), pero no de RPE65 (Fig. 5G).

40 Figura 6A-6J: Supervivencia e integración de células RPE derivadas de hESC trasplantadas en ojos de rata. Tras el trasplante intraocular de células RPE derivadas de hESC, se pudieron identificar fácilmente las células pigmentadas *in vivo* en los ojos de ratas albinas (Fig. 6A, 6B). Tras la enucleación del ojo (Fig. 6B) y la retirada de la córnea y del cristalino, se pudo observar el injerto principal, así como manchas pigmentadas dispersas

adicionales (Fig. 6C). En las secciones histológicas, se pudieron identificar injertos que incluían células pigmentadas oscuras que también co-expresaban GFP (Fig. 6D-6G), lo que demuestra el hecho de que las células derivaban de hESC. Se pudieron encontrar células trasplantadas en la zona intravítreo, entre la retina y el cristalino (Fig. 6H), en la retina (sobresaliendo ocasionalmente en el humor vítreo a lo largo del tracto de inyección) (Fig. 6I), y también en el espacio subretiniano (Fig. 6I, 6O, 6P). Las células RPE derivadas de hESC trasplantadas (células pigmentadas marcadas con flechas) se integraron en la capa de RPE de ratas albinas (Fig. 6J). No se observaron células pigmentadas en la capa de RPE de los otros ojos de control no trasplantados. En los injertos, la inmunotinción con ZO-1 (Fig. 6K-6N) demostró que las células derivadas de hESC GFP+ trasplantadas estaban firmemente unidas. Dichas uniones son características de las células RPE. Tras el trasplante en el espacio subretiniano de ratas RCS con disfunción del RPE y degeneración de la retina, se pudo observar la preservación relativa de la capa de fotorreceptor en las proximidades del injerto (Fig. 6O; la zona del interior del rectángulo está marcada por un asterisco, y ampliada en la Fig. 6P), en comparación con las zonas alejadas del injerto (marcadas con flechas). Cabe destacar las grandes células RPE derivadas de hESC trasplantadas con forma poligonal y de aspecto parecido a adoquines (Fig. 6P) (asterisco). En todos los casos mostrados en el presente documento, las células RPE se obtuvieron de hESC en ausencia de activina-A.

Figura 7: Los registros electrorretinográficos muestran que el trasplante de células RPE derivadas de hESC proporciona el rescate de la función retiniana en los ojos de ratas RCS distróficas. Las respuestas ERG de campo completo son más elevadas en los ojos de ratas RCS tras un trasplante de células RPE derivadas de hESC en comparación con los otros ojos de control no trasplantados ($n = 11$ ratas). Las células RPE usadas en estos experimentos se obtuvieron sin adición de activina A al medio de cultivo. Se muestran amplitudes de onda b de las respuestas mixtas de conos y bastones adaptados a la oscuridad a cuatro estímulos de intensidad creciente.

Figuras 8A-8I: Análisis de la morfología y expresión de marcador que muestra el efecto de NA en la inducción del desarrollo de células pigmentadas de hESC. Micrografías de campo oscuro que muestran la aparición progresiva de células pigmentadas durante el cultivo de agrupaciones derivadas de hESC durante 4 semanas (Fig. 8A, 8B), 6 semanas (Fig. 8C, 8D) y 8 semanas (Fig. 8E, 8F) en presencia (Fig. 8A, 8C y 8E) o ausencia de NA (Fig. 8B, 8D o 8F) (las flechas blancas marcan las zonas pigmentadas dentro de los grupos en diferenciación). Presentación de histograma del porcentaje de agrupaciones que contienen zonas pigmentadas en diferentes puntos temporales durante el cultivo en medio suplementado con NA (barras con línea gruesa) y en cultivos de control (barras con línea fina) (Fig. 8G). Presentación en histograma del porcentaje de células pigmentadas (Fig. 8H) y células que son inmunorreactivas con anticuerpos anti-MiTf (Fig. 8I), un marcador de RPE temprano, durante 8 semanas de cultivo con suplementación de NA. Barras a escala: (A) 200 μ m; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Figuras 9A-9S: PCR en tiempo real, análisis de inmunotinción y citometría de flujo que muestran la progresión del desarrollo del RPE lo largo del tiempo en agrupaciones en diferenciación de hESC. (Fig. 9A-9L) PCR en tiempo real en la que se analiza la sincronización de la expresión de genes clave en el desarrollo del RPE en agrupaciones cultivadas en presencia (barras con línea gruesa) o ausencia (barras con línea fina) de NA. Se analizó la expresión progresiva de los siguientes marcadores en puntos temporales secuenciales durante 8 semanas de diferenciación de agrupaciones derivadas de hESC: el marcador específico de hESC, Oct4 (Fig. 9A); los marcadores neuronales tempranos, Otx2 (Fig. 9B), Musashi (Fig 9C) y Pax6 (Fig. 9D); los marcadores progenitores retinianos, Six3 (Fig 9E), Rx1 (Fig 9F) y Chx10 (Fig. 9G); los marcadores de RPE, MiTF-A (Fig. 9H), RPE65 (Fig. 9I) y bestrofina (Fig. 9J); el marcador progenitor fotorreceptor, Crx (Fig. 9K); el marcador de desarrollo de melanocitos, Sox10 (barras con rayas horizontales, Fig. 9L) (se usó la línea celular de melanoma M51 como control). Análisis FACS que demuestra la expresión progresiva del marcador específico de hESC, TRA-1-60 (Fig. 9M), y el marcador progenitor neuronal, PSA-NCAM (Fig. 9O), en agrupaciones en diferenciación durante 8 semanas en presencia (barras con línea gruesa) o ausencia (barras con línea fina) de NA. Análisis de inmunofluorescencia indirecta del porcentaje de células que expresan los marcadores neuronales tempranos: PSA-NCAM (barras con línea gruesa), nestina (barras con rayas horizontales), Musashi (barras con línea fina), Pax6 (barras con rayas verticales) en las agrupaciones en diferenciación durante 2 y 4 semanas en presencia de NA (Fig. 9N). Imágenes de inmunofluorescencia que muestran las células que expresan estos marcadores, PSA-NCAM (Fig. 9P), nestina (Fig 9Q), Musashi (Fig 9R) y Pax6 (Fig 9S).

Figura 10A-10J: Análisis de la morfología, expresión del marcador y función que muestra que las células que expresan pigmento dentro de las agrupaciones en flotación libre de hESC son células RPE putativas. Tinción con faloidina que muestra la distribución de la F-actina dentro de la progenie pigmentada derivada de hESC que es característica de RPE (Fig. 10A); tras la disociación, el sembrado a baja densidad y el cultivo, las células pigmentadas perdieron pigmentación y adquirieron morfología de tipo fibroide (imagen de contraste de fase, 1 semana de cultivo) (Fig. 10B). Tras un nuevo cultivo prolongado y la proliferación en cultivos de alta densidad, las células volvieron a adquirir las características de morfología y pigmentación de las células RPE (1,5 meses de cultivo) (Fig. 10C). Análisis de microscopía electrónica de células RPE derivadas de hESC que muestran rasgos característicos de RPE: microvellosidades (Fig. 10D), una membrana basal (Fig. 10E), gránulos de melanina (Fig. 10D), uniones firmes (Fig. 10F). Imágenes de contraste de fase, Fig. 10G, y las imágenes fluorescentes (Fig. 10H-J) que muestran la fagocitosis de perlas verdes fluorescentes de látex (puntas de flecha de Wight) por las células de pigmento derivadas de hESC; las membranas celulares se tiñeron con colorante rojo fluorescente PKH (color gris). Las tres imágenes fluorescentes confocales mostraban cortes de eje z en serie (Fig. 10H-J).

Figuras 11A-11P: Análisis de la morfología y expresión génica que muestra que los factores de la familia TGF β potencian la diferenciación hacia las células RPE. Las micrografías de campo oscuro de las agrupaciones derivadas de hESC en diferenciación durante 4 semanas mostraron la aparición de células pigmentadas en esta

5 primera etapa, en presencia de activina (Fig. 11A), así como el aumento del número de agrupaciones pigmentadas en diferenciación en presencia de activina A y NA (Fig. 11C) frente a NA sola (Fig. 11B). De manera similar a la activina A, la suplementación con TGF β 1 también aumenta la aparición de agrupaciones pigmentadas (Fig. 11D). Por el contrario, la aplicación del inhibidor de la vía de señalización de la activina, SB431542, junto con activina A y NA reduce el efecto de la activina A sobre el aspecto de las agrupaciones pigmentadas (Fig. 11E). El desarrollo de agrupaciones pigmentadas también se inhibió mediante el cultivo de las células en presencia de TGF β junto con NA (Fig. 11F). Se demostró la expresión de las transcripciones de los receptores de activina y de la activina A mediante el análisis de RT-PCR de agrupaciones cultivadas durante 2 semanas en presencia o ausencia de NA y células hESC no diferenciadas como controles (Fig. 11G). Análisis de histograma del porcentaje de las agrupaciones que contienen zonas pigmentadas a las 4 semanas después del cultivo en presencia de NA, NA + ActA, NA + SB431542, NA + ActA + SB431542, NA + TGF β 1 (Fig. 11H). Análisis de histograma del porcentaje de células pigmentadas después de 4 semanas de cultivo con suplementación de NA (barras con línea gruesa) o activina A y NA (barras con rayas diagonales) (Fig. 11I). Análisis de histograma del porcentaje de células pigmentadas (Fig. 11J) y el nivel de expresión de transcripciones de los marcadores de RPE, bestrofina (Fig. 11K) y RPE65 (Fig. 11L) a diferentes concentraciones de activina A, siendo 140 ng/ml óptima para la inducción de RPE. Análisis del transcurso en el tiempo por PCR en tiempo real del efecto de la activina A sobre los niveles de expresión de los genes de la retina y RPE, bestrofina (Fig. 11M), MiTF-total (Fig. 11N), Rx1 (Fig. 11O) y Chx10 (Fig. 11P), en células hESC en diferenciación en presencia de NA con (barras con rayas diagonales) o sin (barras con línea gruesa) suplementación de activina A **p < 0,005. (Las flechas blancas marcan las zonas pigmentadas dentro de las agrupaciones en diferenciación).

10 Figura 12A-12E: Las células RPE derivadas de hESC tratadas con NA y activina A sobreviven después de un trasplante subretiniano en ojos de rata RCS distróficas. Se pudieron identificar fácilmente las agrupaciones de células pigmentadas *in vivo* en los ojos de ratas RCS usando sistemas de imagen del fondo ocular (Fig. 12A-12C); fotografías del fondo (Fig. 12A) y foto sin rojo (Fig. 12B) que mostraron la ubicación subretiniana de los injertos (cabe destacar los vasos de la retina que cursan sobre las zonas pigmentadas). Se puede observar que las células que expresan GFP, derivadas de hESC, emiten fluorescencia cuando se usan filtros de excitación y emisión de fluoresceína (Fig. 12C). En preparaciones de la copa ocular fotografiadas ex-vivo en un microscopio de fluorescencia (Fig. 12D-12E), se pueden observar grandes agrupaciones de células positivas en GFP subretiniana (Fig. 12D), así como múltiples agrupaciones dispersas de menor tamaño (Fig. 12E).

15 Figura 13A-13F: Aspecto histológico de injertos de células RPE tratadas con activina-A derivadas de hESC subretinianas en ojos de ratas RCS. Las secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (Fig. 13A y 1B) mostraron la ubicación subretiniana y, ocasionalmente, intrarretiniana de células pigmentadas derivadas de hESC trasplantadas, que aparecían en agrupaciones o como células aisladas (flechas). La inmunotinción con GFP (Fig. 13C-13F) confirmó que las células derivaban realmente de hESC. Los injertos eran a menudo bastante grandes y dispersos (Fig. 13C, 13E), pudiéndose observar claramente las células pigmentadas que expresaban conjuntamente GFP (Fig. 13D, 13F). Cabe señalar las células pigmentadas positivas en GFP que se integran dentro de la capa de RPE del hospedador (Fig. 13D, flecha).

20 Figura 14A-14O: Las células pigmentadas derivadas de hESC trasplantadas expresan marcadores de RPE maduro. La inmunotinción reveló que un gran número de células trasplantadas de injertos expresan proteínas que son características de las células RPE maduras, incluyendo los marcadores específicos de RPE RPE65 (Fig. 14A-14E) y bestrofina (Fig. 14F-14J), así como el marcador firmemente unido ZO-1 (Fig. 14K-14O). Las Fig. 14A, 14F y 14K muestran la imagen fluorescente de bajo aumento de injertos que expresan conjuntamente GFP y el marcador correspondiente. Las imágenes confocales de alto aumento de cada fila muestran el pigmento (mediante la óptica Nomarski), así como la coexpresión de GFP y los diferentes marcadores a nivel de una sola célula. Estas series confirman que las células derivan realmente de hESC y que expresan marcadores del RPE maduro *in vivo*. En la Fig. 14M, cabe señalar que las manchas de RPE del hospedador relativas a ZO-1 (flecha discontinua) son negativas en GFP en las Fig. 14N, 14O (la zona correspondiente es oscura) a diferencia de las células derivadas de hESC positivas en ZO-1 (flecha negra de la Fig. 14M) que expresan conjuntamente GFP (Fig. 14N, 14O).

25 Figura 15A-15C: Las células RPE tratadas con activina-A derivadas de hESC trasplantadas proporcionan el rescate funcional en el modelo de degeneración de la retina de ratas RCS. Las respuestas ERG de campo completo a las 8 semanas son más elevadas en los ojos de ratas RCS tras un trasplante de células RPE derivadas de hESC en comparación con los otros ojos de control no trasplantados, así como en comparación con los ojos en los que se realizó la inyección subretiniana de medio solo. Se muestran las respuestas ERG representativas a una serie de destellos blancos de intensidad creciente en el estado adaptado a la oscuridad en un ojo trasplantado (Fig. 15A) frente a su otro ojo de control (Fig. 15B). La Fig. 15C muestra la marcada diferencia en amplitudes medias entre los ojos transplantados y los diferentes grupos de ojos de control (-♦- ojo inyectado (n = 13); -■- ojo no inyectado (n = 13); -●- ojos no inyectados con medio (n = 5); -▲- ojo inyectado con medio (n = 5)). Como se muestra, hay una tendencia hacia una mejor preservación de la función de la retina después de un trasplante de células RPE tratadas con activina A (mostrado aquí), en comparación con el efecto de rescate logrado tras el trasplante de células RPE derivadas sin activina A (Fig. 7).

30 Figura 16A-16D: Las células RPE tratadas con activina A derivadas de hESC trasplantadas proporcionan el rescate estructural en el modelo de degeneración de la retina de ratas RCS. Se examinaron los efectos de las células RPE tratadas con activina A derivadas de hESC trasplantadas sobre la retina del hospedador en degeneración y se cuantificaron usando imágenes microscópicas de alta resolución de secciones teñidas con hematoxilina y eosina. Se observó la preservación relativa de la capa nuclear externa (ONL) (fotorreceptor) y de

los segmentos interior y externo de fotorreceptor (IS+OS) en la proximidad de los injertos de RPE subretinianos en comparación con las zonas alejadas de los injertos (dos ejemplos mostrados en las Fig. 16A, 16B). Las inserciones de la Fig. 16A demuestran esta diferencia (retina rescatada con ONL relativamente gruesa mostrada en la inserción de la derecha en las proximidades de injerto; se observa un adelgazamiento grave de la ONL en la inserción izquierda, alejada del injerto). El espesor total de la retina (Fig. 16C), así como el espesor de ONL e IS+OS (Fig. 16D) aumentaron significativamente en las proximidades de los injertos de RPE derivados de hESC (barras negras, con una media ± ETM, n = 7) en comparación con las zonas alejadas de los injertos (barras grises). Este tipo de rescate estructural solo se observó en las proximidades de los injertos intrarretiniano profundo y subretiniano, y no cuando los injertos eran exclusivamente intravítreos (no mostrados). Para los datos de la técnica de cuantificación, véase el apartado de métodos.

Figura 17A-17E: Las células RPE tratadas con activina A derivadas de hESC trasplantadas absorben rodopsina *in vivo*. Las imágenes confocales de células RPE trasplantadas subretinianas muestran la localización conjunta de pigmento, GFP, RPE65 y rodopsina dentro de las mismas células individuales. Las células RPE nativas de la rata RCS expresan RPE65 (Fig 17C, flecha), pero no expresan GFP (Fig 17D, flecha) y contienen cantidades mínimas de rodopsina (Fig. 17B, 17E).

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona el uso de uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de transformación β (TGF β) para la preparación de un sistema de cultivo destinado a potenciar la diferenciación de células madre humanas (hSC), preferentemente células madre embrionarias humanas (hESC), en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE). Cabe señalar que, además de los usos especificados descritos en el presente documento detallado, en la presente divulgación, también se abarcan células RPE obtenidas mediante la diferenciación dirigida de hSC en presencia de uno o más miembros de la superfamilia de TGF β ; así como un método de inducción de la diferenciación dirigida de las hSC en células RPE, así como los métodos para el cultivo y mantenimiento de dichas células RPE derivadas de hSC y métodos que hacen uso de dichas células RPE derivadas de hSC. De acuerdo con algunas realizaciones preferidas, las células RPE obtenidas de acuerdo con las enseñanzas del presente documento son células RPE maduras (en otras palabras, diferenciadas terminalmente) y funcionales, como se describirá y explicará más detalladamente a continuación.

En términos generales, la presente divulgación se refiere al uso de uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β en la potenciación/inducción/aumento de la diferenciación dirigida de hSC en células RPE, preferentemente células RPE maduras.

En la siguiente descripción y reivindicaciones, en ocasiones, se hará uso de una variedad de términos y expresiones, debiéndose interpretar el significado de los términos y de las expresiones de acuerdo con las presentes enseñanzas de la siguiente manera:

GLOSARIO

"Factor de crecimiento de la superfamilia de factores de crecimiento de transformación- β (TGF β)", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β , tal como las proteínas factores de crecimiento de transformación β , que incluyen los subtipos TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3, así como los ligandos homólogos incluyendo la activina (por ejemplo, activina A, activina B y activina AB), la hormona antimulleriana (AMH) nodal, algunas proteínas morfogenéticas óseas (BMP), por ejemplo, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 y BMP7, y factores de crecimiento y diferenciación (GDF).

"Células madre humanas" o "hSC", como se usa en el presente documento, se refiere a células de origen humano que, en condiciones adecuadas, son capaces de diferenciarse en otros tipos de células que tienen una determinada función especializada, mientras que, en otras condiciones adecuadas, son capaces de autorregenerarse y permanecer en un estado pluripotente no diferenciado como se detalla más adelante.

Una "célula", como se usa en el presente documento, se refiere a una sola célula, así como a una población de (es decir, más de una) células. La población puede ser una población pura que comprende un tipo de célula. Como alternativa, la población puede comprender más de un tipo de célula. Las células hSC son preferentemente células madre hematopoyéticas o mesenquimales obtenidas a partir de tejido de médula ósea de un individuo a cualquier edad, o de sangre o tejido del cordón umbilical de un individuo recién nacido, células madre neuronales obtenidas de cerebro fetal, en cualquier momento posterior al nacimiento, o de cadáver, células madre embrionarias (ES) o células de germen embrionario (EG) obtenidas de tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferentemente antes de las 10 semanas de gestación. El término célula puede indicar una sola célula o un grupo de células.

"Célula madre embrionaria" y "célula madre embrionaria pluripotente", como se usan en el presente documento, se refieren a una célula que puede dar lugar a cualquier tipo de célula diferenciada en un embrión o un adulto, incluyendo las células germinales (espermatozoides y óvulos).

"Cultivo celular" o "célula cultivada", como se usan en el presente documento, se refieren a células o tejidos que se cultivan o desarrollan en un medio artificial *in vitro*.

5 "hSC pluripotentes no diferenciadas", "hSC pluripotentes", como se usan en el presente documento, se refieren a células precursoras de origen humano que tienen la capacidad de formar cualquier célula adulta. Dichas células son verdaderas líneas celulares en tanto en cuanto: (i) son capaces de proliferar extensamente *in vitro* en un estado no diferenciado; y (ii) son capaces de diferenciarse en derivados de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), incluso tras el cultivo prolongado. Las hESC se pueden obtener de embriones fertilizados. Otras células hSC pluripotentes incluyen, sin limitación, células progenitoras adultas multipotentes (MAP), células madre pluripotentes inducidas (células iPS) y células madre de líquido amniótico.

10 15 "No diferenciadas", como se usa en el presente documento, se refiere a células cultivadas cuando una proporción sustancial (al menos el 20 %, y posiblemente más del 50 % o 80 %) de las células y sus derivados de la población muestran marcadores característicos y características morfológicas de células no diferenciadas que las distinguen de células diferenciadas de origen embrionario o de adulto. Las células se reconocen como en proliferación en un estado no diferenciado cuando pasan por al menos 1 duplicación de la población durante un período de cultivo de al menos 3 semanas, conservando a la vez al menos aproximadamente el 50 % o la misma proporción de células que portan marcadores característicos o características morfológicas de células no diferenciadas tras dicho período de cultivo.

20 25 "Suspensión celular" o "células en flotación libre", como se usan en el presente documento, se refieren a un cultivo de células en el que la mayoría de las células flota libremente en el medio, normalmente un medio (sistema) de cultivo, y células que flotan como células individuales, como grupos de células y/o como agregados de células. En otras palabras, las células sobreviven y se propagan en el medio sin estar unidas a un sustrato.

30 35 40 "Sistema de cultivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de cultivo adecuado para la propagación de las SC. La expresión indica una combinación de elementos que incluye, como mínimo, un medio básico (un medio de cultivo celular que comprende, por lo general, una solución base definida que incluye sales, azúcares y aminoácidos) y el uno o más miembros de una superfamilia de factores de crecimiento de transformación β (TGF β). El sistema de cultivo de acuerdo con la invención puede comprender además otros elementos tales como, sin limitación, un suero o reemplazo de suero, un medio de cultivo (nutrientes) y otros factores añadidos exógenamente que, en conjunto, proporcionan las condiciones adecuadas que mantienen el crecimiento de SC, así como de otros componentes usados normalmente en los sistemas de cultivo celular. Los elementos anteriores se pueden clasificar colectivamente como elementos solubles. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, los elementos también se pueden asociar a un vehículo, es decir, ser elementos no solubles. La asociación puede ser mediante unión química o física. Por ejemplo, el elemento se puede inmovilizar sobre una matriz (por ejemplo, matriz extracelular), presentada por células añadidas al sistema o unidas a material biodegradable. Además, el elemento puede ser liberado desde un vehículo, pudiendo ser el vehículo una célula o una vesícula que tenga encapsulado o introducido el elemento. Por lo tanto, en el siguiente texto, los elementos que suplementan los medios básicos para formar el sistema de cultivo comprenden elementos tanto solubles como no solubles.

45 "Diferenciación", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de cambio de estado de una célula de un tipo de célula a otro, y más específicamente en el contexto de la presente divulgación, indica el proceso de una célula madre humana que adquiere el tipo de célula de una célula del epitelio pigmentario de la retina (RPE) con al menos un rasgo característico indicador de que dicha célula RPE es una célula madura (diferenciada terminalmente). Como se usa en el presente documento, la expresión "tipo de célula" se refiere a una forma morfológica o funcional distinta de una célula.

50 "hSC en diferenciación", como se usa en el presente documento, se refiere a células hSC no diferenciadas que, en condiciones adecuadas, son capaces de diferenciarse de una manera dirigida, aumentada, a un destino predeterminado. La expresión también se refiere a una población de hSC en la que al menos parte de la misma ya ha sido inducida a someterse a la diferenciación, al menos inicial, en concreto, a la diferenciación dirigida o combinación de las mismas.

55 "Cebar", "aumentar" "potenciar" o "dirigir", como se usan en el presente documento indistintamente a menos que el contexto indique lo contrario, se refieren a iniciar la diferenciación no espontánea de las células madre en células RPE.

60 65 "Inductor de la diferenciación" o "promotor de la diferenciación", "agente de cebado de la diferenciación" o "factor promotor de la diferenciación", como se usan indistintamente en el presente documento, denotan cualquier agente que es capaz de cebar, aumentar, potenciar o dirigir la diferenciación de las SC pluripotentes en una célula somática, preferentemente, en células RPE.

"Células del epitelio pigmentario de la retina", "células RPE" y "las RPE", que se pueden usar indistintamente cuando el contexto lo permita, significan células de un tipo de célula funcionalmente similar al de las células RPE nativas que forman la capa de células pigmentadas de la retina (por ejemplo, tras el trasplante dentro de un ojo, presentan

actividades funcionales similares a las de las células RPE nativas). Por lo tanto, las expresiones "células del epitelio pigmentario de la retina", "células RPE" y "las RPE" se pueden usar para referirse tanto a células RPE nativas de la capa pigmentada de la retina como a células RPE directamente diferenciadas de las hSC, de acuerdo con la presente divulgación.

5 La expresión "células RPE derivadas de hSC" se usa en el presente documento para denotar las células RPE que se obtienen mediante diferenciación dirigida de las hSC. De acuerdo con una realización preferida, las células RPE derivadas de hSC son células RPE maduras (diferenciadas terminalmente) y funcionales según lo mostrado por los parámetros definidos a continuación. La expresión "diferenciación dirigida" se usa indistintamente junto con la expresión "diferenciación inducida por RPE", y se ha de entender como el proceso de manipulación de las hSC en condiciones de cultivo que inducen/potencian la diferenciación en solo el tipo de célula RPE.

