

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 370**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

A61K 35/44 (2006.01)

A61K 35/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2008 E 12181140 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2554661**

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:
02.03.2015

73 Titular/es:

**HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES &
DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)
P.O. Box 12000 Kiryat Hadassah
91120 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**IDELSON, MASHA;
ALPER-PINUS, RUSLANA;
OBOLENSKY, ALEX;
BANIN, EYAL y
REUBINOFF, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 530 370 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células del epitelio pigmentario de la retina derivadas de células madre

5 La presente invención se refiere a un método para producir células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) de acuerdo con la reivindicación 1.

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

- 10 (1) Strauss O., The retinal pigment epithelium in visual function; *Physiol. Rev.* 85: 845-881, 2005.
 (2) Lund RD. 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.
 15 (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.
 (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.
 20 (7) Lund RD. 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 solicitud PCT N° WO 06/070370.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

30

La mácula, la parte central de la retina, es responsable de los detalles visuales finos y la percepción del color, y es crucial para muchas de nuestras tareas visuales diarias tales como el reconocimiento facial y la lectura. La mácula a menudo se ve afectada como parte de los procesos patológicos en degeneraciones retinianas generalizadas tales como retinitis pigmentosa (RP), así como en diferentes enfermedades que abordan más específicamente la región macular tales como degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y enfermedad de Best. En muchas de estas enfermedades, la disfunción o fallo primario sucede en las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) que subyacen a los fotorreceptores.

35

40

Las células RPE altamente especializadas desempeñan una tarea principal en el soporte de la función fotorreceptora: transportan activamente nutrientes desde los vasos coroideos, participan en el reciclaje de la vitamina A, que es necesaria para los cromóforos en los fotorreceptores, y captan y reciclan los segmentos externos deprendidos de los fotorreceptores como parte del proceso normal de renovación de estas células¹.

45

En subtipos de RP, enfermedad de Best, y AMD, el fallo del RPE finalmente conduce a pérdida visual y ceguera. El remplazo de estas células es una posible intervención terapéutica², pero obtener dichas células de donantes o embriones humanos es difícil. Las células madre embrionarias humanas (hESC) pueden servir como fuente donante ilimitada potencial para células RPE, si puede dilucidarse el medio para dirigir su diferenciación en células RPE funcionales³. Los métodos para dirigir la diferenciación de hESC en cultivos altamente enriquecidos para células precursoras neurales (NP) se han descrito previamente (Reubinoff BE. et al., Neural progenitors from human embryonic stem cells; *Nat Biotechnol* 19: 1134-1140, 2001; Itsykson P. et al., Derivation of neural 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 retinianas tanto *in vitro* como *in vivo* después de trasplante al espacio subretiniano en roedores (Banin E. et al., Retinal Incorporation and Differentiation of Neural Precursors Derived from Human Embryonic Stem Cells; *Stem Cells* 24(2):246-257, 2006).

50

55

Se ha demostrado el potencial de ESC de ratón y primate no humano de diferenciarse en células RPE, y de sobrevivir y atenuar la degeneración de la retina después de trasplante^{4,5}. Se demostró la diferenciación espontánea de hESC en células RPE, sin embargo, la eficacia del proceso de diferenciación fue bajo, se requería un tiempo sustancial de diferenciación y se obtuvo un porcentaje solamente bajo (< 1%) de grupos que contenían células RPE después de 4-8 semanas de diferenciación. Además, aunque se observó función mejorada de la retina en ratas RCS después de trasplante subretiniano de estas células RPE, no se demostró la función de las células trasplantadas como células RPE maduras auténticas y este efecto podría estar potencialmente relacionado con un efecto trófico no específico de RPE^{6,7,9,10}.

60

65

Recientemente se demostró que las hESC pueden dirigirse para diferenciarse de forma reproducible en células RPE, en que sucedía direccionamiento en lugar de diferenciación espontánea de hESC hacia un destino RPE en presencia de Nicotinamida (NA)⁸.

5 El método para producir células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) de la presente invención se define en la reivindicación 1.

La presente invención proporciona un método para producir células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), comprendiendo el método:

- 10 a. cultivar células madre pluripotentes humanas en un medio suplementado con nicotinamida para generar células en diferenciación; y
 b. cultivar dichas células en diferenciación en un medio que comprende uno o más miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) y nicotinamida, produciendo de este modo células RPE.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para comprender la invención y mostrar el modo en que puede realizarse en la práctica, se describirá ahora una realización preferida, a modo de ejemplo no limitante solamente, con referencia a los dibujos adjuntos, en que:

20 Figuras 1A-1E: PCR a tiempo real, que analiza la expresión de marcadores de RPE en presencia de NA. Se indujo la diferenciación de hESC cultivándolas como grupos de 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) estaba significativamente potenciado en presencia de NA. El análisis por PCR a tiempo real en momentos puntuales secuenciales demostró el aumento progresivo en 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 transcritos adicionales de marcadores de RPE incluyendo Bestrofina, CRALBP y Mertk por análisis de RT-PCR de grupos pigmentados sembrados en placa (Fig. 1E). +/- indica presencia o ausencia, respectivamente, de transcriptasa inversa.

30 Figuras 2A-2F: El efecto inductivo de diferenciación de RPE de NA no es dependiente de una composición específica de medio. Micrografías de campo oscuro de grupos hESC que se diferencian 12 semanas en medio KO (Fig. 2A) o en medio Neurobasal suplementado con N2, que se sustituye después de 1 semana con DMEM/F12 suplementado con B27 (medio NN) (Fig. 2C). En ambos medios la NA aumentó la diferenciación hacia células pigmentadas (Fig. 2B, D) aunque el tamaño de los grupos de hESC diferenciadas y sus cantidad total fue más pequeña con medio NN (las flechas blancas marcan áreas pigmentadas dentro de los grupos en diferenciación). A nivel de ARN, en ambos medios, la suplementación con NA potenció el nivel de expresión de MiTF-A y RPE65 (Fig. 2E, y F; respectivamente).

40 Figuras 3A-3L: Células que expresan melanina dentro de grupos de flotación libre de hESC son células RPE putativas. Micrografía de campo oscuro de grupos de flotación libre de hESC en diferenciación con áreas definidas altamente enriquecidas para células pigmentadas (Fig. 3A). Imágenes de fluorescencia (Fig. 3B) y contraste de fase (Fig. 3C) de células pigmentadas después de disociación y siembra en placa que son inmunorreactivas con anti Otx2 y MiTF. Se muestra una micrografía de campo oscuro de grupos en diferenciación después de siembra en placa que ilustra áreas pigmentadas confinadas (Fig. 3D). Imagen de contraste de fase de células dentro de las áreas pigmentadas que tienen características morfológicas que son típicas de células RPE (Fig. 3E). Tinciones inmunofluorescentes indirectas 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). Después de la disociación, la siembra en placa a baja densidad y el cultivo, las células pigmentadas pierden la pigmentación y adquieren morfología tipo fibroide (imagen de contraste de fase) (Fig. 3K). Después de cultivo prolongado y proliferación adicionales en cultivos de alta densidad, las células vuelven a adquirir las características de morfología y pigmentación de células RPE (Fig. 3L).

50 Figuras 4A-4E: Activina A induce la diferenciación en RPE. Se permitió que ESC humanas se diferenciaran como grupos de flotación libre durante 6 semanas en ausencia o presencia de activina A que se suplementó después de la primera semana de diferenciación. Micrografías de campo oscuro de los grupos muestran que la activina A aumentaba significativamente el porcentaje de grupos que incluían células pigmentadas (Fig. 4A, B) (las flechas blancas marcan áreas pigmentadas dentro de grupos en diferenciación y los límites de las áreas pigmentadas dentro de algunos de los grupos están marcados por líneas discontinuas). En presencia de activina A los límites de las áreas pigmentadas están más agudamente delimitadas de las áreas no pigmentadas adyacentes dentro de los grupos. Además, las células pigmentadas son más oscuras en presencia de activina A (Fig. 4B). A nivel de ARN, el análisis de PCR a tiempo real mostró que la expresión de RPE65 (Fig. 4D) y Bestrofina (Fig. 4E) está significativamente potenciada en presencia de activina A. La expresión de MiTF-A no estaba alterada por el tratamiento con activina A (Fig. 4C).

60 Figuras 5A-5G: BMP y TGF β 3 tienen un papel en la diferenciación en RPE. Se indujo a ESC humanas de diferenciarse como grupos de flotación libre durante 6 semanas. Se observó diferenciación espontánea en células pigmentadas de forma infrecuente (Fig. 5A) pero se potenciaba significativamente cuando se suplementaba el medio con NA (Fig. 5B, imágenes de campo oscuro más a la izquierda y a la izquierda; las flechas blancas marcan áreas pigmentadas dentro de grupos en diferenciación). La suplementación del medio por noggina bloqueó la diferenciación en células pigmentadas tanto en ausencia (Fig. 5D) como en presencia de NA (Fig. 5C). A nivel de

ARN, el análisis de PCR a tiempo real mostró que la noggina reducía los niveles de expresión de MiTF-A tanto en presencia como en ausencia de NA (Fig. 5E). Cuando se añadía TGFβ3 al medio de cultivo durante la diferenciación de grupos de hESC en presencia de NA, aumentaba significativamente los niveles de expresión de MiTF-A (Fig. 5F) pero no de RPE65 (Fig. 5G).

5 Figura 6A-6J: Supervivencia e integración de células RPE derivadas de hESC trasplantadas en ojos de rata. Después de trasplante intraocular de células RPE derivadas de hESC, las células pigmentadas podían identificarse fácilmente in vivo en los ojos de ratas albinas (Fig. 6A, 6B). Después de enucleación del ojo (Fig. 6B) y retirada de la córnea y el cristalino, podían observarse el injerto principal así como marchas pigmentadas dispersas adicionales (Fig. 6C). En secciones histológicas, podían identificarse injertos que incluían células pigmentadas oscuras que también co-expresan GFP (Fig. 6D-6G), confirmando el hecho de que las células eran derivadas de hESC. Las células trasplantadas podían encontrarse en el área intravítrea, entre la retina y el cristalino (Fig. 6H), en la retina (ocasionalmente sobresaliendo en el vítreo a lo largo de la vía 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 RPE de ratas albinas (Fig. 6J). No se observaron células pigmentadas en la capa RPE de ojos no trasplantados de control. Dentro de los injertos, la inmunotinción con ZO-1 (Fig. 6K-6N) demostró que había conexiones estrechas entre células derivadas de hESC GFP+ trasplantadas. Dichas conexiones son características de células RPE. Después del trasplante en el espacio subretiniano de ratas RCS con disfunción del RPE y degeneración de la retina, podía observarse conservación relativa de la capa fotorreceptora en proximidad al injerto (Fig. 6O; el área dentro del rectángulo está marcada por un asterisco, y ampliada en la Fig. 6P), en comparación con áreas distantes del injerto (marcadas por flechas). Obsérvese las grandes células RPE derivadas de hESC trasplantadas con forma poligonal y aspecto tipo adoquín (Fig. 6P) (asterisco). En todos los casos aquí mostrados, las células RPE estaban derivadas de hESC sin presencia de Activina-A.

Figura 7: Registros electroretinográficos 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 mayores en ojos de ratas RCS después del trasplante de células RPE derivadas de hESC en comparación con ojos de control no trasplantados contralaterales (n=11 ratas). Las células RPE usadas en estos experimentos se derivaron sin la adición de Activina A al medio de cultivo. Se muestran las amplitudes de onda b de las respuestas mixtas de conos-bastones adaptados a la oscuridad a cuatro estímulos de intensidad creciente.

Figuras 8A-8I: Análisis de morfología y expresión de marcadores que muestra el efecto de NA en la inducción del desarrollo de células pigmentadas a partir de hESC. Micrografías de campo oscuro que muestran la aparición progresiva de células pigmentadas durante el cultivo de grupos derivados 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 u 8F) (las flechas blancas marcan áreas pigmentadas dentro de grupos en diferenciación). Presentación en histograma del porcentaje de grupos que contienen áreas pigmentadas en diferentes momentos puntuales durante el cultivo en medio suplementado con NA (*barras con línea en negrita*) y en cultivos de control (*barras con línea fina*) (Fig. 8G). Presentación en histograma del porcentaje de células pigmentadas (Fig. 8H) y las células que son inmunorreactivas con anti-MiTF (Fig. 8I), un marcador de RPE prematuro, durante 8 semanas de cultivo con suplementación con NA. Barras a escala: (A) 200 μm; * p<0,05; ** p<0,001.

Figuras 9A-9S: Análisis por PCR a tiempo real, inmunotinción y citometría de flujo que muestra la progresión del desarrollo de RPE a lo largo del tiempo en grupos en diferenciación de hESC. (Fig. 9A-9L) PCR a tiempo real, que analiza la cronología de la expresión de genes clave en el desarrollo de RPE en grupos cultivados en presencia (*barras con línea en negrita*) o ausencia (*barras con línea fina*) de NA. Se analizó la expresión progresiva de los siguientes marcadores en momentos puntuales secuenciales durante 8 semanas de diferenciación de grupos derivados de hESC: el marcador específico de hESC, Oct4 (Fig. 9A); los marcadores neurales prematuros, Otx2 (Fig. 9B), Musashi (Fig. 9C) y Pax6 (Fig. 9D); los marcadores de 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 de progenitores fotorreceptores, Crx (Fig. 9K); el marcador de desarrollo de melanocitos, Sox10 (*barras con rayas horizontales*, Fig. 9L) (Se usa 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 de progenitores neurales, PSA-NCAM (Fig. 9O), en grupos que se diferencian durante 8 semanas en presencia (*barras con línea en negrita*) o ausencia (*barras con línea fina*) de NA. Análisis de inmunofluorescencia indirecta del porcentaje de células que expresan los marcadores neurales prematuros: PSA-NCAM (*barras con línea en negrita*), nestina (*barras con rayas horizontales*), Musashi (*barras con línea fina*), Pax6 (*barras con rayas verticales*), dentro de los grupos que se diferencian durante 2 y 4 semanas en presencia de NA (Fig. 9N). Imágenes de inmunofluorescencia, que demuestran las células que expresan estos marcadores, PSA-NCAM (Fig. 9P), nestina (Fig. 9Q), musashi (Fig. 9R), Pax6 (Fig. 9S).

Figura 10A-10J: Análisis de morfología, expresión de marcadores y función que muestra que las células que expresan pigmento dentro de grupos de flotación libre de hESC son células RPE putativas. Tinción con faloidina que muestra la distribución de F-actina dentro de la descendencia pigmentada derivada de hESC que es característica de RPE (Fig. 10A). Después de disociación, la siembra en placa a baja densidad y el cultivo, las células pigmentadas perdían la pigmentación y adquirirían morfología tipo fibroide (imagen de contraste de fase, 1 semana de cultivo) (Fig. 10B). Después de cultivo prolongado y proliferación adicionales en cultivo de alta densidad, las células volvieron a adquirir las características de morfología y pigmentación de células RPE (1,5 meses en cultivo) (Fig. 10C). Análisis de microscopía electrónica de células RPE derivadas de hESC que muestran propiedades características de RPE: microvellosidades (Fig. 10D), una membrana basal (Fig. 10E), gránulos de melanina (Fig. 10D), conexiones estrechas (Fig. 10F). Imágenes de contraste de fase (Fig. 10G) y fluorescentes (Fig. 10H-J) que

muestran fagocitosis de perlas de látex fluorescentes verdes (*cabezas de flecha Wight*) por las células pigmentarias derivadas de hESC; las membranas celulares se tiñeron con colorante fluorescente rojo PKH (*color gris*). Las tres imágenes fluorescentes confocales demostraron trozos del eje z en serie (Fig. 10H-J).

Figuras 11A-11P: Análisis de morfología y expresión génica que muestra que factores de la familia de TGF β promueven la diferenciación hacia destino RPE. Micrografías de campo oscuro de grupos derivados de hESC que se diferencian durante 4 semanas mostraron la aparición de células pigmentadas en esta fase prematura en presencia de activina (Fig. 11A), así como el aumento en la cantidad de grupos pigmentados que se diferencian en presencia de activina A y NA (Fig. 11C) en oposición a NA solamente (Fig. 11B). Similar a la activina A, la suplementación con TGF β 1 también aumenta la aparición de grupos pigmentados (Fig. 11D). En contraste, la aplicación del inhibidor de la vía de señalización de activina, SB431542, junto con activina A y NA redujo el efecto de activina A sobre la aparición de grupos pigmentados (Fig. 11E). El desarrollo de grupos pigmentados también se vio suprimido por el cultivo de las células en presencia de FGF β junto con NA (Fig. 11F). Se demostró la expresión de transcritos de receptores de activina y activina A por análisis por RT-PCR de grupos de 2 semanas de edad cultivados en presencia o ausencia de NA y hESC indiferenciadas como controles (Fig. 11G). Análisis por histograma del porcentaje de grupos que contienen áreas pigmentadas a las 4 semanas después de cultivo en presencia de NA, NA+ActA, NA+SB431542, NA+ActA+SB431542, NA+TGF β 1 (Fig. 11H). Análisis por histograma del porcentaje de células pigmentadas después de 4 semanas de cultivo con suplementación con NA (*barras con línea en negrita*) o activina A y NA (*barras con rayas diagonales*) (Fig. I). Análisis por histograma del porcentaje de células pigmentadas (Fig. 11J) y el nivel de expresión de transcritos de los marcadores de RPE, Bestrofina (Fig. 11K) y RPE65 (Fig. 11L) a diferentes concentraciones de activina A, la de 140 ng/ml es óptima para la inducción de RPE. Análisis de trayectoria temporal de PCR a tiempo real del efecto de activina A sobre los niveles de expresión de genes de la retina y RPE, Bestrofina (Fig. 11M), MiTF-total (Fig. 11N), Rxl (Fig. 11O) y Chx10 (Fig. 11P), en hESC que se diferencian en presencia de NA con (*barras con rayas diagonales*) o sin (*barras con línea en negrita*) suplementación con activina A $**p<0,005$, (las flechas blancas marcan áreas pigmentadas dentro de grupos en diferenciación).

Figura 12A-12E: Células RPE derivadas de hESC tratadas por NA y Activina A sobreviven después de trasplante sub-retiniano en ojos de ratas RCS distróficas. Pudieron identificarse fácilmente *in-vivo* grupos de células pigmentadas en los ojos de ratas RCS usando sistemas de imágenes de fondo (Fig. 12A-12C); fotos de fondo (Fig. 12A) y fotos sin rojo (Fig. 12B) que mostraron la localización subretiniana de los injertos (obsérvense los vasos retinianos que recorren sobre las áreas pigmentadas). Puede observarse que las células derivadas de hESC, que expresan GFP emiten fluorescencia cuando se usan filtros de excitación y emisión de fluoresceína (Fig. 12C). En preparaciones de copa óptica de las se han formado imágenes *ex-vivo* en un microscopio de fluorescencia (Fig. 12D-12E), pueden observarse grupos grandes de células GFP-positivas subretinianas (Fig. 12D) así como múltiples, grupos más pequeños dispersos (Fig. 12E).

Figura 13A-13F: Aspecto histológico de injertos sub-retinianos de células RPE derivadas de hESC, tratadas con Activina-A en ojos de ratas RCS. Secciones histológicas teñidas por hematoxilina y eosina (Fig. 13A, y 13B) mostraron la localización subretiniana y ocasionalmente intra-retiniana de células pigmentadas derivadas de hESC trasplantadas, que aparecían en grupos o como células aisladas (flechas). La inmunotinción con GFP (Fig. 13C-13F) confirmó que las células son de hecho derivadas de hESC. Los injertos eran a menudo bastante grandes y dispersos (Fig. 13C, 13E), y las células pigmentadas que co-expresan GFP pueden observarse claramente (Fig. 13D, 13F). Obsérvense las células pigmentadas GFP-positivas que se integran dentro de la capa RPE hospedadora (Fig. 13D, flecha).

Figura 14A-14O: Células pigmentadas derivadas de hESC trasplantadas expresan marcadores de RPE maduro. La inmunotinción reveló que grandes cantidades de células trasplantadas dentro de los injertos expresan proteínas que son características de células RPE maduras, incluyendo los marcadores específicos de RPE RPE65 (Fig. 14A-14E) y Bestrofina (Fig. 14F-14J) así como el marcador de conexión estrecha ZO-1 (Fig. 14K-14O). Las Fig. 14A, 14F y 14K muestran imágenes fluorescentes de bajo aumento de injertos que co-expresan GFP y el marcador relevante. Imágenes confocales de alto aumento en cada fila muestran pigmento (por óptica Nomarski) así como co-expresión de GFP y los diferentes marcadores a nivel de célula individual. Esta serie confirma que las células son de hecho derivadas de hESC y que expresan marcadores de RPE maduro *in-vivo*. En la Fig. 14M, obsérvese que el RPE hospedador se tiñe con ZO-1 (flecha discontinua) mientras que es GFP-negativo en la Fig. 14N, 14O (el área correspondiente es oscura) en oposición a las células derivadas de hESC ZO-1 positivas (flecha completa en la Fig. 14M) que co-expresa GFP (Fig. 14N, 14O).

Figura 15A-15C: Células RPE derivadas de hESC, tratadas con Activina-A trasplantadas proporcionan rescate funcional en el modelo de degeneración de la retina de rata RCS. Las respuestas ERG de campo completo registradas a la edad de 8 semanas fueron mayores en ojos de rata RCS después de trasplante de células RPE derivadas de hESC tratadas con activina en comparación con ojos de control no trasplantados contralaterales así como en comparación con ojos en que se realizó inyección subretiniana de medio en solitario. Se muestran respuestas ERG representativas a una serie de flashes blancos de intensidad creciente en estado adaptado a la oscuridad en un ojo trasplantado (Fig. 15A) frente a su ojo de control contralateral (Fig. 15B). La Fig. 15C muestra la marcada diferencia en las amplitudes medias entre ojos trasplantados y los diferentes grupos de ojos de control (-♦- ojo inyectado (n=13); -■- ojo no inyectado (n=13); -●- ojos no inyectados con medio (n=5); -▲- ojos inyectados con medio (n=5)). Como se muestra, existe una tendencia hacia una mejor conservación de la función de la retina después de trasplante de células RPE tratadas con activina-A (mostradas aquí) en comparación con el efecto de rescate conseguido después de trasplante de células RPE derivadas sin activina-A (Fig. 7).

Figura 16A-16D: Células RPE derivadas de hESC, tratadas con Activina-A trasplantadas proporcionan rescate estructural en el modelo de degeneración de la retina de rata RCS. Se examinaron y cuantificaron los efectos de

células RPE derivadas de hESC, tratadas con activina trasplantadas sobre la retina hospedadora en degeneración usando imágenes microscópicas de alta resolución de secciones teñidas con hematoxilina y eosina. Se observó conservación relativa de la capa nuclear externa (fotorreceptora) (ONL) y de los segmentos fotorreceptores interno y externo (IS+OS) en proximidad a los injertos sub-retinianos de RPE en comparación con áreas distantes de los injertos (dos ejemplos mostrados en la Fig. 16A, 16B). Los insertos en la Fig. 16A demuestran esta diferencia (retina rescatada con ONL relativamente gruesa mostrada en inserto derecho en proximidad al injerto; se observa adelgazamiento severo de la ONL en inserto izquierdo, distante del injerto). El grosor total de la retina (Fig. 16C) así como el grosor de la ONL y los IS+OS (Fig. 16D) aumentaron significativamente en las cercanías a injertos de RPE derivado de hESC (barras negras, media \pm ETM, n=7) en comparación con áreas distantes de los injertos (barras grises). Este tipo de rescate estructural se observó solamente en proximidad a injertos sub-retinianos e intra-retinianos profundos, y no cuando los injertos eran exclusivamente intra-vítreos (no mostrado). Para detalles de la técnica de cuantificación, por favor véanse los métodos.

Figura 17A-17E: Células RPE derivadas de hESC, tratadas con Activina-A trasplantadas captan rodopsina in-vivo. Imágenes confocales de células RPE trasplantadas de forma subretiniana muestran la co-localización 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 INVENCION

La presente descripción proporciona el uso de uno o más miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF β) para la preparación de un sistema de cultivo para promover la diferenciación de células madre humanas (hSC), preferiblemente células madre embrionarias humanas (hESC) en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE). Debe apreciarse que además de los usos especificados analizados en detalle en este documento, también se incluye dentro de la presente descripción células RPE obtenidas por diferenciación dirigida de hSC en presencia de uno o más miembros de la superfamilia de TGF β ; así como un método para promover la diferenciación dirigida de hSC en destino RPE, así como métodos para cultivar y mantener 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 el contenido de este documento son células RPE maduras (en otras palabras, diferenciadas de forma terminal) y funcionales, como se analizará adicionalmente y explicará a continuación.

