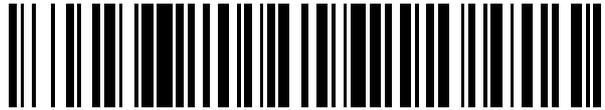


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 226**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/079** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010 E 10161354 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2383333**

54 Título: **Método para producir células progenitoras retinianas polarizadas a partir de células madre pluripotentes y su diferenciación para dar células del epitelio pigmentario retiniano**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.08.2015**

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN (100.0%)  
Mommsenstrasse 11  
01069 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**TANAKA, ELLY y  
ZHU, YU**

74 Agente/Representante:

**ARPE FERNÁNDEZ, Manuel**

**ES 2 542 226 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

Método para producir células progenitoras retinianas polarizadas a partir de células madre pluripotentes y su diferenciación para dar células del epitelio pigmentario retiniano

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un método y a componentes para producir células progenitoras retinianas polarizadas (RPC) a partir de células madre pluripotentes con un rendimiento y una pureza altos. Preferiblemente, las células progenitoras retinianas polarizadas se diferencian adicionalmente con alta eficacia y velocidad para dar células del epitelio pigmentario retiniano (células del RPE). Las células obtenidas son particularmente adecuadas para su uso en trasplante de células o en la generación de tejido para trasplante y son particularmente aplicables para sistemas de selección de sustancias que modulan la función de células del RPE y/o células progenitoras retinianas polarizadas.

10 **[0002]** La retina es una capa de tejido neural sensible a la luz especializado ubicada en la superficie interior del ojo de los vertebrados. La luz que llega a la retina tras pasar por la córnea, el cristalino y el humor vítreo se transforma en una cascada de acontecimientos químicos y eléctricos que desencadenan en última instancia impulsos nerviosos. Las células que son responsables de captar la luz y convertirla en el comienzo de una cadena de procesos biológicos, un proceso que se denomina fototransducción, son neuronas especializadas que se denominan células fotorreceptoras.

15 **[0003]** El epitelio pigmentario retiniano (RPE) es una monocapa polarizada de células hexagonales densamente empaquetadas en el ojo de los mamíferos que separa la retina neural del coroides. Las células en el RPE contienen gránulos pigmentarios y desempeñan un papel crucial en la fisiología de la retina formando una barrera hematorretiniana e interaccionando estrechamente con fotorreceptores en el mantenimiento de la función visual absorbiendo la energía luminosa enfocada por el cristalino sobre la retina, transportando iones, agua y productos finales metabólicos desde el espacio subretiniano hasta la sangre y captando nutrientes tales como glucosa, retinol y ácidos grasos desde la sangre y suministrando esos nutrientes a fotorreceptores. Las células del RPE también son parte del ciclo visual del retinal: dado que los fotorreceptores no pueden volver a isomerizar todo-trans-retinal, que se forma tras la absorción de fotones, para dar de nuevo 11-cis-retinal, el retinal se transporta al RPE en el que vuelve a isomerizarse para dar 11-cis-retinal y se transporta de vuelta a los fotorreceptores.

20 **[0004]** Dado que muchas enfermedades oftálmicas, tales como degeneración macular (asociada a la edad), distrofias maculares tales como enfermedad de Stargardt y similar a Stargardt, enfermedad de Best (distrofia macular viteliforme), distrofia viteliforme del adulto o subtipos de retinitis pigmentosa, están asociadas o bien con una degeneración o bien con un deterioro de la propia retina o del RPE, hay un alto interés en encontrar maneras de producir células del RPE a partir de células madre pluripotentes humanas como fuente para el trasplante de células para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. Se ha demostrado en modelos animales que pueden lograrse el rescate de fotorreceptores y la conservación de la función visual mediante trasplante de células del RPE subretinianas (Coffey, PJ *et al.* Nat. Neurosci. 2002:5, 53-56; Lin, N *et al.* Curr. Eye Res. 1996:15, 1069-1077; Little CW *et al.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1996:37, 204-211; Sauve, Y *et al.* Neuroscience 2002:114, 389-401).

25 **[0005]** Durante el desarrollo embrionario temprano, los primordios retinianos se forman en la región diencefálica más rostral tal como se indica por la expresión del factor de transcripción OTX2. El neuroepitelio anterior se evagina para dar lugar a la vesícula óptica, seguido por invaginación que crea una cúpula óptica de dos capas. El campo ocular puede definirse de manera molecular debido a la expresión de una combinación de factores de transcripción tales como Pax6, Rx y Six3 (figura 1). La capa exterior de la cúpula óptica se diferencia para dar el RPE, tal como puede discernirse en fases tempranas mediante la expresión de MITF (factor de transcripción asociado a la microftalmía), mientras que la capa interior se diferencia para dar la retina neural tal como puede discernirse mediante la expresión continuada de Rx y de Chx10. El desarrollo de la retina neural en capas de los vertebrados es un proceso conservado de génesis celular con el siguiente orden de nacimiento celular: células ganglionares, células horizontales, fotorreceptores de cono, células amacrinas, células bipolares, fotorreceptores de bastón y glía de Müller.