10 15 "Células RPE funcionales" se usa en el presente documento para referirse a células obtenidas por diferenciación dirigida de las hSC en presencia de uno o más miembros de la superfamilia de TGF β , presentando las células RPE al menos una de las siguientes características:

- 20 - durante la diferenciación, las células cultivadas responden a la señalización de TGF β ;
- las células RPE son células maduras diferenciadas terminalmente, según lo mostrado por la expresión de marcadores indicadores de la diferenciación terminal, por ejemplo, bestrofina o RPE65, así como o alternativamente por su falta de potencia para proliferar *in vivo*;
- tras un trasplante (es decir, *in situ*), las células RPE muestran efecto trófico de apoyo a los fotorreceptores adyacentes a las células RPE;
- 25 - además, *in situ*, las células RPE son capaces de funcionar con la fagocitosis de los segmentos externos de fotorreceptor desprendidos como parte del proceso de renovación normal de estos fotorreceptores.

30 Así pues, las células RPE de acuerdo con la presente invención son especialmente adecuadas para la regeneración del RPE del hospedador, proporcionando de ese modo una mejora de la visión tras un trasplante con las mismas en el ojo de un sujeto.

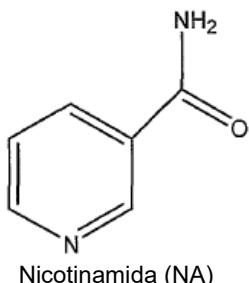
35 40 "Similar", cuando se usa en el contexto de las células RPE diferenciadas, significa que las células RPE diferenciadas comparten uno o más rasgos morfológicos o funcionales característicos con las células RPE nativas. Por ejemplo, una similitud suficiente se podría indicar mediante, por ejemplo, la determinación de que la célula diferenciada expresa uno o más marcadores de células RPE de origen natural, tales como MiTF, ZO-1, bestrofina, RPE65, Otx2, Mertk, y CRALBP; o de que la célula presenta una o más características físicas morfológicas de las células RPE, tales como la distribución típica de la F-actina dentro de las células, la pigmentación por gránulos pigmentados, la forma poligonal (por ejemplo, hexagonal), un aspecto parecido a los adoquines y características ultraestructurales del RPE demostradas por microscopía electrónica. Además, puede incluir una cualquiera de las funciones enumeradas anteriormente, por ejemplo, efecto trófico de apoyo a los fotorreceptores adyacentes a las células RPE; funcionalidad con la fagocitosis de los segmentos externos de fotorreceptor desprendidos que albergan rodopsina o falta de potencia para proliferar *in vivo*.

45 50 "A gran escala", como se usa en el presente documento con respecto al cultivo y la expansión celular, se refiere a la producción de células RPE en condiciones que permiten al menos la duplicación de las células en el cultivo celular tras 4 semanas, consistiendo la población de células tras las 4 semanas esencialmente en células RPE.

55 60 "Marcador celular", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier rasgo fenotípico de una célula que se puede usar para caracterizarla o diferenciarla de otros tipos de células. Un marcador puede ser una proteína (incluyendo proteínas secretadas, de la superficie celular o internas; bien sintetizada o absorbida por la célula); un ácido nucleico (tal como un ARNm o molécula de ácido nucleico enzimáticamente activa) o un polisacárido. Se incluyen los determinantes de cualquiera de dichos componentes celulares que son detectables por el anticuerpo, lectina, sonda o reacción de amplificación de ácido nucleico que sea específica del marcador del tipo de célula de interés. Los marcadores también se pueden identificar mediante un ensayo bioquímico o enzimático, o una respuesta biológica que dependa de la función del producto genético. Con cada marcador, está asociado el gen que codifica la transcripción y los eventos que conducen a la expresión del marcador. Se dice que un marcador se expresa preferentemente en una población de células no diferenciadas o diferenciadas, si se expresa a un nivel que es al menos un 50 % superior (en términos de producto genético total medido en un anticuerpo o ensayo de PCR) o un 30 % más frecuente (en términos de células positivas en la población) que un control aceptable, tal como actina o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Cada vez se prefieren más los marcadores que se expresan 2, 10, 100 o 10.000 veces más o más a menudo.

65 La presente divulgación hace uso de las células hSC de las que se derivan las células RPE, debido a la diferenciación inductiva y dirigida de las células hSC en presencia de un sistema de cultivo único aplicado a las hSC en suspensión.

- Los ejemplos no limitantes de las hSC son células madre neuronales obtenidas del feto, o en cualquier momento posterior al nacimiento o de cadáver, células madre hematopoyéticas obtenidas de tejido de médula ósea de un individuo humano de cualquier edad o de sangre de cordón umbilical de un individuo recién nacido, células madre mesenquimales, células madre de líquido amniótico, células madre embrionarias (ES), células germinales embrionarias (EG) obtenidas del tejido genital de un feto en cualquier momento de la gestación, preferentemente antes de 10 semanas de gestación, células madre pluripotentes inducidas o células madre obtenidas de las gónadas de individuo humano de cualquier edad. Las células madre humanas preferidas de acuerdo con la presente invención son células madre embrionarias humanas (hESC).
- 5 10 También se pueden usar de acuerdo con la invención las células hSC disponibles en el mercado. Las células hSC se pueden adquirir en el registro de células madre embrionarias humanas del NIH.
- 15 20 Las posibles aplicaciones de las hESC y de las células derivadas de las mismas son de largo alcance e incluyen el descubrimiento y ensayo de fármacos, la generación de células, tejidos y órganos para su uso en el trasplante, la producción de biomoléculas, el ensayo de la toxicidad y/o teratogenicidad de compuestos, la detección de alto rendimiento de moléculas en cuanto a su efecto tóxico, regenerador, protector o cualquier otro efecto, y el fomento del estudio de los procesos evolutivos o de otro tipo. Las enfermedades que se esperan poder tratar actualmente mediante el trasplante terapéutico de células hESC o de células derivadas de hESC incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, infartos cardíacos, diabetes mellitus de inicio juvenil y leucemia [Gearhart J. *Science* 282: 1061-1062, 1998; Rossant y Nagy, *Nature Biotech.* 17: 23-24, 1999].
- 25 30 Sin embargo, la explotación práctica de las hESC se encuentra con importantes obstáculos. Dos de dichos obstáculos incluyen: el mantenimiento de las hESC en un estado pluripotente no diferenciado sin diferenciación espontánea; y la dirección a la diferenciación de las hESC en tipos específicos de células somáticas. Se han descrito varios sistemas de cultivo para el mantenimiento y la propagación de células madre y, en particular, las hESC, en un estado no diferenciado B.
- 35 40 Debido al potencial de las células diferenciadas derivadas de células madre en un sinnúmero de aplicaciones terapéuticas, la dirección o potenciación de la diferenciación de las células madre en cultivo hacia una determinada célula somática es de gran interés.
- 45 50 En ciertas enfermedades oculares y trastornos de, por ejemplo, la retina y la mácula, la insuficiencia de las células RPE conduce, en última instancia, a la pérdida de visión e incluso a la ceguera. Se ha sugerido el trasplante de células RPE para reemplazar y ayudar al RPE afectado del hospedador como una posible intervención terapéutica, pero la obtención de dichas células de donantes o embriones humanos es difícil. Así pues, las células hSC pueden servir como una posible fuente donante ilimitada de células RPE, siempre que se puedan dilucidar los medios para dirigir su diferenciación hacia células RPE funcionales.
- 55 60 Ahora se ha encontrado que, sorprendentemente, al poner en contacto las hSC con un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β potencia enormemente la diferenciación de las hSC hacia las células RPE. En otras palabras, estos factores de crecimiento tienen un efecto de inducción sobre las hSC. Por lo tanto, se ha previsto el uso de uno o varios miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de transformación β (TGF β) para la preparación de un sistema de cultivo destinado a inducir la diferenciación de las células madre humanas (hSC) en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE).
- Aunque se conocen muchos miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β (habiendo sido algunos ejemplos no limitantes enumerados anteriormente), de acuerdo con una realización preferida, el miembro de la superfamilia de TGF β es preferentemente el factor de crecimiento TGF β 1 o TGF β 3, o la activina A o una combinación de los mismos.
- 50 55 Se ha encontrado que la nicotinamida (NA) en un cultivo celular tiene un efecto inhibidor sobre la diferenciación de las células madre en células extraembrionarias, y además que la NA potencia la diferenciación somática hacia células neuronales y, todavía más, hacia células de tipo RPE⁸. La NA, también conocida como "niacinamida", es la forma derivada de amida de la vitamina B3 (niacina), que se cree que preserva y mejora la función de las células β . La NA tiene la fórmula química C₆H₆N₂O. La NA es esencial para el crecimiento y la conversión de los alimentos en energía, y se ha usado en el tratamiento de la artritis, y en el tratamiento y la prevención de la diabetes.



En el contexto de la presente divulgación, el término NA también denota derivados de NA.

La expresión "derivado de nicotinamida (NA)", como se usa en el presente documento, denota un compuesto que es un derivado modificado químicamente de la NA natural. La modificación química puede incluir, por ejemplo, una sustitución en el anillo de piridina de la estructura básica de la NA (a través del miembro de carbono o nitrógeno del anillo), a través de los átomos de nitrógeno u oxígeno del resto amida, así como la eliminación o sustitución de un grupo, por ejemplo, para formar un análogo de tiobenzamida de NA, siendo todo ello según lo entendido por los expertos en química orgánica. El derivado en el contexto de la invención también incluye el derivado nucleósido de NA (por ejemplo, nicotinamida adenina). Hay descrita una variedad de derivados de NA, algunos también en conexión con una actividad inhibidora de la enzima PDE4 (WO03/068233; WO02/060875; GB2327675A), o como inhibidores de la tirosina quinasa del receptor VEGF (WO01/55114). Por ejemplo, el proceso de preparación de derivados de 4-aryl-nicotinamida (WO05/014549).

En relación con lo anterior, se ha encontrado ahora que, sorprendentemente, cuando las hSC se están diferenciando en presencia de NA, sus propiedades se alteran y, por consiguiente, adquieren la capacidad de responder a un efecto inductor de uno o más miembros de la superfamilia de TGF β que dirige su diferenciación hacia las células RPE, preferentemente células RPE maduras y funcionales. Por lo tanto, el efecto inductor de la diferenciación en RPE de NA se puede mejorar significativamente al exponer posteriormente las hSC a la uno o más miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β en combinación con la exposición previa de las células del cultivo a NA.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el método comprende el tratamiento de las células con el uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β , que se usa en combinación con la exposición previa a NA. La combinación puede ser para la preparación de un sistema de cultivo que comprenda tanto TGF β como NA, así como para la preparación de un sistema de cultivo que solo comprenda el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β , para su uso con el fin de inducir/potenciar la diferenciación y/o una mayor diferenciación de las hSC pluripotentes que ya se han expuesto a NA. Sin quedar ligados a la teoría, se cree que la NA actúa como un inductor/promotor de la diferenciación y que, de igual forma, el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β actúan como un factor promotor de la diferenciación de RPE. Además, aunque sin quedar ligados a la teoría, se cree que la exposición previa de las células hSC pluripotentes a NA aporta a las células propiedades que les permiten responder al efecto potenciador de la diferenciación de RPE del uno o más miembros de la superfamilia de TGF β .

Así pues, de acuerdo con una realización de la invención, las hSC pluripotentes se cultivan primero en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con NA durante dos semanas antes de cultivar la célula de dicho cultivo de células en un medio básico (igual o diferente) suplementado con el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β .

De acuerdo con otra realización, las células hSC pluripotentes no diferenciadas se cultivan en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con NA y el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β .

Cabe señalar que hay varios medios básicos conocidos en la técnica para su uso en cultivos de células y, preferentemente, para su uso en cultivos de SC. Una lista no limitante de medios básicos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación comprende Neurobasal™ (Nº de catálogo 21103-049, Gibco 1998/1999), KODMEM (Nº de catálogo 10829-018, Gibco 1998/1999), DMEM (Nº de catálogo 41965-039, Gibco 2004), DMEM/F12 (Nº de catálogo 21331-020, Gibco 2004), medio de crecimiento de células madre Cellgro™ (Nº de catálogo 2001, CellGenix 2005) o X-Vivo™ (Nº de catálogo 04-3800, LONZA 2007).

La presente divulgación también proporciona un método para inducir la diferenciación dirigida de las hSC en células RPE, método que comprende:

- (a) proporcionar un cultivo celular que comprende células hSC;

- (b) cultivar las células de dicho cultivo celular en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con uno o más miembros de la superfamilia de TGF β , mediante lo que se potencia la diferenciación dirigida de las células hSC en células RPE.
- 5 La diferenciación puede tener lugar dentro de las agrupaciones en flotación libre de las hSC o en cultivos adherentes. La diferenciación somática dentro de cultivos adherentes se ha descrito [patente de EE.UU. Nº 7.112.437]. Por lo tanto, dichos cultivos adherentes pueden servir como base para inducir la diferenciación hacia RPE mediante un sistema de cultivo suplementado con al menos uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β .
- 10 Las células del cultivo celular pueden ser una población de hSC no diferenciadas o una población de células en la que al menos parte de las células hSC ha iniciado la diferenciación. La diferenciación inicial es una diferenciación dirigida. Por lo tanto, en el contexto de la divulgación, las células proporcionadas en el método a veces se denominan células en diferenciación.
- 15 Como ya se ha indicado anteriormente, el medio básico se puede suplementar mediante la introducción en el mismo de elementos solubles, así como elementos no solubles. Con respecto a la suplementación con uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β , el miembro se puede presentar en forma soluble, o fijado o asociado a una matriz o célula añadida al sistema de cultivo, o el elemento se puede unir a o formar complejos con otras sustancias. El miembro también se puede secretar en el sistema de cultivo desde las células presentes en este.
- 20 Las células hSC se pueden proporcionar en estado no diferenciado, así como tras su exposición a un factor potenciador de la diferenciación (agente de cebado de la diferenciación), tal como NA. Las células hSC no diferenciadas se pueden obtener de diversos sistemas de cultivo en los que las hSC se pueden mantener en un estado pluripotente no diferenciado. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en un sistema en suspensión o adherente exento de células alimentadoras (WO06/070370) o en células alimentadoras. Las células alimentadoras usadas comúnmente incluyen un fibroblasto embrionario murino primario (PMEF), un fibroblasto embrionario murino (MEF), un fibroblasto fetal murino (MFP), un fibroblasto embrionario humano (HEF), un fibroblasto humano obtenido de la diferenciación de células madre embrionarias humanas, una célula muscular fetal humana (HFM), una célula cutánea fetal humana (HFS), una célula cutánea adulta humana, un fibroblasto de prepucio humano (HFF), una célula humana obtenida de cordón umbilical o de placenta, una célula epitelial de trompa de falopio adulta humana (HAFT) y células estromales de médula humanas (hMSC). Las agrupaciones de hSC se pueden obtener de un cultivo de células adherentes mediante la disociación de las células de la capa de alimentación o de la matriz extracelular para formar una suspensión de células. La suspensión de células puede comprender las agrupaciones en flotación libre o la suspensión de esencialmente una sola célula a partir de la cual se extienden agrupaciones de células formándose agrupaciones de células.
- 25 De acuerdo con una realización preferida, el cultivo celular comprende suspensión celular, preferentemente agrupaciones en flotación libre en un cultivo en suspensión, es decir, agregados de células derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC).
- 30 La etapa de cultivo de acuerdo con la presente divulgación puede comprender el cultivo de las células en el cultivo celular con uno o más sistemas de cultivo diferentes, comprendiendo al menos uno de los sistemas de cultivo el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β .
- 35 De acuerdo con una realización de la presente divulgación, las células del cultivo se cultivan en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con NA, además de dicho uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β .
- 40 De acuerdo con otra realización, en primer lugar, las células se cultivan en un sistema de cultivo que comprende un medio básico y NA, siendo las células hSC pluripotentes no diferenciadas, y preferentemente tras inducir la diferenciación de las hSC pluripotentes (es decir, tras un período de tiempo predeterminado o tras confirmar la diferenciación celular mediante técnicas disponibles en la materia), las células del cultivo celular se cultivan en un sistema de cultivo que comprende el uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β . El segundo sistema de cultivo también puede comprender NA, es decir, puede ser igual al sistema de cultivo inicial, al que se añade el miembro de la superfamilia de TGF β . Como resultado de ello, se induce la diferenciación dirigida hacia las células RPE.
- 45 De acuerdo con la presente realización, las hSC pluripotentes del cultivo celular inicial se cultivan en el sistema de cultivo que comprende NA al menos durante dos semanas necesario para que se inicie la diferenciación de las células hSC. De acuerdo con una realización particular, el sistema de cultivo celular se cultiva en el sistema de cultivo que comprende NA durante al menos dos semanas.

- 5 Sin quedar vinculados a teoría alguna, los inventores estipulan que la NA induce el proceso de diferenciación dirigida que también se acelera en su progresión en comparación con la diferenciación espontánea (es decir, la que se produce en ausencia de la exposición a NA o la exposición a NA en combinación con un miembro de TGF β). En el presente documento, se ha demostrado que, en la diferenciación dirigida, las células madre no diferenciadas se eliminan más rápidamente del sistema de cultivo. Por lo tanto, la NA se usa en un sistema de cultivo de hSC en diferenciación como medio para potenciar y acelerar el proceso de diferenciación dirigida, y para la eliminación completa de las células madre no diferenciadas, evitando así posibles complicaciones tales como la formación de tumores teratoídes por la presencia de células no diferenciadas después del trasplante.
- 10 10 En el presente documento, se ha demostrado que la exposición de las células hSC pluripotentes a NA seguida de la exposición a uno o más miembros de la superfamilia de TGF β induce la diferenciación en células con un fenotipo diferente en comparación con la diferenciación de las células de forma espontánea (es decir, en ausencia de estos factores).
- 15 15 Además, sin quedar vinculados a teoría alguna, los inventores suponen que la NA induce la diferenciación hacia células que expresan receptores para uno o más miembros de la superfamilia de TGF β (que no son expresados por las células madre que se diferencian de forma espontánea), permitiendo de este modo la diferenciación dirigida en células RPE maduras y funcionales. Dicha expresión de receptores permite el efecto inductor del miembro de la superfamilia de TGF β sobre la diferenciación dirigida de las células que se diferencian en el cultivo hacia células RPE, es decir, hacia células RPE maduras y funcionales.
- 20 20 Como se ha indicado anteriormente, hay una variedad de miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de TGF β . Por ejemplo, el factor de crecimiento de acuerdo con la invención puede ser uno o más de los siguientes TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, activina A, activina B, activina AB, hormona antimuleriana nodal (AMH) BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7 o factor de crecimiento y diferenciación (GDF). Sin embargo, preferentemente, el factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β es TGF β 3 o TGF β 1 o activina A o la combinación de los mismos.
- 25 25 El medio básico de acuerdo con la invención es cualquier medio de cultivo celular conocido en la técnica para mantener el crecimiento celular *in vitro*, por lo general, un medio que comprende una solución base definida que incluye sales, azúcares, aminoácidos y otros nutrientes necesarios para el mantenimiento de las células en el cultivo en un estado viable. Los ejemplos no limitantes de medios básicos disponibles en el mercado que se pueden utilizar de acuerdo con la invención comprenden Neurobasal™, KO-DMEM, DMEM, DMEM/F12, medio de crecimiento de células madre Cellgro™ o X-Vivo™. El medio básico se puede suplementar con una variedad de agentes como se conoce en la técnica relativa a los cultivos celulares. La siguiente es una referencia no limitante a varios suplementos que se pueden incluir en el sistema de cultivo que se va a usar de acuerdo con la presente divulgación:
- 30 30 - medio que contiene suero o reemplazo de suero tal como, sin limitación, reemplazo de suero knock out (KOSR), Nutridoma-CS, TCH™, N₂, derivado de N₂ o B27 o una combinación;
- 35 35 - un componente de la matriz extracelular (ECM) tal como, sin limitación, fibronectina, laminina y gelatina. La ECM se puede usar luego para transportar el uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β ;
- 40 40 - un agente antibacteriano tal como, sin limitación, penicilina y estreptomicina;
- 45 45 - aminoácidos no esenciales (NEAA);
- 50 50 - neurotrofinas, que se conocen por desempeñar un papel en la potenciación de la supervivencia de las células SC en cultivo, tales como, sin limitación, BDNF, NT3, NT4.
- 55 55 Una vez que las células se han dirigido al destino RPE, las células RPE se pueden retirar/recoger del cultivo mediante métodos conocidos para su uso en diversas aplicaciones.
- 60 60 La presente divulgación también proporciona células RPE obtenidas mediante la diferenciación dirigida de hSC en presencia de uno o más miembros de la superfamilia de TGF β . De acuerdo con una realización, las células RPE se obtienen mediante el método de la invención.
- 65 65 Además de lo anterior, las células RPE producidas mediante la diferenciación dirigida de acuerdo con la presente divulgación tienen propiedades específicas en comparación con las células RPE que se desarrollan durante la diferenciación espontánea.
- Las células que se diferencian tienen el potencial de responder a la señalización de TGF β en su desarrollo y diferenciación.
- Las células RPE resultantes son células maduras (diferenciadas terminalmente).

- Las células RPE maduras muestran una pigmentación más oscura en comparación con las células RPE formadas durante la diferenciación espontánea.
 - Las células RPE maduras expresan niveles significativamente más altos de transcripciones de marcadores de células RPE maduras tales como bestrofina y RPE65 en comparación con su expresión en células RPE producidas por diferenciación espontánea. A este respecto, se hace referencia, por ejemplo, a las Fig. 9J, 11M y 11K, que muestran la expresión de la bestrofina en la diferenciación espontánea (sin NA) en comparación con la diferenciación en presencia de NA (Fig. 9J) y el efecto potenciador de la activina A sobre la diferenciación dirigida (Fig. 11K, 11M y 4E). También se hace referencia a las Fig. 1B y 9I, que muestran la expresión de RPE65 en la diferenciación espontánea (sin NA) en comparación con la diferenciación en presencia de NA y, además, en comparación con el efecto potenciador de la activina A de la Fig. 4D.
 - En el análisis de microscopio electrónico (EM), las células RPE presentan características morfológicas de las auténticas células RPE maduras que no se han observado en las células de tipo RPE obtenidas por diferenciación espontánea de hSC, tales como las vellosidades apicales, las uniones firmes y la membrana basal.
- Las células RPE producidas por el método de la presente divulgación se pueden usar para el cultivo a gran escala y/o a largo plazo de dichas células. Con este fin, el método de la invención se va a realizar en biorreactores adecuados para la producción de células a gran escala, y en los que se van a cultivar las hSC no diferenciadas de acuerdo con la invención. Los requisitos generales para el cultivo de células en biorreactores son bien conocidos para los expertos en la materia.
- Como alternativa, las células RPE producidas por el método de la presente divulgación se pueden expandir tras su derivación. Para la expansión, se disocian, se siembran a baja densidad en una matriz extracelular, preferentemente poli-D-lisina y laminina, y se cultivan en KOM exento de suero con NA. En estas condiciones de cultivo, las células pigmentadas pierden pigmentación y adquieren una morfología de tipo fibroide. Tras un nuevo cultivo prolongado y la proliferación en cultivos de alta densidad, las células vuelven a adquirir la morfología poligonal y la pigmentación características de las células RPE.
- Las células RPE se pueden expandir en suspensión o en una monocapa. La expansión de las células RPE en cultivos en monocapa se puede modificar para la expansión a gran escala en biorreactores mediante métodos bien conocidos para los expertos en la materia.
- Los expertos en la materia pueden comprender lo beneficiosa que es la derivación de células RPE a partir de hSC. Se pueden usar como modelo *in vitro* para el desarrollo de nuevos fármacos destinados a potenciar su supervivencia, regeneración y función. Las células RPE derivadas de hSC pueden servir para la selección de alto rendimiento de compuestos que tengan un efecto tóxico o regenerador sobre las células RPE. Se pueden usar para descubrir mecanismos, nuevos genes, factores solubles o unidos a la membrana que sean importantes para el desarrollo, la diferenciación, el mantenimiento, la supervivencia y la función de células fotorreceptoras.
- Las células RPE también pueden servir como fuente ilimitada de células RPE para el trasplante, la reposición y el mantenimiento de las células RPE con mal funcionamiento o degeneradas de las degeneraciones de la retina. Además, las células RPE modificadas genéticamente pueden servir como vector para transportar y expresar genes en el ojo y la retina después del trasplante.
- Así pues, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de trasplante de células RPE en el ojo de un sujeto, método que comprende:
- 50 (a) proporcionar un cultivo celular que comprende células hSC;
 - (b) cultivar las células en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con uno o más miembros de super familia de TGFβ, mediante lo que las hSC son inducidas a diferenciarse en células RPE;
 - 55 (c) recoger células RPE de dicho cultivo celular; y
 - (c) trasplantar dichas células RPE diferenciadas en el ojo de dicho sujeto.
- La recogida de las células se puede realizar mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen la disección mecánica y la disociación con papaína. También se pueden aplicar otros métodos conocidos en la técnica.
- 60 Las células RPE derivadas de las hSC se pueden trasplantar en varios sitios diana dentro del ojo de un sujeto. De acuerdo con una realización, el trasplante de las células RPE se realiza en el espacio subretiniano del ojo, que es la ubicación anatómica normal del RPE (entre los segmentos externos de fotorreceptor y la coroides). Además, en función de la capacidad migratoria y/o de los efectos paracrinos positivos de las células, cabe considerar el

trasplante en compartimentos oculares adicionales, incluyendo el espacio vítreo, la retina interior o externo, la periferia de la retina y en la coroides.