La presente descripción se refiere ampliamente al uso de uno o más miembros de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento en la promoción/inducción/aumento de la diferenciación dirigida de hSC en células RPE, preferiblemente células RPE maduras.

En la siguiente descripción y reivindicaciones se hará uso, a veces, de una diversidad de términos, y el significado de dichos términos deberá entenderse de acuerdo con el presente contenido del siguiente modo:

GLOSARIO

"Factor de crecimiento de la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF β)", como se usa en este documento, indica cualquier miembro de la superfamilia TGF β de factores de crecimiento, tales como proteínas del factor de crecimiento transformante- β , incluyendo los subtipos TGF β 1, TGF β 2, y TGF β 3, así como ligandos homólogos incluyendo activina (por ejemplo, activina A, activina B, y activina AB), nodal, hormona anti-mulleriana (AMH), 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 este documento, se refiere a células de origen humano que en condiciones adecuadas son capaces de diferenciarse en otros tipos celulares que tienen una función especializada particular mientras que en otras condiciones adecuadas son capaces de auto-renovarse y permanecer en un estado pluripotencial indiferenciado como se detalla a continuación.

Una "célula" como se usa en este documento se refiere a una célula individual así como a una población de (es decir, más de una) células. La población puede ser una población pura que comprende un tipo celular. Como alternativa, la población puede comprender más de un tipo celular. Las células hSC son preferiblemente células madre hematopoyéticas o mesenquimáticas obtenidas de tejido de médula ósea de un individuo de cualquier edad o de sangre o tejido de cordón de un individuo recién nacido, células madre neurales obtenidas de cerebro fetal, de cualquier edad después del nacimiento, o de cadáveres, células madre embrionarias (ES), o células germinales embrionarias (EG) obtenidas del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferiblemente antes de las 10 semanas de gestación. El término células puede indicar una célula individual o un grupo de células.

"Célula madre embrionaria" y "célula madre embrionaria pluripotente", como se usan en este documento, se refieren a una célula que puede dar lugar a cualquier tipo celular diferenciado en un embrión o un adulto, incluyendo células germinales (esperma y óvulos).

5 "Cultivo celular" o "célula cultivada", como se usan en este documento, se refieren a células o tejidos que se incuban, cultivan o crecen en un entorno artificial *in vitro*.

10 "hSC pluripotenciales indiferenciadas", "hSC pluripotentes" como se usan en este documento, se refieren a células precursoras de fuente humana que tienen la capacidad de formar cualquier célula adulta. Dichas células son verdaderas líneas celulares porque: (i) tienen capacidad de proliferación extensiva *in vitro* en un estado indiferenciado; y (ii) tienen capacidad de diferenciación en derivados de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo, y ectodermo) incluso después de cultivo prolongado. Las hESC se derivan de embriones fertilizados.

15 Otras hSC pluripotentes incluyen, sin limitación, células progenitoras adultas multipotentes (MAP), células madre pluripotentes inducidas (células iPS) y células madre de fluido amniótico.

20 "Indiferenciado", como se usa en este documento, se refiere a células cultivadas cuando una proporción sustancial (al menos el 20%, y posiblemente más del 50% u 80%) de las células y sus derivados en la población muestran marcadores característicos y características morfológicas de células indiferenciadas, que las distinguen de células diferenciadas de origen embrionario o adulto. Las células se reconocen como en proliferación en un estado indiferenciado cuando pasar por al menos 1 duplicación de población durante un periodo de cultivo de al menos 3 semanas, reteniendo al mismo tiempo al menos aproximadamente el 50%, o la misma proporción de células que albergan marcadores característicos o características morfológicas de células indiferenciadas después de dicho periodo de cultivo.

30 "Suspensión celular" o "células de flotación libre" como se usan en este documento, se refieren a un cultivo de células en que la mayoría de las células flotan libremente en el medio, típicamente un medio de cultivo (sistema), y las células flotan como células individuales, como grupos de células y/o como agregados celulares. En otras palabras, las células sobreviven y se propagan en el medio sin unirse a un sustrato.

35 "Sistema de cultivo", como se usa en este documento, se refiere a un sistema de cultivo adecuado para la propagación de SC. El término indica una combinación de elementos, incluyendo como mínimo un medio básico (un medio de cultivo celular que habitualmente comprende una solución básica definida, que incluye sales, azúcares y aminoácidos) y uno o más miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF β) de factores de crecimiento. El sistema de cultivo de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente otros elementos tales como, sin limitación, un suero o reemplazo de suero, un medio de cultivo (nutriente) y otros factores añadidos de forma exógena, que juntos proporcionan condiciones adecuadas que soportan el crecimiento de SC así como otros componentes típicamente usados en sistemas de cultivo celular. Los elementos anteriores pueden clasificarse colectivamente como elementos solubles. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, los elementos también pueden asociarse a un vehículo, es decir, elementos no solubles. La asociación puede ser por adhesión/unión química o física. Por ejemplo, el elemento puede inmovilizarse a una matriz (por ejemplo, matriz extracelular), presentarse por células añadidas al sistema o unirse a material biodegradable. Además, el elemento puede liberarse desde un vehículo, pudiendo ser el vehículo una célula o una vesícula que encapsula o incluye el elemento. Por 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.

50 "Diferenciación", como se usa en este documento, se refiere al proceso de cambiar el estado de una célula de un tipo celular a otro, y más específicamente en el contexto de la presente descripción indica el proceso de una célula madre humana que adquiere el tipo celular de una célula del epitelio pigmentario de la retina (RPE) con al menos una propiedad característica indicativa de que dicha célula RPE es una célula madura (diferenciada de forma terminal). Como se usa en este documento, la expresión "tipo celular" se refiere a una forma morfológica o funcional distinta de una célula.

55 "hSC en diferenciación" como se usa en este documento, se refiere a hSC indiferenciadas que en condiciones adecuadas son capaces de diferenciarse de un modo aumentado, dirigido en un destino predeterminado; la expresión también se refiere a una población de hSC en que al menos parte de la misma ya se ha inducido a experimentar al menos diferenciación inicial, concretamente diferenciación dirigida o combinación de las mismas.

60 "Cebiar", "aumentar", "promover" o "dirigir", como se usa en este documento de forma intercambiable, salvo que el contexto indique otra cosa, se refiere a iniciar la diferenciación no espontánea de células madre en células RPE.

65 "Inductor de diferenciación" o "promotor de diferenciación", "agente cebador de la diferenciación" o "factor promotor de diferenciación" como se usan de forma intercambiable en este documento indican cualquier agente que sea capaz de cebiar, aumentar, promover o dirigir la diferenciación de SC pluripotentes en una célula somática, preferiblemente, en células RPE.

"Células del epitelio pigmentario de la retina", "células RPE", "RPE", que pueden usarse de forma intercambiable según permita el contexto, significan células de un tipo celular funcionalmente similar al de células RPE nativas que forman la capa celular pigmentada de la retina (por ejemplo, después de trasplante dentro de un ojo, muestran actividades funcionales similares a las de células RPE nativas). Por tanto, las expresiones "células del epitelio pigmentario de la retina", "células RPE" o "RPE" pueden usarse para hacer referencia tanto a células RPE nativas de capa pigmentada de la retina como a células RPE diferenciadas de forma dirigida a partir de hSC, de acuerdo con la presente descripción.

La expresión "células RPE derivadas de hSC" se usa en este documento para indicar células RPE que se obtienen por diferenciación dirigida a partir de hSC. De acuerdo con una realización preferida, las células RPE derivadas de hSC son células RPE maduras (diferenciadas de forma terminal) y funcionales como se muestra por parámetros definidos a continuación en este documento. La expresión "diferenciación dirigida" se usa de forma intercambiable con la expresión "diferenciación inducida de RPE" y debe entenderse que significa el proceso de manipulación de hSC en condiciones de cultivo que inducen/promueven la diferenciación en solamente el tipo celular RPE.

"Células RPE funcionales" se usa en este documento para indicar células obtenidas por diferenciación dirigida de hSC en presencia de uno o más miembros de la superfamilia TGF β , mostrando las células RPE al menos una de las siguientes características:

- durante la diferenciación, las células cultivadas responden a señalización de TGF β ;
- las células RPE son células maduras, diferenciadas de forma terminal como se muestra por la expresión de marcadores indicativos de diferenciación terminal, por ejemplo, bestrofina o RPE65 así como o alternativamente, por su ausencia de potencia para proliferar *in vivo*.
- después de trasplante (es decir, *in situ*), las células RPE muestran efecto trófico que soporta los fotorreceptores adyacentes a células RPE;
- además, *in situ* las células RPE son capaces de funcionar con fagocitosis de segmentos externos desprendidos de fotorreceptores como parte del proceso normal de renovación de estos fotorreceptores.

Por tanto, las células RPE de acuerdo con la presente invención son especialmente adecuadas para la regeneración de RPE hospedador proporcionando de este modo visión mejorada después de trasplante con las mismas en el ojo de un sujeto.

"Similar", cuando se usa en el contexto de células RPE diferenciadas, significa que las células RPE diferenciadas comparten una o más características morfológicas o funcionales distintas con células RPE nativas. Por ejemplo, la similitud suficiente puede indicarse, por ejemplo, determinando 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 que la célula manifiesta una o más características morfológicas físicas de células RPE, tales como distribución típica de F-actina dentro de las células, pigmentación por gránulos pigmentados, forma poligonal (por ejemplo, hexagonal), aspecto tipo adoquín y características ultra-estructurales de RPE demostradas por microscopía electrónica. Además, puede incluir una cualquiera de las funciones enumeradas anteriormente, por ejemplo, efecto trófico que soporta los fotorreceptores adyacentes a células RPE; funcionalidad con fagocitosis de segmentos externos desprendidos del fotorreceptor que alberga rodopsina o carecen de potencia para proliferar *in vivo*.

"Gran escala", como se usa en este documento con respecto al cultivo y expansión celular, se refiere a la producción de células RPE en condiciones que permitan al menos duplicar las células en el cultivo celular después de 4 semanas, consistiendo la población celular después de las 4 semanas esencialmente en células RPE.

"Marcador celular", como se usa en este documento, se refiere a cualquier característica fenotípica de una célula que puede usarse para caracterizarla o discriminarla de otros tipos celulares. Un marcador puede ser una proteína (incluyendo proteínas secretadas, de superficie celular, o internas; sintetizadas o captadas por la célula); un ácido nucleico (tal como un ARNm, o molécula de ácido nucleico enzimáticamente activa) o un polisacárido. Se incluyen determinantes de cualquiera de dichos componentes celulares que se puedan detectar por anticuerpo, lectina, sonda o reacción de amplificación de ácido nucleico que son específicos para el marcador del tipo celular de interés. Los marcadores también pueden identificarse por ensayo bioquímico o enzimático o respuesta biológica que depende de la función del producto génico. Asociado con cada marcador está el gen que codifica el transcrito, y los eventos que conducen a la expresión del marcador. Se dice que un marcador se expresa preferentemente en una población celular indiferenciada o diferenciada, si se expresa a un nivel que es al menos un 50% mayor (en términos de producto génico total medido en un ensayo de anticuerpo o PCR) o de un 30% más frecuentemente (en términos de células positivas en la población) que un control aceptable tal como actina o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los marcadores que se expresan 2, 10, 100, ó 10.000 veces más o más frecuentemente son más preferidos de forma creciente.

La presente descripción hace uso de hSC a partir de las cuales se deriva el RPE, debido a la diferenciación inductiva y dirigida de las hSC en presencia de un sistema de cultivo único aplicado a las hSC en suspensión.

5 Ejemplos no limitantes de hSC son células madre neurales obtenidas del feto, o en cualquier edad después del nacimiento o de un cadáver, células madre hematopoyéticas obtenidas de tejido de médula ósea de un individuo humano en cualquier edad o de sangre del cordón de un individuo recién nacido, células madre mesenquimáticas, células madre de fluido amniótico, células madre embrionarias (ES), células germinales embrionarias (EG) obtenidas del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferiblemente antes de las 10 semanas de gestación, células madre pluripotentes inducidas, o células madre obtenidas de las gónadas de un individuo humano de cualquier edad. Las células madre humanas preferidas de acuerdo con la presente invención son células madre embrionarias humanas (hESC).

15 También pueden usarse hSC disponibles en el mercado de acuerdo con la invención. Las hSC pueden adquirirse del registro de células madre embrionarias humanas NIH.

20 Las aplicaciones potenciales de las hESC y células derivadas de las mismas son para clasificar e incluir descubrimiento y ensayo de fármacos, generación de células, tejidos y órganos para uso en trasplante, producción de biomoléculas, ensayo de toxicidad y/o teratogenicidad de compuestos, selección de alto rendimiento de moléculas por su efecto tóxico, regenerativo, protector o cualquier otro efecto, y facilitación del estudio de procesos de desarrollo y otros procesos biológicos. Por ejemplo, enfermedades que actualmente se espera que se puedan tratar por trasplante terapéutico de hESC o células derivadas de hESC incluyen enfermedad de Parkinson, infartos cardíacos, diabetes mellitus de aparición juvenil, y leucemia [Gearhart J. Science 282: 1061-1062, 1998; Rossant y Nagy, Nature Biotech. 17: 23-24, 1999].

25 Existen, sin embargo, obstáculos significativos a la explotación práctica de hESC. Dos de estos obstáculos incluyen: mantenimiento de las hESC en un estado indiferenciado, pluripotencial sin diferenciación espontánea; y direccionamiento de la diferenciación de hESC en tipos específicos de células somáticas. Se han descrito varios sistemas de cultivo para mantener y propagar células madre, y particularmente hESC, en un estado indiferenciado⁸.

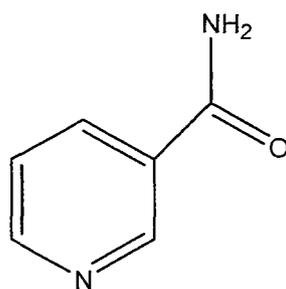
30 A causa del potencial de las células diferenciadas derivadas de células madre en incontables aplicaciones terapéuticas, el direccionamiento o promoción de la diferenciación de células madre en cultivo hacia un destino específico de células somáticas es de gran interés.

35 En ciertas enfermedades y trastornos oculares de, por ejemplo, la retina y la mácula, el fallo de las células RPE finalmente conduce a pérdida visual e incluso ceguera. El trasplante de células RPE para reemplazar y soportar el fallo del RPE hospedador se ha sugerido como posible intervención terapéutica, pero es difícil obtener dichas células de donantes o embriones humanos. Las hSC por tanto pueden servir como fuente donante ilimitada potencial de células RPE, si puede dilucidarse el medio para dirigir su diferenciación en células RPE funcionales.

40 Ahora se ha descubierto sorprendentemente que el contacto de hSC con un miembro de la superfamilia de TGFβ de factores de crecimiento promueve fuertemente la diferenciación de hSC hacia un destino RPE. En otras palabras, estos factores de crecimiento tienen un efecto inductor sobre las hSC. Por tanto, el uso de un miembro/miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante-β (TGFβ) para la preparación de un sistema de cultivo para inducir diferenciación de células madre humanas (hSC) en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), se ha previsto de este modo.

45 Aunque se conocen muchos miembros de la superfamilia de TGFβ de factores de crecimiento (algunos ejemplos no limitantes se han enumerado anteriormente), de acuerdo con una realización preferida, el miembro de la superfamilia de TGFβ es preferiblemente los factores de crecimiento TGFβ1, TGFβ3 o activina A o una combinación de los mismos.

50 Se descubrió previamente que la nicotinamida (NA) en un cultivo celular tiene un efecto inhibitorio sobre la diferenciación de células madre en células extraembrionarias, y adicionalmente que la NA promueve la diferenciación somática hacia destino neural y adicionalmente hacia destino tipo célula RPE⁸. NA, también conocida como "niacinamida", es la forma derivada amida de Vitamina B3 (niacina) que se cree que conserva y mejora la función de células beta. La NA tiene la fórmula química C₆H₆N₂O. La NA es esencial para el crecimiento y la conversión de alimentos en energía, y se ha usado en el tratamiento de la artritis y el tratamiento y prevención de la diabetes.



Nicotinamida (NA)

En el contexto de la presente descripción, el término NA también se refiere a derivados de NA.

5 La expresión "*derivado de nicotinamida (NA)*" como se usa en este documento se refiere a un compuesto que es un derivado modificado químicamente de la NA natural. La modificación química puede incluir, por ejemplo, una sustitución en el anillo piridina de la estructura NA básica (mediante el miembro de carbono o nitrógeno del anillo), mediante los átomos de nitrógeno u oxígeno del resto amida, así como deleción o remplazo de un grupo, por ejemplo, para formar un análogo tiobenzamida de NA, siendo todos como apreciarán los especialistas en química orgánica. El derivado en el contexto de la invención también incluye el derivado nucleosídico de NA (por ejemplo, nicotinamida adenina). Se describe una diversidad de derivados de NA, algunos también en relación con una actividad inhibidora de la enzima PDE4 (documentos WO03/068233; WO02/060875; GB2327675A), o como inhibidores del receptor tirosina quinasa de VEGF (documento WO01/55114). Por ejemplo, el proceso para preparar derivados de 4-aril-nicotinamida (documento WO05/014549).

En relación con lo anterior, ahora se ha descubierto sorprendentemente que cuando las hSC se diferencian en presencia de NA, sus propiedades se alteran y por consiguiente obtienen la capacidad de responder a un efecto inductor de uno o más miembros de la superfamilia de TGF β que dirige su diferenciación hacia un destino RPE, preferiblemente células RPE maduras y funcionales. Por tanto el efecto inductor de la diferenciación de RPE de la NA puede potenciarse significativamente cuando posteriormente se exponen las hSC al uno o más miembros de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento en combinación con la pre-exposición de las células en el cultivo a NA.

Por tanto, de acuerdo con una realización, el método comprende ensayar las células con el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento usados en combinación con exposición previa a NA. La combinación puede ser para la preparación de un sistema de cultivo que comprende tanto TGF β como NA; así como para la preparación de un sistema de cultivo que comprende solamente el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β , a usar para inducir/promover la diferenciación y/o diferenciación adicional de hSC que ya se han expuesto a NA. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que la NA actúa como inductor/promotor de la diferenciación y que asimismo, el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β actúan como factor promotor de la diferenciación de RPE. Además, aunque sin limitarse a teoría alguna, se cree que la exposición previa de las hSC a NA proporciona a las células propiedades que posibilitan su respuesta al efecto promotor de la diferenciación de RPE del uno o más miembros of la superfamilia de TGF β .

Por tanto, de acuerdo con una realización de la invención, las hSC primero se cultivan en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con NA durante al menos varias horas, preferiblemente al menos un día y más preferiblemente, al menos dos días antes del cultivo de las células en ese cultivo celular en un medio básico (el mismo o diferente) suplementado con el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β .

De acuerdo con otra realización, las hSC indiferenciadas 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 .

Se aprecia que se conocen diversos medios básicos en la técnica para su uso en cultivos celulares y preferiblemente para su uso en cultivos de SC. Una lista no limitante de medios básicos que pueden usarse de acuerdo con la presente descripción comprende Neurobasal™ (CAT nº 21103-049, Gibco 1998/1999), KO-DMEM (CAT nº 10829-018, Gibco 1998/1999), DMEM (CAT nº 41965-039, Gibco 2004), DMEM/F12 (CAT nº 21331-020, Gibco 2004), medio de crecimiento de células madre Cellgro™ (CAT nº 2001, CellGenix 2005), o X-Vivo™ (CAT nº 04-380Q, LONZA 2007).

La presente descripción también proporciona un método para inducir diferenciación dirigida de hSC en destino RPE, comprendiendo el método:

(a) proporcionar cultivo celular que comprende hSC;

55

(b) cultivar las células en dicho cultivo celular en un sistema de cultivo que comprende un medio básico suplementado con uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ mediante lo cual se promueve la diferenciación dirigida de las hSC en destino RPE.

5 La diferenciación puede suceder dentro de grupos de flotación libre de hSC o cultivos adherentes. La diferenciación somática dentro de cultivos adherentes se ha descrito [patente de Estados Unidos N° 7.112.437]. Dichos cultivos adherentes pueden por tanto servir como base para inducir la diferenciación en RPE por un sistema de cultivo suplementado con al menos uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ de factores de crecimiento.

10 Las células en el cultivo celular pueden ser una población de hSC indiferenciadas o una población de células en que al menos parte de las hSC han iniciado la diferenciación. La diferenciación inicial es una diferenciación dirigida. Por tanto, en el contexto de la descripción, las células proporcionadas en el método se mencionan a veces como células en diferenciación.

15 Como ya se ha indicado anteriormente, el medio básico puede suplementarse mediante la introducción al mismo de elementos solubles así como mediante elementos no solubles. Con respecto a la suplementación con uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ de factores de crecimiento, el miembro puede estar presente en forma soluble o fijado o asociado a una matriz o célula añadida al sistema de cultivo o el elemento puede estar unido o en complejo con otras sustancias. El miembro también puede secretarse al sistema de cultivo desde células presentes en el último.

20 Las hSC pueden proporcionarse en estado indiferenciado así como después de exponerse a un factor promotor de la diferenciación (agente de cebado de la diferenciación), tal como NA. Las hSC indiferenciadas pueden obtenerse de diversos sistemas de cultivo en que las hSC pueden mantenerse en un estado pluripotente indiferenciado. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un sistema adherente o en suspensión sin alimentador (documento WO06/070370) o en células de alimentación. Las células de alimentación habitualmente usadas incluyen fibroblastos embrionarios primarios de ratón (PMEF), fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos fetales murinos (MFF), fibroblastos embrionarios humanos (HEF), fibroblastos humanos obtenidos de la diferenciación de células madre embrionarias humanas, células musculares fetales humanas (HFM), células cutáneas fetales humanas (HFS),
 25 células cutáneas adultas humanas, fibroblastos de prepucio humano (HFF), células humanas obtenidas del cordón umbilical o placenta, células epiteliales de trompa de Falopio adulta humana (HAFT) y células estromáticas de médula humana (hMSC). Los grupos de hSC pueden obtenerse de un cultivo celular adherente por disociación de las células de la capa de alimentación o matriz extracelular para formar una suspensión de células. La suspensión de células puede comprender los grupos de flotación libre o una suspensión de células esencialmente individuales a
 30 partir de la cual crecen grupos de células para formar los grupos de células.

35 De acuerdo con una realización preferida, el cultivo celular comprende suspensión celular, preferiblemente grupos de flotación libre en un cultivo en suspensión, es decir agregados de células derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC).

40 La etapa de cultivo de acuerdo con la presente descripción puede comprender el cultivo de las células en el cultivo celular con uno o más diferentes sistemas de cultivo, comprendiendo al menos uno de los sistemas de cultivo el uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ.

45 De acuerdo con una realización de la presente descripción, las células en el 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 TGFβ de factores de crecimiento.

50 De acuerdo con otra realización, las células en primer lugar se cultivan en un sistema de cultivo que comprende un medio básico y NA, siendo las células hSC indiferenciadas, y preferiblemente después de inducir la diferenciación de las hSC (es decir después de un periodo de tiempo predeterminado o después de confirmar la diferenciación celular por técnicas disponibles en la técnica) las células en el cultivo celular se cultivan en un sistema de cultivo que comprende el uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ de factores de crecimiento. El segundo sistema de cultivo también puede comprender NA, es decir puede ser igual que el sistema de cultivo inicial, en que se añade el
 55 miembro de la superfamilia de TGFβ. Como resultado, se induce la diferenciación dirigida en células RPE.

60 De acuerdo con esta realización, las hSC en el cultivo celular inicial se cultivan en el sistema de cultivo que comprende NA durante al menos el periodo de necesario para que se inicie la diferenciación de las hSC. De acuerdo con una realización particular, el sistema de cultivo celular se cultiva en el sistema de cultivo que comprende NA durante varios días, preferiblemente al menos dos días y preferiblemente durante al menos una semana, más preferiblemente, al menos dos semanas.

65 Sin limitarse a teoría alguna, se estipula por los inventores que la NA induce el proceso de diferenciación dirigida que también se acelera en su progresión en comparación con la diferenciación espontánea (concretamente, la que sucede en ausencia de exposición a NA o exposición a NA en combinación con el miembro de TGFβ). Se ha

demostrado en este documento que en la diferenciación dirigida, las células madre indiferenciadas se eliminan más rápidamente del sistema de cultivo. Por tanto, se usa NA en un sistema de cultivo para diferenciar hSC como medio para promover y acelerar el proceso de diferenciación dirigida, y para la eliminación completa de células madre indiferenciadas evitando de este modo complicaciones potenciales tales como la formación de tumor teratoma a partir de la presencia de células indiferenciadas después del trasplante.

Se ha demostrado en este documento que la exposición de las hSC a NA seguida de exposición a uno o más miembros de la superfamilia de TGF β induce la diferenciación en células con un fenotipo diferente en comparación con las células en diferenciación espontánea (es decir en ausencia de estos factores).

Además, sin limitarse a teoría alguna, se asume por los inventores que NA induce diferenciación en células que expresan receptores para uno o más miembros de la superfamilia de TGF β (que no se expresan por células madre en diferenciación 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 en diferenciación en el cultivo hacia un destino RPE, concretamente, hacia células RPE maduras y funcionales.

Como se ha indicado anteriormente, existe una diversidad de miembros de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento. 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, nodal, hormona anti-mulleriana (AMH), BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7 o factor de crecimiento y diferenciación (GDF). Sin embargo, preferiblemente, 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.

El medio básico de acuerdo con la invención es cualquier medio de cultivo celular conocido en la técnica para soportar células cultivadas *in vitro*, típicamente, un medio que comprende una solución básica definida, que incluye sales, azúcares, aminoácidos y cualquier otro nutriente necesario para el mantenimiento de las células en el cultivo en un estado viable. Ejemplos no limitantes de medios básicos disponibles en el mercado que pueden utilizarse de acuerdo con la invención comprenden Neurobasal™, KO-DMEM, DMEM, DMEM/F12, medio de cultivo de células madre Cellgro™, o X-Vivo™. El medio básico puede suplementarse con una diversidad de agentes conocidos en la técnica respecto a cultivos celulares. Lo siguiente es una referencia no limitante a diversos suplementos que pueden incluirse en el sistema de cultivo a usar de acuerdo con la presente descripción:

- medio que contiene suero o remplazo de suero, tal como, sin limitación, remplazo de suero knock out (KOSR), Nutridoma-CS, TCH™, N2, derivado N2, o B27 o una combinación;
- un componente de matriz extracelular (ECM), tal como, sin limitación, fibronectina, laminina y gelatina. La ECM puede entonces usarse para portar el uno o más miembros de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento;
- un agente antibacteriano, tal como, sin limitación, penicilina y estreptomicina;
- aminoácidos no esenciales (NEAA),
- neurotrofinas que son conocidas por desempeñar una tarea en la promoción de la supervivencia de SC en cultivo, tales como, sin limitación, BDNF, NT3, NT4.

Una vez las células se han promovido al destino RPE, las células RPE pueden extraerse/recogerse del cultivo por métodos conocidos, para su uso en diversas aplicaciones.

La presente descripción también proporciona células RPE obtenidas por 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 por el método de la invención.

Además de lo anterior, las células RPE producidas por la diferenciación dirigida de acuerdo con la presente descripción, tienen propiedades específicas en comparación con células RPE que se desarrollan durante la diferenciación espontánea.

- Las células en diferenciación tienen el potencial de responder a señalización por TGF β en su desarrollo y diferenciación.
- Las células RPE resultantes son células maduras (diferenciadas de forma terminal).
- Las células RPE maduras presentan pigmentación más oscura en comparación con células RPE formadas durante diferenciación espontánea.

- Las células RPE maduras expresan niveles significativamente mayores de transcritos 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 ha referencia, por ejemplo, a la Fig. 9J, 11M y 11K que muestran la expresión de bestrofina en diferenciación espontánea (sin NA) en comparación con la diferenciación en presencia de NA (Fig. 9J) y el efecto de aumento de la activina A sobre la diferenciación dirigida (Fig. 11K, 11M y 4E). Se hace referencia adicional a la Fig. 1B y 9I que muestran la expresión de RPE65 en diferenciación espontánea (sin NA) en comparación con la diferenciación en presencia de NA y adicionalmente en comparación con el efecto de aumento de la activina A en la Fig. 4D.

- En análisis por microscopía electrónica (EM) las células RPE presentan características morfológicas de células RPE auténticas maduras que no se muestran dentro de células tipo RPE que se obtuvieron de hSC de diferenciación espontánea tales como microvellosidades apicales, conexiones estrechas, y membrana basal.

Las células RPE producidas por el método de la presente descripción pueden usarse para cultivo a gran escala y/o largo plazo de dichas células. Para este fin, el método de la invención tiene que realizarse en biorreactores adecuados para producción a gran escala de células, y en que tienen que cultivarse hSC indiferenciadas de acuerdo con la invención. Las necesidades generales para el cultivo de células en biorreactores son bien conocidas para los especialistas en la técnica.

Como alternativa, las células RPE producidas por el método de la presente descripción pueden expandirse después de su derivación. Para la expansión, se disocian, se siembran en placa a baja densidad en una matriz extracelular, preferiblemente poli-D-lisina y laminina, y se cultivan en KOM sin suero con NA. En estas condiciones de cultivo, las células pigmentadas pierden la pigmentación y adquieren una morfología tipo fibroide. Después de cultivo prolongado y proliferación adicionales en cultivos de alta densidad, las células vuelven a adquirir la morfología de forma poligonal y pigmentación características de células RPE.

Las células RPE pueden expandirse en suspensión o en una monocapa. La expansión de las células RPE en cultivos de monocapa puede modificarse a expansión a gran escala en biorreactores por métodos bien conocidos para los especialistas en la técnica.

Los especialistas en la técnica apreciarían bien que la derivación de células RPE a partir de hSC es de gran beneficio. Pueden usarse como modelo *in vitro* para el desarrollo de nuevos fármacos para promover su supervivencia, regeneración y función. Las células RPE derivadas de hSC pueden servir para selección de alto rendimiento de compuestos que tengan un efecto tóxico o regenerador sobre células RPE. Pueden usarse para descubrir mecanismos, nuevos genes, factores solubles o unidos a membrana que sean importantes para el desarrollo, diferenciación, mantenimiento, supervivencia y función de células fotorreceptoras.

Las células RPE también pueden servir como fuente ilimitada de células RPE para el trasplante, reposición y soporte de células RPE que funcionan mal o degeneradas en degeneraciones de la retina. Además, las células RPE modificadas genéticamente pueden servir como vector para portar y expresar genes en el ojo y la retina después del trasplante.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente descripción se proporciona un método para trasplantar células RPE en el ojo de un sujeto, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un cultivo celular que comprende hSC;

(b) cultivar células en un sistema de cultivo que comprenden un medio básico suplementado con uno o más miembros de la superfamilia de TGF β mediante los cuales se promueve que las hSC se diferencien en células RPE;

(c) recoger las células RPE de dichos cultivo celular; y

(d) trasplantar dichas células RPE diferenciadas en el ojo de dicho sujeto.

La recolección de las células puede realizarse por diversos métodos conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes incluyen disección mecánica y disociación con papaína. También son aplicables otros métodos conocidos en la técnica.

Las células RPE derivadas de hSC pueden trasplantarse en diversos sitios diana dentro del ojo de un sujeto. De acuerdo con una realización, el trasplante de las células RPE es al espacio subretiniano del ojo, que es la localización anatómica normal del RPE (entre los segmentos externos fotorreceptores y la coroides). Además, dependiendo de la capacidad migradora y/o efectos paracrinos positivos de las células, puede considerarse el trasplante en compartimientos oculares adicionales incluyendo el espacio vítreo, la retina interna o externa, la periferia de la retina y dentro de la coroides

Además, el trasplante puede realizarse por diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen métodos para realizar trasplantes de RPE en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.962.027, 6.045.791, y 5.941.250 y en Eye Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Marzo 1997; 235(3):149-58; Biochem Biophys Res Commun Feb. 24, 2000; 268(3): 842-6; Ophthalmic Surg Febrero 1991; 22(2): 102-8. Se describen métodos para realizar trasplantes en la córnea en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.755.785, y en Eye 1995; 9 (Pt 6 Su):6-12; Curr Opin Ophthalmol Agosto 1992; 3 (4): 473-81; Ophthalmic Surg Lasers Abril 1998; 29 (4): 305-8; Ophthalmology Abril 2000; 107 (4): 719-24; y Jpn J Ophthalmol Noviembre-Diciembre 1999; 43(6): 502-8. Si tienen que utilizarse efectos principalmente paracrinos, también pueden suministrarse y mantenerse células al ojo encapsuladas dentro de un recipiente semi-permeable, que también disminuirá la exposición de las células al sistema inmune del hospedador (Neurotech USA CNTF delivery system; PNAS Marzo 7, 2006 vol. 103(10) 3896-3901).

De acuerdo con una realización, el trasplante se realiza mediante cirugía por vitrectomía pars plana seguida de suministro de las células a través de una pequeña abertura en la retina en el espacio sub-retiniano o por inyección directa. Como alternativa, las células pueden suministrarse al espacio subretiniano mediante aproximación trans-esclerótica, trans-coroidea. Además, puede realizarse inyección trans-esclerótica directa en el espacio vítreo o suministro a la periferia de la retina anterior en proximidad al cuerpo ciliar.

Las células RPE pueden trasplantarse de diversas formas. Por ejemplo, las células RPE pueden introducirse al sitio diana en forma de suspensión celular, o adheridas a una matriz, matriz extracelular o sustrato tal como un polímero biodegradable o una combinación. Las células RPE también pueden trasplantarse junto con (co-trasplante) otras células de la retina, tal como con fotorreceptores.

Por tanto, la invención también se refiere a una composición que comprende células RPE derivadas de hSC obtenidas por el método de la invención. La composición es preferiblemente adecuada para trasplante en el ojo.

Pueden tratarse o prevenirse diversas afecciones oculares mediante la introducción de las células RPE obtenidas por el método de la invención en el ojo de un sujeto. Las afecciones oculares pueden incluir enfermedades o trastornos de la retina generalmente asociados con disfunción de la retina, lesión de la retina, y/o pérdida de epitelio pigmentario de la retina. Una lista no limitante de afecciones que pueden tratarse de acuerdo con la invención comprende retinitis pigmentosa, amaurosis congénica de Leber, degeneración macular hereditaria o adquirida, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), enfermedad de Best, desprendimiento de la retina, atrofia girada, coroideremia, distrofia en patrón así como otras distrofias del RPE, enfermedad de Stargardt, daño en el RPE y la retina debido a daño causado por una cualquiera de lesión luminosa, láser, inflamatoria, infecciosa, radiación, neovascular o traumática.

Sin limitarse a teoría alguna, las células RPE trasplantadas pueden ejercer su efecto terapéutico a través de múltiples mecanismos. Un mecanismo es el efecto de soporte trófico que promueve la supervivencia de fotorreceptores u otras células en degeneración dentro de la retina. Las células RPE derivadas de hSC por los métodos de esta descripción y en presencia de un miembro de la superfamilia de TGF β son capaces de conservar los fotorreceptores adyacentes a las mismas potencialmente por un efecto trófico.

Las células RPE trasplantadas también pueden ejercer su efecto a través de un mecanismo de regeneración que repone las células RPE hospedadoras de mal funcionamiento y/o en degeneración. Las células RPE derivadas de hSC por los métodos de esta descripción y en presencia de un miembro de la superfamilia de TGF β pueden reponer el RPE hospedador de mal funcionamiento. Las células trasplantadas son maduras y tienen la capacidad funcional de fagocitosis de segmentos externos desprendidos de fotorreceptores que incluyen rodopsina.

Como se ha mencionado anteriormente, las células RPE derivadas de hSC por los métodos de esta descripción y en presencia de un miembro de la superfamilia de TGF β son maduras y por tanto no proliferan in vivo después del trasplante. Por lo tanto, las células RPE derivadas de hSC por los métodos de esta descripción son más seguras para terapia de trasplante y portan un riesgo reducido de desarrollo en tumores teratoma o tumores de células precursoras en proliferación.

Como se usa en este documento, el término "*tratar*" o "*tratamiento*" se refiere al efecto terapéutico así como profiláctico de las células RPE derivadas de hSC de la invención sobre la afección ocular de un sujeto, el efecto puede incluir generalmente, mejora de los síntomas asociados con las afecciones, disminución de la gravedad o cura de la afección, más específicamente, el efecto puede incluir reversión del daño causado a la retina y el RPE del sujeto tratado, función mejorada de la retina del sujeto, reconstrucción de la retina y el RPE del sujeto por remplazo y/o soporte de células retinianas y RPE hospedadoras defectuosas, directamente o mediante efectos paracrinos así como al efecto profiláctico que puede mostrarse mediante la atenuación, inhibición o cese en el daño causado a la retina del sujeto como resultado de la afección.

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas "*un*", "*una*" y "*el*", "*la*" incluyen referencias singulares así como plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "*un 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.

Como se usa en este documento, el término "o" significa uno o una combinación de dos o más de las elecciones enumeradas. Además, el uso de la expresión "seleccionado entre..." seguido de una lista de elecciones separadas por el "y" incluye una o una combinación de dos o más de las elecciones enumeradas.

5 Además, como se usa en este documento, el término "comprender" pretende indicar que los métodos o la composición incluyen los elementos recitados, pero no excluye otros. Asimismo, "que consiste esencialmente en" se usa para definir métodos y sistemas que incluyen los elementos recitados pero excluyen otros elementos que pueden tener importancia esencial en la funcionalidad de los sistemas de cultivo de la invención. Por ejemplo, un sistema de cultivo que consiste esencialmente en un medio básico, suplementos de medio y células de alimentación
10 no incluirá o incluirá cantidades solamente insignificantes (cantidades que tendrán un efecto insignificante sobre la propagación y diferenciación de células en el sistema de cultivo) de otras sustancias que tienen un efecto sobre células en un cultivo. Además, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en este documento no excluiría contaminantes traza procedentes del método de aislamiento y purificación. "Que consiste en" indicará que excluye cantidades más que traza de otros elementos. Las realizaciones definidas por cada uno de
15 estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Además, todos los valores numéricos, por ejemplo, concentración o dosis o intervalos de las mismas, son aproximaciones que varían (+) o (-) en hasta un 20%, a veces en hasta un 10%, de los valores indicados. Debe entenderse, incluso si no se indica siempre explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no se indique siempre explícitamente, que los reactivos descritos en este documento son simplemente ejemplares y que se conocen equivalentes de los mismos en la técnica.

25 EJEMPLOS DE REFERENCIA

25 Materiales y métodos

Cultivo celular HES

30 Se cultivaron ESC humanas (línea celular HES1) y hESC modificadas por ingeniería por vector lentiviral para expresar de forma constitutiva eGFP [Gropp M, Itsykson P, Singer O, Ben-Hur T, Reinhartz E, Galun E, y Reubinoff BE. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. Molecular Therapy 7:281-7 (2003)] sobre capas de alimentación de fibroblastos de prepucio humano en medio KO (KOM) que consiste en KO-DMEM al 86% (Gibco, Invitrogen, Gaithersburg, MD), KOSR al 14% (Gibco), glutamina 1 mM, aminoácidos no
35 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., Minneapolis, MN). Las células hES se pasaron semanalmente con colagenasa tipo IV (1 mg/ml; Gibco) y se sembraron en placa sobre una nueva capa de alimentación. Una semana antes de la inducción de la diferenciación, las células se pasaron por disociación a una suspensión casi de células individuales con PBS libre de Ca/Mg⁺⁺ suplementado con EDTA al 0,05% (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) y se volvieron a sembrar en
40 placa sobre las capas de alimentación.

Formación de EB en cultivo en suspensión

45 Seis-ocho días después de sembrar en placa las células hES que se habían disociado en células individuales como anteriormente; se retiraron de las capas de alimentación por tratamiento con colagenasa tipo IV. Los cúmulos se cultivaron durante diversos periodos de hasta 12 semanas en suspensión en placas bacteriológicas pre-recubiertas con agarosa de bajo punto de fusión al 0,1% en medio KO (KOM) que consiste en KO-DMEM al 86%, KOSR al 14%, glutamina 1 mM, aminoácidos no esenciales al 1%, 50 unidades/ml penicilina, y 50 µg/ml de estreptomicina, en presencia o ausencia de nicotinamida (NA) 10 mM (Sigma, St. Louis, MO, EEUU). En algunos experimentos, el
50 medio usado fue medio Neurobasal™ (Gibco) suplementado con suplemento N2 (1:100) (Gibco) (medio NN), que se sustituyó después de 1 semana con DMEM/F12 (Gibco) suplementado con B27 (1:50) (Gibco).

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

55 Se permitió que las ESC humanas se diferenciaron como grupos de flotación libre en KOM como anteriormente durante hasta seis semanas en presencia de nicotinamida (NA) 10 mM. Después de la primera semana o 2 semanas de diferenciación, los cultivos se suplementaron con activina A 20-180 ng/ml (PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ), con TGFβ3 (1 ng/ml; R&D Systems Inc, Minneapolis, MN) con TGFβ1 (1 ng/ml-20 ng/ml; R&D Systems Inc) o con SB431542 (5 µM-50 µM, Sigma). Los cultivos de control se suplementaron con NA solamente.
60

Las ESC humanas en suspensión en KOM también se suplementaron después de una semana con el antagonista de la proteína morfogenética ósea (BMP) noggina (700 ng/ml R&D Systems Inc, Minneapolis, MN) en presencia o ausencia de NA, o durante la 3ª y 4ª semanas con FGFβ (20 ng/ml PeproTech Inc) en presencia de NA y se permitió que se diferenciaron hasta una edad de 6 semanas como grupos de flotación libre en suspensión.
65

Descripción de expansión de las células RPE

Para expandir las células RPE, los grupos pigmentados se disociaron mecánicamente de forma suave en pequeños cúmulos y se sembraron en placa a baja densidad en poli-D-lisina ((30-70 kDa, 10 µg/ml) y laminina (4 µg/ml), y se cultivaron en KOM con NA. En estas condiciones de cultivo, las células pigmentadas perdieron la pigmentación y adquirieron una morfología tipo fibroide. Después de cultivo adicional durante 1,5 meses y proliferación en cultivos de alta densidad, las células volvieron a adquirir la morfología de forma poligonal y pigmentación características de células RPE.

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

Tinción inmunofluorescente indirecta de células diferenciadas dentro de grupos

Para caracterizar el inmunofenotipo de las células dentro de los agregados, los grupos cultivados durante 2, 4, 6 u 8 semanas se disociaron suavemente con tripsina al 0,04%/EDTA al 0,04% o con sistema de disociación con papaína (Worthington Biochemical Lakewood, NJ), y los pequeños cúmulos y células individuales resultantes se sembraron en placa en medio KO suplementado con NA en poli-D-lisina (30-70 kDa, 10-20 µg/ml) en solitario o suplementado con laminina (4 µg/ml) o fibronectina (10-20 µg/ml; todos de Sigma, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% después de 2 horas y se examinaron para la expresión de nestina (1:200), ácido polisialílico NCAM (PSA-NCAM) (1:100), Musashi (1:200; todos 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).

Para inmunotefir preparaciones enriquecidas de células pigmentadas, los grupos pigmentados (marrones) de células dentro de los cúmulos en flotación, que se habían diferenciado 8-10 semanas, se diseccionaron mecánicamente y se aislaron mediante micropipetas de vidrio o cuchillas de escalpelo (Nº 15; Swann-Morton Sheffield, Ing.).

Los grupos aislados que se enriquecieron para células pigmentadas se disociaron adicionalmente en cúmulos más pequeños mecánicamente mediante trituración con/sin la ayuda de digestión con tripsina (0,025%, EDTA 3 mM en PBS) o disociación con papaína (sistema de disociación con papaína; Worthington Biochemical Corporation Lakewood, Nueva Jersey). Los grupos pequeños de células se sembraron en placa en cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina (30-70 kDa, 10 µg/ml; Sigma) y recubiertos con laminina (4 µg/ml; Sigma) y se cultivaron durante 3-5 semanas adicionales en el medio de cultivo usado para el cultivo en suspensión de los grupos de hESC. Las células diferenciadas dentro del sobrecrecimiento se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para inmunotinción con anticuerpos anti-marcador intracelular, se permeabilizaron las membranas celulares con Triton X100 al 0,2% (Sigma) en PBS durante 30 minutos, se suplementaron con suero de cabra normal (5%, Biological Industries) para 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 (proporcionado amablemente por John C. Saari, University of Washington, Seattle; policlonal de conejo, 1:100). Las células también se incubaron con Faloidina (1:200 Sigma).

La localización del anticuerpo primario se realizó usando inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako Denmark A/S; 1:20-1:50), IgG de cabra anti-ratón conjugada con CyTH3 (1:500) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA), IgG de conejo anti-cabra conjugada con Cy2 (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc) e Ig de cerdo anti-conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako; 1:50).

Análisis de grupos de hESC por RT-PCR y PCR a tiempo real

Se extrajo el ARN total de las hESC cultivadas en condiciones sin suero (1 semana después del pase), y en momentos puntuales secuenciales hasta 8 semanas durante el cultivo de los grupos derivados de hESC en presencia o ausencia de nicotinamida 10 mM y con o sin suplementación con factores de crecimiento de la superfamilia de TGFβ o antagonistas. El ARN se aisló usando reactivo TRIzol (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>) o reactivo TRI (Sigma). La síntesis de ADNc se realizó usando 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>). Se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando protocolos convencionales con ADN Polimerasa Taq (Gibco-BRL). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 45 segundos. La cantidad de ciclos varió entre 18 y 40, dependiendo de la abundancia del ARNm particular. Las secuencias humanas cebadoras para identificar transcritos de genes humanos (directa e inversa 5'-3') y la longitud de los productos amplificados fueron las siguientes (SEC ID Nº 1-12):

MiTF-A (GAGCCATGCAGTCCGAAT, GACATGGCAAGCTCAGGACT; 486 pb);
 RPE65 (GCTGCTGGAAAGGATTTGAG, CAGGCTCCAGCCAGATAGTC; 231 pb);
 Bestrofina (GAATTTGCAGGTGTCCCTGT, ATCCTCCTCGTCCTCTGAT; 214 pb);
 CRALBP (AGCTGCTGGAGAATGAGGAA, CAAGAAGGGCTTGACCACAT; 218 pb)
 5 MERTK (AAGTGATGTGTGGGCATTTG, TCTAAGGGATCGGTTCTCCA, 189 pb);
 ACTRIA (AATGTTGCCGTGAAGATCTTC, CTGAGAACCATCTGTTGGTA; 699 pb);
 ACTRIB (CACGTGTGAGACAGATGGG, GGCGTTGTGATAGACACG; 346 pb);
 ACTRIIA (AACCATGGCTAGAGATTGGC, CTTTCACCTACACATCCAGCTG; 551 pb);
 ACTRIIB (CACCATCGAGCTCGTGAAG, GAGCCCTTGTCATGGAAGG; 611 pb);
 10 Activina A (CTTGAAGAAGAGACCCGAT; CTTCTGCACGCTCCACCAC; 262 pb);
 β -actina (TTCACCACCACGGCCGAGC, TCTCCTTCTGCATCCTGTGCG; 351 pb);
 GAPDH (AGCCACATCGCTCAGACACC; GTACTIONCAGCGCCAGCATCG; 301 pb).

Para PCR a tiempo real se controlaron los niveles de transcritos usando cebadores y sondas TaqMan que se
 15 obtuvieron de los TaqMan[®] Assays-on-Demand Gene Expression Products disponibles en el mercado (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
 20 PCR cuantitativa se realizó usando sistemas de detección de secuencia ABI Prism 7000HT y ABI Prism 7900HT y
 mezcla maestra de PCR universal TaqMan[®] (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se
 seleccionó el gen constitutivo de β -glucuronidasa (GusB, ensayo ID Hs99999908) como referencia interna para la
 normalización en el análisis de cuantificación por RT-PCR a tiempo real y se muestra el nivel de expresión relativa
 de cada gen como un valor relativo cuando el nivel de expresión del día 0 (o células no tratadas) se estableció en 1.
 Se realizaron reacciones de amplificación por duplicado o triplicado de acuerdo con el protocolo del fabricante
 25 (Applied Biosystems).