- Además, el trasplante se puede realizar mediante diversas técnicas conocidas en la materia. Los métodos para realizar trasplantes de RPE se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nº 5.962.027, 6.045.791 y 5.941.250 y en *Eye Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, marzo de 1997; 235(3): 149-58; *Biochem Biophys Res Commun*, 24 de febrero de 2000; 268(3): 842-6; *Ophthalmic Surg*, febrero de 1991; 22(2): 102-8. Los métodos para realizar trasplantes de córnea se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 5.755.785, y en "Eye" 1995; 9 (Pt 6 Su):6-12; *Curr Opin Ophthalmol*, agosto de 1992; 3 (4): 473-81; *Ophthalmic Surg Lasers*, abril de 1998; 29 (4): 305-8; *Ophthalmology*, abril de 2000; 107 (4): 719-24; y *Jpn J Ophthalmol*, noviembre-diciembre de 1999; 43(6): 502-8. Si se van a utilizar principalmente efectos paracrinos, las células también se pueden administrar y mantener en el ojo encapsuladas dentro de un recipiente semipermeable, que también reducirá la exposición de las células al sistema inmune del hospedador ("Neurotech USA CNTF delivery system"; PNAS, 7 de marzo de 2006 vol. 103(10) 3896-3901).
- De acuerdo con la divulgación, el trasplante se realiza a través de una vitrectomía vía pars pana seguida de la administración de las células a través de una pequeña abertura de la retina en el espacio subretiniano o por inyección directa. Como alternativa, las células se pueden administrar en el espacio subretiniano a través de una metodología trans-escleral, trans-coroidea. Además, se puede realizar la inyección trans-escleral directa en el espacio vítreo o la administración en la periferia retiniana anterior en las proximidades del cuerpo ciliar.
- Las células RPE se pueden trasplantar de diversas formas. Por ejemplo, las células RPE se pueden introducir en el sitio diana en forma de suspensión celular o adheridas sobre una matriz, matriz extracelular o sustrato tal como un polímero biodegradable o una combinación. Las células RPE también se pueden trasplantar junto (trasplantar conjuntamente) con otras células de la retina, tales como con fotorreceptores.
- También se desvela una composición que comprende células RPE derivadas de células hSC obtenidas mediante el método de la invención. La composición es preferentemente adecuada para el trasplante en el ojo.
- Se pueden tratar o prevenir varias afecciones oculares con la introducción de las células RPE obtenidas mediante el método de la invención en el ojo de un sujeto. Las afecciones oculares pueden incluir enfermedades de la retina o trastornos generalmente asociados con la disfunción de la retina, lesión de la retina y/o pérdida del epitelio pigmentario de la retina. Una lista no limitante de afecciones que se pueden tratar de acuerdo con la invención comprende retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, degeneración macular hereditaria o adquirida, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), enfermedad de Best, desprendimiento de retina, atrofia girada, coroideremia, distrofia en patrón, así como otras distrofias del RPE, enfermedad de Stargardt, lesión en el RPE y en la retina debida al daño causado por una cualquiera de entre lesión fótica, lesión por láser, lesión inflamatoria, lesión infecciosa, lesión por radiación, lesión neovascular o lesión traumática.
- Sin quedar ligados a teoría alguna, las células RPE transplantadas pueden ejercer su efecto terapéutico a través de múltiples mecanismos. Un mecanismo es el efecto de apoyo trófico, que potencia la supervivencia de los fotorreceptores u otras células en degeneración dentro de la retina. Las células RPE derivadas de las células hSC mediante los métodos de la presente divulgación y en presencia de un miembro de la superfamilia de TGFβ son capaces de preservar los fotorreceptores adyacentes a las mismas potencialmente por un efecto trófico.
- Las células RPE transplantadas también pueden ejercer su efecto a través de un mecanismo de regeneración que repone las células RPE en mal funcionamiento y/o en degeneración del hospedador. Las células RPE derivadas de las hSC mediante los métodos de la presente divulgación y en presencia de un miembro de la superfamilia de TGFβ pueden reponer el RPE en mal funcionamiento del hospedador. Las células transplantadas son maduras, y tienen la capacidad funcional de realizar la fagocitosis de los segmentos externos de fotorreceptor desprendidos que incluyen la rodopsina.
- Como se ha mencionado anteriormente, las células RPE derivadas de las hSC mediante los métodos de la presente divulgación y en presencia de un miembro de la superfamilia de TGFβ son maduras y, como tales, no proliferan *in vivo* tras el trasplante. Por lo tanto, las células RPE derivadas de las hSC mediante los métodos de la presente divulgación son más seguras para la terapia de trasplante y tienen un menor riesgo de desarrollar tumores teratoides o tumores de células precursoras en proliferación.
- Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere al efecto terapéutico, así como al efecto profiláctico de las células RPE derivadas de hSC de la invención sobre la afección ocular de un sujeto, pudiendo incluir el efecto, en general, la mejora de los síntomas asociados a las afecciones, la reducción de la gravedad o la curación de la afección. Más específicamente, el efecto pueden incluir la inversión de los daños causados en la retina y en el RPE del sujeto tratado, la mejora de la función de la retina del sujeto, la reconstrucción de la retina y del RPE del sujeto mediante la sustitución y/o mantenimiento de las células de la retina y RPE del hospedador afectado, directamente o por efecto paracrino, así como el efecto profiláctico que se puede presentar por la atenuación, la inhibición o el cese del daño causado en la retina del sujeto como consecuencia de la afección.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen el singular, así como el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "factor de crecimiento" incluye uno o más factores de crecimiento, y la expresión "factores de crecimiento" incluye un factor de crecimiento, así como más de un factor de crecimiento.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "o" significa una o una combinación de dos o más de las opciones enumeradas. Además, el uso de la expresión "seleccionado entre" seguida de una enumeración de opciones separadas por el término "y" incluye una o una combinación de dos o más de las opciones enumeradas.
- 10 Además, como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que los métodos o la composición incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. Del mismo modo, "que consiste esencialmente en" se usa para definir los métodos y sistemas que incluyen los elementos citados, pero que excluyen otros elementos que pueden tener un significado esencial en la funcionalidad de los sistemas de cultivo de las invenciones. Por ejemplo, un sistema de cultivo que consiste esencialmente en un medio básico, suplementos del medio y células alimentadoras no incluye o incluirá solo cantidades irrelevantes (cantidades que tendrán un efecto insignificante sobre la propagación y diferenciación de las células en el sistema de cultivo) de otras sustancias que tengan un efecto sobre las células de un cultivo. Además, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se define en el presente documento no excluiría los contaminantes traza del método de aislamiento y purificación. La expresión "que consiste en" significará la exclusión de más que las cantidades traza de otros elementos. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición pertenecen al alcance de la presente invención.

25 Además, todos los valores numéricos, por ejemplo, la concentración o la dosis, o los intervalos de las mismas, son aproximaciones que varían (+) o (-) hasta en un 20 %, a veces hasta en un 10 %, con respecto a los valores indicados. Se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son meramente ilustrativos y que los equivalentes de dichos reactivos son conocidos en la técnica.

30 Ejemplos de referencia

Materiales y métodos

35 Cultivo de células hES

Se cultivaron ESC humana (línea celular HES1) y hESC diseñadas por ingeniería genética mediante el vector lentiviral para expresar constitutivamente eGFP [Gropp M., Itsykson P., Singer O., Ben-Hur T., Reinhardt E., Galun E. y Reubinoff B. E. "Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors". *Molecular Therapy* 7:281-7 (2003)] en capas alimentadoras de fibroblastos de prepucio humano en medio KO (KOM) que consistía en KO-DMEM al 86 % (Gibco, Invitrogen, Gaithersburg, MD), KOSR al 14 % (Gibco), glutamina 1 mM, aminoácidos no esenciales al 1 %, 50 unidades/ml de penicilina (Gibco), 50 µg/ml de estreptomicina (Gibco), y 4 ng/ml de bFGF (R&D Systems, Inc., Mineápolis, MN). Se pasaron las células hES semanalmente con colagenasa de tipo IV (1 mg/ml; Gibco) y se sembraron sobre una capa alimentadora recién preparada. Una semana antes de la inducción de la diferenciación, se pasaron las células por disociación en casi una suspensión de una sola célula con PBS exento de Ca/Mg⁺⁺ suplementado con EDTA al 0,05 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), y se volvieron a sembrar en los alimentadores.

50 Formación de EB en cultivo en suspensión

De seis a ocho días después de la siembra de las células hES que se disociaron en células individuales como se ha explicado anteriormente, se retiraron de los alimentadores mediante el tratamiento con colagenasa de tipo IV. Se cultivaron los agregados durante varios períodos de hasta 12 semanas en suspensión dentro de placas bacteriológicas recubiertas previamente con agarosa de baja temperatura de fusión al 0,1 % en medio KO (KOM) que consistía en KO-DMEM al 86 %, KOSR al 14 %, glutamina 1 mM, aminoácidos no esenciales al 1 %, 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina, en presencia o ausencia de nicotinamida 10 mM (NA) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). En algunos experimentos, el medio usado fue medio NeurobasalTM (Gibco) suplementado con suplemento de N₂ (1:100) (Gibco) (medio NN), que se sustituyó después de 1 semana con DMEM/F12 (Gibco) suplementado con B27 (1:50) (Gibco).

60 Diferenciación de hESC en células RPE en presencia de factores de crecimiento TGF-β o inhibidores

Se dejó que las ESC humanas se diferenciaran en forma de agrupaciones en flotación libre en KOM como se ha explicado anteriormente durante hasta seis semanas en presencia de nicotinamida (NA) 10 mM. Tras la primera semana o 2 semanas de diferenciación, se suplementaron los cultivos con 20-180 ng/ml de activina A (PeproTech

Inc, Rocky Hill, NJ) con TGF β 3 (1 ng/ml; R&D Systems Inc, Mineápolis, MN) con TGF β 1 (1 ng/ml-20 ng/ml; R&D Systems Inc) o con SB431542 (5 μ M-50 μ M, Sigma). Los cultivos de control se suplementaron solo con NA.

5 Las ESC humanas en suspensión en KOM también se suplementaron tras una semana con nogina antagonista de la proteína morfogenética ósea (BMP) (700 ng/ml, R&D Systems Inc, Mineápolis, MN) en presencia y ausencia de NA, o, durante la tercera y cuarta semana, con FGF β (20 ng/ml PeproTech Inc) en presencia de NA, y se dejaron diferenciar hasta las 6 semanas en forma de agrupaciones en flotación libre en suspensión.

10 *Descripción de la expansión de las células RPE*

10 Para expandir las células RPE, se disociaron suavemente mediante medios mecánicos las agrupaciones pigmentadas en pequeños cúmulos, y se sembraron a baja densidad en poli-D-lisina ((30-70 kDa, 10 μ g/ml) y laminina (4 μ g/ml), y se cultivaron en KOM con NA. En estas condiciones de cultivo, las células pigmentadas perdieron pigmentación y adquirieron una morfología de tipo fibroide. Tras un nuevo cultivo durante 1,5 meses y la proliferación en cultivos de alta densidad, las células volvieron a adquirir la morfología poligonal y la pigmentación características de las células RPE.

15 Se realizaron la inmunotinción y la RT-PCR en tiempo real en todos los cultivos como se describe a continuación.

20 *Tinción inmunofluorescente indirecta de las células diferenciadas de las agrupaciones*

20 Para caracterizar el inmunofenotipo de las células de los agregados, se disociaron suavemente las agrupaciones cultivadas durante 2, 4, 6 o 8 semanas, bien con tripsina al 0,04 %/EDTA al 0,04 % o con un sistema de disociación de papaína (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), y se sembraron los pequeños grupos resultantes y las células individuales en medio KO suplementado con NA en poli-D-lisina (30-70 kDa, 10-20 μ g/ml) sola o suplementada bien con laminina (4 μ g/ml) o fibronectina (10-20 μ g/ml; todo de Sigma, St. Louis, <http://www.sigmaldrich.com>). Se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % después de 2 horas y se examinó la expresión de la nestina (1:200), NCAM de ácido polisiálico (PSA-NCAM) (1:100), Musashi (1:200; todo de Chemicon, Temecula, de CA), Pax6 (DSHB, 1:100 o Chemicon, 1:250), Otx2 (Chemicon, 1:200), MiTF (Lab Vision Corporation, Fremont, CA; IgG₁ de ratón, 1:50).

25 Para la inmunotinción de preparaciones enriquecidas de células pigmentadas, se diseccionaron por medios mecánicos las agrupaciones pigmentadas (de color marrón) de células de los cúmulos flotantes, que se diferenciaron durante 8-10 semanas, y se aislaron con micropipetas de vidrio u hojas de bisturí (Nº 15; Swann-Morton Sheffield, Eng.).

30 Se disociaron más las agrupaciones aisladas que estaban enriquecidas en células pigmentadas en cúmulos más pequeños mecánicamente por trituración con/sin la ayuda de la digestión con tripsina (0,025 %, EDTA 3 mM en PBS) o la disociación con papaína (sistema de disociación de papaína; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, Nueva Jersey). Se sembraron las pequeñas agrupaciones de células en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-D-lisina (30-70 kDa, 10 μ g/ml; Sigma) y recubiertos con laminina (4 μ g/ml; Sigma), y se cultivaron durante un período adicional de 3-5 semanas en el medio de cultivo usado para el cultivo en suspensión de las agrupaciones de células hESC. Se fijaron las células diferenciadas dentro de la excrecencia con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la inmunotinción con anticuerpos contra los marcadores intracelulares, se permeabilizaron las membranas de las células con Triton X100 al 0,2 % (Sigma) en PBS durante 30 minutos, suplementado con suero de cabra normal (5 %, Biological Industries) para realizar el bloqueo. Las células se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-MiTF (Lab Vision Corporation, Fremont, CA; IgG₁ de ratón, 1:50); anti-RPE65 (Novus Biologicals, Littleton, CO; IgG₁ de ratón, 1:300); anti-bestrofina (Novus Biologicals; IgG₁ de ratón, 1:150); anti-ZO-1 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA; policlonal de conejo, 1:10); anti-Ki67 (Dako Denmark A/S; 1:50) y anti-CRALBP (amablemente proporcionado por John C. Saari, Universidad de Washington, Seattle; policlonal de conejo, 1:100). Las células también se incubaron con faloidina (1:200 Sigma)

35 La localización del anticuerpo primario se realizó mediante el uso de inmunoglobulinas antimurinas de cabra conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako Denmark A/S; 1:20-1:50), IgG antimurina de cabra conjugada con Cy^{TH3} (1:500) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA), IgG anti-cabra de conejo conjugada con Cy2 (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc) e Ig anti-conejo porcina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako; 1:50).

40 *Análisis de agrupaciones de hESC por RT-PCR y PCR en tiempo real*

40 Se extrajo todo el ARN de las células hESC cultivadas en condiciones exentas de suero (1 semana después del paso), y en puntos temporales secuenciales hasta las 8 semanas durante el cultivo de agrupaciones derivadas de hESC en presencia o ausencia de nicotinamida 10 mM y con o sin suplementación con factores de crecimiento de la superfamilia de TGF β o antagonistas. El ARN se aisló usando el reactivo TRIzol (Invitrogen,

http://www.invitrogen.com) o reactivo TRI-Reagent (Sigma). La síntesis del ADNc se llevó a cabo usando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT) y cebadores aleatorios, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega Corporation, Madison, WI, http://www.promega.com). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo usando los protocolos convencionales con Taq ADN polimerasa (Gibco-BRL). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturización a 94 °C durante 15 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. El número de ciclos varió entre 18 y 40, dependiendo de la abundancia de ARNm en particular. Las secuencias humanas de los cebadores para la identificación de las transcripciones de los genes humanos (directo e inverso 5'-3') y la longitud de los productos amplificados fueron las siguientes (SEC ID Nº 1-12.):

10 MITF-A (GAGCCATGCAGTCAGAAT, GACATGGCAAGCTCAGGACT; 486 pb);
 RPE65 (G CTGCTG G AAAG GATT GAG, CAGGCTCCAGCCAGATAGTC; 231 pb);
 Bestrofina (GAATTTCAGGTGCCCTGT, ATCCTCCTCGTCTCCTGAT; 214 pb);
 15 CRALBP (AGCTGCTGGAGAAATGAGGAA, CAAGAAGGGCTTGACCACAT; 218 pb);
 MERTK (AAGTGATGTGTGGGCATTG, TCTAAGGGATCGGTTCTCCA, 189 pb);
 ACTRIA (AATGTTGCCGTGAAGATCTTC, CTGAGAACCATCTGTTGGTA; 699 pb);
 ACTRIB (CACGTGTGAGACAGATGGG, GGCGGTTGTGATAGACACG; 346 pb);
 20 ACTRIIA (AACCATGGCTAGAGGATTGGC, CTTCACCTACACATCCAGCTG; 551 pb);
 ACTRIIB (CACCAC CGAGCT CGT GAAG, GAGCCCTTGTATGGAAGG; 611 pb);
 Activina A (CTTGAAGAAGAGACCCGAT; CTTCTGCACGCTCCACCAC; 262 pb);
 β-actina (TTCACCACCAACGGCGGAGC, TCTCCTCTGCATCCTGTCG; 351 pb);
 GAPDH (AGCCACATCGCTCAGACACC; GTACTCAGCGCCAGCATCG; 301 pb).

25 Para la PCR en tiempo real, se hizo un seguimiento de los niveles de transcripciones usando cebadores y sondas TaqMan obtenidos de los productos de expresión génica TaqMan® Assays-on-Demand (Applied Biosystems, Foster City, CA): Oct4, ID Hs01895061; Musashi, ID Hs01045894; Pax6, ID Hs00240871; Six3, ID Hs00193667; Rx1, ID Hs00429459; Chx10, ID Hs01584048; MiTF-A, ID Hs01115553; MiTF-total, ID Hs01115557; Bestrofina, ID Hs00188249; RPE65, ID Hs00165642; Sox10, ID Hs00366918; Crx, ID Hs00230899. El análisis de PCR cuantitativo se realizó usando uno de los sistemas de detección de secuencias ABI Prism 7000HT y ABI Prism 7900HT y la mezcla madre de PCR universal TaqMan® (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El gen constitutivo de la β-glucuronidasa (GusB, ensayo ID Hs99999908) se seleccionó como referencia interna para la normalización en el análisis de cuantificación de RT-PCR en tiempo real, y el nivel de expresión relativa de cada gen se muestra como un valor relativo, al fijarse el nivel de expresión del día 0 (o las células no tratadas) en 1. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por duplicado o triplicado de acuerdo con el protocolo del fabricante (Applied Biosystems).

Microscopio electrónico de transmisión y fagocitosis de perlas de látex

40 Se cultivaron agrupaciones derivadas de ESC humanas en suspensión en KOM. A continuación, se separaron mecánicamente las zonas pigmentadas y se procesaron para el microscopio electrónico de transmisión. Se fijaron las células con glutaraldehído al 2 % y formaldehído al 4 % en tampón de cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Despues de tres lavados en tampón de cacodilato 0,1 M, se fijó el tejido con tetróxido de osmio al 1 % y ferricianuro de potasio al 1,5 %, se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol y se introdujo en resina de Agar 100. Se tiñeron las secciones ultra-finas cortadas con un Ultrotome LKB 3 con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se tomaron 45 micrografías con un microscopio electrónico Tecnai 12 (Phillips, Eindhoven, Países Bajos http://www.phillips.com) dotado de una cámara CCD Megaview II y un programa informático de análisis versión 3.0 (Soft Imaging System, http://www.soft-imaging.net).

50 Para examinar la capacidad fagocítica, se incubaron las agrupaciones pigmentadas con perlas de látex de 1 μm (Polysciences Inc., Warrington, PA) a una concentración de 1,0 x 10⁹ perlas/ml durante 18 horas a 37 °C. A continuación, se lavaron las agrupaciones pigmentadas con PBS+, se disociaron en células individuales o pequeños cúmulos usando un sistema de disociación de papaína y se sembraron en poli-D-lisina. Tras la fijación, se tiñeron las membranas de las células con colorante fluorescente de color rojo, PKH (Sigma). La fagocitosis se analizó usando un microscopio confocal (Olympus Fluoview FV1000).

Citometría de flujo

55 Se realizó un análisis de citometría de flujo para determinar el número de células positivas en PSA-NCAM y TRA-1-60 en diferentes puntos temporales dentro de las agrupaciones derivadas de hESC que se diferenciaron con o sin suplementación de nicotinamida. Se disociaron las agrupaciones con tripsina al 0,04 %/EDTA al 0,04 %. Se tiñeron las células individuales con anticuerpos anti-PSA-NCAM o anti-Tra-1-60 (ambos de Chemicon; 1:100), que se detectaron con inmunoglobulinas de cabra antimurinas conjugadas con FITC (Dako; 1:100), y se tiñeron con colorante de contraste de viabilidad celular de yoduro de propidio (0,005 mg/ml; Sigma). Las células de control solo se incubaron con un anticuerpo secundario. Se analizó la inmunorreactividad asociada a las células con FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), usando el programa informático CellQuest.

Trasplante intravítreo y subretiniano de células RPE diferenciadas derivadas de hESC

Para el trasplante intraocular, se usaron células hESC diseñadas por ingeniería genética para expresar eGFP [como se ha descrito anteriormente en Groppe *et al.*, "Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors". *Molecular Therapy* 2003; 7: 281-7] con el fin de generar células RPE en cultivo como se ha descrito anteriormente. En resumen, se aislaron mecánicamente las agrupaciones enriquecidas con células pigmentadas por disección tras la diferenciación durante 6-8 semanas en presencia de NA sola o en presencia de NA suplementada con activina A. Para permitir la inyección a través de un capilar de vidrio de orificio pequeño, los cúmulos se disociaron más en pequeños grupos de células mediante la digestión con papaína (sistema de disociación de papaína; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, Nueva Jersey) a 37 °C durante 30 minutos, tras lo que se trituraron.

Para el trasplante intraocular, se usaron quince ratas albinas adultas (peso corporal de 230-250 g) y más de 100 ratas RCS distróficas exogámicas de 1-3 semanas de vida. En las ratas RCS, una mutación en el gen Mertk causa la disfunción del RPE que conduce a la degeneración de la retina durante los primeros meses de vida. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la declaración de ARVO para el uso de animales en investigación oftálmica y de la visión, y fueron aprobados por el comité institucional para la investigación animal de la Facultad de Medicina Hadassah de la Universidad Hebreo.

Para el trasplante (así como para los registros electrorretinográficos), los animales se anestesiaron con HCl de ketamina (Ketalar, Parke Davis, Reino Unido; 100 mg/kg) inyectado por vía intraperitoneal en combinación con el agente relajante xilazina (2,0 mg/kg). Se administraron gotas de anestésico local (HCl de benoxinato al 0,4 %, Fischer Pharmaceuticals, Israel). Se dilataron las pupilas con tropicamida al 0,5 % (Mydramide, Fisher Pharmaceuticals, Israel) y HCl de fenilefrina al 2,5 % (Fisher Pharmaceuticals, Israel). Bajo la visualización de un microscopio de disección (Stemi SV 11, Zeiss, Alemania), se inyectaron aproximadamente 100.000 células en 4 µl de medio en el vítreo o en el espacio subretiniano a través de una metodología trans-escleral, trans-coroidea a través de un capilar de vidrio conectado a un Pico-inyector neumático (PLI-100; Medical System Corp., Greenvale, NY, <http://www.medicalsystems.com>). Los otros ojos no inyectados sirvieron como un tipo de control. Como control adicional, se inyectó solución salina en los ojos (inyección de cloruro de sodio BP, 0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania).

Durante y después de la inyección, no se observó hemorragia coroidea. Los animales se mantuvieron calientes a lo largo y después del procedimiento usando una lámpara de calentamiento. Después del trasplante, todos los animales recibieron el agente inmunosupresor ciclosporina A (Sandimmune, Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza) en agua potable a una concentración de 210 mg/l.

Formación de imágenes in vivo y ex vivo de las células transplantadas

Para hacer un seguimiento de la supervivencia y la ubicación de las células transplantadas *in vivo*, se fotografiaron los animales anestesiados usando una cámara de fondo de color (Zeiss, Alemania), y se detectó la fluorescencia de las células que expresaban la GFP usando filtros de fluoresceína en un oftalmoscopio láser de barrido (Heidelberg HRA, Alemania). En algunos ojos, también se determinó la ubicación de los injertos positivos en GFP *ex-vivo* en preparaciones de taza ocular, usando un microscopio de fluorescencia (Canon, Japón).