Microscopía electrónica de transmisión y fagocitosis de perlas de látex

Se cultivaron grupos derivados de ESC humanas en suspensión en KOM. Las áreas pigmentadas después se
 30 separaron mecánicamente y se procesaron para microscopía electrónica de transmisión. Las células se fijaron con
 glutaraldehído al 2% y formaldehído al 4% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Después de tres lavados en tampón
 cacodilato 0,1 M el tejido se post-fijó con tetróxido de osmio al 1% y ferricianuro de potasio al 1,5%, se deshidrató
 con concentraciones crecientes de etanol y se incrustó en resina de Agar 100. Se tiñeron secciones ultra-delgadas
 35 cortadas por un LKB ultratome 3 con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se tomaron micrografías con microscopio
 electrónico Tecnai 12 (Phillips, Eindhoven, Países Bajos <http://www.philips.com>) equipado con una cámara CCD
 Megaview II y un software Analysis versión 3.0 (Soft Imaging System, <http://www.soft-imaging.net>).

Para examinar la capacidad fagocítica, los grupos pigmentados se incubaron con perlas de látex de 1 μ m
 40 (Polysciences Inc., Warrington, PA) a una concentración de $1,0 \times 10^9$ perlas/ml durante 18 horas a 37°C. Los grupos
 pigmentados después se lavaron con PBS+, se disociaron en células individuales o cúmulos pequeños usando
 sistema de disociación con papaína y se sembraron en placa en poli-D-lisina. Después de la fijación, las membranas
 de las células se tiñeron con colorante fluorescente rojo, PKH (Sigma). La fagocitosis se analizó usando microscopio
 confocal (Olympus Fluoview FV1000)

Citometría de flujo

El análisis citométrico de flujo se realizó para determinar la cantidad de células PSA-NCAM y TRA-1-60 positivas en
 diferentes momentos puntuales dentro de los grupos derivados de hESC que se diferencian con o sin
 50 suplementación con nicotinamida. Los grupos se disociaron con Tripsina al 0,04%/EDTA al 0,04%. Las células
 individuales después se tiñeron con anticuerpos anti-PSA-NCAM o anti-Tra-1-60 (ambos de Chemicon; 1:100), se
 detectaron con inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con FITC (Dako; 1:100), y se tiñeron con contraste
 con el colorante de viabilidad celular yoduro de propidio (0,005 mg/ml; Sigma). Las células de control se incubaron
 solamente con un anticuerpo secundario. Se analizó la inmunoreactividad asociada a células con FACScalibur
 55 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), usando software CellQuest.

Trasplante intravítreo y subretiniano de células RPE diferenciadas derivadas de hESC

Para el trasplante intra-ocular, se usaron hESC modificadas por ingeniería para expresar eGFP [como se ha descrito
 60 previamente en Gropp et al., Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors.
 Molecular Therapy 2003; 7: 281-7] para generar células RPE en cultivo como se ha descrito anteriormente. En
 resumen, se aislaron mecánicamente grupos enriquecidos con células pigmentadas por disección después de
 diferenciación durante 6-8 semanas en presencia de NA solamente 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
 65 adicionalmente en grupos más pequeños de células por digestión con Papaína (sistema de disociación con papaína;
 Worthington Biochemical Corporation Lakewood, Nueva Jersey) a 37°C durante 30 minutos, seguido de trituración.

Se usaron quince ratas albinas adultas (peso corporal 230-250 g) y más de 100 ratas RCS distróficas exogámicas de 1-3 semanas para trasplante intraocular. En ratas RCS, una mutación en el gen MerTK causa disfunción del RPE que conduce a degeneración de la retina durante los primeros pocos meses de vida. Todos los experimentos en animales se realizaron de acuerdo con el ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, y se aprobaron por el Institutional Committee for Animal Research of the Hebrew University-Hadassah Medical School.

Para el trasplante (así como para los registros electroretinográficos) los animales se anestesiaron con Ketamina HCl (Ketalar, Parke Davis, RU; 100 mg/kg), inyectada por vía intra-peritoneal en combinación con el agente relajante Xilazina (2,0 mg/kg). Se administraron gotas anestésicas locales (Benoxinato HCl al 0,4%; Fischer Pharmaceuticals, Israel). Las pupilas se dilataron con Tropicamida al 0,5% (Midramida, Fisher Pharmaceuticals, Israel) y Fenilefrina HCl al 2,5% (Fisher Pharmaceuticals, Israel). Bajo visualización de un microscopio de disección (Stemi SV 11, Zeiss, Alemania), se inyectaron aproximadamente 100.000 células en 4 μ l de medio en el vítreo o en el espacio subretiniano mediante aproximación transesclerótica, transcoroidea a través de un capilar de vidrio acoplado a un Pico-inyector neumático (PLI-100; Medical System Corp., Greenvale, NY, <http://www.medicalsystems.com>). Los ojos no inyectados contralaterales sirvieron como un tipo de control. Como control adicional, se inyectaron ojos con solución salina (inyección de cloruro sódico BP, 0,9%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania).

Durante y después de la inyección, no se observó sangrado de la coroides. Los animales se mantuvieron calientes durante todo el procedimiento y después del mismo usando una lámpara de calor. Después del trasplante, todos los animales recibieron el agente inmunosupresor ciclosporina A (Sandimmune, Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza) en su agua para beber a una concentración de 210 mg/l.

Imágenes in-vivo y ex-vivo de células trasplantadas

Para controlar la supervivencia y localización de las células trasplantadas in-vivo, se tomaron imágenes de los animales anestesiados usando una cámara de fondo de color (Zeiss, Alemania) y se detectó la fluorescencia de las células que expresan GFP usando filtros de fluoresceína en un oftalmoscopio láser de barrido (Heidelberg HRA, Alemania). En algunos ojos, también se determinó la localización de los injertos GFP-positivos ex-vivo en preparaciones de copa óptica usando un microscopio fluorescente (Canon, Japón).

Avaluación de la función de la retina hospedadora después de trasplante intra-ocular de células RPE derivadas de hESC

De cuatro a seis semanas después del trasplante, se evaluó la función de la retina en ojos trasplantados y de control de rata RCS por electroretinografía (ERG). Se registraron ERG de campo completo después de adaptación a la oscuridad durante una noche. Los animales se anestesiaron con Ketamina y Xilazina en luz roja atenuada, y las pupilas se dilataron con tropicamida y fenilefrina. Se colocaron electrodos de lentes monopares para ERG de rata (Medical Workshop, Amsterdam, Países Bajos) en cada ojo después de anestesia tópica adicional, con un electrodo de referencia y un electrodo de tierra colocados en la lengua y la cola respectivamente. Se usó un sistema ERG computerizado comercial (LKC technologies, UTAS 3000) para registrar respuestas de la retina a estímulos de campo completo generados usando un flash fotoestroboscópico de Xenón (Grass, PS-22) montado en una cubeta Ganzfeld. Se usaron flashes azules atenuados en condiciones escotópicas para provocar una respuesta en gran medida dirigida por los bastones. A intensidades mayores de estímulo de azul, y con flashes blancos en el estado adaptado a la oscuridad, se registraron respuestas mixtas de conos-bastones. En condiciones adaptadas a la luz (fólicas), con flashes blancos en un fondo blanco de 34 cd/m^2 de supresión de bastones, se generaron respuestas de conos de 1 Hz y 16 Hz. Las señales se filtraron entre 0,3-500 Hz, y se promediaron las señales.

Evaluación histológica e inmunohistoquímica de ojos trasplantados

Los animales se sacrificaron 4-8 semanas después del trasplante y los ojos se enuclearon para el examen histológico e inmunohistoquímico. Después de la fijación en solución de Davidson, los ojos se incrustaron en parafina y se seccionaron en secciones en serie de 4 μ m serial. Cada quinto portaobjetos se tiñó con hematoxilina y eosina para evaluación y cuantificación histomorfológica. Para estudios de inmunofluorescencia indirecta, para caracterizar el estado de diferenciación de las células trasplantadas, las muestras se desparafinizaron en xileno y se deshidrataron en alcoholes graduados, se aclararon con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4), y se incubaron con tampón citrato 10 mM (pH 6,0) a 110°C durante 4 minutos. Después de lavar con PBS, las muestras se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de PBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 1%, Triton X100 al 0,1% (Sigma-Aldrich), y suero normal de cabra o normal de burro al 3%. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 hora en una cámara humidificada con combinaciones apropiadas de los siguientes anticuerpos primarios: anti-proteína fluorescente verde (anti-GFP), conjugado 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; policlonal de conejo, 1:100); y anti-rodopsina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA; policlonal de conejo, 1:100). La localización del anticuerpo primario se realizó después de lavar en PBS usando IgG de cabra anti-conejo conjugada con CyTM2 (1:200), IgG de carpa anti-ratón conjugada con CyTM2 (1:200), IgG de cabra anti-conejo conjugada con CyTM3 (1:200), IgG de burro anti-ratón

conjugada con CyTM2 (1:200), IgG de burro anti-conejo conjugada con CyTM5 (1:200; todos de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA). Los núcleos se tiñeron con contraste con medio de montaje que contenía 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) o con yoduro de propidio 1 µg/ml (BioLegend, San Diego, CA). Para determinar la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, se realizaron controles negativos correspondientes con un anticuerpo irrelevante de isotipo coincidente. Se usó un microscopio Olympus BX41 equipado con una cámara digital DP70 (Olympus, Japón) para imágenes de microscopía fluorescente y óptica. Se recogieron imágenes confocales en un microscopio confocal Olympus Fluoview 300 (FV300) (Olympus, Japón) construido alrededor de un microscopio invertido IX70. Se usaron láseres 488-nm Ar, 543 HeNe-Verde, y 633 HeNe Rojo en combinación con óptica Nomarski.

Cuantificación del rescate de la capa fotorreceptora en las cercanías de injertos de RPE

Para cuantificar el efecto del trasplante de RPE derivado de hESC sobre la retina hospedadora en degeneración, se obtuvieron imágenes microscópicas de alta resolución de secciones teñidas con hematoxilina y eosina y montajes de la longitud completa de la retina construidos usando software Photoshop (Adobe, EEUU). El grosor total de la retina, el grosor de la capa nuclear externa (fotorreceptora) así como el grosor de la capa de segmentos internos y externos se midieron en las proximidades de los injertos subretinianos de células RPE derivadas de hESC usando el programa J-image (NIH). Éstos se compararon con las mediciones obtenidas en el correspondiente lado opuesto de la retina, distante del injerto. Como el proceso degenerativo en ratas RCS es dependiente de la localización, se midió el grosor en áreas que estaban a igual distancia del cuerpo ciliar. En cada área, se promediaron al menos tres mediciones equitativamente espaciadas.

Resultados

Caracterización de RPE diferenciados

La diferenciación de hESC se indujo cultivándolas como grupos de flotación libre en medio KO suplementado con NA. En estas condiciones de cultivo se desarrollaron áreas definidas altamente enriquecidas para células pigmentadas dentro de los grupos en diferenciación, como se muestra en la Fig. 3A. Estas áreas pigmentadas aparecieron después de 4 semanas de diferenciación y después de 8 semanas el 72,9 ± 2,5% de los grupos tenían áreas pigmentadas. No se observaron áreas pigmentadas después de 4 semanas de diferenciación en ausencia de suplementación con NA, y en estas condiciones solamente el 13,1 ± 4,8% desarrollaron áreas pigmentadas después de 8 semanas (Fig. 8A, y 8B). Por tanto, el tratamiento con NA aumentó/promovió la diferenciación dentro de grupos de hESC en células pigmentadas en comparación con grupos de hESC de diferenciación espontánea.

Dentro de los grupos que se diferenciaron 8 semanas en presencia de NIC, el 5,7 ± 1,0% de las células estaban pigmentadas, el 5,4 ± 1,1% expresaban el marcador de RPE prematuro MiTF y en la mayoría de los casos la expresión de MiTF se correlacionaba con la pigmentación (Fig. 8C). Los grupos de hESC diferenciadas parcialmente disociadas y sembradas en placa se desarrollaron, entre otros tipos de células diferenciadas, en colonias compuestas de monocapas de células pigmentadas, como se muestra por una micrografía de campo oscuro (Fig. 3D) y una imagen de contraste de fase (Fig. 3E). Las células dentro de estas colonias asumieron una forma poligonal y formaron láminas de tipo "adoquín" de células con conexiones estrechas entre ellas (Fig. 3E), propiedades que son altamente características de células RPE nativas. La distribución de F-actina dentro de las células estaba adyacente a sus membranas, como células RPE auténticas, como se demuestra por tinción con Faloidina (Figura 10A). Las células RPE pigmentadas co-expresaban los marcadores de 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).

Después de disociación, siembra en placa a baja densidad y cultivo, las células pigmentadas perdieron la pigmentación y adquirieron una morfología tipo fibroide, como se muestra por las imágenes de contraste de fase (Fig. 3K, y 10B). Después de cultivo prolongado y proliferación adicionales en cultivos de alta densidad, las células volvieron a adquirir la morfología de forma poligonal y la pigmentación de células RPE (Fig. 3L, y 10C).

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

Una de las funciones más importantes de las células RPE es la fagocitosis de segmentos externos desprendidos de 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 trozos del eje z en serie (Fig. 10H-10J). El análisis de microscopía confocal demostró que las células RPE putativas tenían capacidad de fagocitosis de las perlas fluorescentes (Fig. 10G-10J).

Efecto inductor de la diferenciación de nicotinamida

Se examinó la diferenciación de hESC hacia un destino RPE cultivándolas como grupos de flotación libre en KOM con o sin NA (sin proporcionar grupos en diferenciación espontánea como controles). Después de 6 semanas de diferenciación, el nivel de expresión de los marcadores de células RPE, MiTF-A y RPE65, se potenciaba significativamente en presencia de NA, determinado por RT-PCR a tiempo real (Fig. 1A, y 1B; respectivamente). La expresión de MiTF-A aumentó casi dos veces en presencia de NA, mientras que la expresión de RPE65 aumentó casi 30 veces. Como la mayoría de las células pigmentadas co-expresaban MiTF-A (Fig. 8C), pareció que en presencia de NA había aumento significativo y prominente al nivel de expresión de RPE65 por célula pigmentada. Por tanto, además de su efecto inductor hacia el destino RPE, NA también promovía la maduración de las células RPE y tenía un efecto sobre el fenotipo de las células. El análisis por Q-PCR en momentos puntuales secuenciales 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 estaba regulada positivamente después de cuatro semanas de diferenciación, y los niveles de expresión siguieron aumentando durante las siguientes cuatro semanas (dos semanas finales no mostradas). Se demostró una expresión aumentada similar de los marcadores de RPE Bestrofina, CRALBP y Mertk por análisis por RT-PCR de células en grupos pigmentados sembrados en placa (Fig. 1E).

Para descubrir si el desarrollo de células RPE *in vitro* recapitula las etapas clave del desarrollo de RPE *in vivo*, se realizaron experimentos de trayectoria temporal incluyendo análisis de la expresión dentro de los grupos de hESC de marcadores clave durante el desarrollo del RPE. Se analizaron grupos que se diferenciaban en presencia o ausencia de NA por PCR a tiempo real para la expresión de marcadores de hESC indiferenciadas, diferenciación neural prematura, desarrollo de la retina y RPE (Fig. 9A-9L). Primero se demostró que la expresión de Oct4 (Fig. 9A), un marcador de hESC indiferenciadas, disminuía más rápidamente durante la diferenciación en presencia de NA. Por consiguiente, en análisis FACS demostró que la expresión de TRA-1-60, un marcador superficial de membrana de células indiferenciadas, también disminuía más rápidamente en muestras tratadas con NA (Fig. 9M). Por tanto, puede usarse la diferenciación en presencia de NA para eliminar células indiferenciadas del cultivo y puede ayudar a evitar la formación de tumor teratoma después del trasplante.

Además, el tratamiento con NA potenciaba el proceso de diferenciación neural prematura. En presencia de NA, la expresión de transcritos de los marcadores neurales prematuros Otx2 (Fig. 9B), Pax6 (Fig. 9D) y Musashi (Fig. 9C) aumentaba significativamente después de 2, 2-6 y 4-6 semanas de diferenciación, respectivamente. Se demostraron resultados similares a nivel de proteínas por análisis FACS de la expresión de PSA-NCAM, un marcador de precursores neurales (Fig. 9O). Después de 4 semanas de diferenciación con NA, el $81,4 \pm 6,3\%$ de las células expresaban PSA-NCAM en comparación con el $14,4 \pm 5,9$ en grupos de control. La tinción de inmunofluorescencia indirecta confirmó que a las 4 semanas, la mayoría de las células dentro de los grupos tratados con NA adquirían un fenotipo neural y expresaban PSA-NCAM ($74,2 \pm 4,1\%$), nestina ($55,9 \pm 10,1\%$), y Musashi ($71,4\%$; Fig. 9N).

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

En presencia de NA, la expresión de transcritos del marcador de RPE prematuro, MiTF A se indujo después de 4 semanas de diferenciación (Fig. 9H). La expresión de marcadores de RPE más maduro, Bestrofina y RPE65 estaba principalmente regulada positivamente después de 4 y 8 semanas, respectivamente (Fig. 9J y 9I, respectivamente). La expresión de estos transcritos también era mayor en cultivos tratados con NA en comparación con grupos de hESC de diferenciación espontánea como controles (Fig. 9I, y 9J). La expresión de RPE65 se aumentó en más de 100 veces, lo que confirma adicionalmente que además del efecto inductor, NA también tenía un efecto sobre el fenotipo de las células. Para descartar que las células pigmentadas que se obtuvieron no fueran melanocitos derivados de la cresta neural, se demostró que la expresión de Sox10, que es un marcador del desarrollo de estas células, estaba baja en comparación con células de control de la línea celular de melanoma M51 y no era dependiente de la suplementación con NA. Por tanto, los cultivos no estaban compuestos de melanocitos. Por tanto, se concluyó que NA promueve la inducción de diferenciación hacia un destino RPE.

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

En resumen, los inventores concluyeron que el proceso de diferenciación en RPE dentro de los grupos de hESC procedía a través de etapas similares al desarrollo del RPE auténtico *in vivo* y se aumentaba por NA. Además, la NA tenía un efecto sobre el fenotipo de las células RPE que se obtuvieron. Estas células eran diferentes de las células RPE que se obtiene después de diferenciación espontánea y expresaban marcadores de células RPE maduras a niveles mayores significativos.

NA muestra un efecto inductor independientemente del medio de cultivo

La suplementación con NA aumentó la pigmentación en células diferenciadas cultivadas tanto en medio KO como en medio NN/DMEM durante 12 semanas, como se muestra en micrografías de campo oscuro de grupos de hESC en diferenciación (Fig. 2A-2D). En medio NN que se reemplazó adicionalmente después de una semana por DMEM/F12-

B27 (NN/DMEM), en comparación con medio KO, en presencia de NA, el porcentaje de grupos de hESC pigmentadas respecto a la cantidad total de grupos era mayor, aunque su tamaño y cantidades totales de población relativas a los grupos cultivados en medio KO eran más pequeños. El análisis por RT-PCR mostró que la suplementación con NA potenciaba 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 estaba aproximadamente duplicada en KOM, y aumentada casi 6 veces en medio NN/DMEM, con suplementación de NA frente a sin NA (Fig. 2F). Por tanto, el efecto inductor de la diferenciación de NA se muestra en células RPE diferenciadas independientemente del medio en que se cultivan las hESC y sucede la diferenciación.

10 *El efecto de miembros de la superfamilia de TGF β sobre la diferenciación de SC*

Primero se analizó la expresión de receptores de activina así como activina A en grupos de 2 semanas de edad. El análisis se realizó en este momento puntual ya que la expresión de marcadores de campo ocular prematuro está surgiendo en este momento y por lo tanto las células en diferenciación están probablemente en una fase de desarrollo paralela a la vesícula óptica prematura. Se demostró que la expresión de los receptores ACTRIB y ACTRIIB era elevada en presencia de NA en comparación con la ausencia o expresión minoritaria cuando las células se diferenciaban sin NA (Fig. 11G). Por tanto la NA tuvo un efecto sobre el fenotipo de células en que se diferencian en su presencia.

Se descubrió que la activina A aumentaba la diferenciación hacia el destino RPE. Micrografías de campo oscuro de grupos derivados de hESC que se diferencian durante 4 semanas mostraron la aparición de células pigmentadas en esta fase prematura en presencia de activina (Fig. 11A) Se demostró adicionalmente que en presencia de NA, la activina A aumentaba significativamente la diferenciación de hESC hacia células RPE (Fig. 4A-4B, y 11B-11C). El porcentaje de grupos que incluían células pigmentadas ($50,7 \pm 6,5$ frente a $17,7 \pm 3,2$), así como el porcentaje de células pigmentadas respecto a la cantidad total de células ($9,9 \pm 1,4$ frente a $2,4 \pm 1,2$), era significativamente mayor cuando la diferenciación se inducía 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 RT-PCR, que mostró que el tratamiento con activina A aumentaba 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 para células RPE maduras. Además, las características morfológicas de grupos de células pigmentadas que se desarrollaron en presencia de activina A eran diferentes. Su pigmentación era más oscura y presentaban una demarcación muy clara respecto a las células no pigmentadas adyacentes (Fig. 4B). La expresión de MiTF-A, un marcador que aparece antes durante el desarrollo del RPE no se veía afectada por la suplementación con activina A. Por tanto, la activina A, que es un miembro de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento, aumenta la diferenciación de hESC en células RPE. La suplementación del inhibidor de activina, SB431542, disminuyó significativamente la aparición de grupos pigmentados en estas condiciones (Fig. 11E, y 11H). El efecto de activina A sobre la diferenciación en RPE se estudió a diversas concentraciones. Se descubrió que el efecto era dependiente de la dosis con un efecto óptimo de aumento a 140 ng/ml sobre el porcentaje de células pigmentadas y la expresión de marcadores de RPE, Bestrofina (Fig. 11K) y RPE65 (Fig. 11L). En la mayoría de los experimentos la activina A se suplementaba durante dos semanas (semanas 3-4) después de que los grupos se hubieran diferenciado ya durante 2 semanas, ya que se descubrió que la aplicación en este periodo de tiempo era óptima para potenciar la diferenciación en RPE. Dada la observación de que la expresión de marcadores de desarrollo ocular prematuro también comenzaba después de 2 semanas de diferenciación (Fig. 9A-9L), pareció que la activina aumentaba el proceso de desarrollo del ojo y el RPE. Además, ya que el porcentaje de células pigmentadas aumentaba en 5-6 veces en presencia de activina A, mientras que la expresión de marcadores de células RPE maduras tales como bestrofina aumentaba en aproximadamente 10 veces, parece que la activina A tenía un efecto sobre la madurez y fenotipo de las células además de su efecto inductor. Esto estuvo apoyado por el aspecto morfológico de las células pigmentadas que se obtuvieron en presencia de activina A que eran más oscuras y con demarcación aguda respecto a las células adyacentes.

El análisis de trayectoria temporal por Q-PCR del efecto de 2 semanas de tratamiento con activina A sobre la expresión génica demostró que la activina A aumentaba significativamente la expresión de los marcadores de progenitor retinianos Rx1 y Chx10 así como el marcador de RPE Bestrofina. A las 4 semanas de diferenciación el tratamiento con activina A también aumentaba el nivel de expresión de las isoformas MiTF totales (Fig. 11M-11P).

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

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 en RPE de hESC. Como se muestra en

micrografías de campo oscuro, en presencia del antagonista de BMP noggina, la diferenciación de grupos de hESC en células RPE pigmentadas estaba bloqueada (Fig. 5D). La diferenciación en células pigmentadas se bloqueaba con suplementación de noggina incluso cuando el medio también estaba suplementado con NA (Fig. 5C). A nivel de ARN, la RT-PCR a tiempo real demostró que la noggina reducía significativamente la expresión de MiTF-A tanto en presencia como en ausencia de NA en el medio de cultivo (Fig. 5E). Por tanto, las BMP desempeñan un papel en la inducción de la diferenciación de hESC en células RPE.

Pueden usarse células RPE diferenciadas derivadas de hESC para trasplante intraocular

Inicialmente se trasplantaron poblaciones enriquecidas de células RPE derivadas de hESC modificadas por ingeniería para expresar eGFP en el vítreo y el espacio subretiniano de ratas albinas, para facilitar la localización de las células pigmentadas. Después del trasplante intraocular, las células pigmentadas trasplantadas podían identificarse fácilmente *in vivo* (Fig. 6A y 6B). Después de la enucleación del ojo mostrado en la Fig. 6B, la retirada de la córnea y el cristalino y el aislamiento de la retina, la retina mostró el injerto principal así como células pigmentadas dispersas adicionales (Fig. 6C). En secciones histológicas, estaban presentes injertos que incluían células trasplantadas pigmentadas viables que también expresaban GFP (Fig. 6D - 6G). Las células trasplantadas podían encontrarse en el espacio vítreo, en la retina, a lo largo de la vía de inyección, y también en el espacio subretiniano (Fig. 6H, 6I, 6O, 6P). Las células RPE trasplantadas también migraron desde los injertos subretinianos y se integraron dentro de la capa RPE de las ratas hospedadoras (Fig. 6J). En los injertos, se formaron conexiones estrechas, que son características de células RPE, como se muestra por la expresión del marcador de conexión estrecha ZO-1 en células eGFP-positivas trasplantadas (Fig. 6K-6N). Las células dentro de los injertos también mantuvieron la expresión de RPE65, Bestrofina, y MiTF-A.