Evaluación de la función de la retina del hospedador tras el trasplante intraocular de células RPE derivadas de hESC

Tras de cuatro a seis semanas del trasplante, se evaluó la función de la retina en los ojos de rata RCS transplantadas y de control mediante electrorretinografía (ERG). Se registraron ERG de campo completo tras la adaptación a la oscuridad durante la noche. Se anestesiaron los animales con ketamina y xilazina en tenue luz roja, y se dilataron las pupilas con tropicamida y fenilefrina. Se colocaron electrodos de lente ERG para rata monopulares (Medical Workshop, Amsterdam, Países Bajos) en cada ojo tras la anestesia tópica adicional, con un electrodo de referencia y un electrodo de tierra colocado en la lengua y en la cola, respectivamente. Se usó un sistema ERG computarizado comercial (LKC technologies, UTAS 3000) para registrar las respuestas de la retina hacia estímulos de campo completo generados usando un flash foto-estroboscópico Xenon (Grass, PS-22) montado en un tazón Ganzfeld. Se usaron destellos azules tenues en condiciones escotópicas para provocar una respuesta principalmente guiada los bastones. A las intensidades de azul de estímulos más potentes, y con destellos blancos en el estado adaptado a la oscuridad, se registraron las respuestas mixtas de conos y bastones. En condiciones de adaptación a la luz (fototópicas), con destellos blancos en fondo blanco de 34 cd/m² inhibidor de los bastones, se generaron las respuestas de los conos de 1 Hz y 16 Hz. Las señales se filtraron entre 0,3-500 Hz, y se usó la señal media.

Evaluación histológica e inmunohistoquímica de los ojos transplantados

Los animales fueron sacrificados 4-8 semanas después del trasplante, y se enuclearon los ojos para el examen histológico e inmunohistoquímico. Tras la fijación en solución de Davidson, se introdujeron los ojos en parafina y se cortaron en secciones de 4 µm en serie. Cada quinto portaobjetos se tiñó con hematoxilina y eosina para realizar la evaluación histomorfológica y la cuantificación. Para los estudios de inmunofluorescencia indirecta, para caracterizar

el estado de diferenciación de las células trasplantadas, se eliminó la parafina de las muestras en xileno y se deshidrataron en alcoholes graduados, se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) y se incubaron con tampón de citrato 10 mM (pH 6,0) a 110 °C durante 4 minutos. Despues de lavar con PBS, se bloquearon las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1 % (BSA), Triton X100 al 0,1 % (Sigma-Aldrich) y suero de cabra normal o suero de asno normal al 3 %. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 hora en una cámara humidificada con combinaciones apropiadas de los siguientes anticuerpos primarios: proteína fluorescente anti-verde (anti-GFP), conjugada con fluoresceína (FITC) o rodamina (TRITC) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA; monoclonal de ratón, 1:100); anti-RPE65 (Novus Biologicals, Littleton, CO; IgG₁ de ratón, 1:100); anti-bestrofina (Novus Biologicals; IgG₁ de ratón, 1:100); anti-ZO-1 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA; polyclonal de conejo, 1:100); y anti-rodopsina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA; polyclonal de conejo, 1:100). La localización del anticuerpo primario se realizó después del lavado en PBS mediante el uso de IgG anti-conejo de cabra conjugada con GyTM2 (1:200), IgG antimurina de cabra conjugada con CyTM2 (1:200), IgG anti-conejo de cabra conjugada con CyTM3 (1:200), IgG antimurina de asno conjugada con CyTM2 (1:200), IgG anti-conejo de asno conjugada con CyTM5 (1:200), todas de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA). Los núcleos se contratiñeron con medio de montaje que contenía 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) o con 1 µg/ml de yoduro de propidio (BioLegend, San Diego, CA). Para determinar la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, se realizaron los correspondientes controles negativos con un anticuerpo conjugado de isotipo irrelevante. Se usó un microscopio Olympus BX41 dotado de una cámara digital DP70 (Olympus, Japón) para obtener imágenes de microscopía de fluorescencia y de luz. Las imágenes confocales se recogieron en un microscopio confocal Olympus Fluoview 300 (FV300) (Olympus, Japón), montado en torno a un microscopio invertido IX70. Se usaron láseres de Ar 488 nm, HeNe-verde 543 y HeNe-rojo 633 en combinación con la óptica Nomarski.

25 Cuantificación del rescate de la capa de fotorreceptor en las proximidades de los injertos de RPE

Para cuantificar el efecto del trasplante de RPE derivadas de hESC sobre la retina del hospedador en degeneración, se obtuvieron imágenes microscópicas de alta resolución de secciones teñidas con hematoxilina y eosina y se crearon montajes de toda la longitud de la retina usando el programa informático Photoshop (Adobe, EE.UU.). Se midieron el espesor total de la retina, el espesor de la capa nuclear externa (fotorreceptores), así como el espesor de la capa de los segmentos interior y externo en la proximidad de los injertos subretinianos de células RPE derivadas de hESC usando el programa de imagen J (NIH). Se compararon estos con las mediciones obtenidas en el lado opuesto correspondiente de la retina, alejado del injerto. Dado que el proceso degenerativo en las ratas RCS depende de la ubicación, el espesor se midió en zonas que se encontraban a la misma distancia del cuerpo ciliar. En cada zona, se promediaron al menos tres mediciones situadas a la misma distancia.

Resultados

Caracterización de las células RPE diferenciadas

40 Se indujo la diferenciación de las células hESC cultivándolas como agrupaciones en flotación libre en medio KO suplementado con NA. En estas condiciones de cultivo, se desarrollaron zonas definidas muy enriquecidas en células pigmentadas dentro de las agrupaciones en diferenciación, como se muestra en la Fig. 3A. Estas zonas pigmentadas aparecieron tras 4 semanas de diferenciación y, tras 8 semanas, el $72,9 \pm 2,5$ % de las agrupaciones tenía zonas pigmentadas. Tras 4 semanas, no se observaban zonas pigmentadas de diferenciación en ausencia de suplementación con NA, y en estas condiciones, solo el $13,1 \pm 4,8$ % desarrolló zonas pigmentadas tras 8 semanas (Fig. 8A y 8B). Así pues, el tratamiento con NA aumentó/potenció la diferenciación dentro de las agrupaciones de hESC en células pigmentadas en comparación con las agrupaciones de hESC en diferenciación espontánea.

45 50 Dentro de las agrupaciones que se diferenciaron durante 8 semanas en presencia de NIC, el $5,7 \pm 1,0$ % de las células estaban pigmentadas, el $5,4 \pm 1,1$ % expresó el marcador RPE temprano MiTF y, en la mayoría de los casos, la expresión de MiTF se correlacionó con la pigmentación (Fig. 8C). Las agrupaciones parcialmente disociadas y sembradas de hESC diferenciadas se desarrollaron, entre otros tipos de células diferenciadas, en colonias compuestas de monocapas de células pigmentadas, según lo mostrado por una micrografía de campo oscuro (Fig. 5D) y una imagen de contraste de fase (Fig. 3E). Las células de estas colonias adoptaron una forma poligonal y formaron láminas de células de tipo "adoquín" firmemente unidas entre sí (Fig. 3E), rasgos que son muy característicos de las células RPE nativas. La distribución de la F-actina dentro de las células era adyacente a sus membranas, como las células RPE auténticas, como se demuestra con la tinción con faloidina (Figura 10A). Las células RPE pigmentadas expresaron conjuntamente los marcadores RPE Otx2 (Fig. 3B) y MiTF-A (Fig. 3B y Fig. 3F), así como ZO-1 (Fig. 3G), bestrofina (Fig. 3H), RPE65 (Fig. 3I) y CRALBP (Fig. 3J).

55 60 65 Tras la disociación, la siembra a baja densidad y el cultivo, las células pigmentadas perdieron pigmentación y adquirieron una morfología de tipo fibroide, como se muestra mediante la formación de imágenes de contraste de fase (Fig. 3K y 10B). Tras un nuevo cultivo prolongado y la proliferación en cultivos de alta densidad, las células volvieron a adquirir la morfología poligonal y la pigmentación de las células RPE (Fig. 3L y 10C).

El análisis de microscopía electrónica (EM) demostró que las células pigmentadas derivadas de hESC tenían características morfológicas de las células RPE nativas incluyendo microvellosidades en su lado apical (Fig. 10D) y membrana basal en su lado basal (Fig. 10E). Las células contenían gránulos de melanina (Fig. 10D) y estaban firmemente unidas (Fig. 10F).

Una de las funciones más importantes de las células RPE es la fagocitosis de los segmentos externos desprendidos de los fotorreceptores. Para examinar si las células pigmentadas derivadas de hESC tenían capacidad fagocítica, se incubaron con perlas de látex fluorescentes de 1 μm . Las tres imágenes fluorescentes confocales demuestran cortes de eje z en serie (Fig. 10H-10J). El análisis de microscopía confocal mostró que las células RPE putativas eran capaces de realizar la fagocitosis de las perlas fluorescentes (Fig. 10G-10J).

Efecto inductor de la diferenciación de la nicotinamida

La diferenciación de las células hESC hacia las células RPE se examinó cultivándolas en forma de agrupaciones en flotación libre en KOM con o sin NA (sin proporcionar agrupaciones en diferenciación espontánea como controles). Tras 6 semanas de diferenciación, el nivel de expresión de los marcadores de células RPE MiTF-A y RPE65 era significativamente mayor en presencia de NA, según lo determinado por RT-PCR en tiempo real (Fig. 1A y 1B; respectivamente). La expresión de MiTF-A aumentó casi el doble en presencia de NA, mientras que la expresión de RPE65 aumentó casi 30 veces. Como la mayoría de las células pigmentadas expresaron conjuntamente MiTF-A (Fig. 8C), parecía que, en presencia de NA, hubo un aumento significativo y prominente del nivel de expresión de RPE65 por célula pigmentada. Por lo tanto, además de su efecto inductor hacia las células RPE, la NA también potenció la maduración de las células RPE y tuvo efecto sobre el fenotipo de las células. El análisis Q-PCR en puntos temporales secuenciales de entre 2 y 6 semanas mostró un aumento en los niveles de expresión de MiTF-A y RPE65 (Fig. 1C y 1D, respectivamente), en presencia de NA. La expresión de los marcadores se reguló positivamente tres cuatro semanas de diferenciación, y los niveles de expresión siguieron aumentando durante las cuatro semanas siguientes (dos últimas semanas no mostradas). Se observó un aumento similar de la expresión de los marcadores RPE bestrofina, CRALBP y Mertk mediante el análisis de RT-PCR de las células en agrupaciones pigmentadas sembradas (Fig. 1E).

Para encontrar si el desarrollo de las células RPE *in vitro* recapitula las etapas evolutivas clave de RPE *in vivo*, se realizaron experimentos de tiempo incluyendo el análisis de la expresión en las agrupaciones de hESC de marcadores clave durante el desarrollo del RPE. Se analizaron las agrupaciones que se diferenciaron en presencia o ausencia de NA por PCR en tiempo real para la expresión de marcadores de hESC no diferenciadas, la diferenciación neuronal temprana, y el desarrollo de la retina y de RPE (Fig. 9A-9L). En primer lugar, se demostró que la expresión de Oct4 (Fig. 9A), un marcador de hESC no diferenciadas, disminuyó más rápidamente durante la diferenciación en presencia de NA. Conforme a ello, el análisis FACS demostró que la expresión de TRA-1-60, un marcador de la membrana superficial de células no diferenciadas, también disminuyó más rápidamente en las muestras tratadas con NA (Fig. 9M). Por lo tanto, la diferenciación en presencia de NA se puede usar para eliminar las células no diferenciadas del cultivo y puede ayudar a evitar la formación de tumores teratoides tras el trasplante.

Además, el tratamiento con NA mejoró el proceso de diferenciación neuronal temprana. En presencia de NA, la expresión de las transcripciones de los marcadores neuronales tempranos Otx2 (Fig. 9B), Pax6 (Fig. 9D) y Musashi (Fig. 9C) aumentó significativamente después de 2, 2-6 y 4-6 semanas de diferenciación, respectivamente. Se demostraron resultados similares a nivel de proteína mediante el análisis FACS de la expresión de PSA-NCAM, un marcador de precursores neuronales (Fig. 9O). Después de 4 semanas de diferenciación con NA, el $81,4 \pm 6,3\%$ de las células expresaba PSA-NCAM en comparación con el $14,4 \pm 5,9\%$ de las agrupaciones de control. La tinción de inmunofluorescencia indirecta confirmó que a las 4 semanas, la mayoría de las células de las agrupaciones tratadas con NA adquirió un fenotipo neuronal y expresaba PSA-NCAM ($74,2 \pm 4,1\%$), nestina ($55,9 \pm 10,1\%$) y Musashi ($71,4\%$; Fig. 9N).

La expresión de las transcripciones de Rx1 y Six3 (Fig. 9F y 9E, respectivamente), que son genes reguladores clave de la especificación y la morfogénesis de la retina, se demostró tras 2 semanas de diferenciación. El tratamiento con NA aumentó la expresión de estos genes.

En presencia de NA, la expresión de las transcripciones del marcador de RPE temprano MiTFA se indujo tras 4 semanas de diferenciación (Fig. 9H). La expresión de marcadores de RPE más maduras, bestrofina y RPE65, fue principalmente regulada positivamente tras 4 y 8 semanas, respectivamente (Fig. 9J y 9I, respectivamente). La expresión de estas transcripciones también fue mayor en los cultivos tratados con NA en comparación con las agrupaciones de hESC en diferenciación espontánea como controles (Fig. 9I y 9J). La expresión de RPE65 se aumentó en más de 100 veces, confirmando además que, además del efecto inductor de NA, también tuvo un efecto sobre el fenotipo de las células. Para descartar que las células pigmentadas que se obtuvieron no eran melanocitos derivados de la cresta neuronal, se demostró que la expresión de Sox10, que es un marcador del desarrollo de estas células, fue baja en comparación con las células de control de la línea celular de melanoma M51 e independiente de la suplementación con NA. Por lo tanto, los cultivos no estaban compuestos de melanocitos. Así pues, se concluyó que la NA potencia la inducción de la diferenciación hacia las células RPE.

El tratamiento con NA también aumentó la expresión de Chx10, que regula la proliferación de células progenitoras de la retina neuronal, y de Crx, el marcador de los progenitores fotorreceptores (Fig. 9K).

En resumen, los inventores concluyeron que el proceso de diferenciación hacia RPE dentro de las agrupaciones de hESC tuvo lugar a través de etapas similares al desarrollo del RPE auténtico *in vivo* y fue aumentado por la NA. Además, la NA tuvo un efecto sobre el fenotipo de las células RPE que se obtuvieron. Estas células eran diferentes de células RPE obtenidas tras la diferenciación espontánea y expresaban marcadores de células RPE maduras a niveles significativamente superiores.

10 *La NA muestra un efecto inductor independientemente de medio de cultivo*

La suplementación con NA aumentó la pigmentación en las células diferenciadas cultivadas tanto en medio KO como en medio NN/DMEM durante 12 semanas, como se muestra en las micrografías de campo oscuro de las agrupaciones de hESC en diferenciación (Fig. 2A-2D). En el medio NN, que fue reemplazado adicionalmente después de una semana por DMEM/F12-B27 (NN/DMEM), en comparación con el medio KO, en presencia de NA, el porcentaje de agrupaciones de hESC pigmentadas del número total de agrupaciones fue mayor, aunque sus números de tamaño y población total en relación con las agrupaciones cultivadas en medio KO fueron menores. El análisis de RT-PCR mostró que la suplementación con NA mejoró la expresión de MiTF-A aproximadamente 3 veces en KOM y aproximadamente 2,5 veces en medio NN/DMEM (Fig. 2E). La expresión de RPE65 fue aproximadamente el doble en KOM, y aumentó casi 6 veces en medio NN/DMEM, con la suplementación de NA frente a la ausencia de NA (Fig. 2F). Así pues, el efecto inductor de la diferenciación de la NA se muestra en las células RPE diferenciadas independientemente del medio en el que se cultivan las hESC y se produce la diferenciación.

25 *El efecto de los miembros de la superfamilia de TGF β en la diferenciación de SC*

Lo primero en analizarse fue la expresión de los receptores de activina, así como la activina A en agrupaciones de 2 semanas de vida. El análisis se realizó en este punto temporal, ya que la expresión de los marcadores tempranos del campo ocular está emergiendo en este momento y, por lo tanto, las células que se diferencian se encuentran probablemente en una etapa de desarrollo paralelo a la vesícula óptica temprana. Se demostró que la expresión de los receptores ACTRIIB y ACTRIIB fue alta en presencia de NA en comparación con la falta o la menor expresión cuando las células se diferenciaron sin NA (Fig. 11G). Así pues, la NA tuvo un efecto sobre el fenotipo de las células que se diferenciaron en su presencia.

35 Se encontró que la activina A aumenta la diferenciación hacia las células RPE. Las micrografías de campo oscuro de las agrupaciones derivadas de hESC que se diferenciaron durante 4 semanas mostraron la aparición de células pigmentadas en esta primera etapa, en presencia de la activina (Fig. 11A). Se demostró además que, en presencia de NA, la activina A aumentó significativamente la diferenciación de las células hESC hacia las células RPE (Fig. 4A-4B y 11B-11C). El porcentaje de agrupaciones que incluía células pigmentadas ($50,7 \pm 6,5$ frente a $17,7 \pm 3,2$), así como el porcentaje de células pigmentadas del número total de células ($9,9 \pm 1,4$ frente a $2,4 \pm 1,2$), fue significativamente mayor cuando se indujo la diferenciación en presencia de activina A en comparación con los cultivos de control suplementados con NA sin activina A (Figuras 11H y 11I). Este resultado se confirmó con la RT-PCR, que demostró que el tratamiento con activina A aumentó significativamente (más de cinco veces y más de cuatro veces, respectivamente) la expresión de los marcadores RPE65 (Fig. 4D) y bestrofina (Fig. 4E), que son específicos de las células RPE maduras. Además, las características morfológicas de las agrupaciones de células pigmentadas que se desarrollaron en presencia de activina A fueron diferentes. Su pigmentación era más oscura y presentaban una demarcación muy clara con respecto a las células no pigmentadas circundantes (Fig. 4B). La expresión de MiTF-A, un marcador que aparece antes durante el desarrollo del RPE no se vio afectado por la suplementación con activina A. Por lo tanto, la activina A, que es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β , aumenta la diferenciación de las células hESC en células RPE. La suplementación con el inhibidor de la activina SB431542 disminuyó significativamente la aparición de agrupaciones pigmentadas en estas condiciones (Fig. 11E y 11H). El efecto de la activina A sobre la diferenciación del RPE se estudió a diversas concentraciones. Se encontró que el efecto era dependiente de la dosis con un efecto de aumento óptimo a 140 ng/ml en el porcentaje de células pigmentadas y la expresión de los marcadores de RPE, bestrofina (Fig. 11K) y RPE65 (Fig. 11L). En la mayoría de los experimentos, la activina A se usó como suplemento durante dos semanas (semanas 3-4), una vez que las agrupaciones ya se habían diferenciado durante 2 semanas, ya que se encontró que la aplicación en este período de tiempo era óptima para mejorar la diferenciación de RPE. Dada la observación de que la expresión de los marcadores del desarrollo ocular temprano también comenzó después de 2 semanas de diferenciación (Fig. 9A-9L), parecía que la activina aumentó el proceso de desarrollo del ojo y RPE. Además, dado que el porcentaje de células pigmentadas aumentó de 5 a 6 veces en presencia de la activina A, mientras que la expresión de los marcadores de células RPE maduras tales como la bestrofina aumentó en aproximadamente 10 veces, parece que la activina A tuvo un efecto sobre la madurez y el fenotipo de las células, además de su efecto inductor. Esto fue apoyado por el aspecto morfológico de las células pigmentadas que se obtuvieron en presencia de activina A, puesto que eran más oscuras y con una demarcación nítida con respecto a las células circundantes.

65 El análisis de Q-PCR a lo largo del tiempo del efecto de tratamiento con activina A de 2 semanas en la expresión génica mostró que la activina A aumentó significativamente la expresión de los marcadores progenitores de la retina

Rx1 y Chx10, así como el marcador de RPE bestrofina. A las 4 semanas de diferenciación, el tratamiento con activina A también aumentó el nivel de expresión de las isoformas MiTF totales (Fig. 11M-11P).

5 También se observó el efecto inductor de la activina A sobre la diferenciación de la retina y RPE con otros miembros de la superfamilia de TGF β . El tratamiento de las agrupaciones en diferenciación con TGF β 3 aumentó significativamente los niveles de expresión de las transcripciones de MiTF-A, que desempeña un papel clave en el desarrollo de RPE *in vivo* (Fig. 5F). Además, el tratamiento con TGF β 1, que es otro miembro de la superfamilia de TGF β también mejoró significativamente la aparición de agrupaciones que albergaban células pigmentadas (Fig. 11D y 11H). Por el contrario, la diferenciación en presencia de NA y FGF básico (bFGF) en lugar de factores de la 10 superfamilia de TGF β inhibió la aparición de células pigmentadas (Fig. 11F).

15 Además, se demostró que las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), que pertenecen a una segunda subfamilia de la superfamilia de TGF β , desempeñan un papel en la diferenciación de hESC hacia RPE. Como se muestra en las micrografías de campo oscuro, en presencia del antagonista de BMP nogina, se bloqueó la diferenciación de las agrupaciones de hESC en células RPE pigmentadas (Fig. 5D). La diferenciación en células pigmentadas se bloqueó con la suplementación de nogina, incluso suplementando también el medio con NA (Fig. 5C). A nivel de ARN, la RT-PCR en tiempo real demostró que la nogina redujo significativamente la expresión de MiTF-A, tanto en presencia como en ausencia de NA, en el medio de cultivo (Fig. 5E). Por lo tanto, las BMP desempeñan un papel en la inducción de la diferenciación de las células hESC en células RPE.

20 *Las células RPE diferenciadas derivadas de hESC se pueden usar para el trasplante intraocular*

25 Primero, se trasplantaron poblaciones enriquecidas de células RPE derivadas de hESC diseñadas por ingeniería genética para expresar eGFP en los espacios vítreo y subretiniano de ratas albinas, con el fin de facilitar la localización de las células pigmentadas. Tras el trasplante intraocular, se pudieron identificar fácilmente las células pigmentadas trasplantadas *in vivo* (Fig. 6A y 6B). Tras la enucleación del ojo mostrada en la Fig. 6B, la retirada de la córnea y del cristalino, y el aislamiento de la retina, esta mostró el injerto principal, así como células pigmentadas dispersas adicionales (Fig. 6C). En las secciones histológicas, había injertos que incluían células trasplantadas pigmentadas viables que también expresaban GFP (Fig. 6D-6G). Se pudieron encontrar células trasplantadas en el espacio vítreo, en la retina, a lo largo del tracto de inyección y también en el espacio subretiniano (Fig. 6H, 6I, 6O, 6P). Las células RPE transplantadas también migraron desde los injertos subretinianos y se integraron en la capa de RPE de las ratas hospedadoras (Fig. 6J). En los injertos, se formaron uniones firmes, que son características de las células RPE, como se muestra por la expresión del marcador de uniones firmes ZO-1 en las células positivas en eGFP transplantadas (Fig. 6K-6N). Las células de los injertos también mantuvieron la expresión de RPE65, bestrofina y MiTF-A.

35 *Las células RPE derivadas de hESC sobreviven, se integran y mantienen características de células RPE diferenciadas tras el trasplante en el espacio subretiniano de ratas RCS*

40 40 El cuerpo principal de los experimentos de trasplante se realizó en ratas RCS que presentaban una degeneración del RPE y de la retina causada por una mutación en el gen *mertk*, en un intento de examinar si la administración de células RPE derivadas de hESC podía modular el curso de la enfermedad.

45 45 Las células pigmentadas transplantadas se pudieron identificar fácilmente *in vivo* en los ojos de las ratas RCS usando sistemas de formación de imágenes del fondo de ojo convencionales (Fig. 12A-12C). Se puede observar que las células que expresan GFP, derivadas de hESC, emiten fluorescencia cuando se usan filtros de excitación y emisión de fluoresceína (Fig. 12C). En las preparaciones de copa ocular observadas *ex vivo* en un microscopio de fluorescencia (Fig. 12D-12E), se pueden ver grandes agrupaciones de células positivas en GFP subretinianas (Fig. 12D), así como múltiples agrupaciones dispersas de menor tamaño (Fig. 12E).

50 50 La evaluación histológica e inmunohistoquímica confirmó las macro-observaciones *in vivo* y *ex vivo*. Las células transplantadas sobrevivieron y se integraron en el espacio subretiniano, y mantuvieron la expresión de proteínas que caracterizan y suelen ser específicas del RPE maduro (Fig. 13 y 14). Es importante señalar que no se produjo inflamación ni reacción inmune significativa, y que no se observaron tumores ni teratomas en más de 100 ojos 55 transplantados. Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina (Fig. 13A y 13B) muestran la ubicación subretiniana y, en ocasiones, intrarretiniana de las células pigmentadas derivadas de hESC transplantadas, que aparecieron en agrupaciones o como células aisladas (flechas). La inmunotinción con GFP (Fig. 13C-13F) confirmó que las células derivan realmente de hESC. Los injertos a menudo eran bastante grandes y dispersos (Fig. 13C y 13E), y se observaron claramente células pigmentadas que expresaban conjuntamente la GFP (Fig. 13D y 13F).