Las células RPE derivadas de hESC sobreviven, se integran y mantienen características de RPE diferenciado después del trasplante en el espacio subretiniano de ratas RCS

La parte principal de los experimentos de trasplante se realizó en ratas RCS que manifiestan una degeneración del RPE y la retina causada por una mutación en el gen *merlk*, en un intento por examinar si el suministro de células RPE derivadas de hESC puede modular el curso de la enfermedad.

Las células pigmentadas trasplantadas podían identificarse fácilmente *in-vivo* en los ojos de ratas RCS usando sistemas de imágenes de fondo convencionales (Fig. 12A-12C). Puede observarse que las células derivadas de hESC, que expresan GFP emiten fluorescencia cuando se usan filtros de excitación y emisión de fluoresceína (Fig. 12C). En preparaciones de copa óptica plasmadas en imágenes *ex-vivo* en un microscopio de fluorescencia (Fig. 12D-12E), pueden observarse grupos grandes de células GFP-positivas subretinianas (Fig. 12D) así como múltiples grupos más pequeños dispersos (Fig. 12E).

La evaluación histológica e inmunohistoquímica confirmó las observaciones macroscópicas *in-vivo* y *ex-vivo*. Las células trasplantadas sobrevivían y se integraban en el espacio subretiniano, y mantenían la expresión de proteínas que caracterizan y a menudo son específicas de RPE maduro (Fig. 13 y 14). Es importante observar que no había inflamación o reacción inmune significativa presente, y no se observaron tumores o teratomas en más de 100 ojos trasplantados. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina (Fig. 13A y 13B) muestran la localización subretiniana y ocasionalmente *intra-retiniana* de células pigmentadas derivadas de hESC trasplantadas, que aparecían en grupos o como células aisladas (flechas). La inmunotinción con GFP (Fig. 13C-13F) confirmó que las células son de hecho derivadas de hESC. Los injertos eran a menudo bastante grandes y dispersos (Fig. 13C, y 13E), y se observaron claramente células pigmentadas que co-expresaban GFP (Fig. 13D, y 13F).

La inmunotinción reveló que grandes cantidades de células trasplantadas dentro de injertos expresan proteínas que caracterizan 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 conexiones estrechas (Fig. 14K-14O), que es una función importante de las células RPE y esencial para mantener la barrera hemato-retiniana. El panel más a la izquierda en cada fila muestra una imagen fluorescente a bajo aumento de injertos que co-expresan GFP y el marcador relevante. Las imágenes confocales a gran aumento en cada fila muestran el pigmento (por óptica Nomarski) así como la co-expresión de GFP y los diferentes marcadores a nivel de célula individual.

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

En el modelo de rata RCS de degeneración de la retina, la función de la retina está habitualmente alterada de forma severa a los 2-3 meses de edad. Estructuralmente, sucede la correspondiente pérdida y adelgazamiento de la capa nuclear externa de la retina (ONL) y a menudo se reduce a menos de 1-2 filas de núcleos fotorreceptores a esta edad. En ojos trasplantados con células RPE derivadas de hESC, los registros electrorretinográficos revelaron conservación relativa significativa de la función de la retina en comparación con ojos de control no tratados o inyectados con medio (Fig. 7 y Fig. 15).

Se muestran respuestas ERG representativas a una serie de flashes blancos de intensidad creciente en el estado adaptado a la oscuridad (DA) en un ojo trasplantado (Fig. 15A) frente a su ojo de control contralateral (Fig. 15B). La Fig. 15C muestra las marcadas diferencias en las amplitudes medias entre ojos trasplantados y los diferentes grupos de ojos de control. A la mayor intensidad, la amplitud de onda b DA media en ojos trasplantados con RPE fue $283,3 \pm 37,5$ (media \pm ETM; n=13) frente a $158,5 \pm 18,1$ en ojos de control no tratados contralaterales (n=13, $p < 0,01$) y $89,9 \pm 14,4$ en ojos inyectados con medio (n=5, $p < 0,01$). Es importante observar que hay una tendencia hacia una mejor conservación de la función de la retina después del trasplante de células RPE tratadas con Activina-A (Fig. 15) en comparación con el efecto de rescate conseguido después del trasplante de células RPE derivadas sin activina-A (Fig. 7).

La evaluación cualitativa así como cuantitativa de la estructura de la retina corroboró los hallazgos funcionales (Fig. 16). Se observó conservación relativa de la capa fotorreceptora (ONL) y de los segmentos fotorreceptores internos y externos (IS+OS) en proximidad a los injertos RPE sub-retinianos en comparación con áreas distantes de los injertos (dos ejemplos mostrados en la Fig. 16A, 16B). El grosor total de la retina (Fig. 16C) así como el grosor de ONL e IS+OS (Fig. 16D) está significativamente aumentado en las cercanías a injertos RPE derivados de hESC (barras negras, media \pm ETM, n=7) en comparación con áreas distantes de los injertos (barras grises). Este tipo de rescate estructural se observó solamente en proximidad a injertos sub-retinianos e intra-retinianos profundos, y no cuando los injertos eran exclusivamente intra-vítreos (no mostrado).

Células RPE derivadas de hESC, tratadas con Activina-A trasplantadas captan rodopsina in-vivo

Una de las funciones clave del RPE sano es la captación y reciclaje de los segmentos externos desprendidos de los fotorreceptores, como parte del proceso de renovación del fotorreceptor. Imágenes confocales de células RPE trasplantadas subretinianas muestran la co-localización de pigmento, GFP, RPE65 y rodopsina dentro de las mismas células individuales. Esto sugirió que las células trasplantadas tienen el fenotipo de RPE maduro y son capaces de realizar la captación de segmentos externos desprendidos (que contienen rodopsina). Obsérvese 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).

Los resultados anteriores por tanto proporcionan evidencias de que las células RPE derivadas de hSC obtenidas por cultivo en un sistema de cultivo que comprende un miembro de la superfamilia de TGF β y preferiblemente en presencia de NA pueden utilizarse in vivo para trasplante para proporcionar células RPE funcionales de forma esencialmente completa en el ojo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hadasit Medical Research Services & Development Limited

<120> Células del epitelio pigmentario de la retina derivadas de células madre

<130> F-20553/EP-SSP

<140> 08738258.6

<141> 27-04-2008

<150> US 60/907.818

<151> 18-04- 2007

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 38

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

gagccatgca gtccgaatga catggcaagc tcaggact 38

<210> 2

<211> 40

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 530 370 T3

gctgctggaa aggattgag caggctccag ccagatagtc 40

<210> 3
 <211> 40
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3
 gaattgcag gtgtccctgt atcctcctcg tcctcctgat 40

10 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 4
 agctgctgga gaatgaggaa caagaagggc ttgaccacat 40

20 <210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 5
 aagtgatgtg tgggcatttg tctaagggat cggttctcca 40

30 <210> 6
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6
 aatgttgccg tgaagatctt cctgagaacc atctgtggg ta 42

35 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 7
 cacgtgtgag acagatgggg gcggttgta tagacacg 38

45 <210> 8
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8
 aaccatggct agaggattgg ctttcacct acacatccag ctg 43

50 <210> 9
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 9
 caccatcgag ctcgtgaagg agccctgtc atggaagg 38

60 <210> 10
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

65 <400> 10
 ctgaagaag agaccgatc ttctgcacgc tccaccac 38

ES 2 530 370 T3

<210> 11
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 11
ttcaccacca cggccgagct ctccttctgc atcctgtcg 39

10

<210> 12
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 12
agccacatcg ctcagacacc gtactcagcg ccagcatcg 39

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), comprendiendo el método:
 - 5 a. cultivar células madre pluripotentes humanas en un medio suplementado con nicotinamida para generar células en diferenciación; y
 - b. cultivar dichas células en diferenciación en un medio que comprende uno o más miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) y nicotinamida, produciendo de este modo células RPE.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho cultivo de células madre pluripotentes humanas en un medio suplementado con nicotinamida en la etapa (a) se realiza durante al menos dos días.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho miembro de la superfamilia de TGF β es TGF β 1, TGF β 3 o activina A.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente preparar las células RPE en una forma de dosificación adecuada para trasplante intraocular en un sujeto.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas células madre pluripotentes humanas son células madre embrionarias humanas.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente recoger las células RPE.