60 60 La inmunotinción reveló que un gran número de células transplantadas del interior de los injertos expresan proteínas que caracterizan las células RPE diferenciadas maduras (Fig. 14). Esto incluía la expresión de los marcadores específicos de RPE RPE65 (Fig. 14A-14E) y bestrofina (Fig. 14F-14J). Las células también eran capaces de formar uniones firmes (Fig. 14K-14O), que es una función importante de las células RPE y esencial para mantener la barrera hematorretiniana. El grupo situado más a la izquierda de cada fila muestra la imagen fluorescente de bajo

aumento de los injertos que expresan conjuntamente GFP y el marcador correspondiente. Las imágenes confocales de alto aumento de cada fila muestran el pigmento (mediante la óptica Nomarski), así como la expresión conjunta de GFP y los diferentes marcadores a nivel de una sola célula.

5 *Las células RPE derivadas de hESC proporcionan el rescate funcional y estructural de la retina en ratas RCS distróficas*

10 En el modelo de ratas RCS de degeneración de la retina, en general, la función de la retina se ve gravemente afectada a los 2-3 meses de vida. A nivel estructural, se produce la pérdida y el adelgazamiento correspondientes de la capa nuclear externa (ONL) de la retina y, a menudo, se reduce hasta menos de 1-2 filas de núcleos fotorreceptores a esta edad. En los ojos trasplantados con células RPE derivadas de hESC, los registros electrorretinográficos revelaron una importante preservación relativa de la función de la retina en comparación con los ojos no tratados o con inyección de medio de control (Fig. 7 y Fig. 15).

15 Las respuestas ERG representativas hacia una serie de destellos blancos de intensidad creciente en el estado adaptado a la oscuridad (DA) se muestran en un ojo transplantado (Fig. 15A) frente a su otro ojo de control (Fig. 15B). La Fig. 15C muestra las notables diferencias en las amplitudes medias entre los ojos transplantados y los diferentes grupos de ojos de control. A la intensidad más alta, la amplitud de la onda b DA media en los ojos transplantados con RPE fue de $283,3 \pm 37,5$ (media ± ETM, n = 13) frente a $158,5 \pm 18,1$ en los otros ojos de control no tratados (n = 13, p < 0,01) y de $89,9 \pm 14,4$ en los ojos inyectados con medio (n = 5, p < 0,01). Es importante tener en cuenta que existe una tendencia hacia una mejor preservación de la función de la retina después de un trasplante de células RPE tratadas con activina-A (Fig. 15) en comparación con el efecto de rescate logrado tras el trasplante de células RPE derivadas sin activina-A (Fig. 7).

20 25 La evaluación cualitativa así como cuantitativa de la estructura de la retina corroboró los hallazgos funcionales (Fig. 16). Se observó la preservación relativa de la capa (ONL) de fotorreceptores y de los segmentos fotorreceptores interior y externo (IS + OS) en las proximidades de los injertos de RPE subretinianos en comparación con las zonas alejadas de los injertos (dos ejemplos mostrados en la Fig. 16A, 16B). El espesor total de la retina (Fig. 16C), así como el espesor de ONL y de IS+OS (Fig. 16D) se aumentó significativamente cerca de los injertos de células RPE derivadas de hESC (barras negras, media ± ETM, n = 7) en comparación con las zonas alejadas de los injertos (barras grises). Este tipo de rescate estructural solo se observó en las proximidades de los injertos subretiniano e intrarretiniano profundo, y no de los injertos exclusivamente intravítreos (no mostrados).

30 35 *Las células RPE tratadas con activina-A derivadas de hESC trasplantadas absorben la rodopsina in vivo*

40 Una de las funciones clave del RPE sano es la absorción y el reciclaje de los segmentos externos de fotorreceptor desprendidos, como parte del proceso de renovación del fotorreceptor. Las imágenes confocales de células RPE transplantadas subretinianas muestran la localización conjunta de pigmento, GFP, RPE65 y rodopsina dentro de las mismas células individuales. Esto sugiere que las células transplantadas tienen el fenotipo de RPE maduro y son capaces de realizar la absorción de segmentos externos desprendidos (que contienen rodopsina). Cabe señalar que las células RPE nativas de la rata RCS expresan RPE65 (Fig 17C, flecha), pero no expresan GFP (Fig 17D, flecha), y contienen cantidades mínimas de rodopsina (Fig. 17B, 17E).

45 Así pues, los resultados anteriores proporcionan pruebas de que las células RPE derivadas de hSC obtenidas mediante cultivo en un sistema de cultivo que comprende un miembro de la superfamilia de TGF β y, preferentemente, en presencia de NA se pueden utilizar *in vivo* para trasplantarlas con el fin de proporcionar células RPE esencialmente completamente funcionales en el ojo.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hadasit Medical Research Services & Development Limited

55 <120> Sistemas de cultivo de células del epitelio pigmentario de la retina diferenciadas

<130> 1827336

<150> US 60/907.818

<151> 18-04-2007

60 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.1

65

5 <210> 1
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 1

 gagccatgca glccgaatga catggcaagc tcaggact
 38
 15 <210> 2
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 2

 gctgcgtggaa aggattttag caggctccag ccagatagtc
 40
 25 <210> 3
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 3
 gaatttgcag gtgtccctgt atcctccctcg tcctccctgat 40

 35 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 4
 agctgcgtggaa gaatgaggaa caagaagggc ttgaccacat
 40
 45 <210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 5

 aatgtgttgt tggccatgt tctaaggat cggttctcca
 40
 55 <210> 6
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 60 <400> 6

 aatgtgttgt tgaagatctt ccgtgtttttt atctgtggg ta
 42

55

5 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

 cacgtgtgag acagatgggg goggttgtga tagacacg
 38

10 <210> 8
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 8

 aaccatggct agaggattgg ccttcacctt acacatccag ctg
 43

20 <210> 9
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 9
 caccatcgag ctctgtgaagg agcccttgic atggaagg
 38

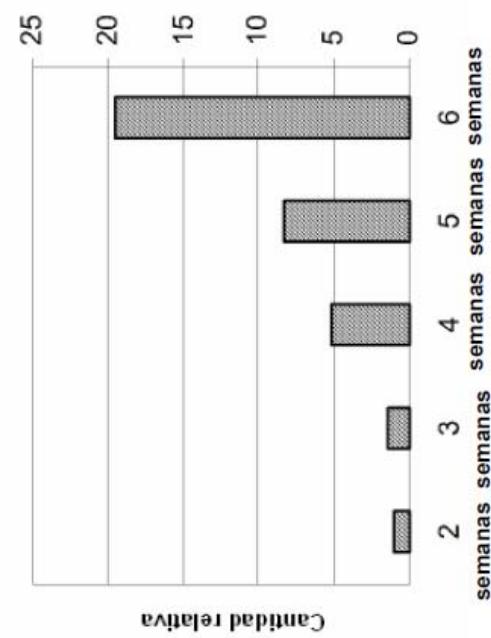
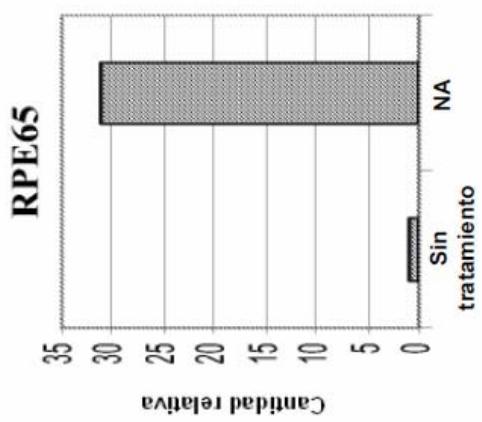
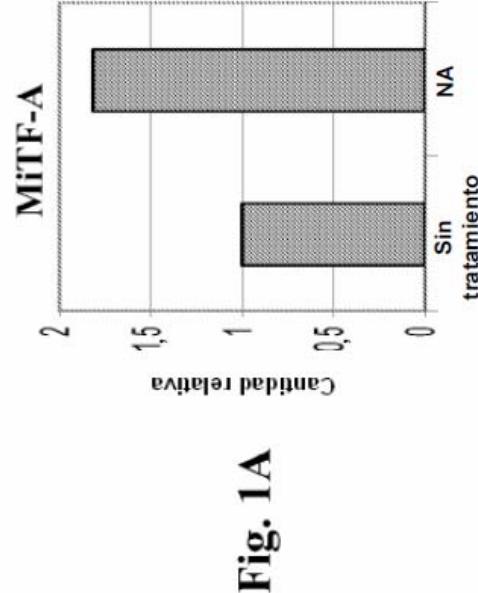
REIVINDICACIONES

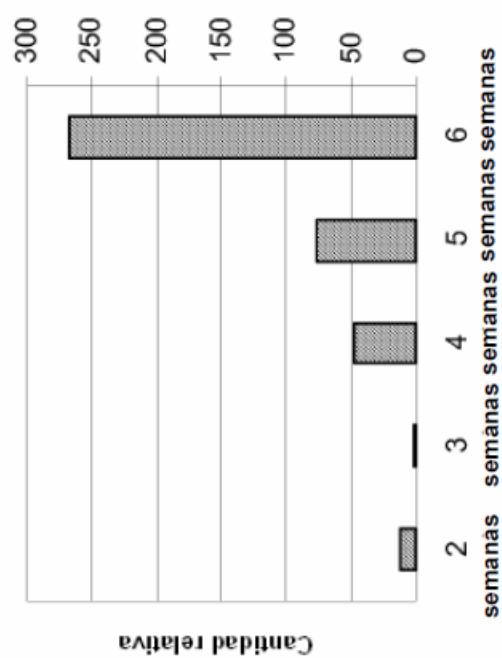
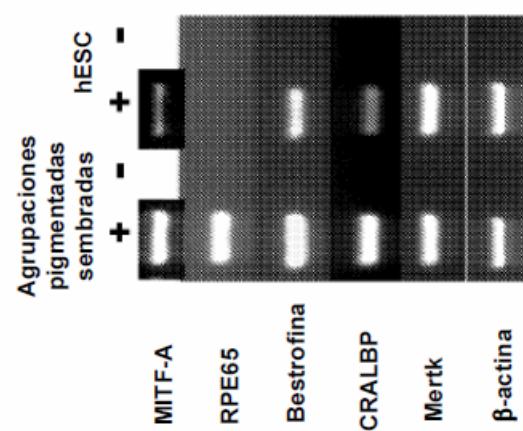
1. Un método de inducción de la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes humanas en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), método que comprende:

- 5 a. cultivar células madre pluripotentes humanas en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con nicotinamida (NA) durante al menos dos semanas para generar células en diferenciación; y
10 b. cultivar dichas células en diferenciación en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de transformación β (TGF β), mediante lo que dichas células madre pluripotentes humanas son inducidas a la diferenciación en células RPE.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho miembro de la superfamilia de TGF β es TGF β 1, TGF β 3 o activina A.

15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dichas células madre pluripotentes humanas son células madre embrionarias humanas.



**Fig. 1D****Fig. 1E**

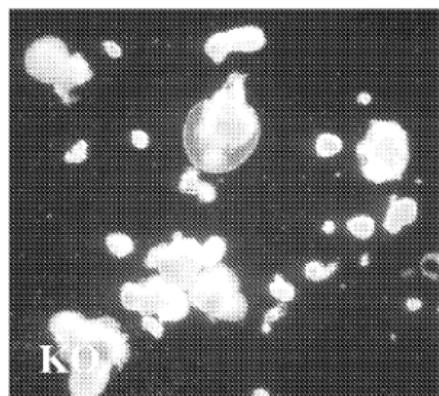


Fig. 2A

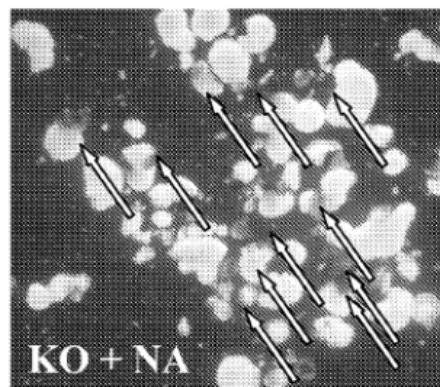


Fig. 2B

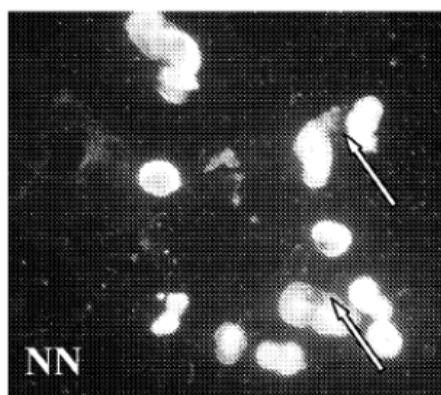


Fig 2C

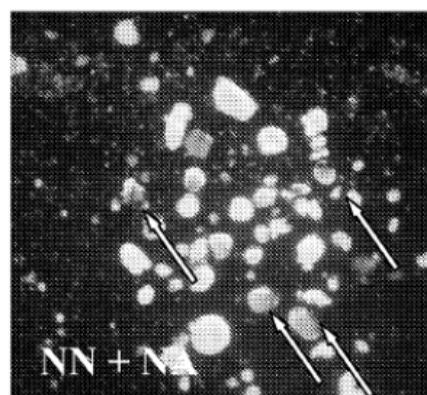


Fig 2D

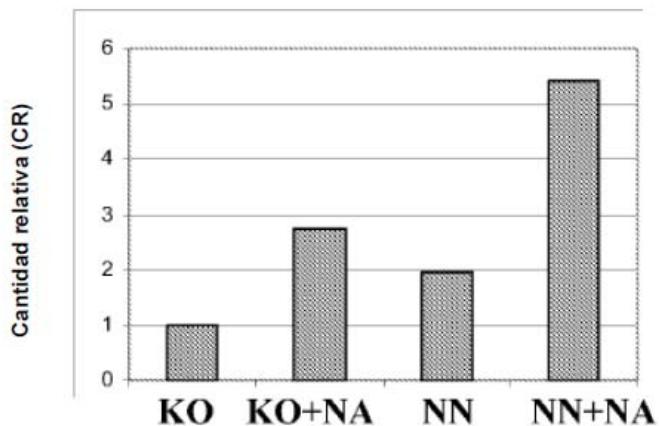


Fig. 2E

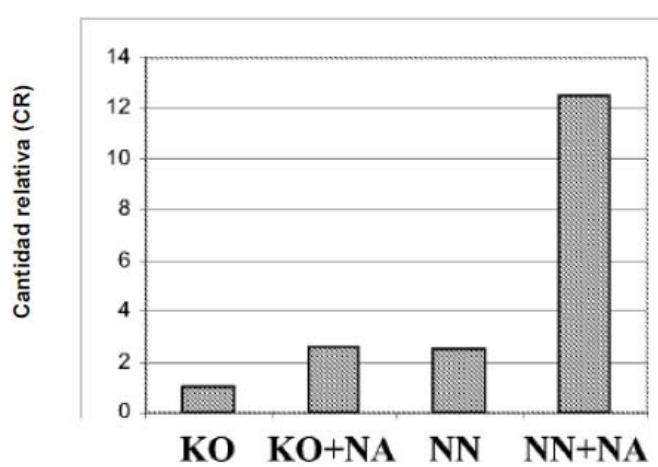


Fig. 2F

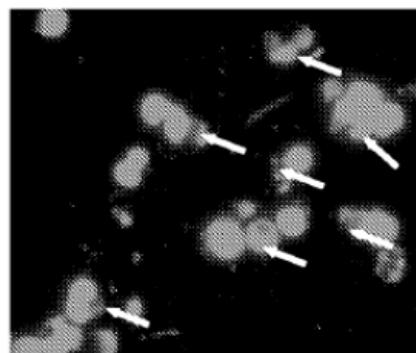


Fig. 3A

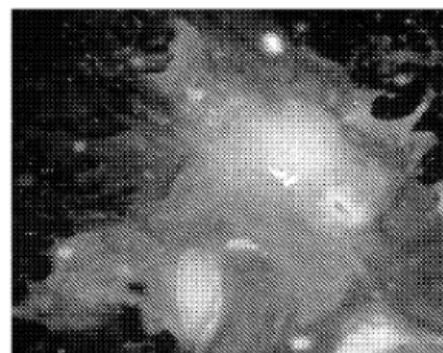


Fig. 3D

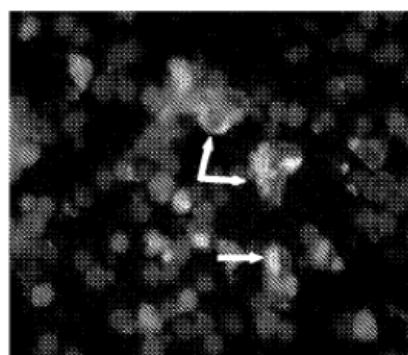


Fig. 3B

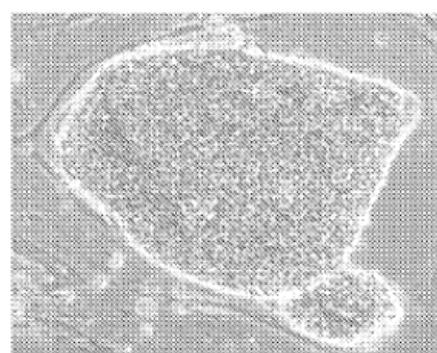


Fig. 3E

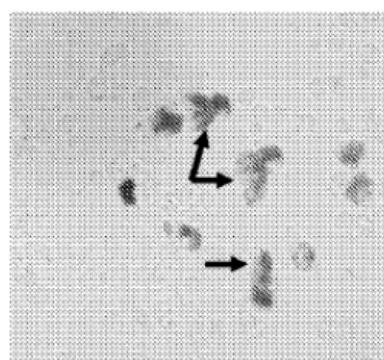


Fig. 3C

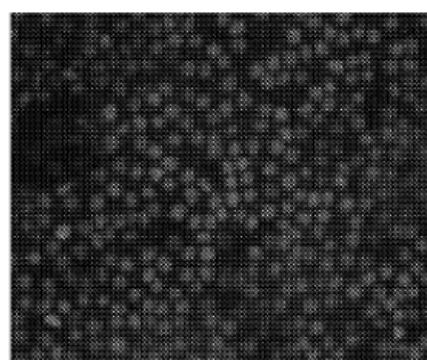


Fig. 3F

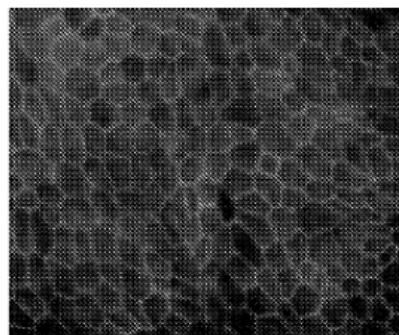


Fig. 3G

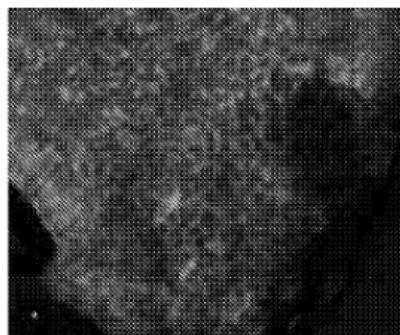


Fig. 3J

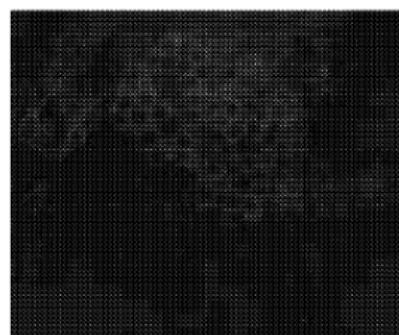


Fig. 3H

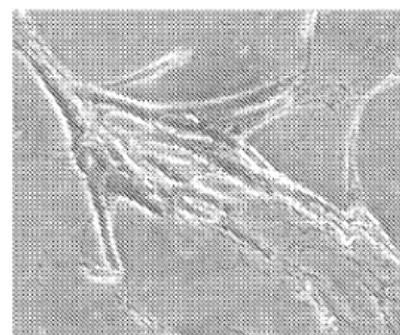


Fig. 3K



Fig. 3I

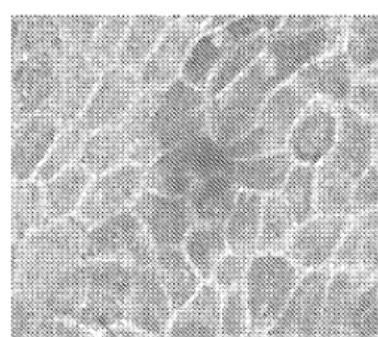


Fig. 3L

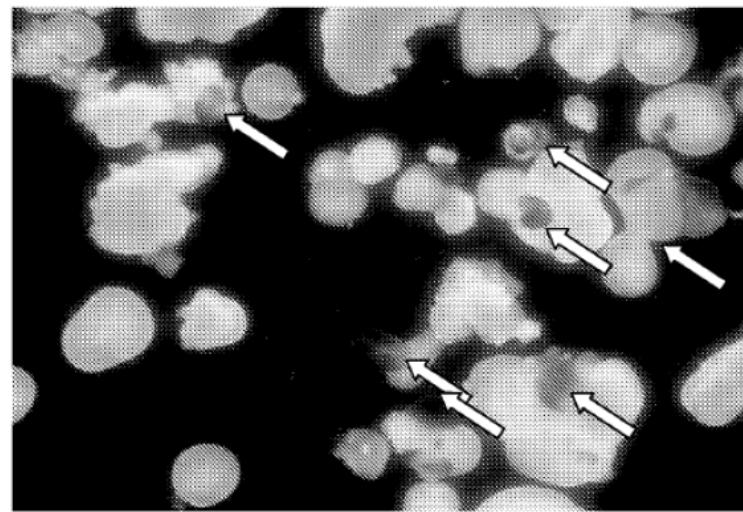


Fig. 4A

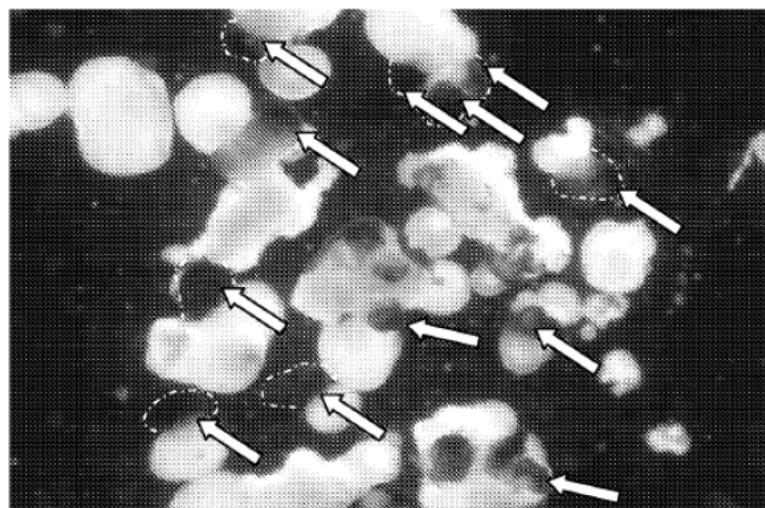


Fig. 4B

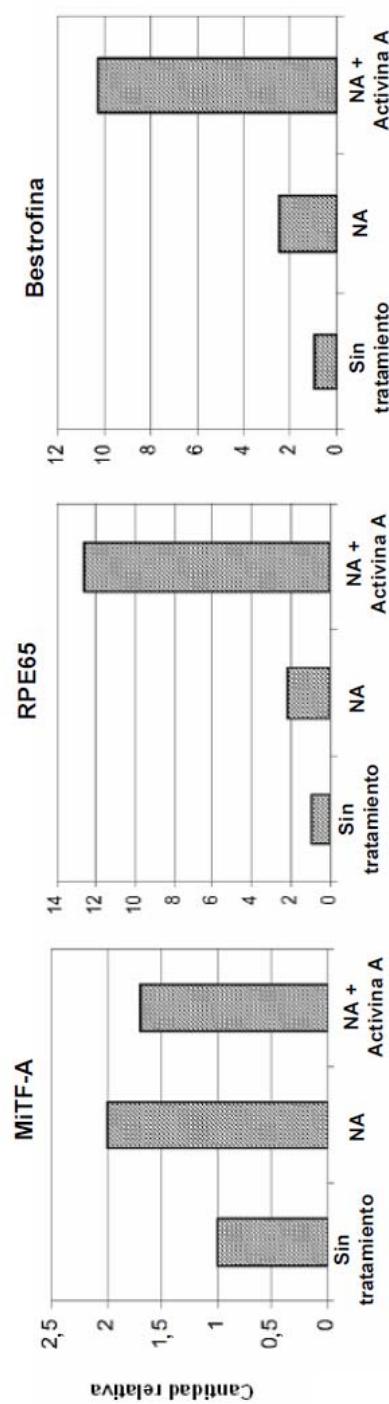


Fig. 4C

Fig. 4D

Fig. 4E

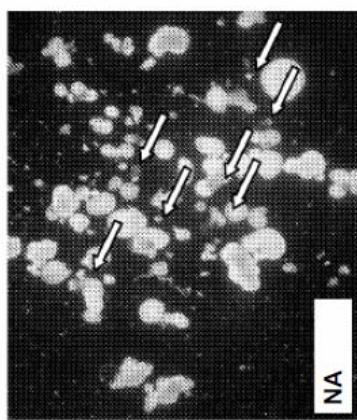


Fig. 5B

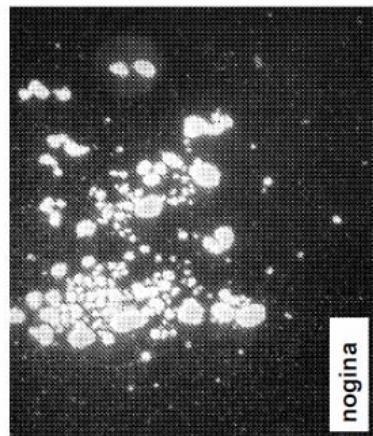


Fig 5D

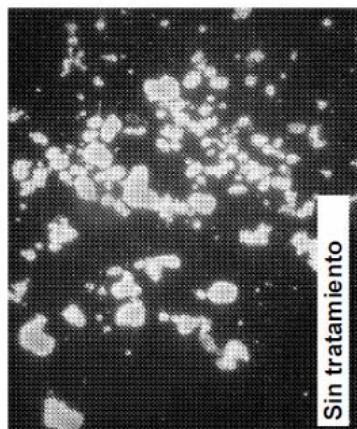


Fig. 5A

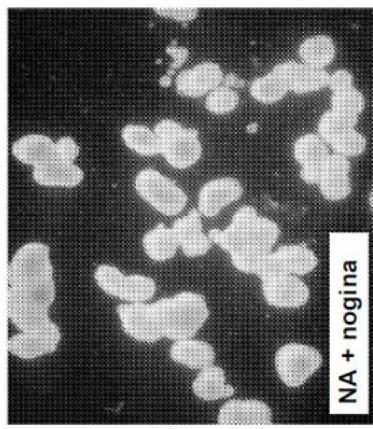


Fig 5C

Fig. 5E

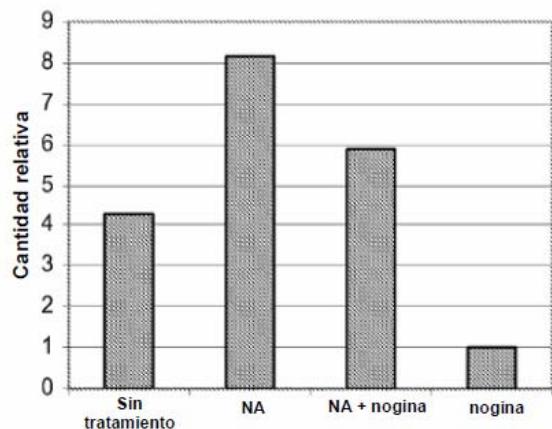


Fig. 5F

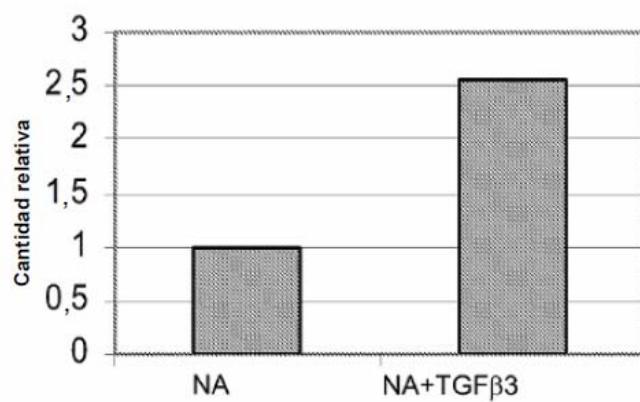
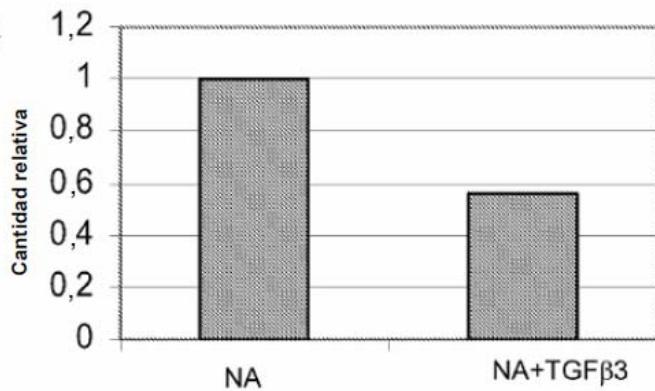


Fig. 5G



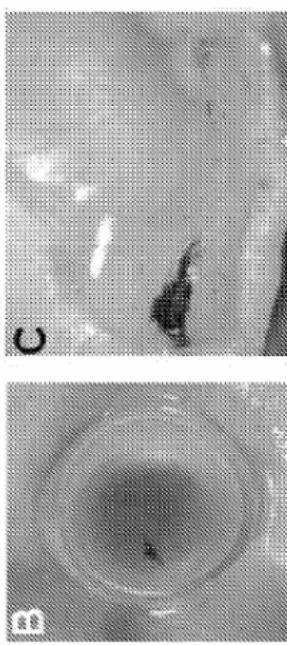
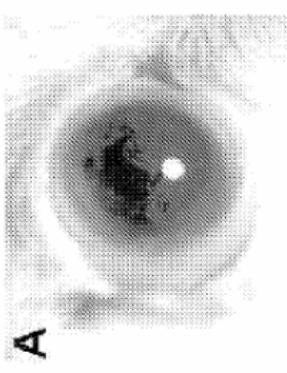


Fig. 6A

Fig. 6B

Fig. 6C

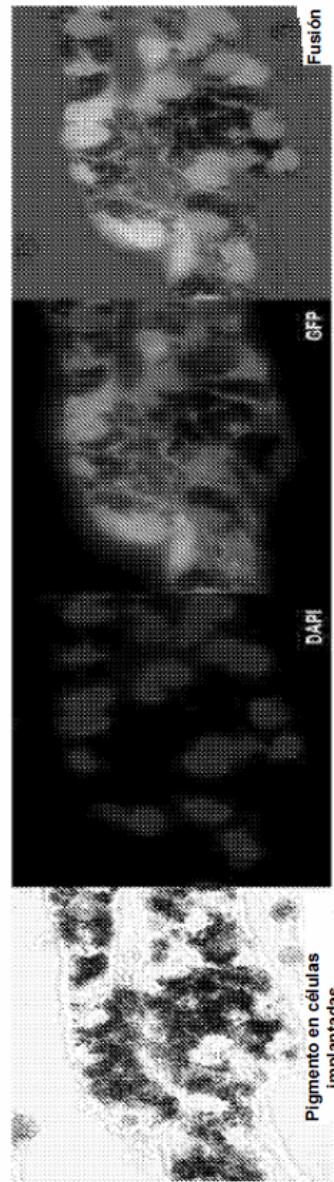


Fig. 6D

Fig. 6E

Fig. 6F

Fig. 6G

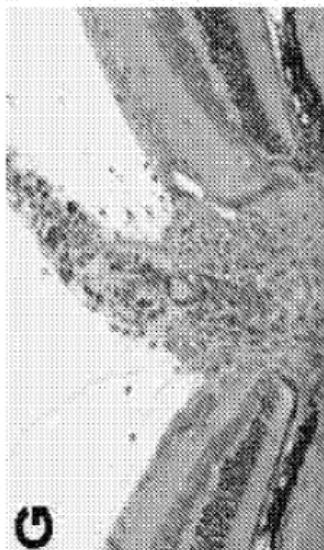


Fig. 6I

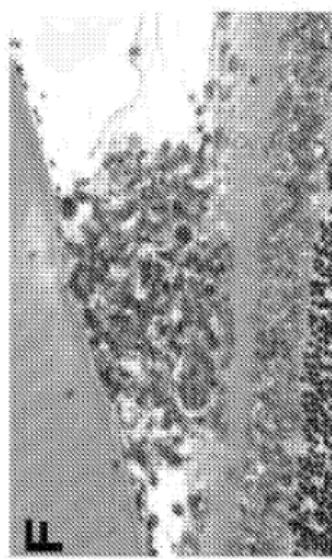


Fig. 6H

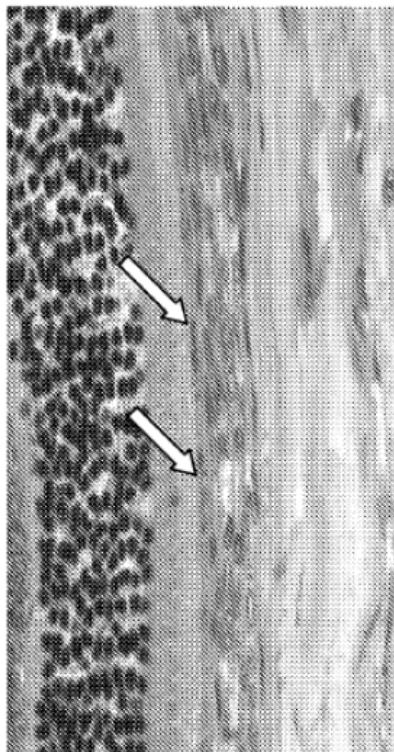


Fig. 6J

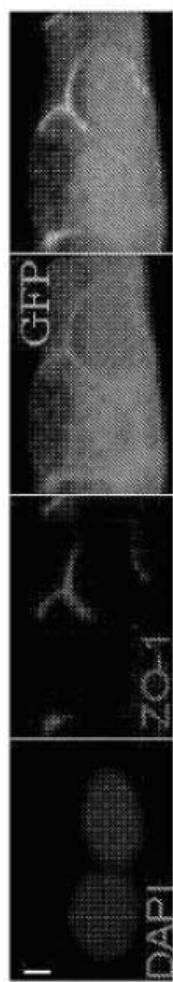


Fig. 6K Fig. 6L Fig. 6M Fig. 6N

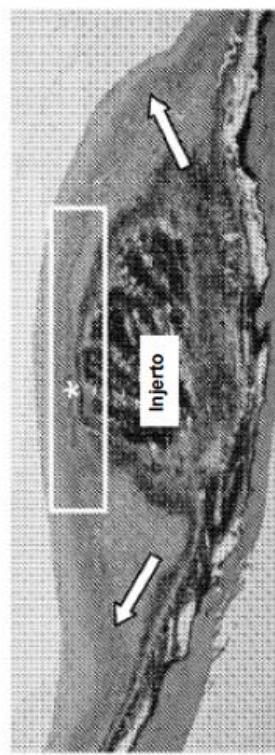


Fig. 6O

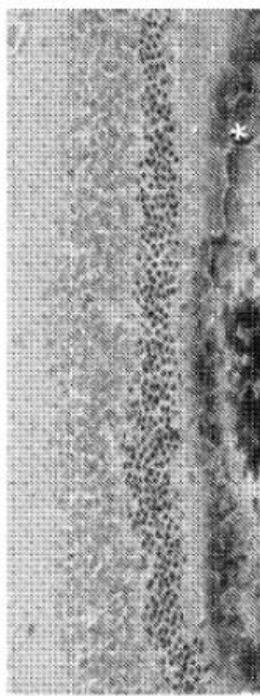


Fig. 6P

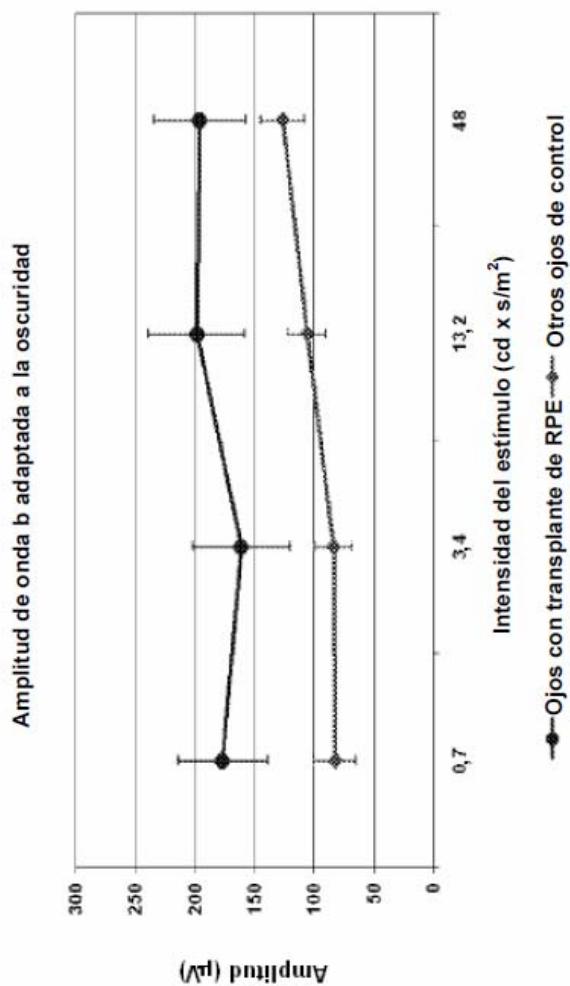


Fig. 7

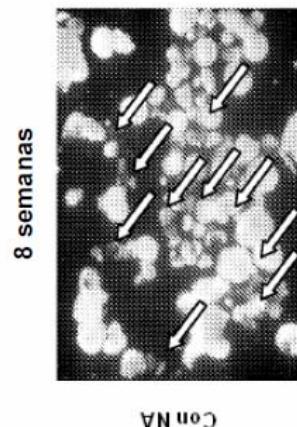


Fig. 8E

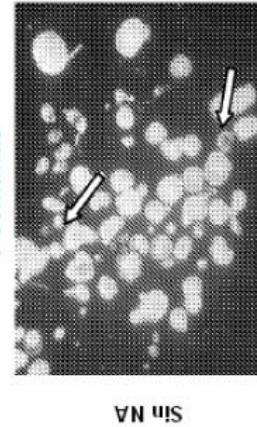


Fig. 8F

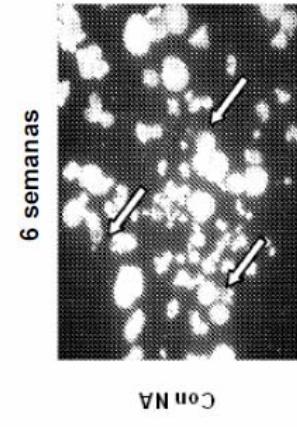


Fig. 8C

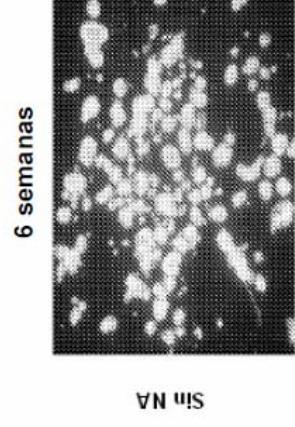


Fig. 8D

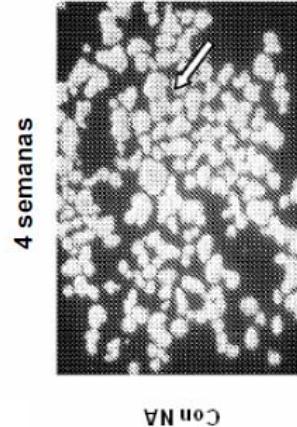


Fig. 8A

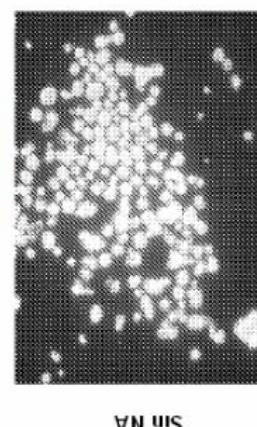
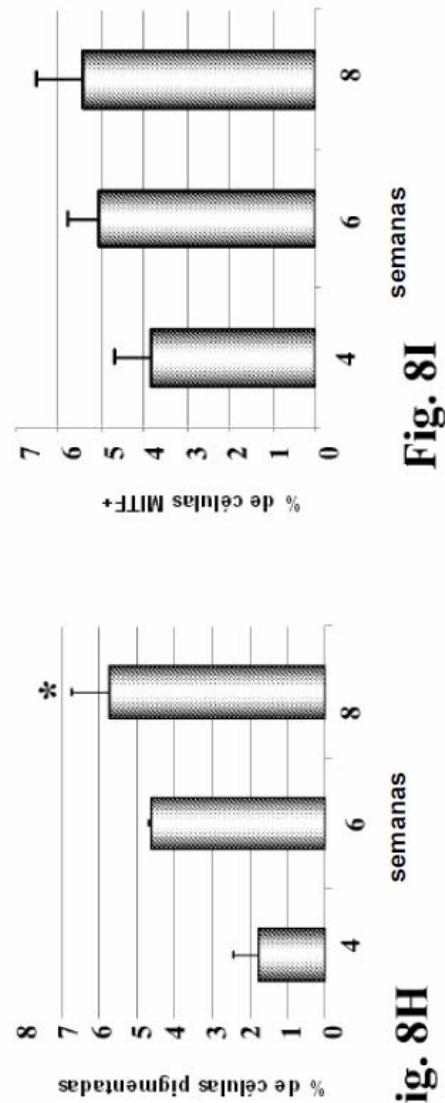
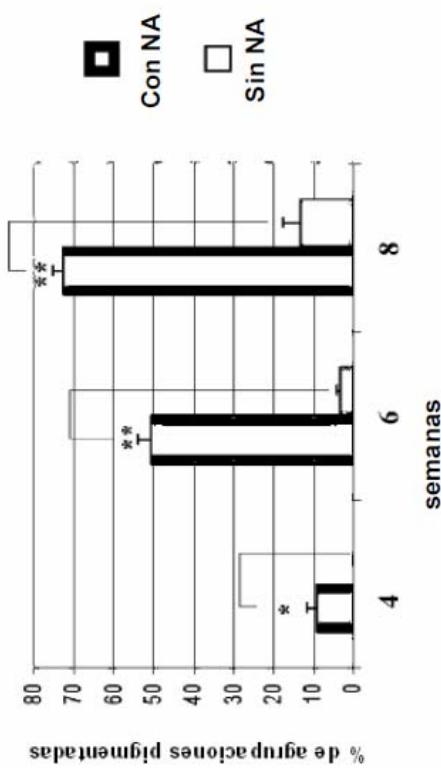