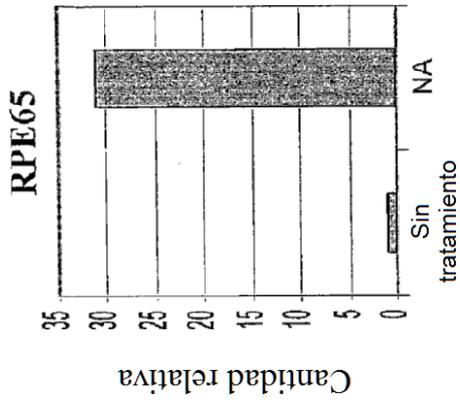


Fig. 1B

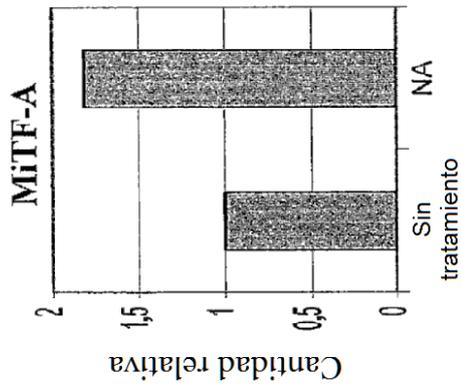


Fig. 1A

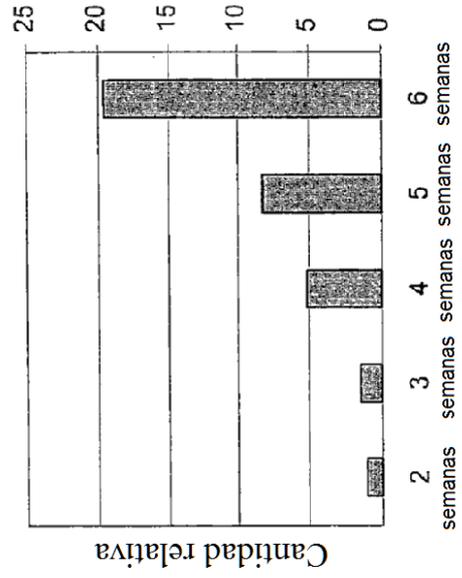


Fig. 1C

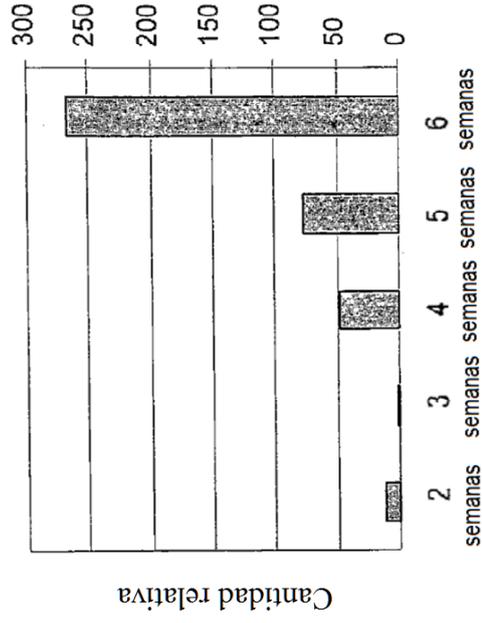


Fig. 1D

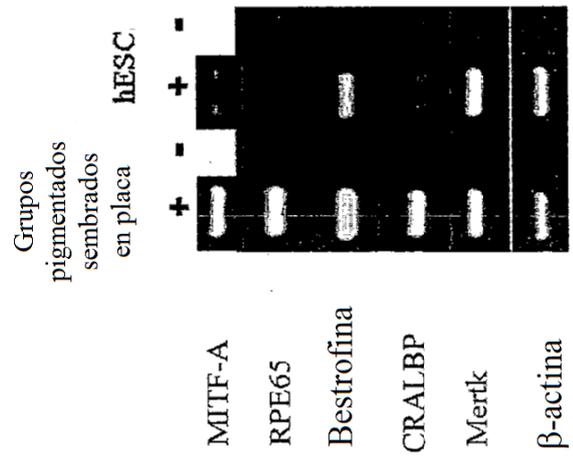


Fig. 1E

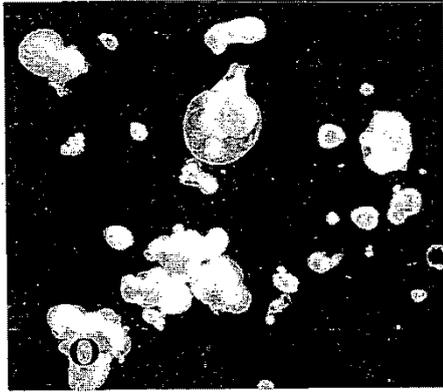


Fig. 2A

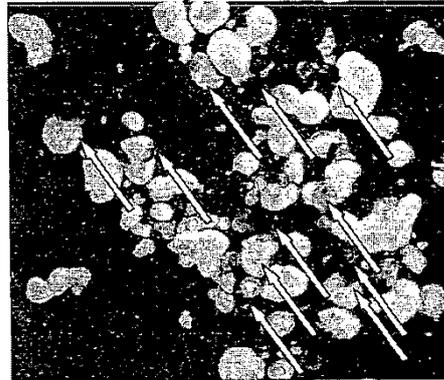


Fig. 2B

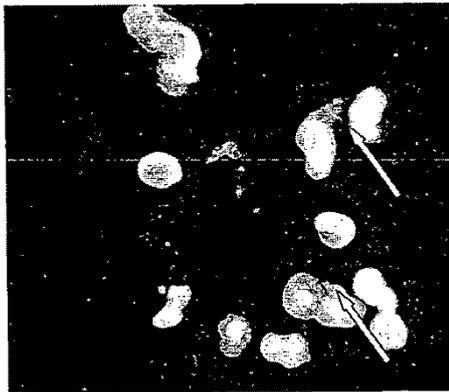


Fig 2C

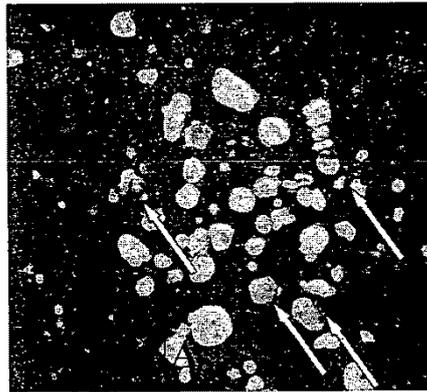


Fig 2D

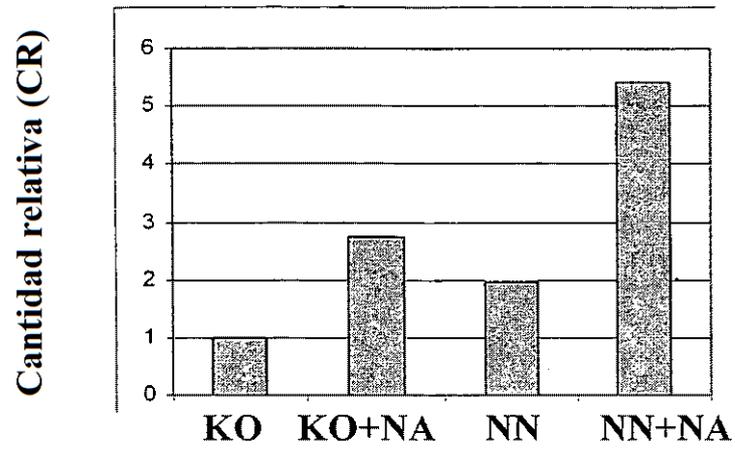


Fig. 2E

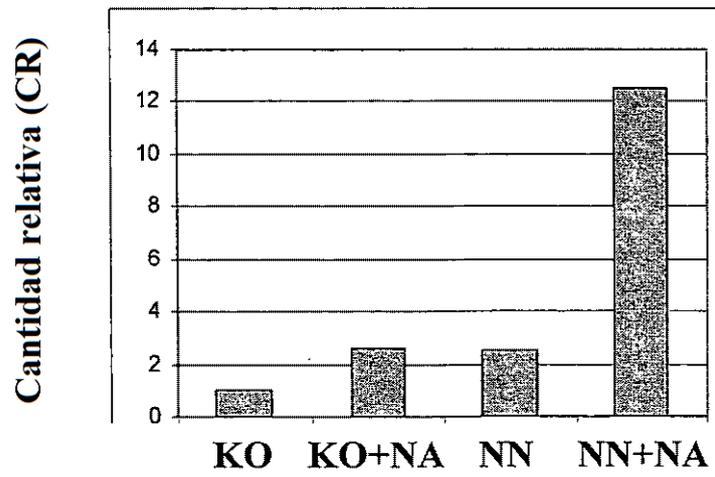


Fig. 2F

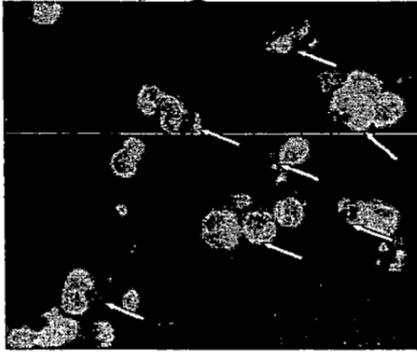


Fig. 3A

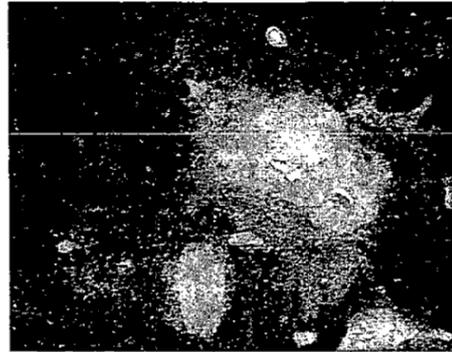


Fig. 3D



Fig. 3B

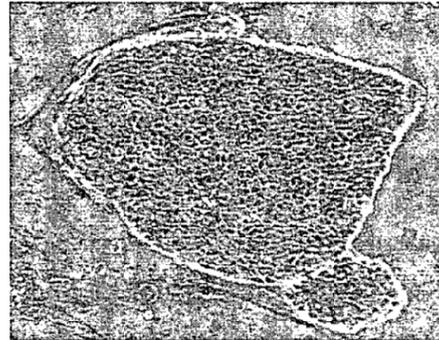


Fig. 3E

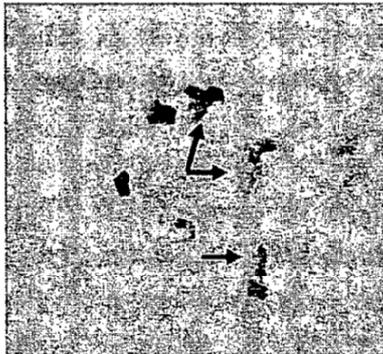


Fig. 3C

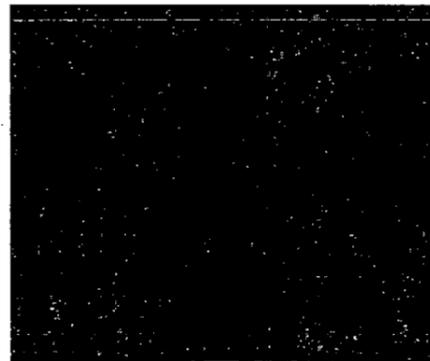


Fig. 3F

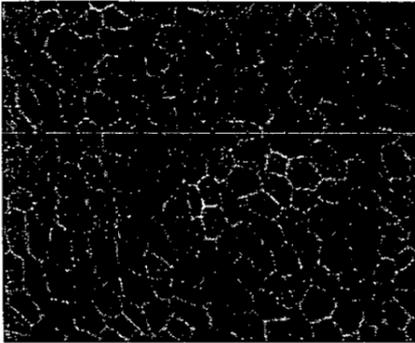


Fig. 3G

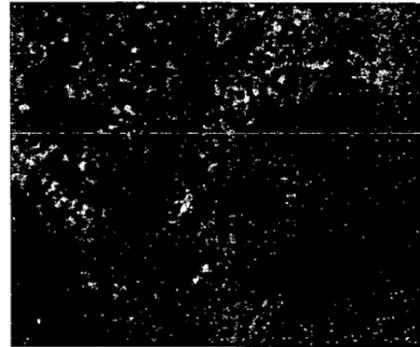


Fig. 3J



Fig. 3H

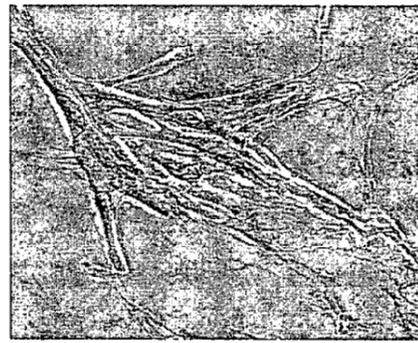


Fig. 3K



Fig. 3I

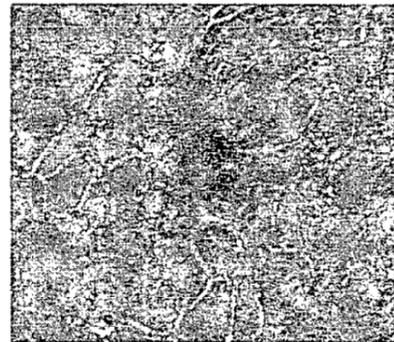


Fig. 3L

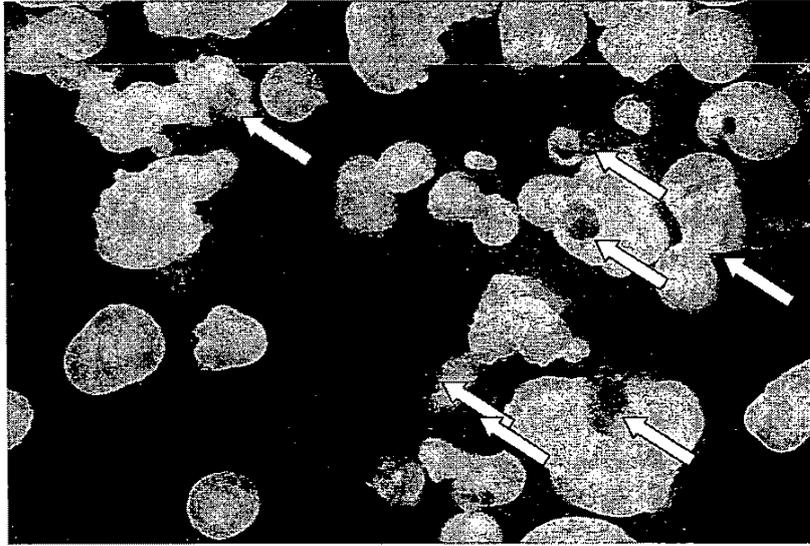


Fig. 4A

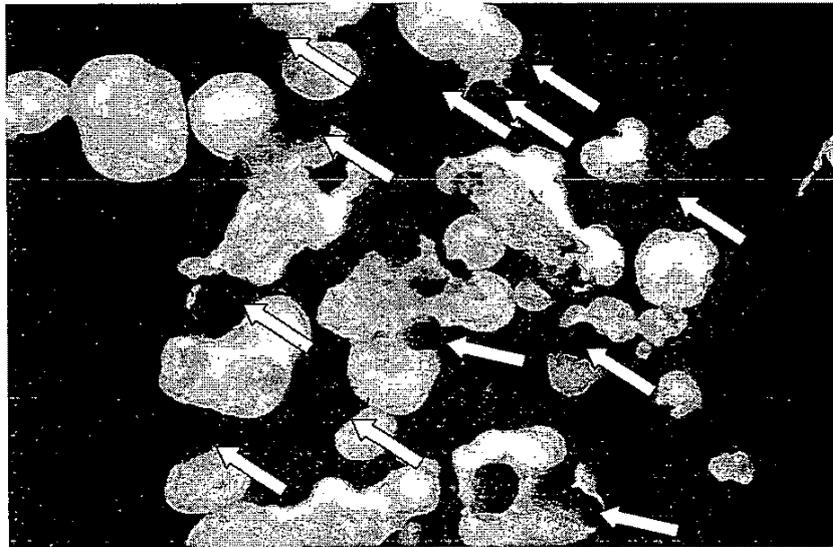


Fig. 4B

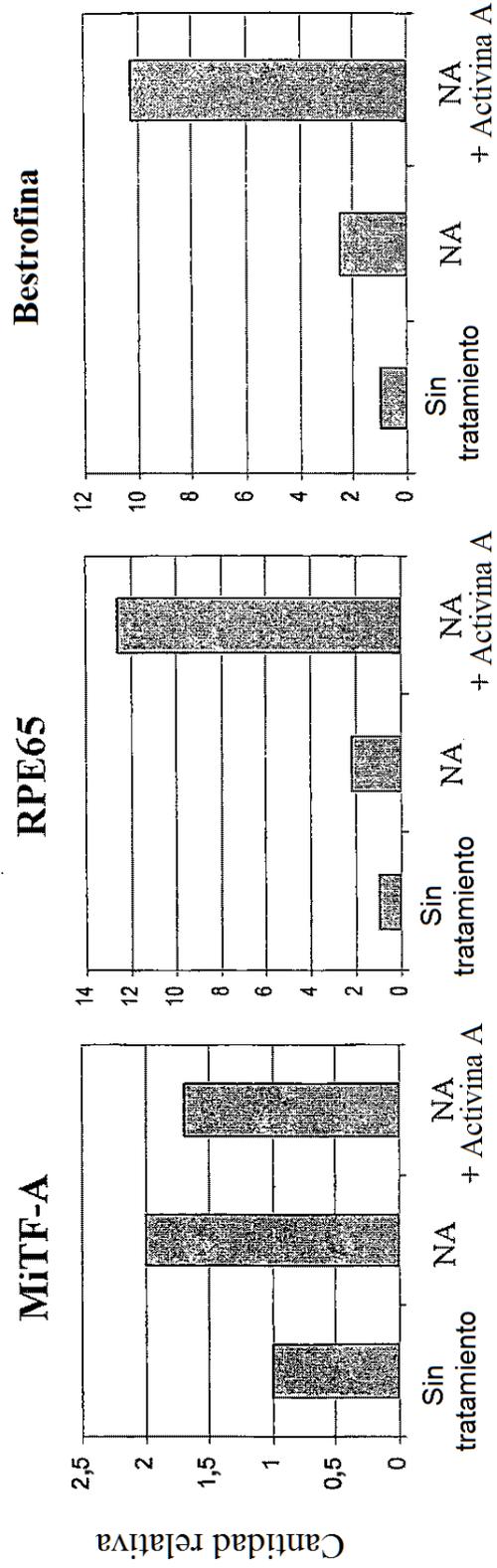


Fig. 4E

Fig. 4D

Fig. 4C

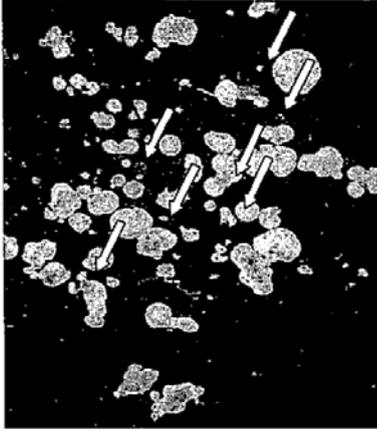


Fig. 5B

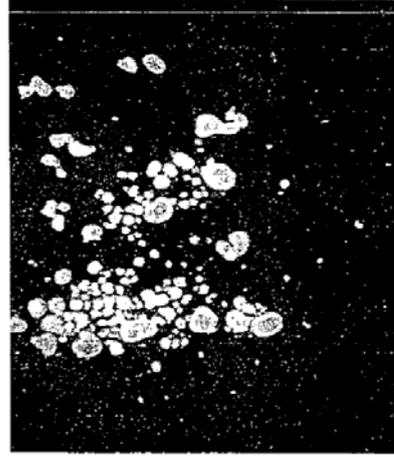


Fig 5D

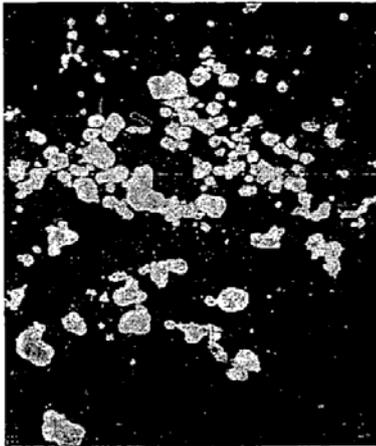


Fig. 5A

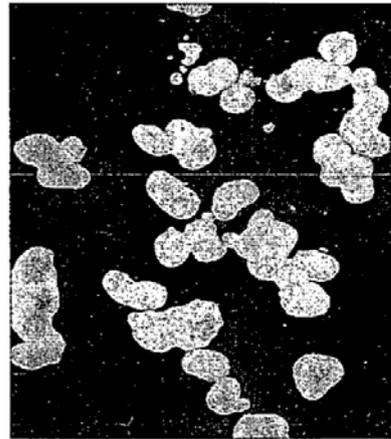


Fig 5C

Fig. 5E

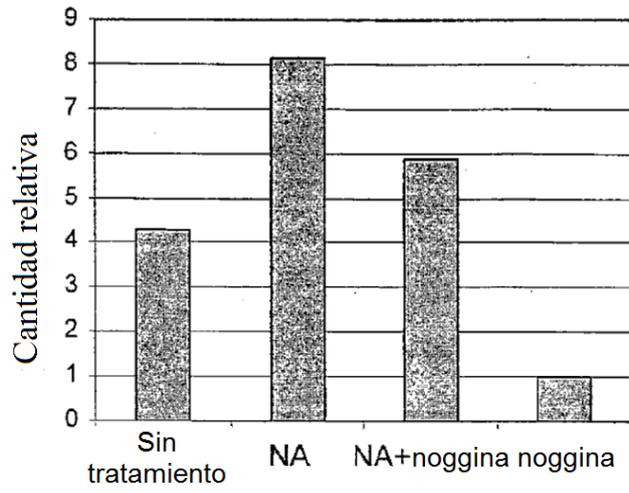


Fig. 5F

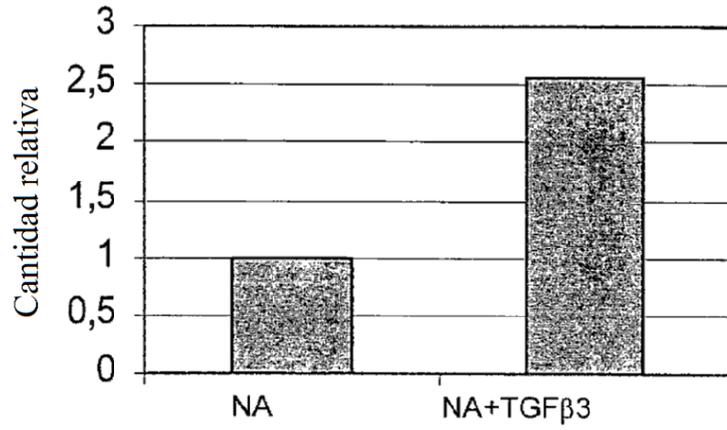
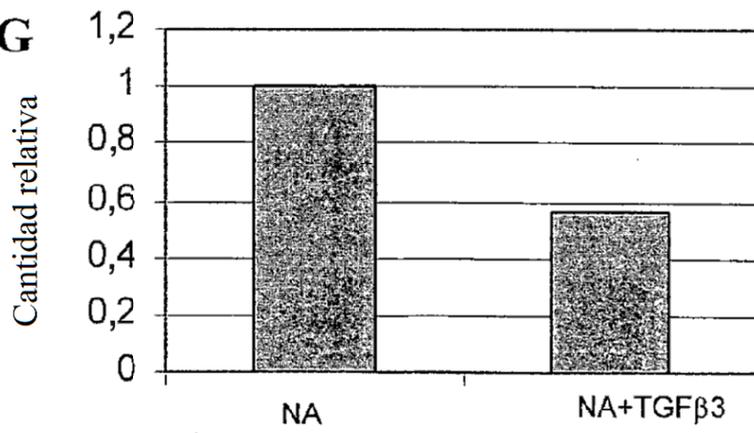


Fig. 5G



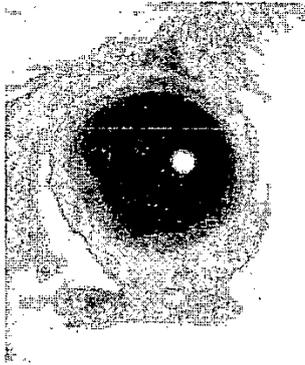


Fig. 6A

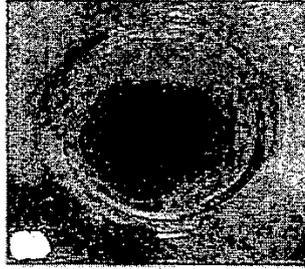


Fig. 6B



Fig. 6C



Fig. 6D

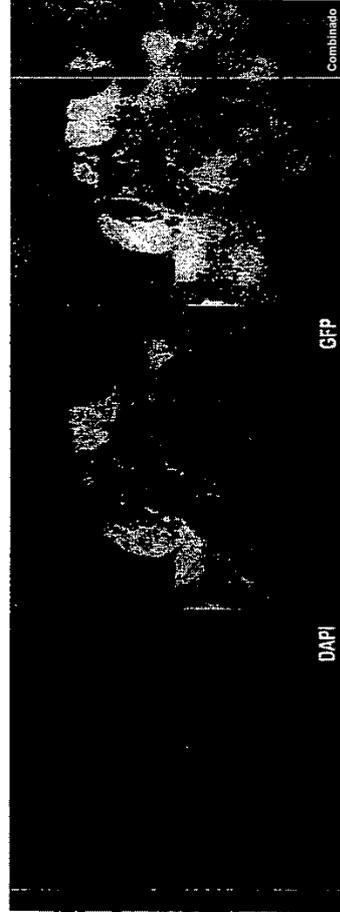


Fig. 6E

Fig. 6F

Fig. 6G



Fig. 6I



Fig. 6H

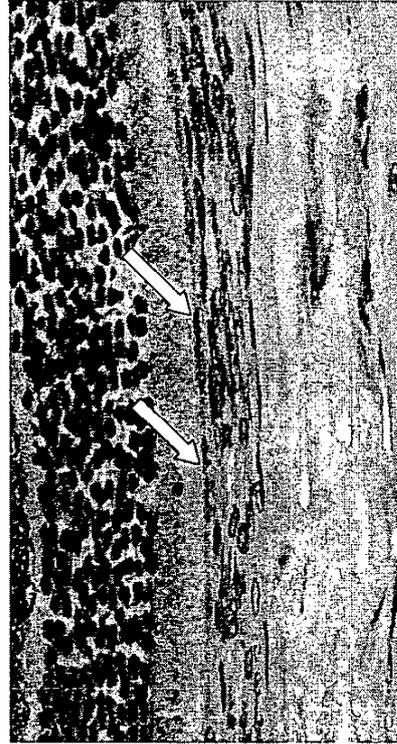


Fig. 6J

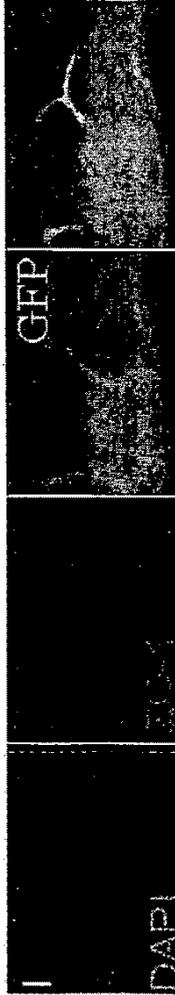


Fig. 6K Fig. 6L Fig. 6M Fig. 6N

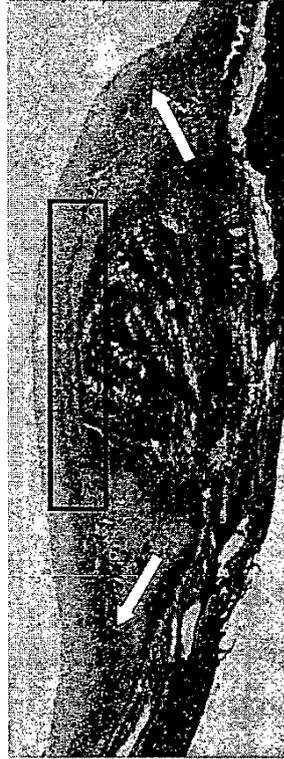


Fig. 6O

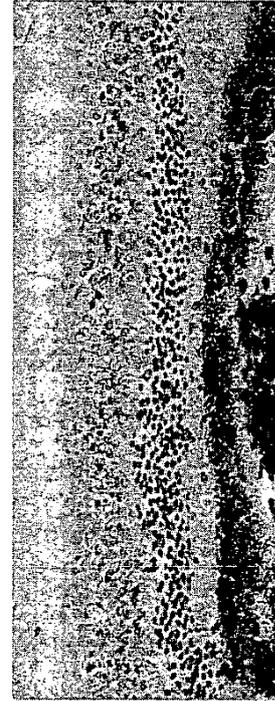


Fig. 6P

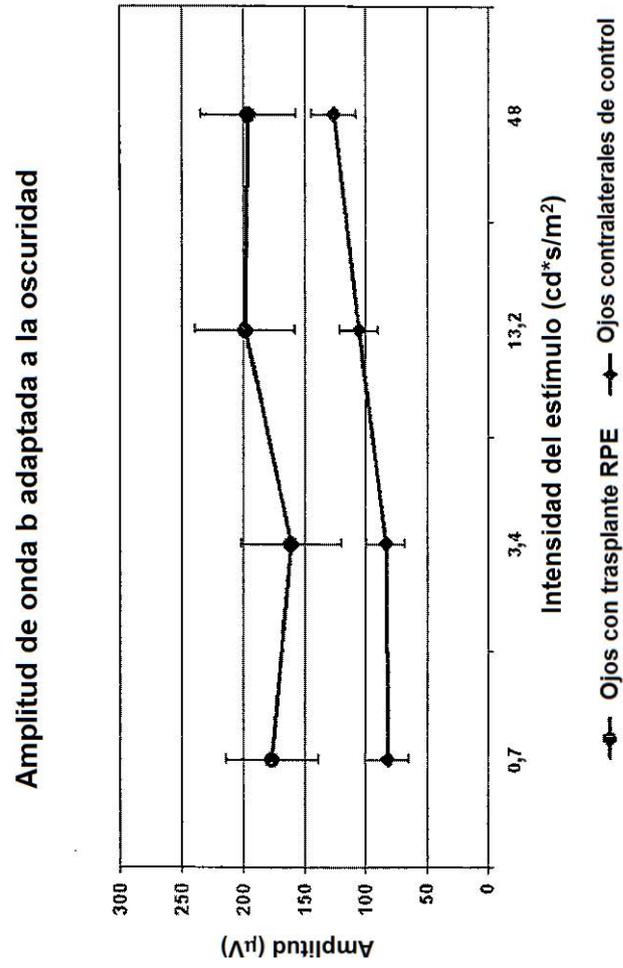


Fig. 7



Fig. 8E

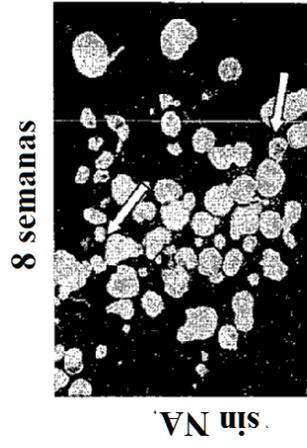


Fig. 8F

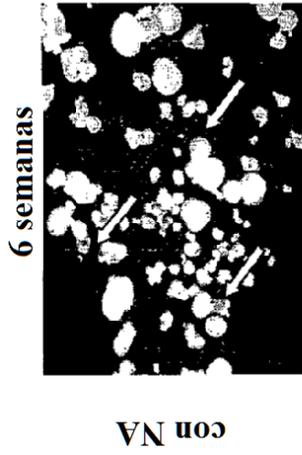


Fig. 8C

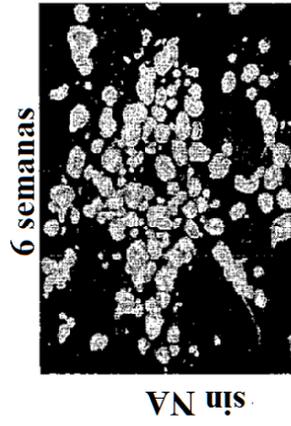


Fig. 8D

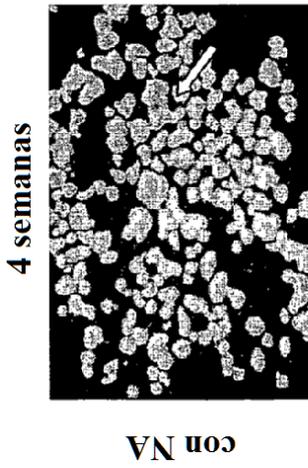


Fig. 8A

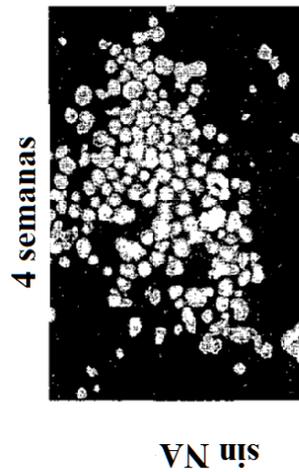


Fig. 8B

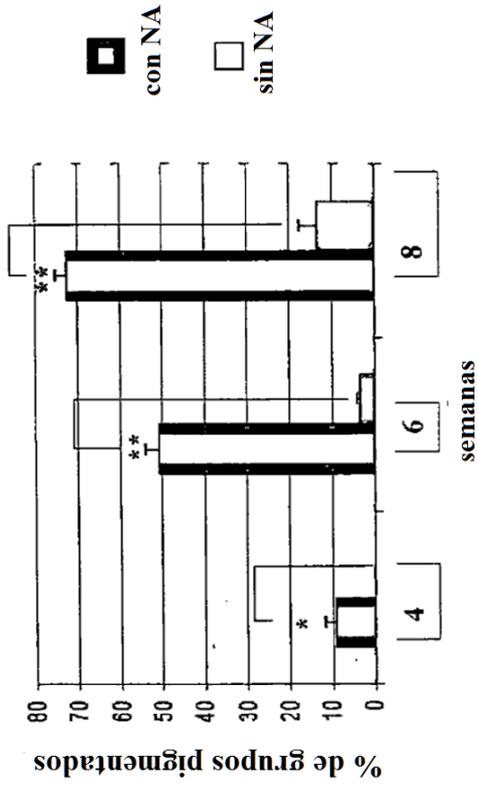


Fig. 8G

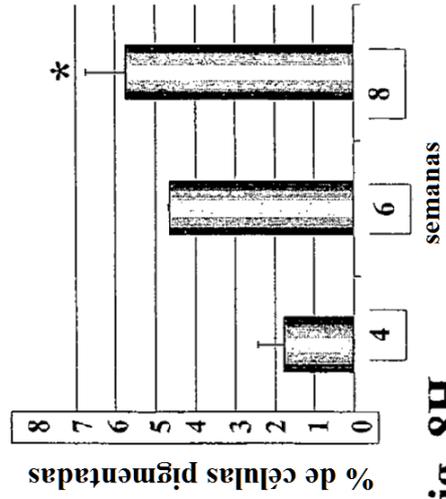


Fig. 8H

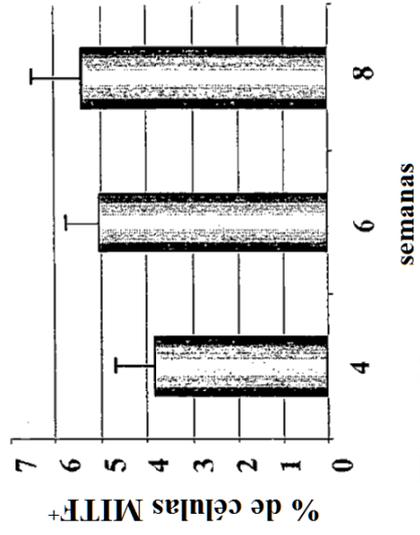


Fig. 8I

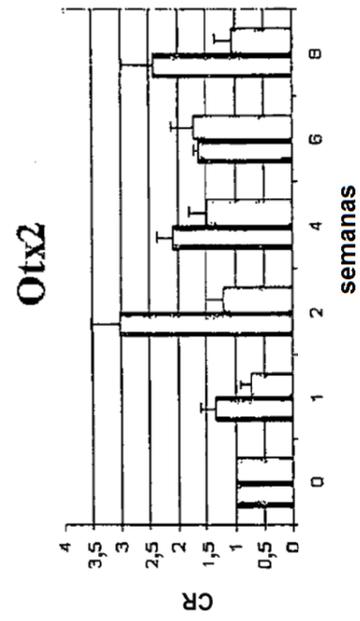


Fig. 9B

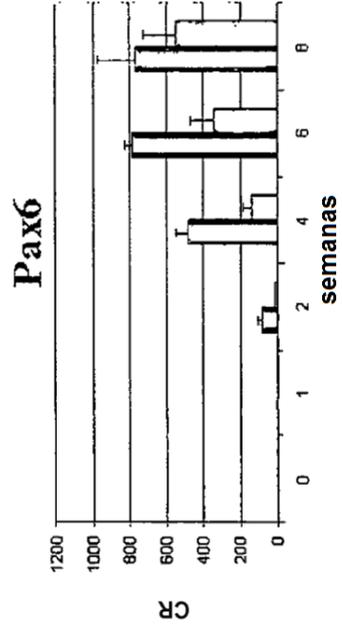


Fig. 9D

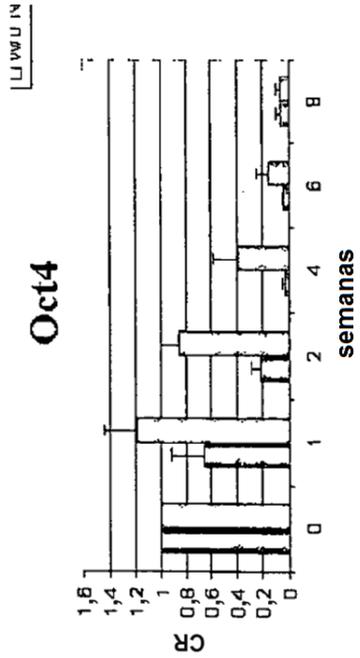


Fig. 9A

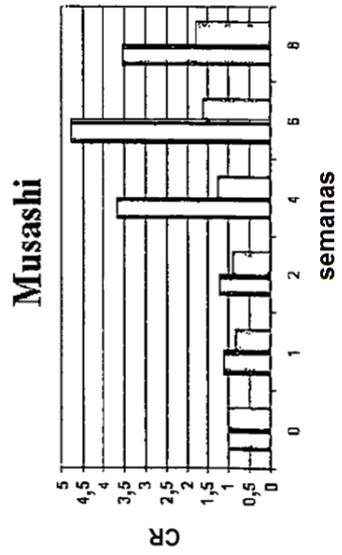


Fig. 9C

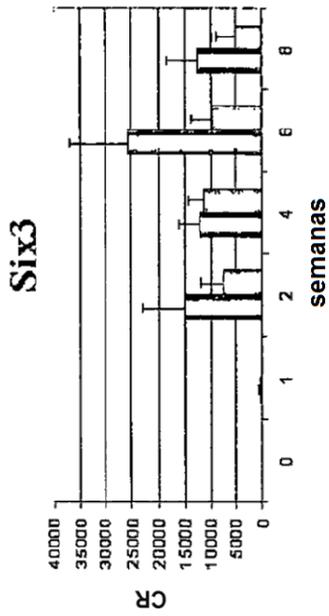


Fig. 9E

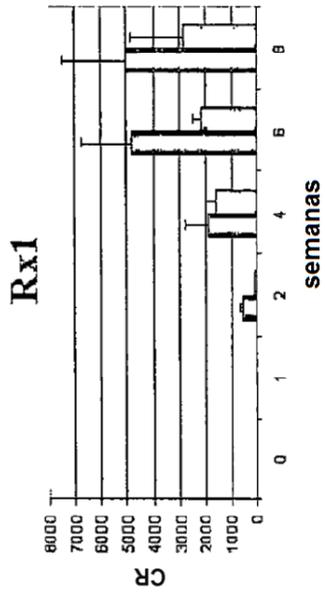


Fig. 9F

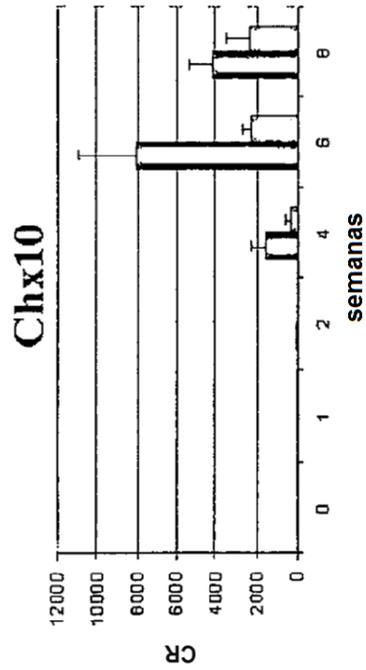


Fig. 9G

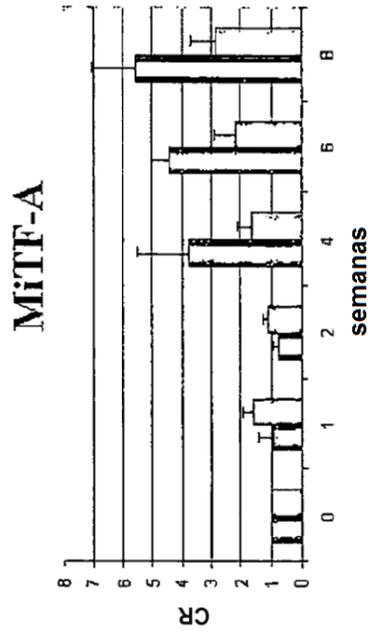


Fig. 9H

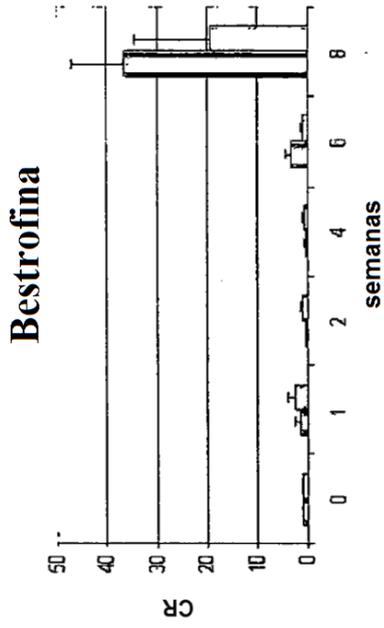


Fig. 9J

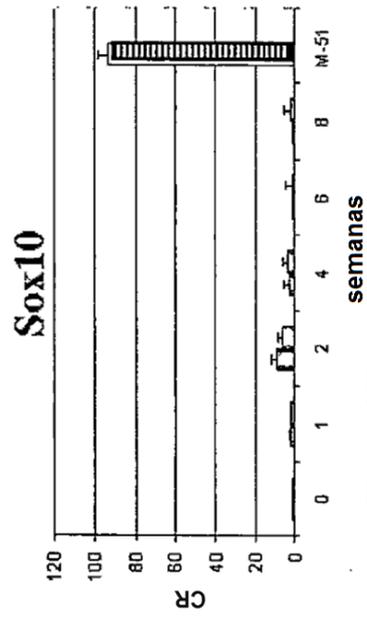


Fig. 9L

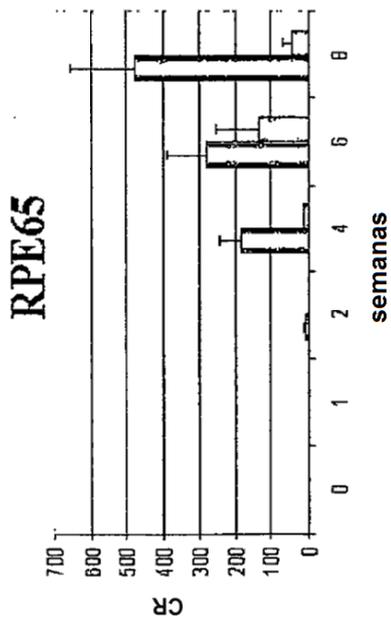


Fig. 9I

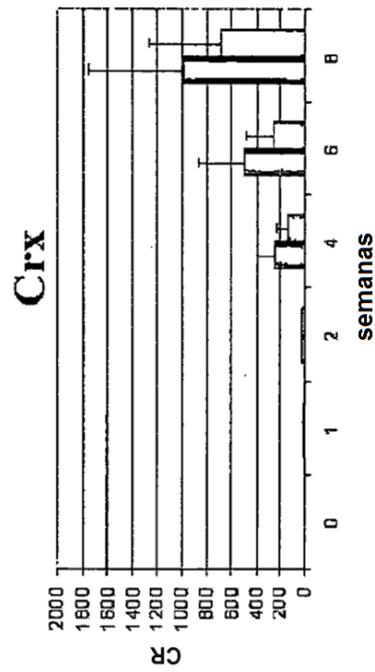


Fig. 9K

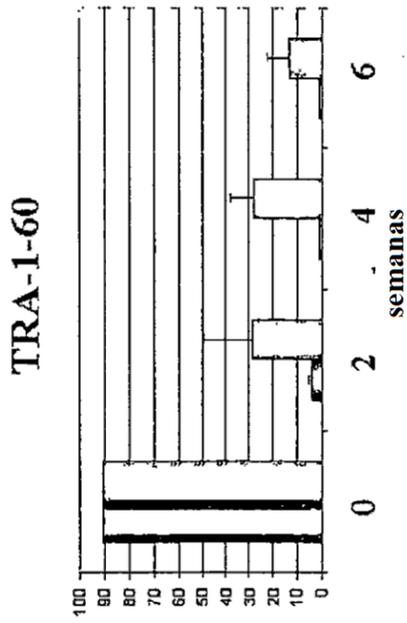


Fig. 9M

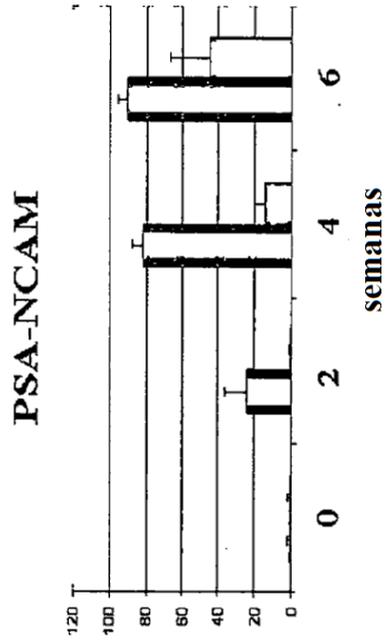


Fig. 9O

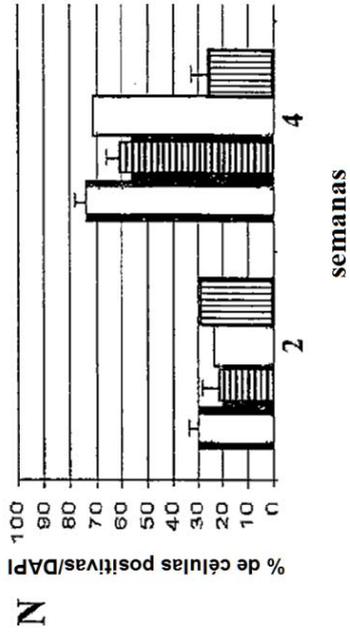


Fig. 9N



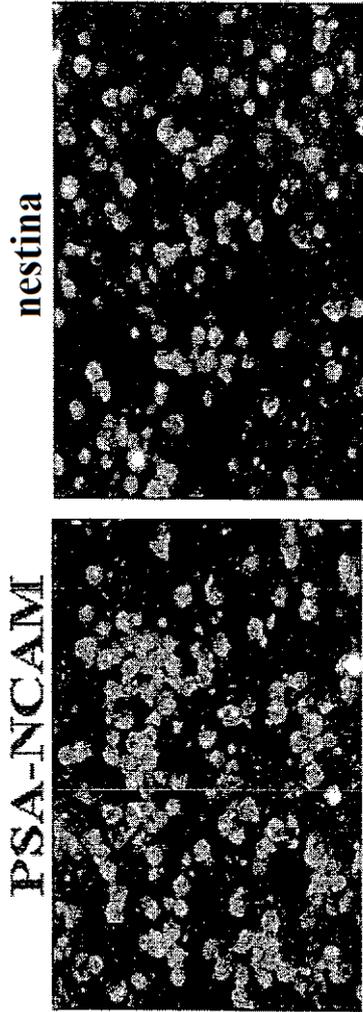


Fig. 9P

Fig. 9Q

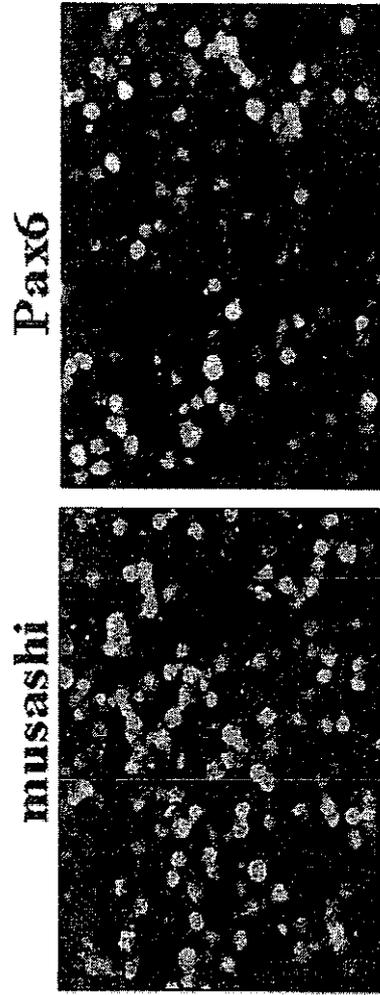


Fig. 9R

Fig. 9S

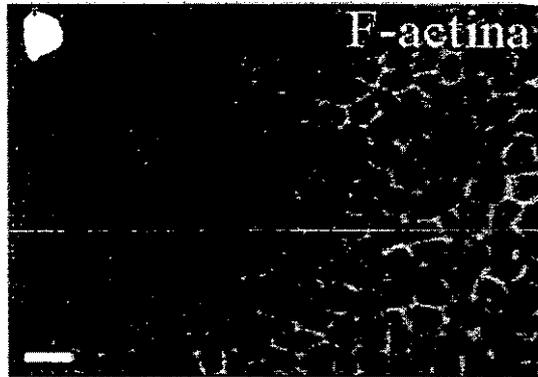


Fig. 10A

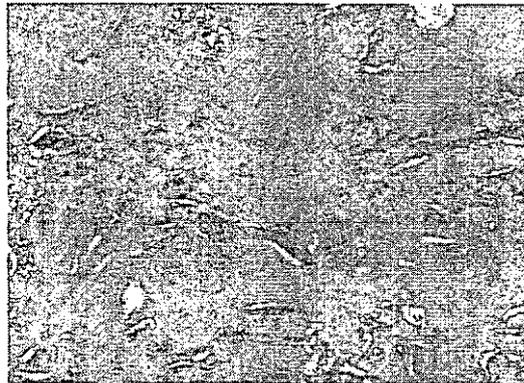


Fig. 10B

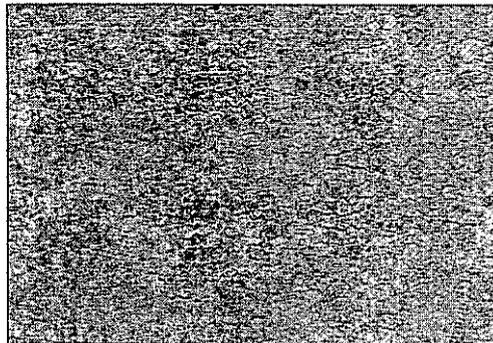


Fig. 10C



Fig. 10D

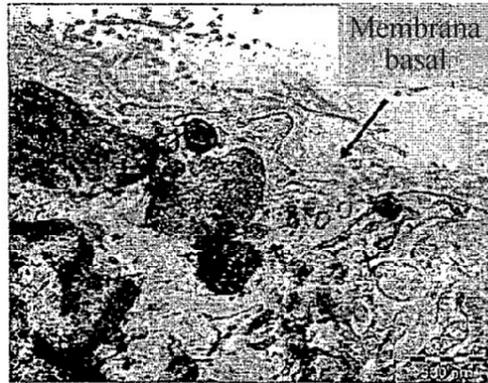


Fig. 10E



Fig. 10F

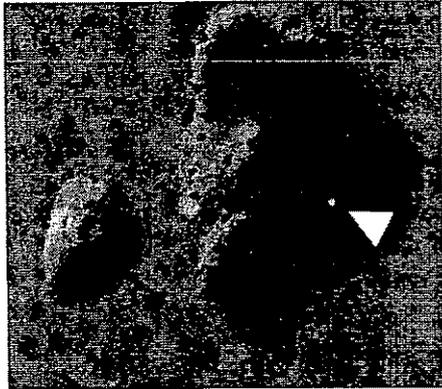


Fig. 10G

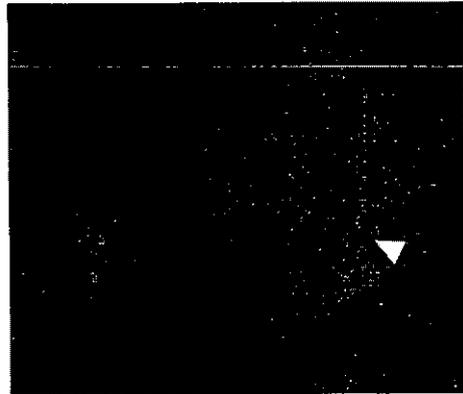


Fig. 10H



Fig. 10I

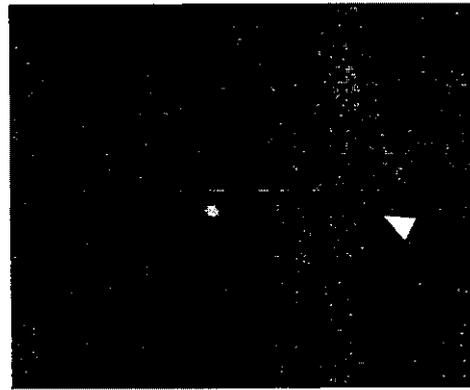


Fig. 10J

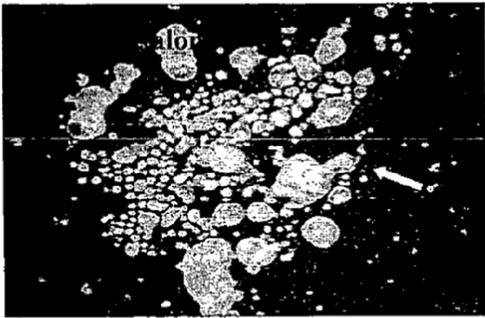


Fig. 11A

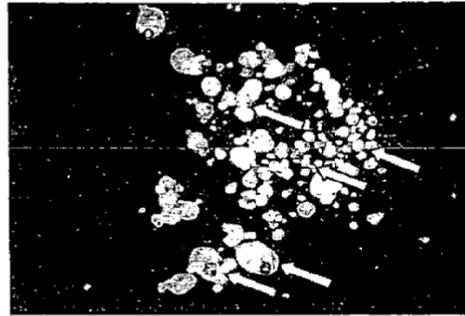