Fig. 8B



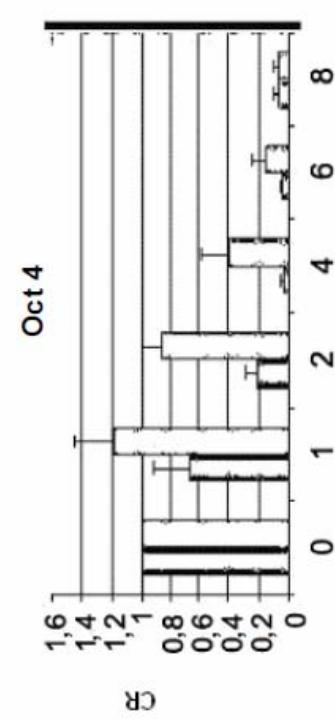


Fig. 9A

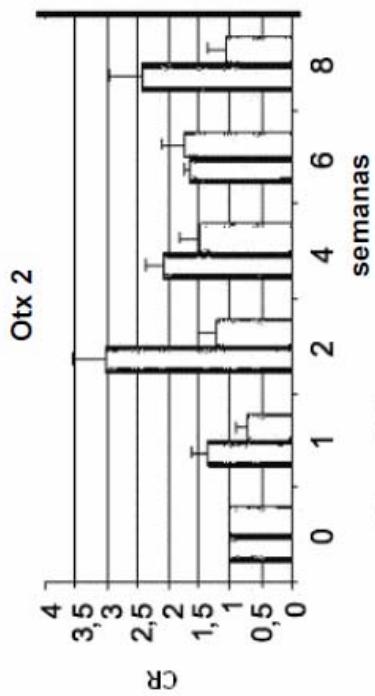


Fig. 9B

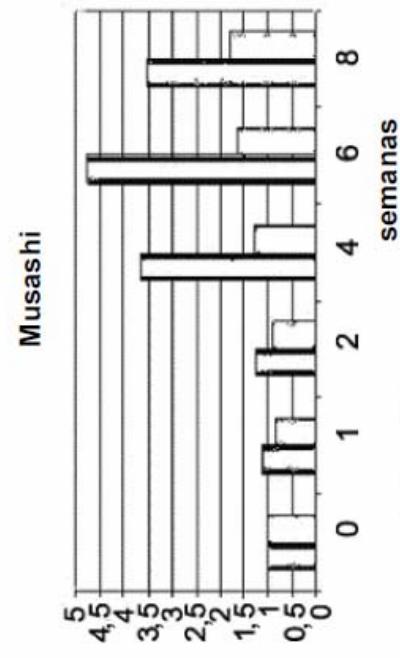


Fig. 9C

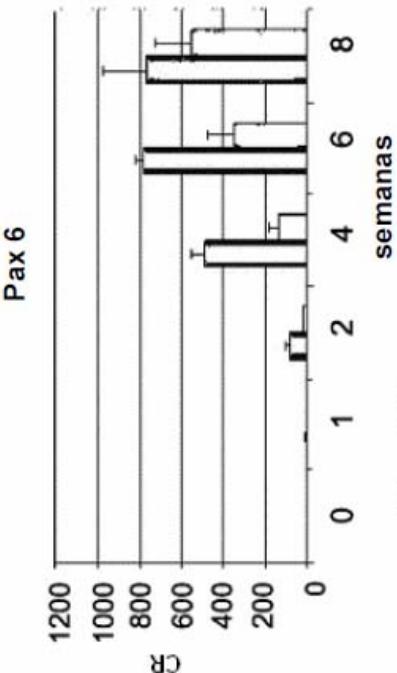


Fig. 9D

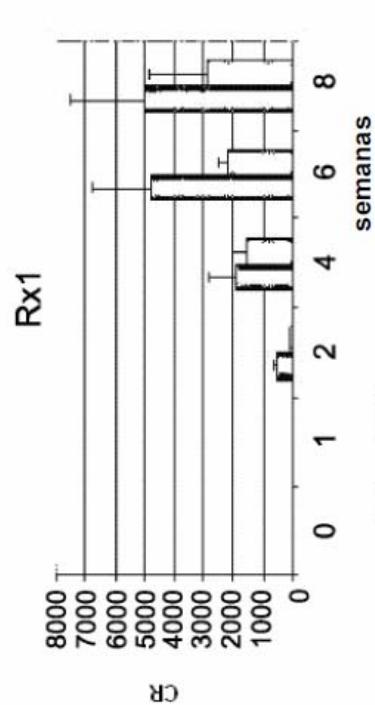


Fig. 9F

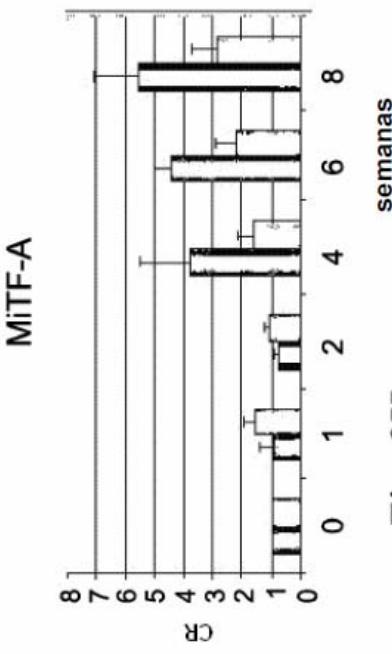


Fig. 9H

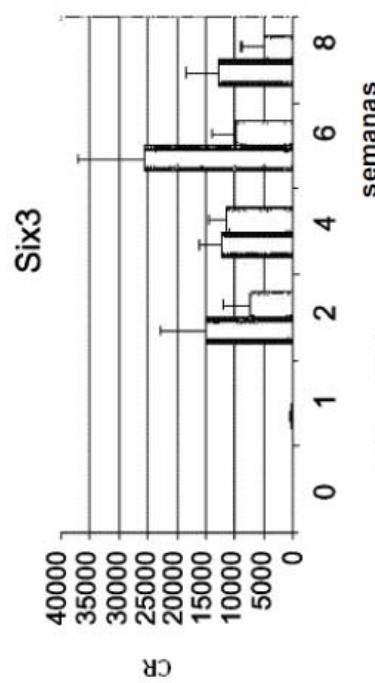


Fig. 9E

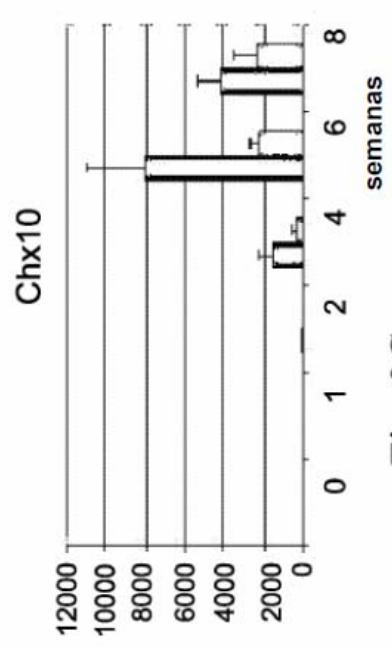


Fig. 9G

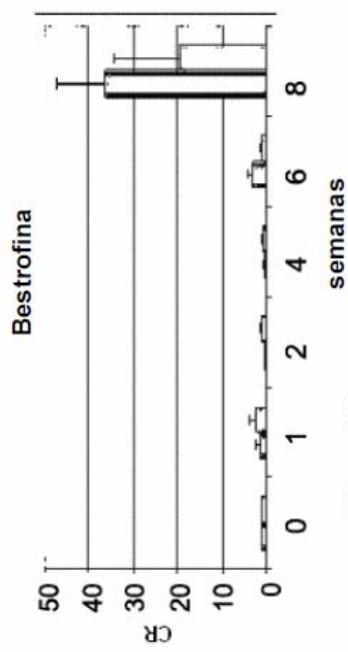


Fig. 9J

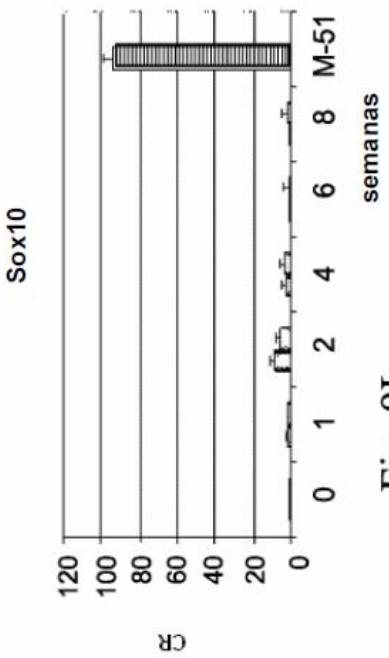


Fig. 9L

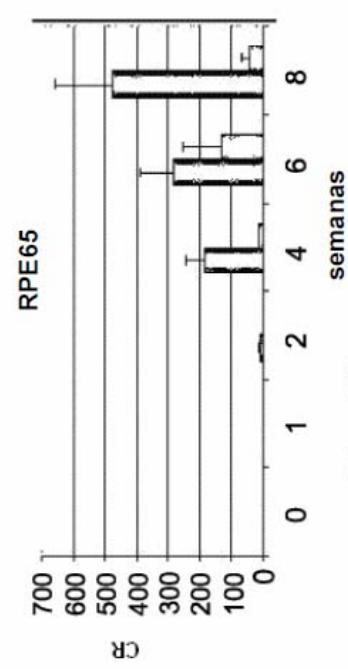


Fig. 9I

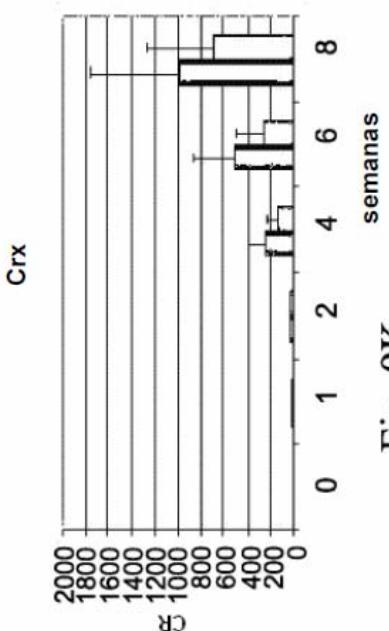
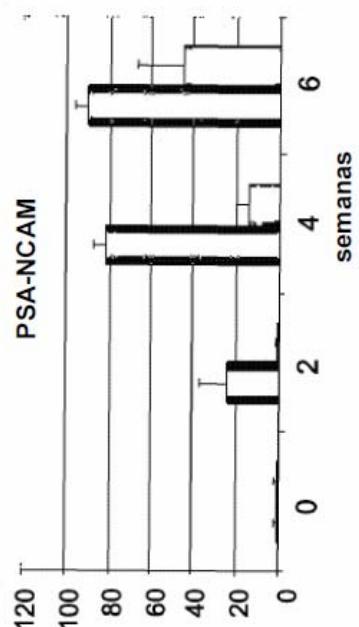
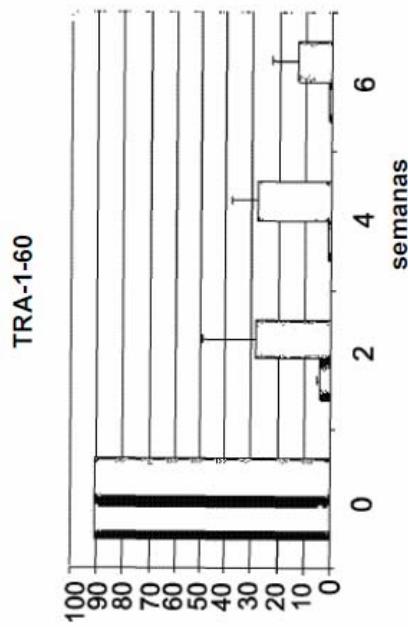
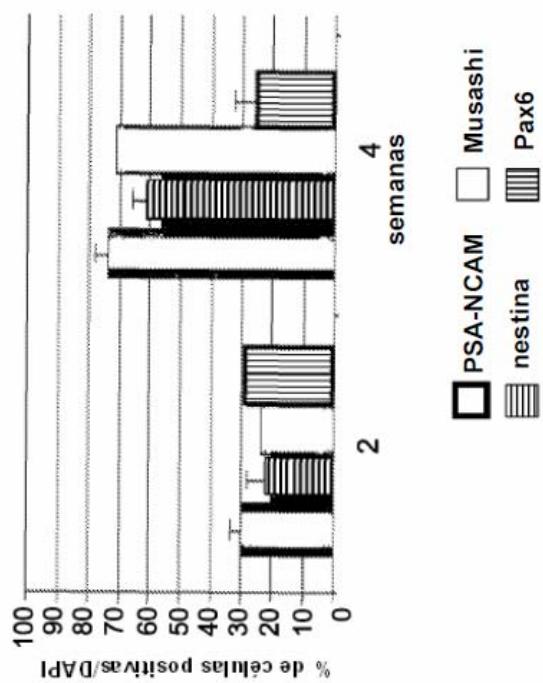


Fig. 9K



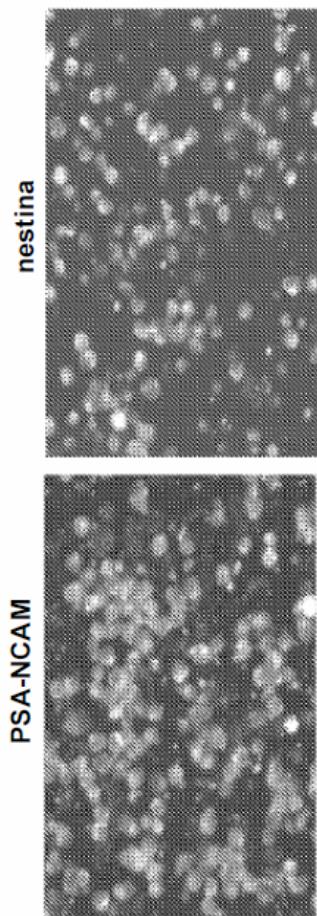


Fig. 9P **Fig. 9Q**

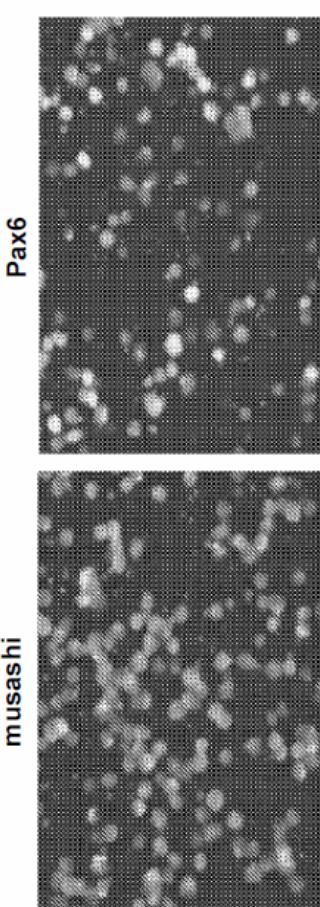


Fig. 9R **Fig. 9S**

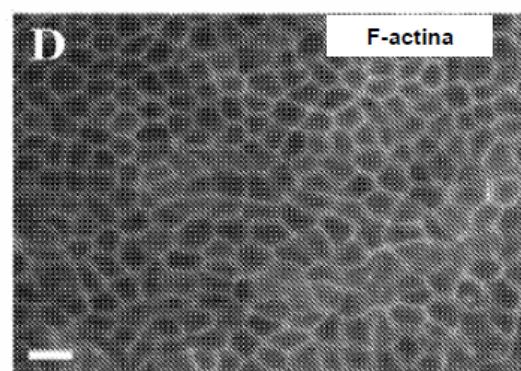


Fig. 10A

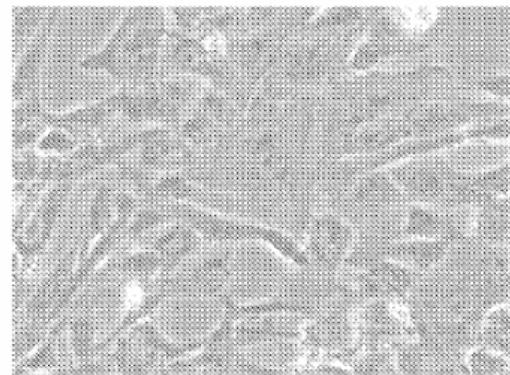


Fig. 10B

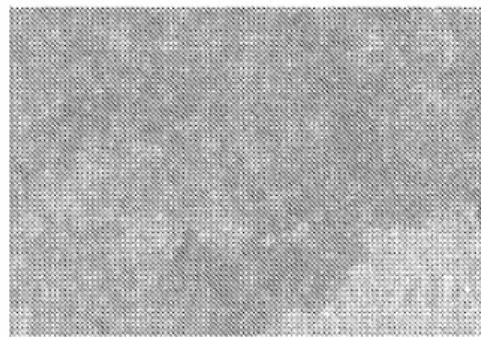


Fig. 10C

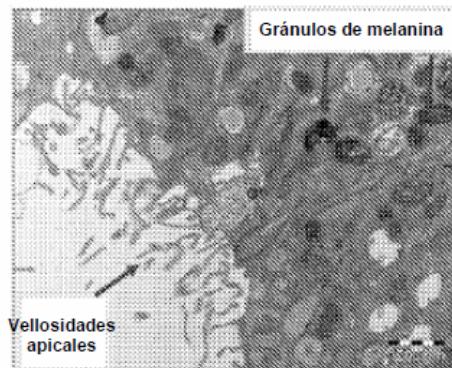


Fig. 10D

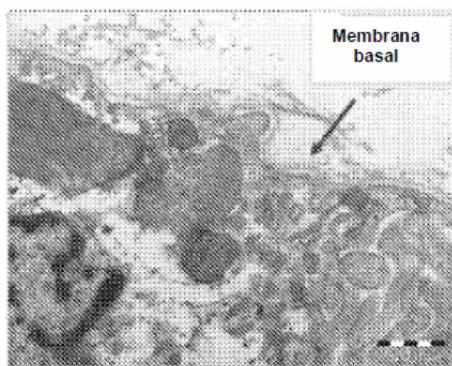


Fig. 10E

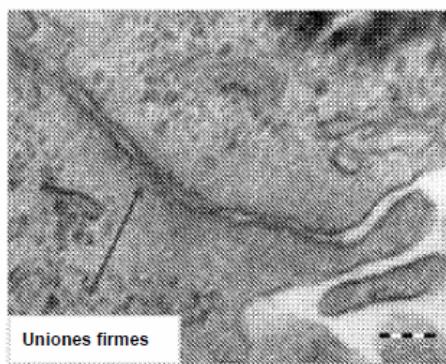


Fig. 10F

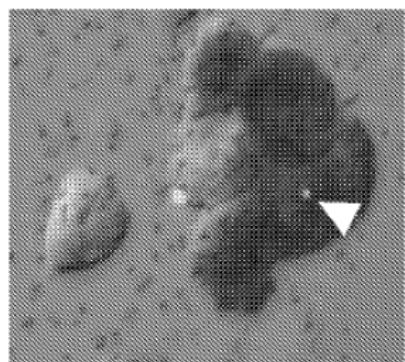


Fig. 10G

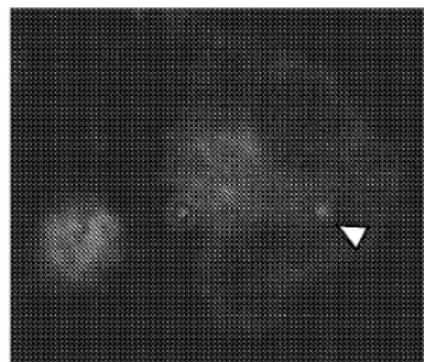


Fig. 10H

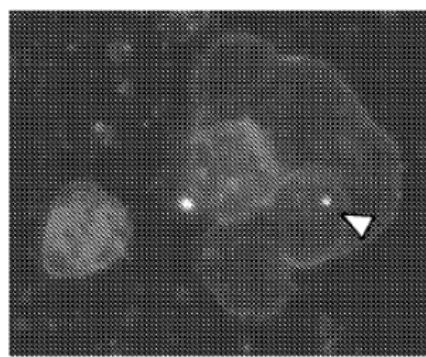


Fig. 10I

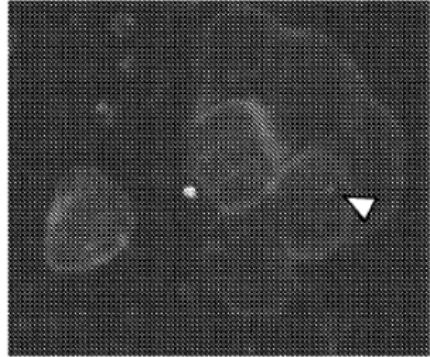


Fig. 10J

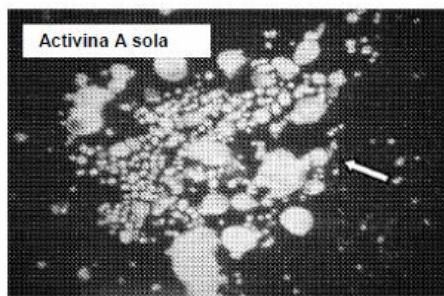


Fig. 11A

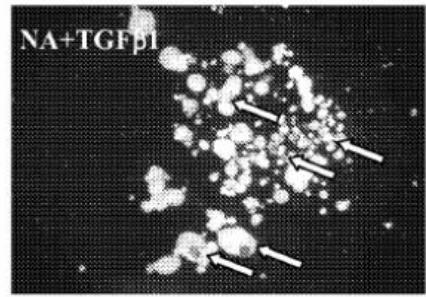


Fig. 11D

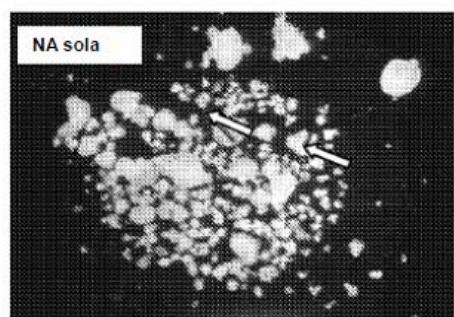


Fig. 11B

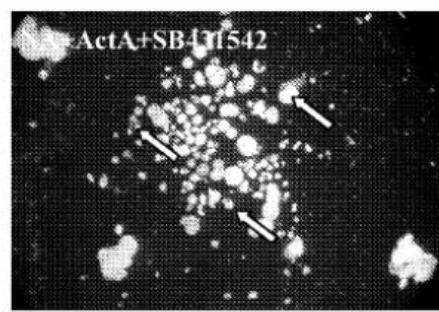


Fig. 11E

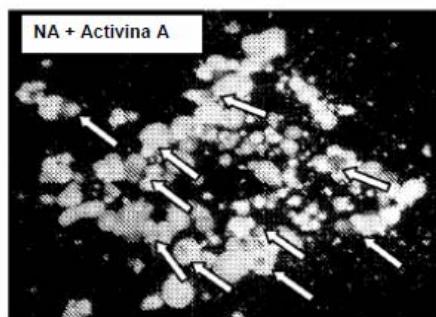


Fig. 11C

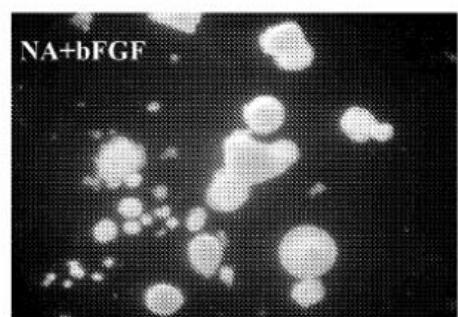
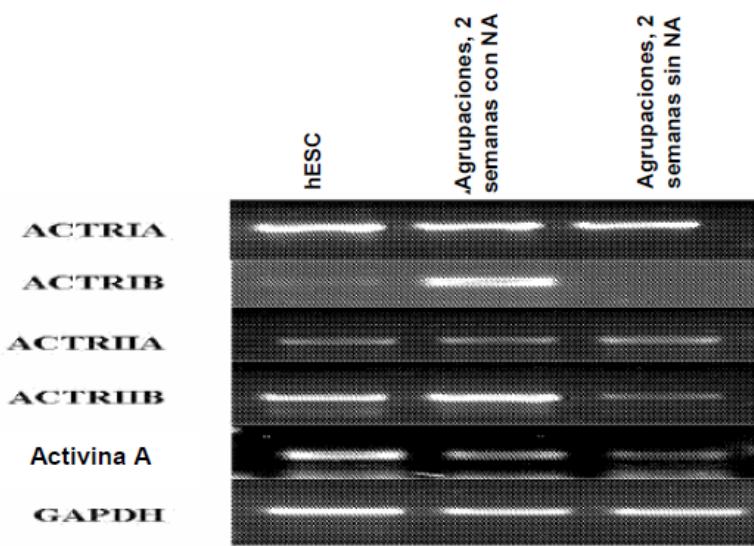
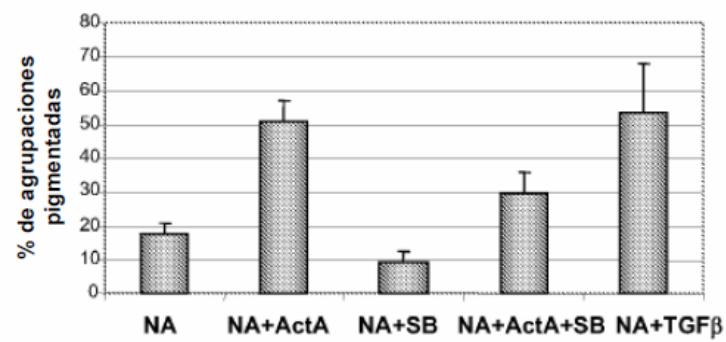
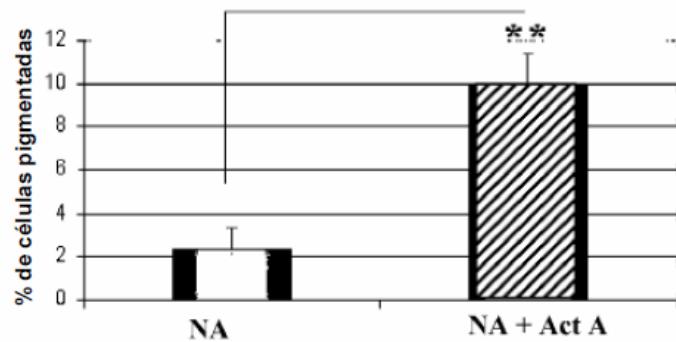


Fig. 11F

**Fig. 11G****Fig. 11H****Fig. 11I**

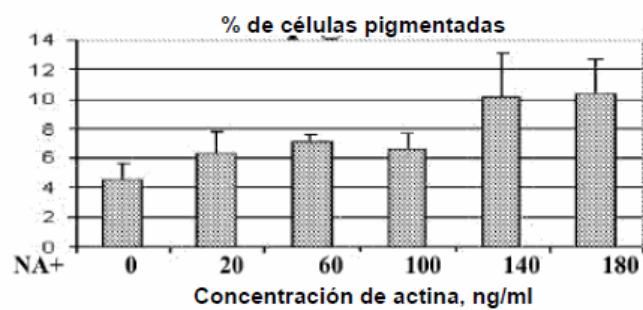


Fig. 11J

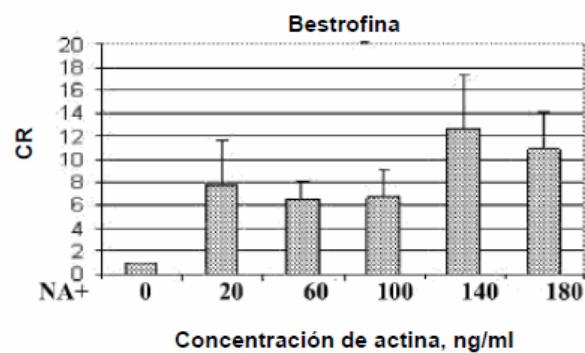


Fig. 11K

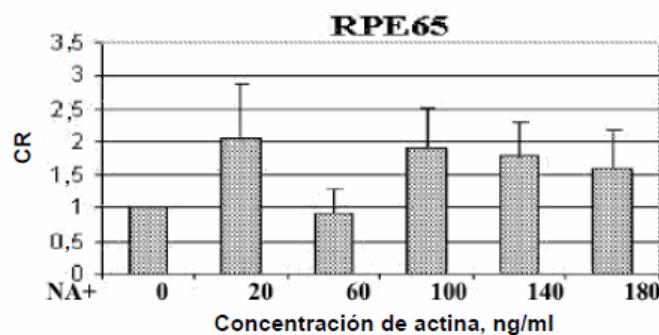


Fig. 11L

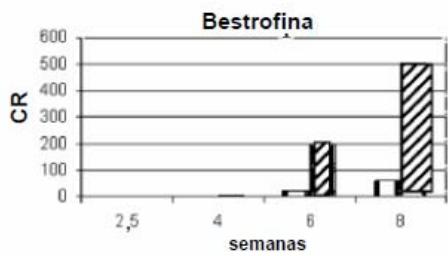


Fig. 11M

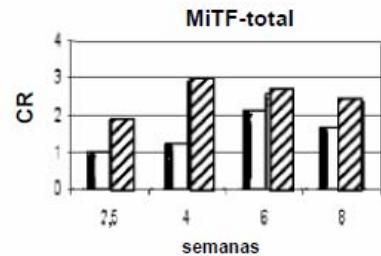


Fig. 11N

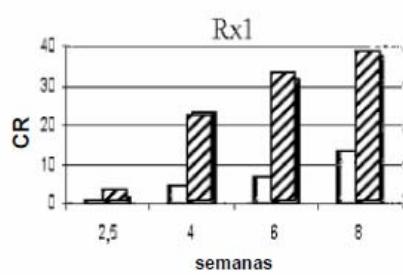


Fig. 11O

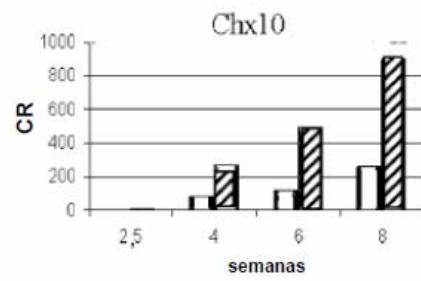


Fig. 11P

Fig. 12A

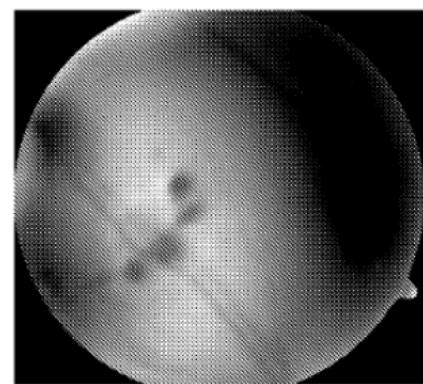


Fig. 12B

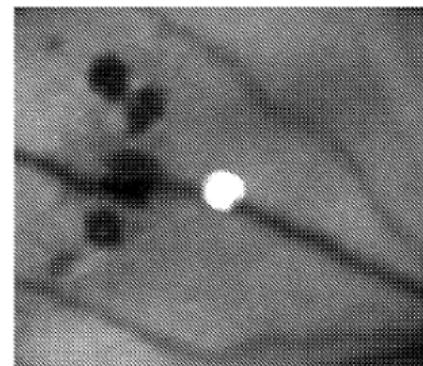


Fig. 12C

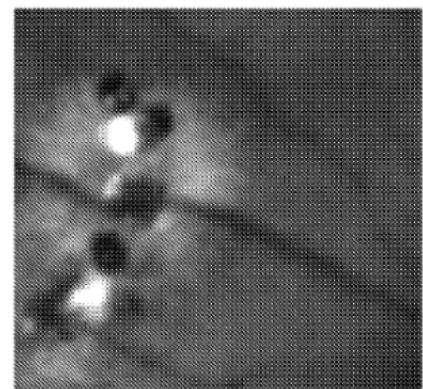


Fig. 12D

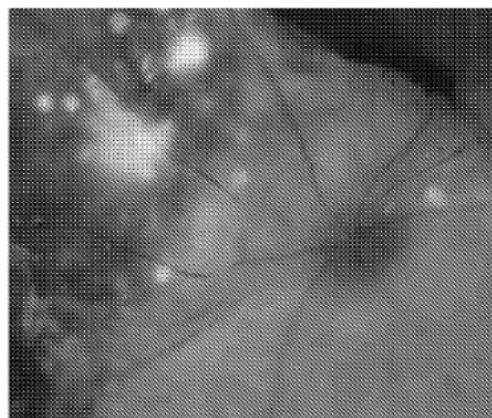


Fig. 12E

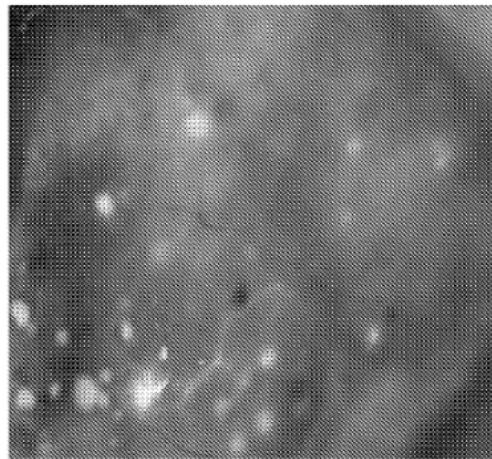


Fig. 13A

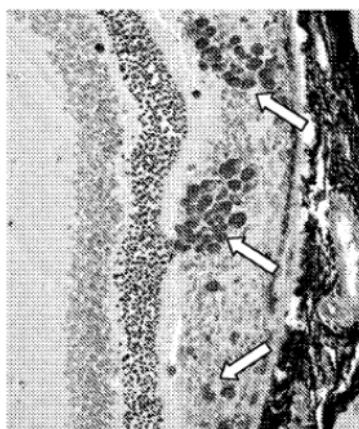
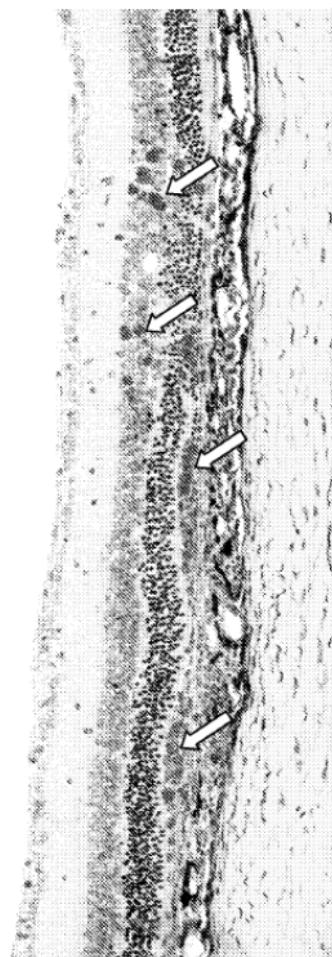


Fig. 13B



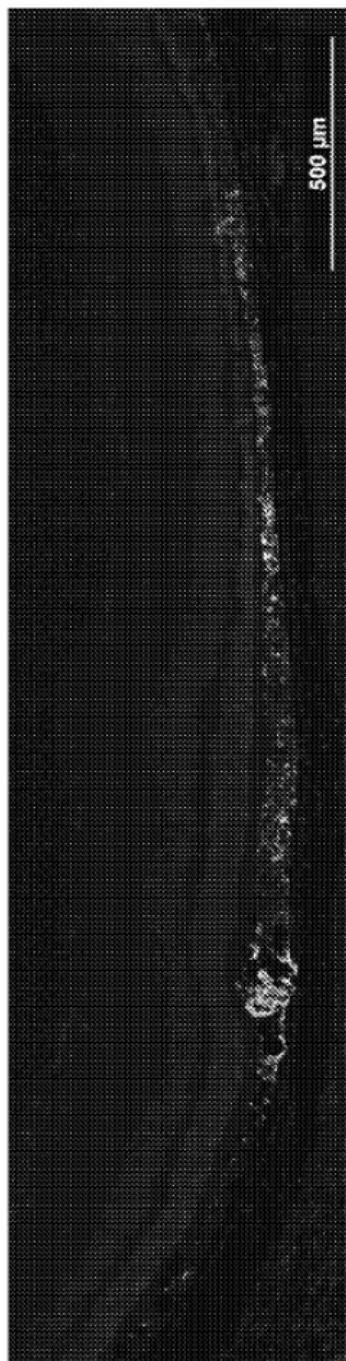


Fig. 13C

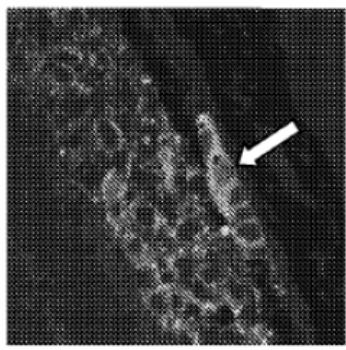


Fig. 13D

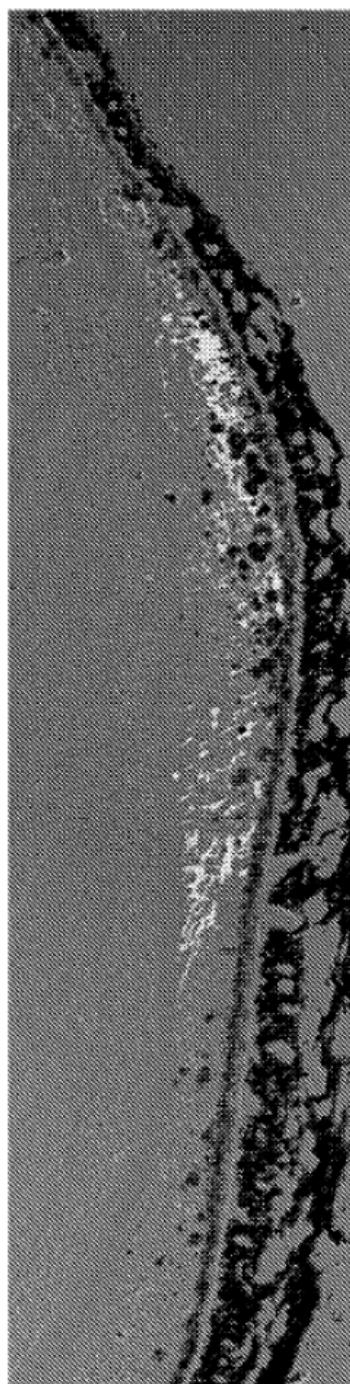


Fig. 13E

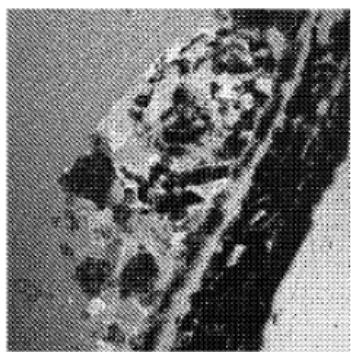


Fig. 13F

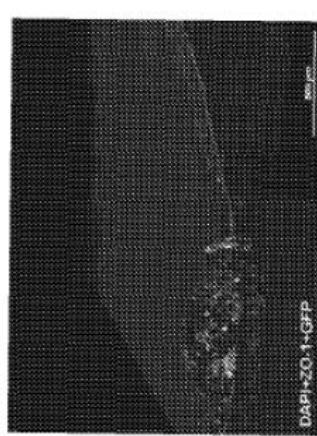


Fig. 14A

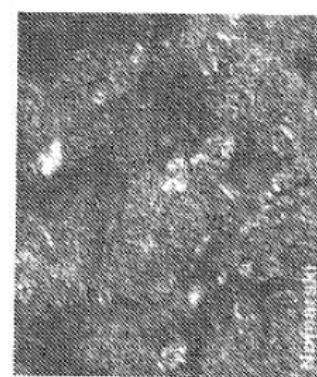


Fig. 14B

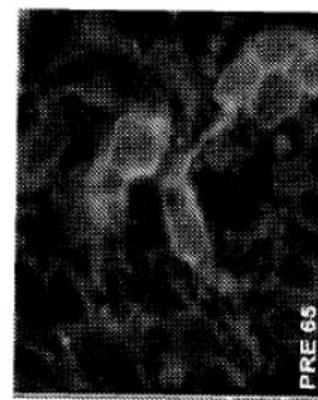


Fig. 14C

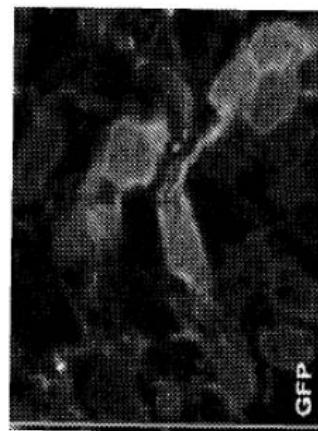


Fig. 14D

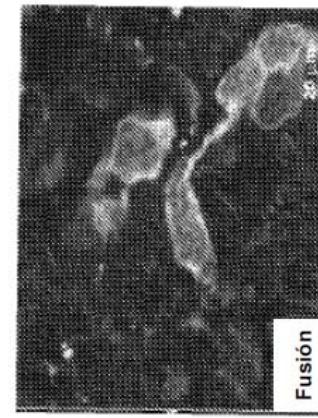


Fig. 14E

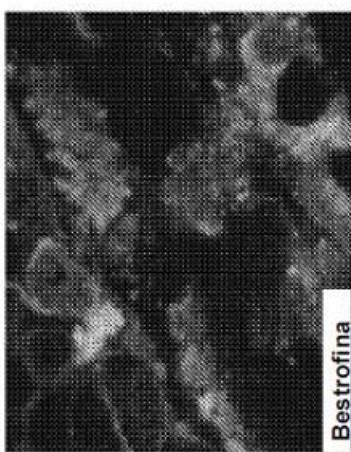


Fig. 14H

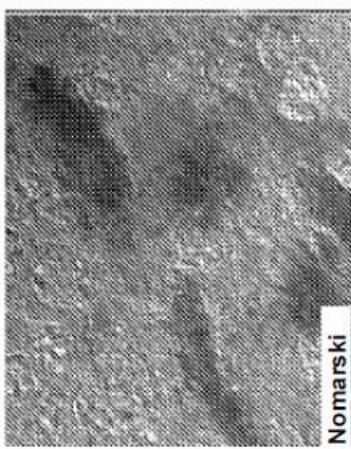


Fig. 14G

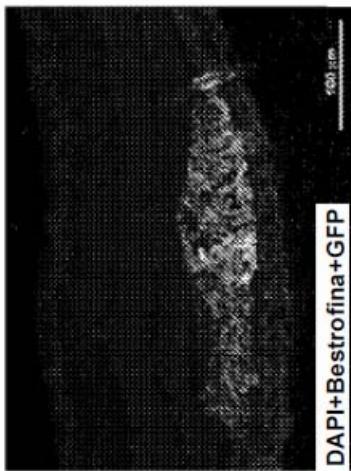


Fig. 14F

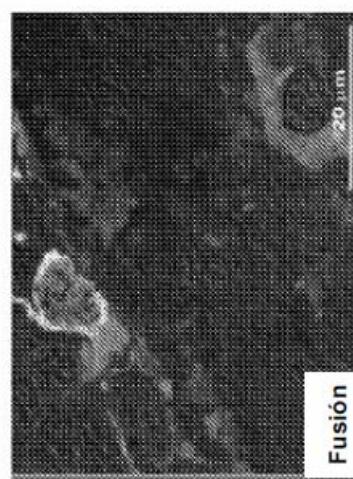


Fig. 14J

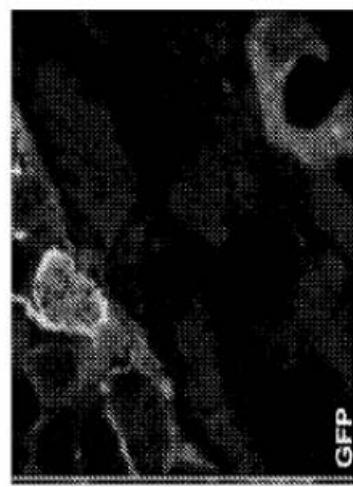


Fig. 14I

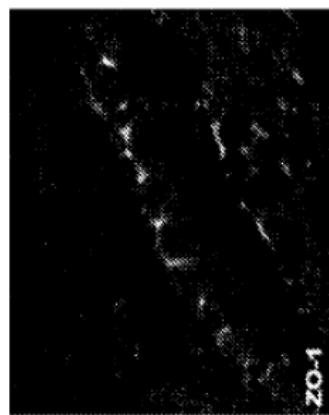


Fig. 14M

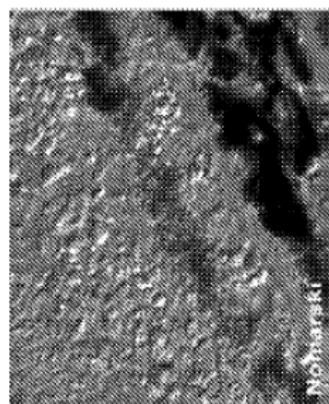


Fig. 14L



Fig. 14K

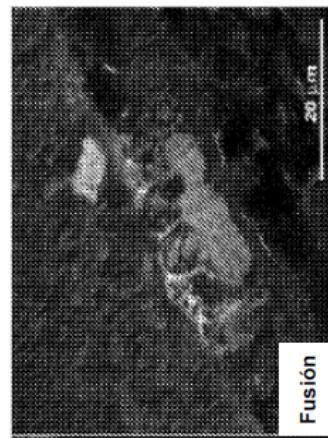


Fig. 14O

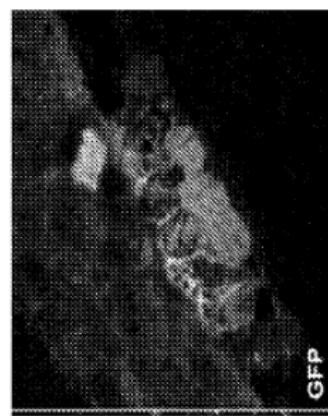


Fig. 14N

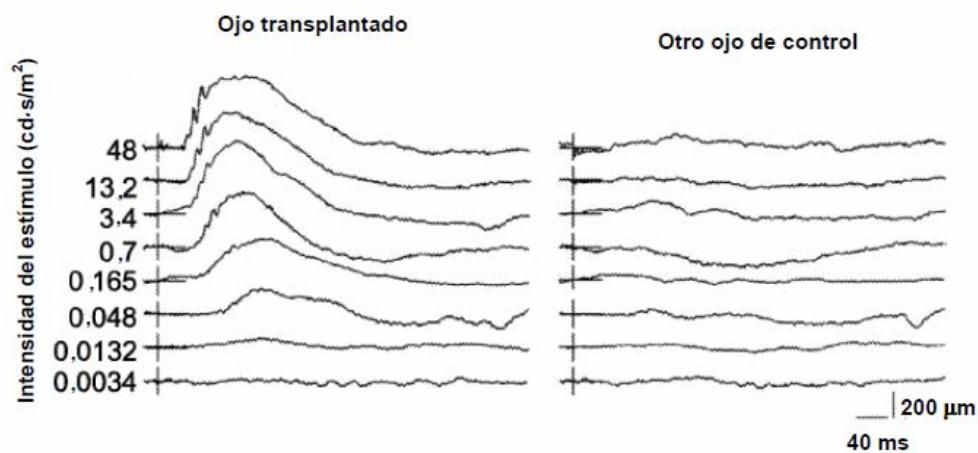


Fig. 15A

Fig. 15B

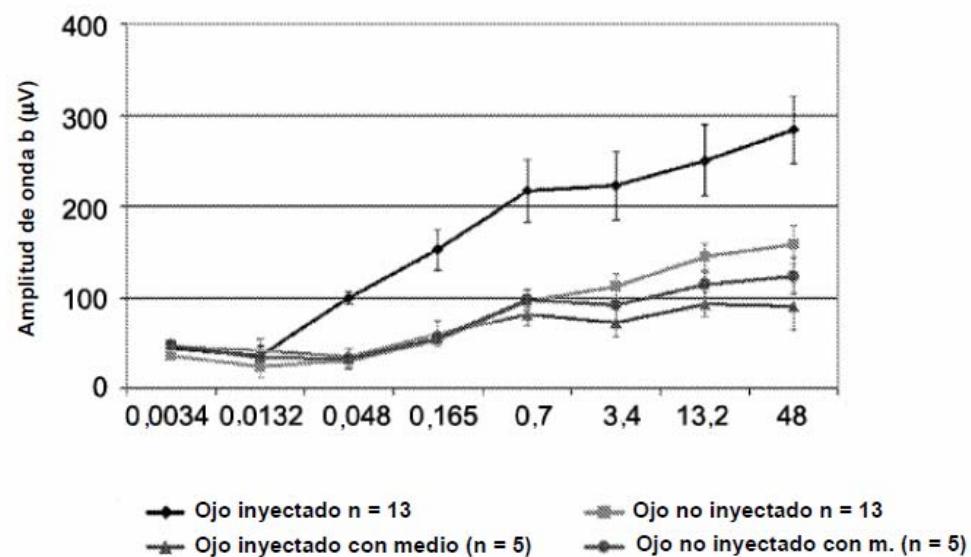


Fig. 15C

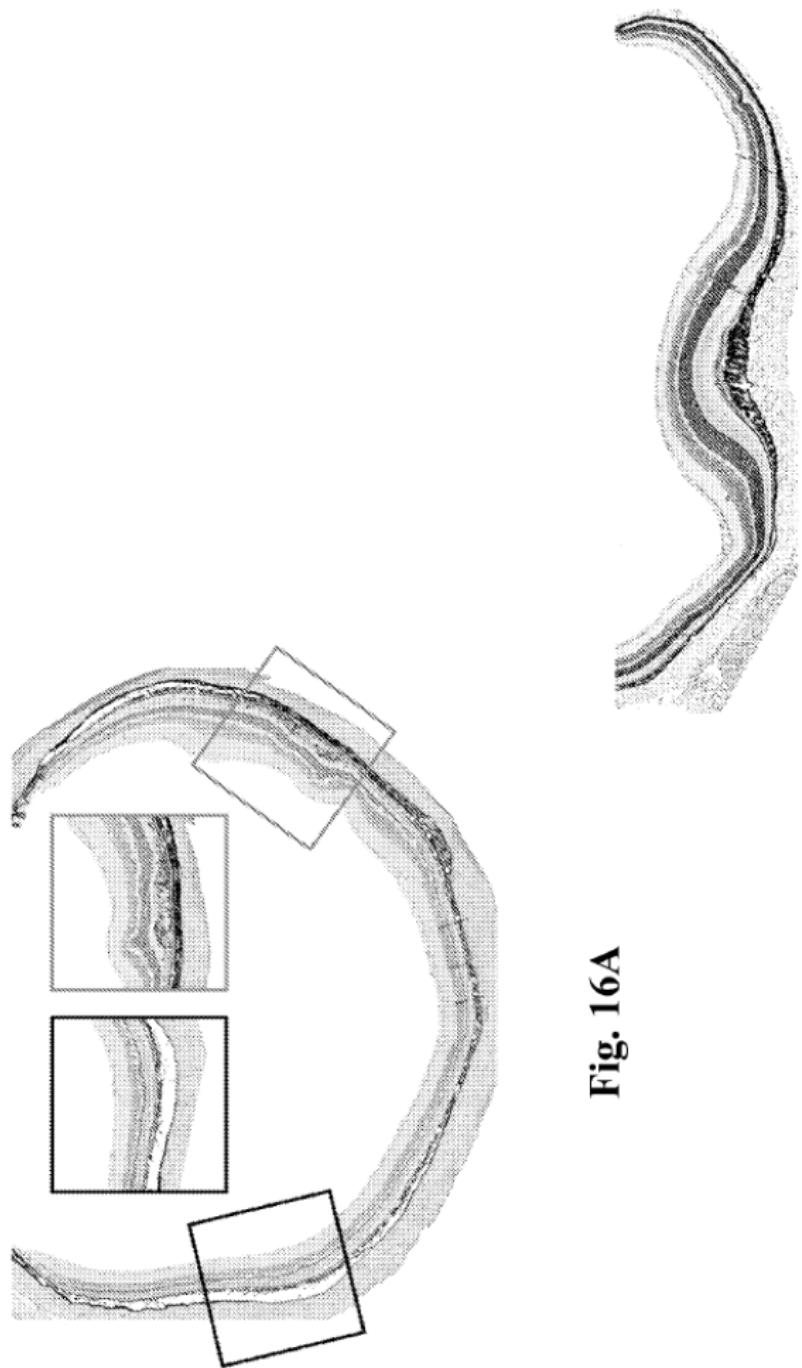


Fig. 16A

Fig. 16B



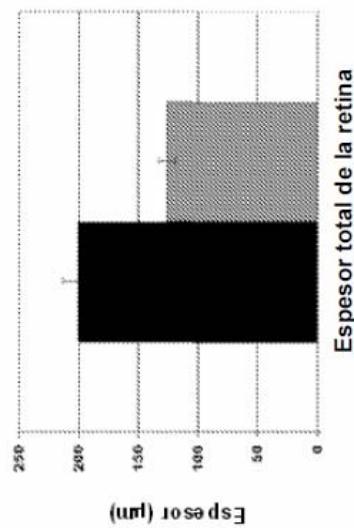


Fig. 16C

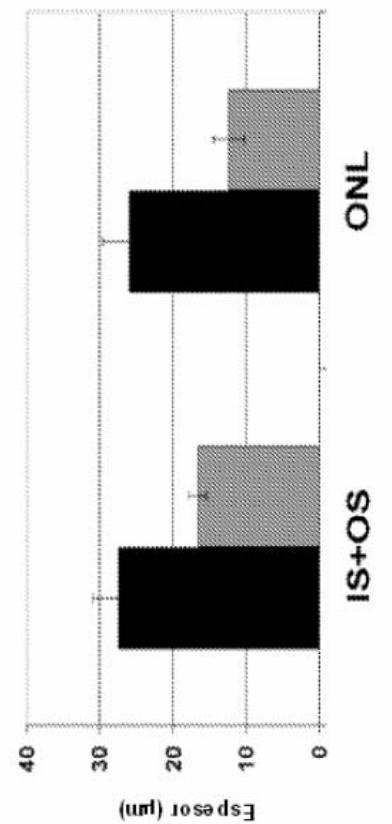


Fig. 16D

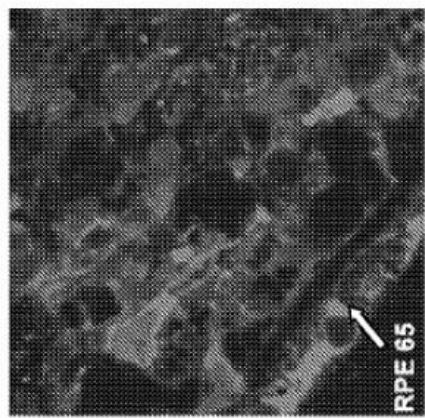


Fig. 17C

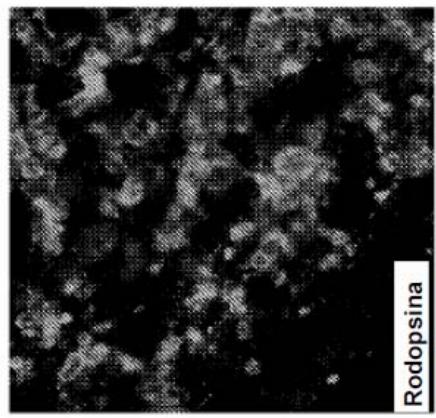


Fig. 17B

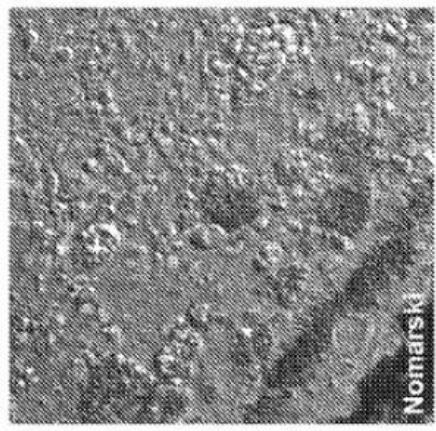


Fig. 17A

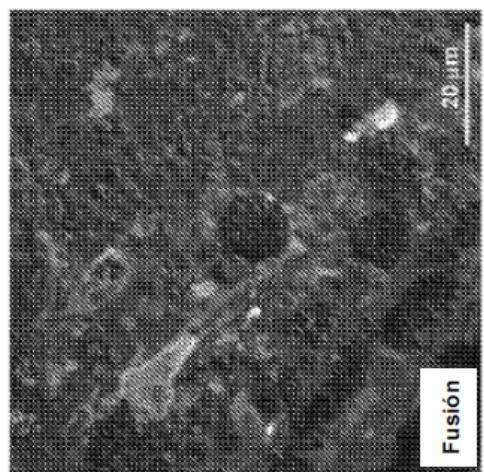


Fig. 17E

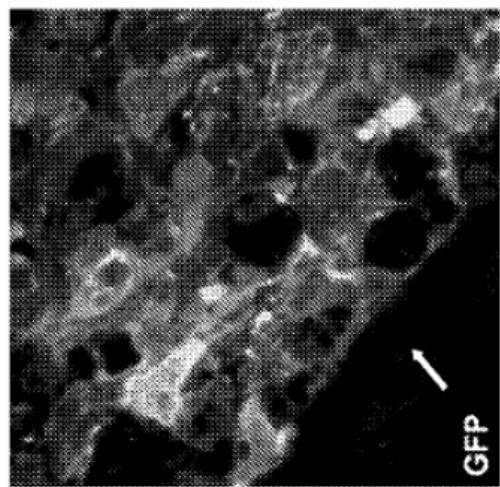


Fig. 17D