Fig. 11D

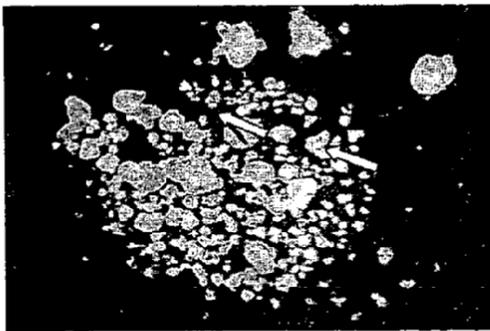


Fig. 11B

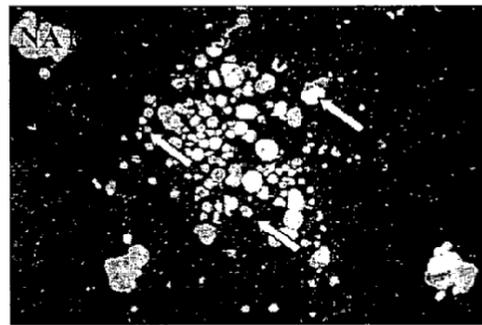


Fig. 11E



Fig. 11C

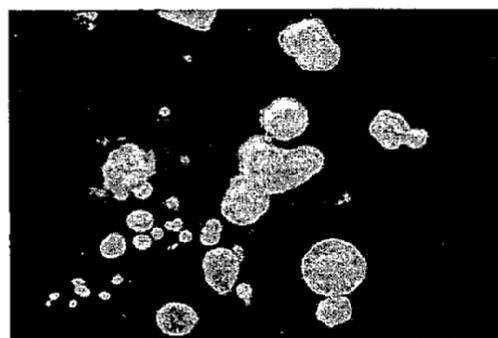


Fig. 11F

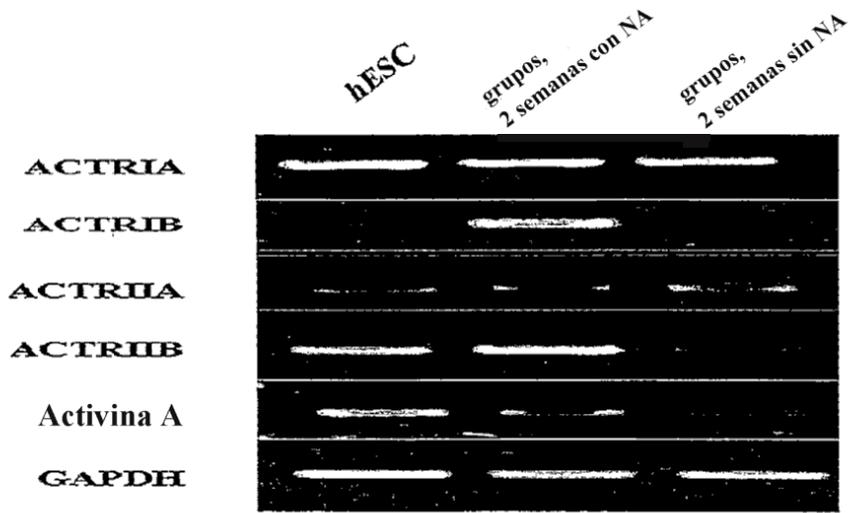


Fig. 11G

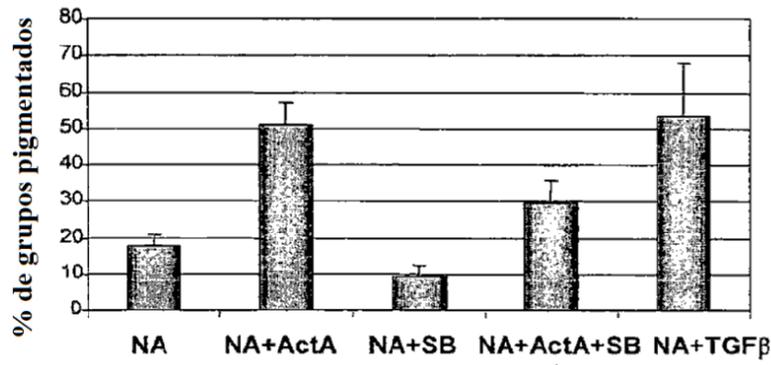


Fig. 11H

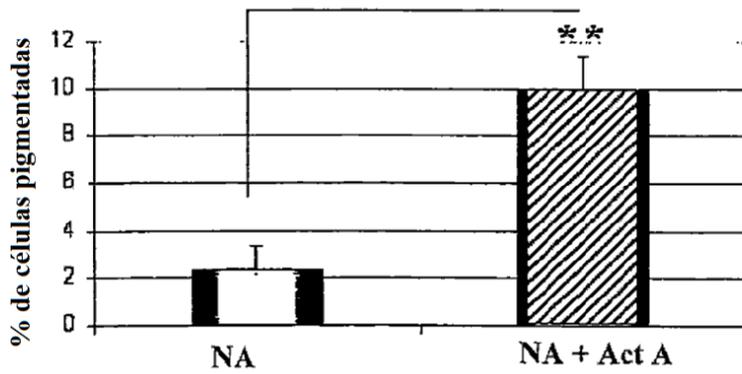


Fig. 11I

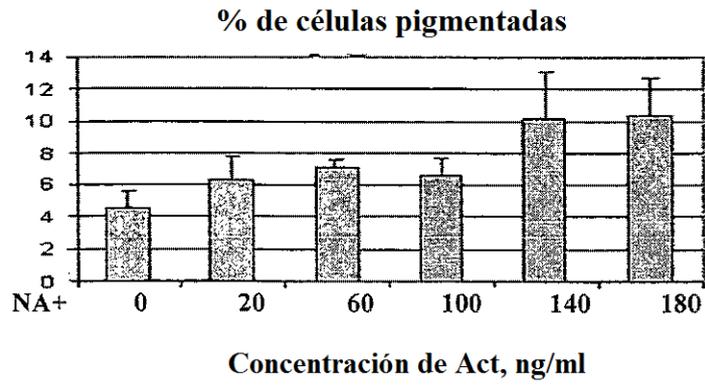


Fig. 11J

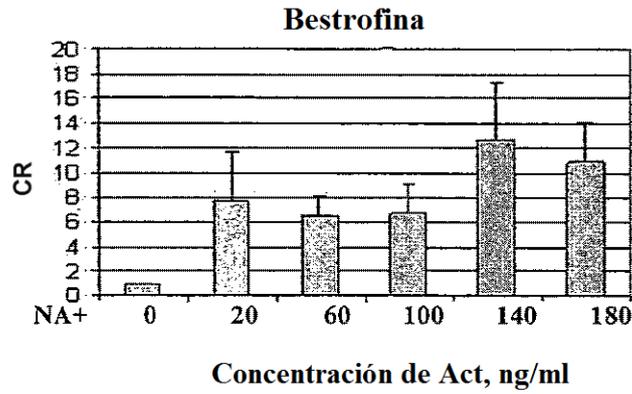


Fig. 11K

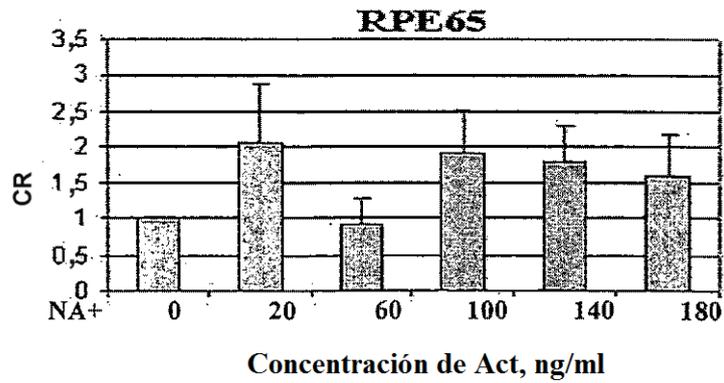


Fig. 11L

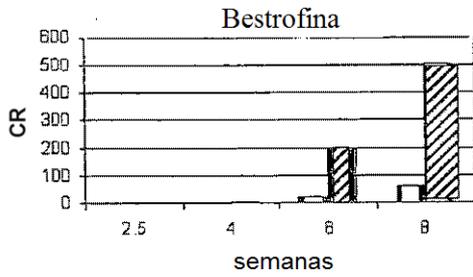


Fig. 11M

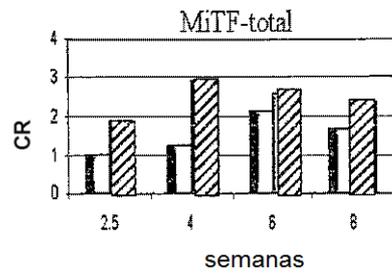


Fig. 11N

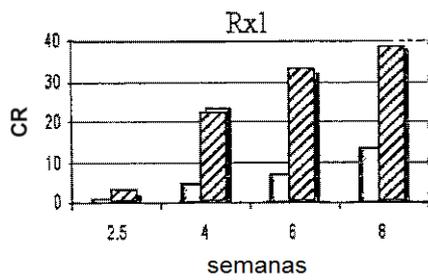


Fig. 11O

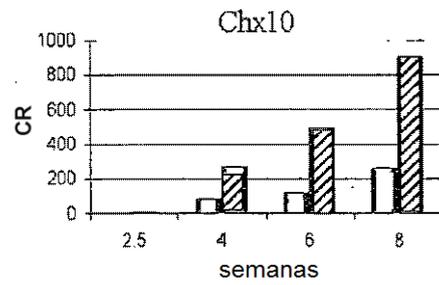


Fig. 11P

Fig. 12A



Fig. 12B

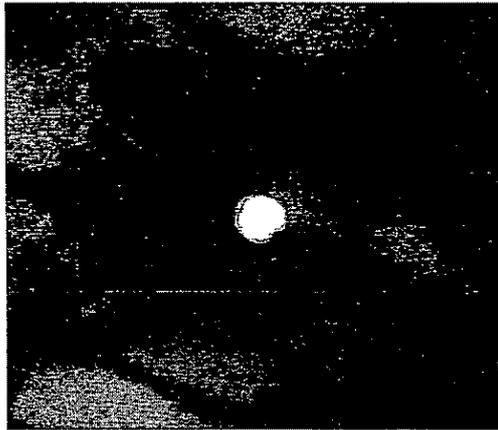


Fig. 12C

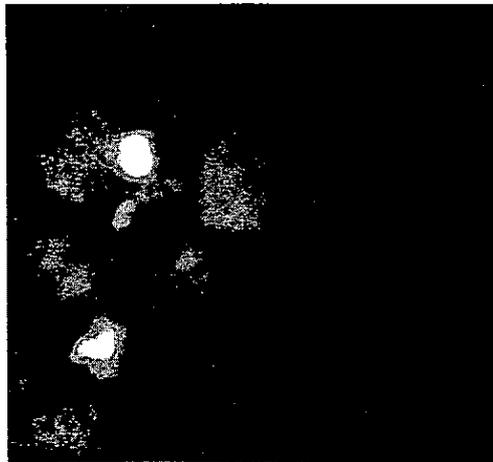


Fig. 12D

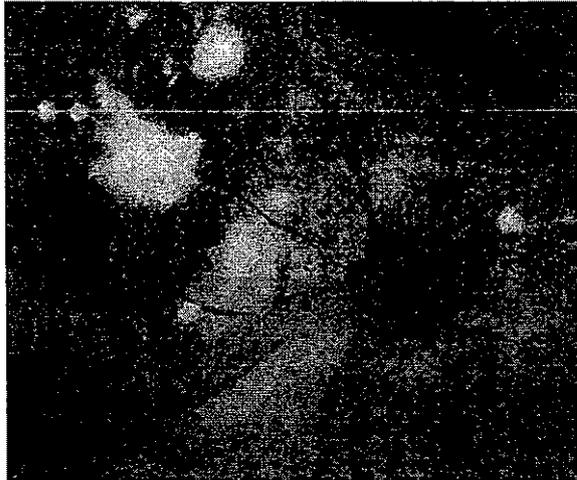
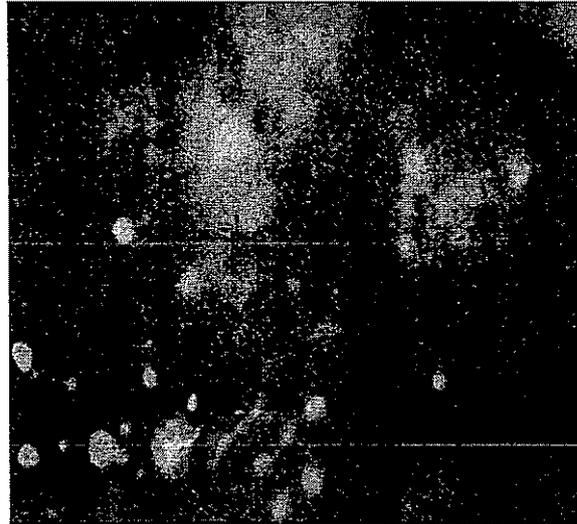


Fig. 12E



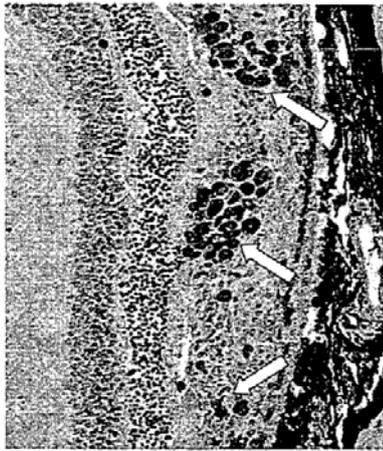


Fig. 13A



Fig. 13B

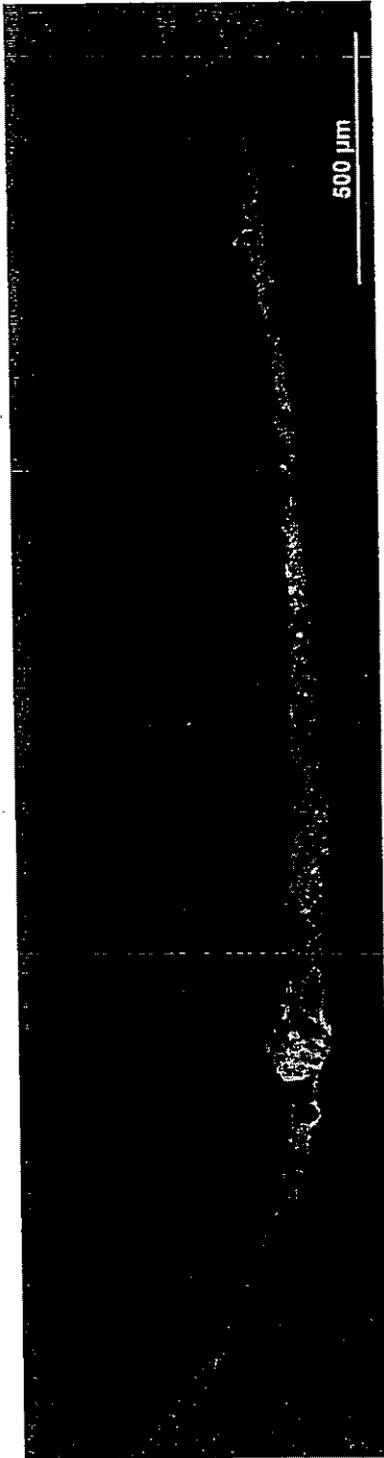


Fig. 13C

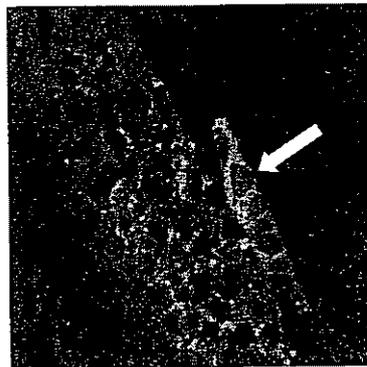


Fig. 13D

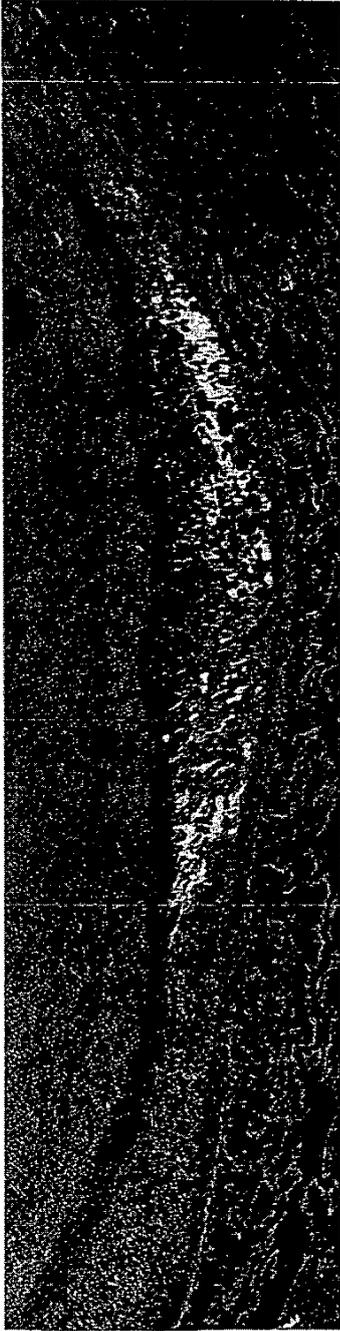


Fig. 13E

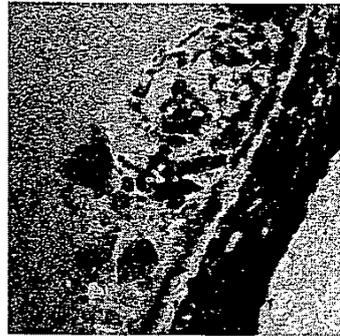


Fig. 13F

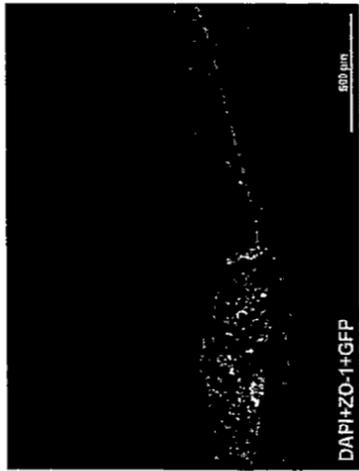


Fig. 14A

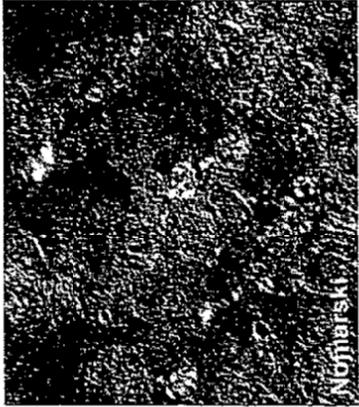


Fig. 14B

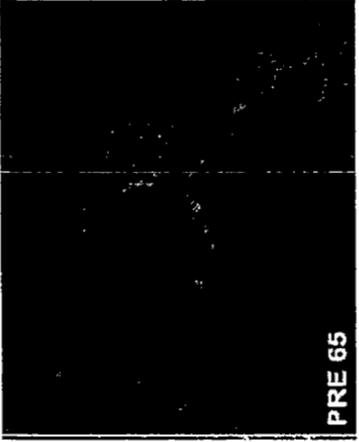


Fig. 14C

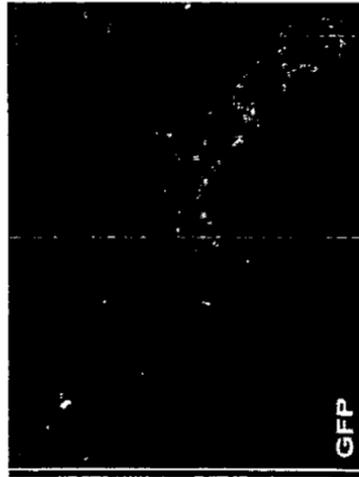


Fig. 14D



Fig. 14E



Fig. 14F



Fig. 14G

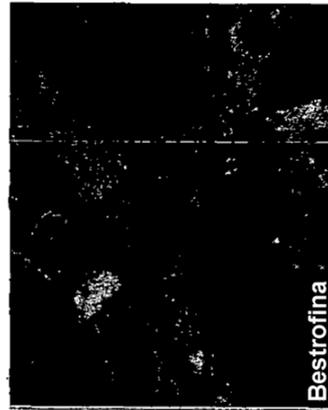


Fig. 14H

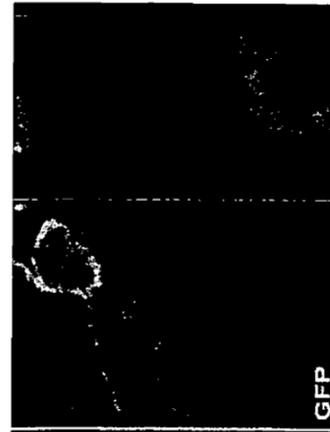


Fig. 14I

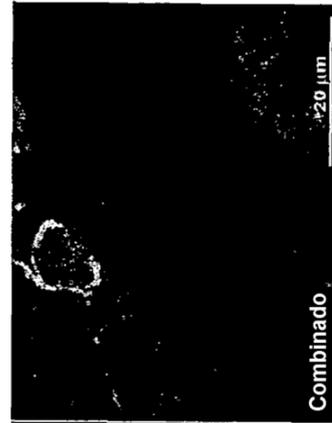


Fig. 14J

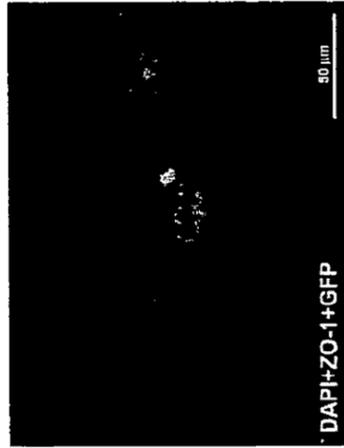


Fig. 14K



Fig. 14L



Fig. 14M

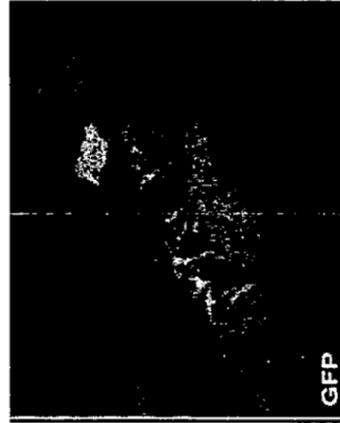


Fig. 14N



Fig. 14O

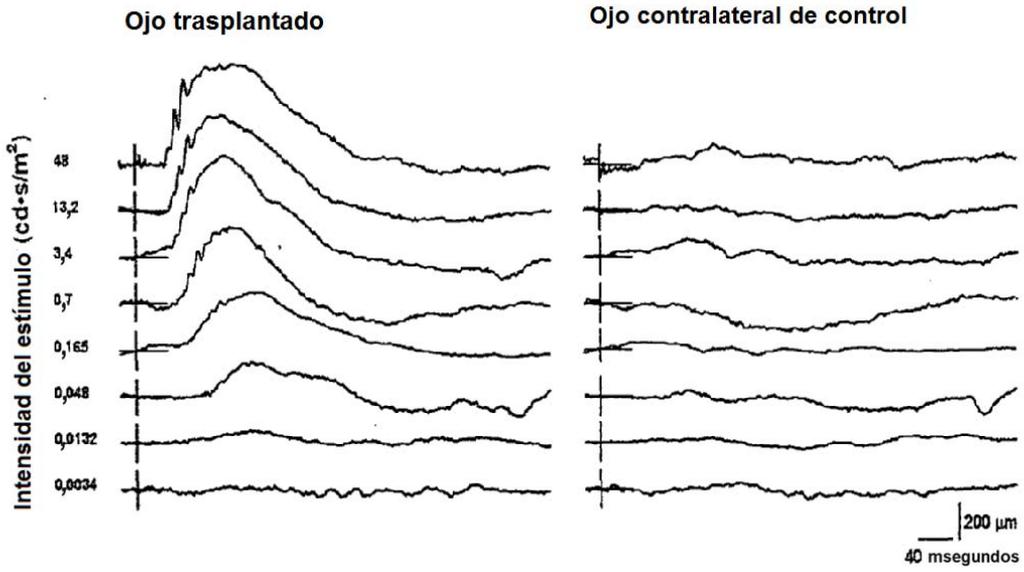


Fig. 15A

Fig. 15B

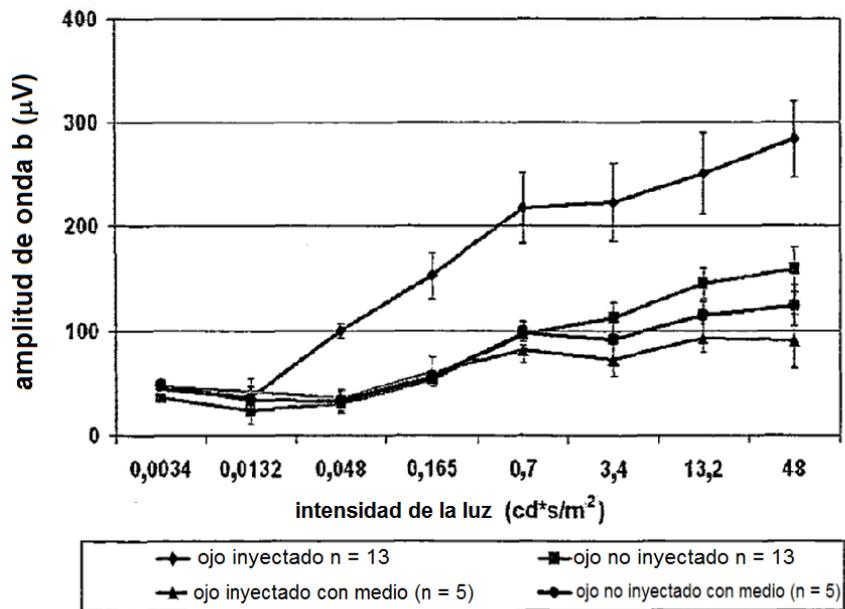


Fig. 15C

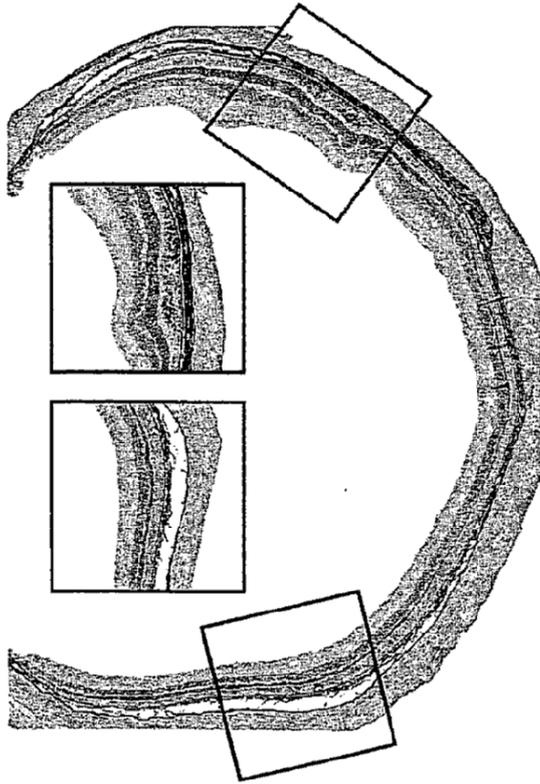


Fig. 16A



Fig. 16B

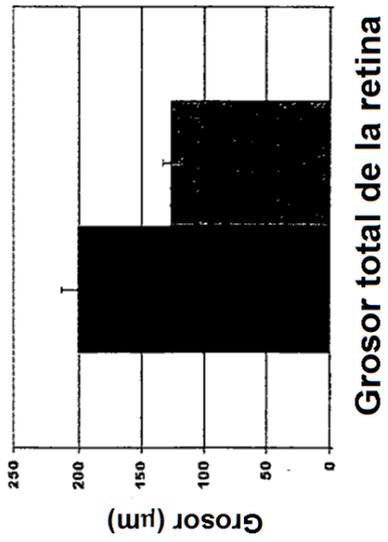


Fig. 16C

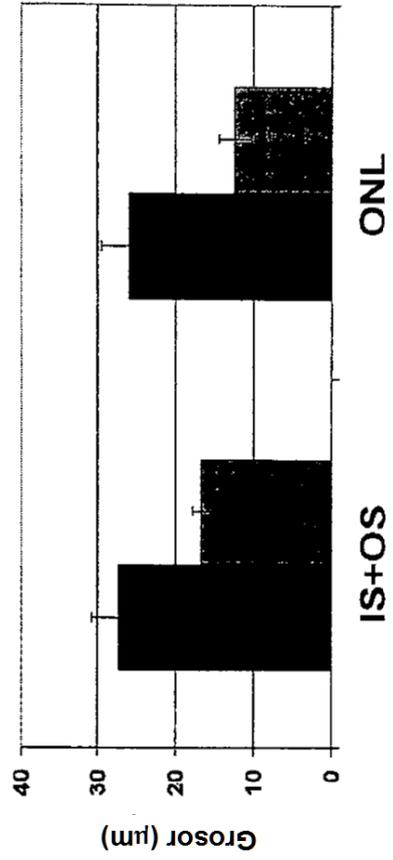


Fig. 16D

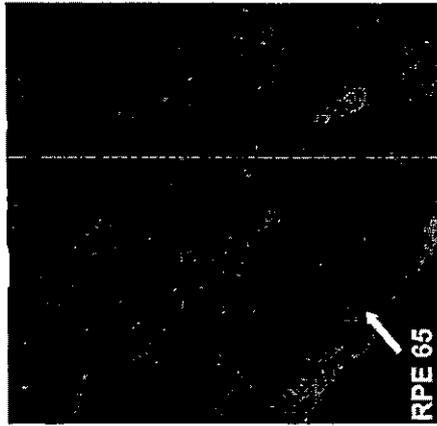


Fig. 17C

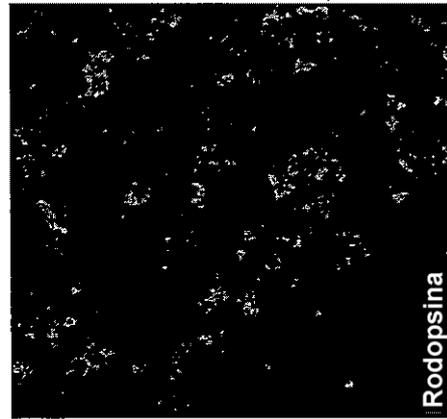


Fig. 17B

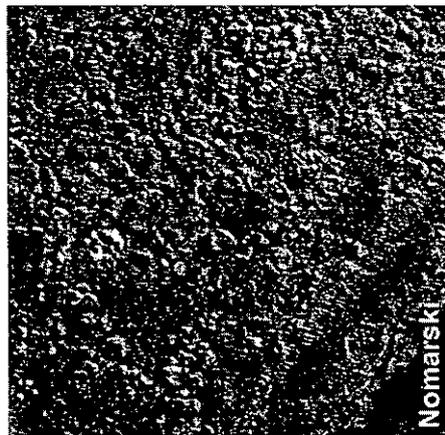


Fig. 17A

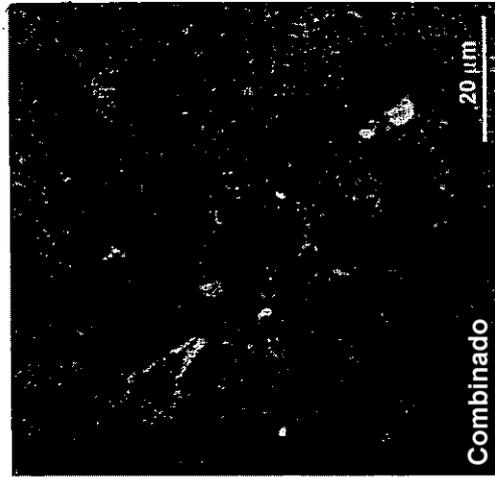


Fig. 17E

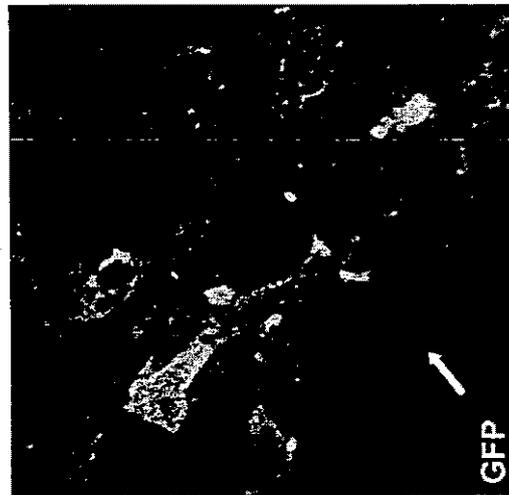


Fig. 17D