30 **[0006]** Debido a la secuencia definida de etapas y los marcadores de diagnóstico disponibles para el desarrollo de RPE, se han producido células progenitoras retinianas y sus descendientes diferenciados en cultivo celular a partir de células madre pluripotentes embrionarias de ser humano, de mono y de ratón e inducidas, exponiéndolas a diferentes condiciones de cultivo. Tales métodos proporcionan un posible medio para producir células trasplantables para enfermedades degenerativas de la retina tal como se describió anteriormente y para la selección *in vitro* de moléculas farmacéuticas con células madre pluripotentes inducidas específicas del paciente como estrategia curativa. Las células madre pluripotentes son un tipo de célula particularmente bueno para la producción de células progenitoras retinianas debido a su capacidad de expansión ilimitada con cariotipo estable, y la capacidad de producir células madre pluripotentes a partir de muestras de pacientes humanos. Sin embargo, los métodos actuales para diferenciar células madre pluripotentes humanas para dar progenitores retinianos, y adicionalmente para dar RPE incluyendo tipos de células diferenciadas tales como fotorreceptores, son ineficaces y requieren mucho tiempo, limitando su uso eficaz para el trasplante y la selección de fármacos.

35 **[0007]** Las células madre embrionarias (células ES) son células pluripotentes que pueden propagarse en cultivo celular y mantienen de manera estable la capacidad para diferenciarse para dar las tres capas germinales embrionarias. También conservan de manera estable un cariotipo normal, proporcionando por tanto una potente fuente para formar diferentes tipos de células *in vitro*.

**[0008]** En protocolos clásicos, se aislaron células ES a partir de la masa celular interior de blastocisto de ratón (Martin 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7634-7638; Evans & Kaufman 1981, Nature 292: 154-156) y actualmente pueden obtenerse a partir de un gran número de especies. Sin embargo, en protocolos más recientes pueden obtenerse células ES sin destrucción de un blastocisto. Por ejemplo, en un protocolo esto se logra basándose en el crecimiento de blastómeros individuales derivados de blastocistos usando una técnica similar al diagnóstico genético preimplantacional (PGD), tal como se describe por Chung Y *et al.* (Cell Stem Cell 2008 (2): 113 - 117 + material suplementario). Otros estudios han mostrado que pueden obtenerse células ES mediante partenogénesis, por ejemplo a partir de un ovocito con un único pronúcleo (Lin *et al.* 2007. Cell Res 2007; 17:999-1007), o activación partenogenética de ovocitos humanos (Mai *et al.* 2007. Cell Res 17:1008-1019).

**[0009]** Recientemente ha sido posible producir células pluripotentes a partir de células adultas de ser humano y de ratón proporcionando un número definido de factores de transcripción a las células (Takahashi K. *et al.* Cell 2007:131, 861-872; Yu J *et al.* Science 2007:318, 1917-1920). Estas células madre pluripotentes inducidas (células iPS) son notablemente similares a las células madre embrionarias, expresan marcadores moleculares similares y presentan pluripotencia. Además de células pluripotentes inducidas por factores de transcripción, se han derivado las denominadas células madre embrionarias de línea germinal (gESC) a partir de células madre de línea germinal de ratón y posiblemente de ser humano sin el uso de embriones. Tanto las células iPS como las gESC son funcionalmente equivalentes o muy similares a las células ES y pueden usarse para formar diversos tipos de células diferenciadas *in vitro*.

**[0010]** Se han implementado células ES de ratón, de mono y de ser humano para la diferenciación retiniana así como células iPS humanas. Para la diferenciación de células para dar RPE, se han desarrollado dos clases diferentes de protocolos. Una se basa en la diferenciación aleatoria de células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas en medios que contienen suero o un sustituto del suero (Vugler A *et al.* Exp Neurol. dic. de 2008; 214(2):347-61; Klimanskaya I *et al.* Cloning Stem Cells. 2004; 6(3):217-45; Buchholz DE *et al.* Stem Cells. oct. de 2009; 27(10):2427-34). La tasa de tales células que se diferencian espontáneamente para dar células del RPE es extremadamente baja, inferior al 1 %. No queda claro el motivo por el cual algunas células se convierten en células del RPE mientras que otras no. Entonces se recogen manualmente los clones de células del RPE y se expanden, un procedimiento que tarda al menos seis semanas, si no más. La otra clase de protocolos comienza mediante la formación de agregados en flotación. Idelson *et al.* (Cell Stem Cell 2009:5, 396-408) dan a conocer un método para dirigir la diferenciación de células madre embrionarias humanas para dar células del RPE funcionales, que emplea nicotinamida y activina A para inducir y aumentar la diferenciación para dar células del RPE. Para la diferenciación, se cultivaron colonias de hESC como agrupaciones en flotación en medio que contenía suero desactivado suplementado con nicotinamida 10 mM en placas de cultivo de 6 pocillos que se trataron previamente con agarosa de bajo punto de fusión al 0,1 %. Se suplementó activina A (20-180 ng/ml) durante la tercera y cuarta semanas para aumentar la aparición de agrupaciones pigmentadas. Para la expansión como monocapa, tras 8 semanas en suspensión, se recopilaron mecánicamente las zonas pigmentadas, se trituraron y se sembraron sobre una placa recubierta con poli-D-lisina y laminina y se cultivaron en medio desactivado + NIC. Este protocolo tarda mucho tiempo en lograr una monocapa típica de células del RPE hexagonales, mientras que el rendimiento y la eficacia son bajos. Tras 4 semanas de cultivo en suspensión con NIC y activina A, el rendimiento de células pigmentadas similares a RPE es de aproximadamente el 10 %. La expansión de la zona pigmentada como monocapa requiere aproximadamente 14 semanas en total.

**[0011]** Meyer *et al.* describen un protocolo que comienza con la flotación de agregados seguido por la siembra en placa para la diferenciación de RPE (Meyer JS *et al.* PNAS 2009:106, 16698-703). Se hicieron crecer las células ES o iPS humanas sin diferenciación como agregados en suspensión en medio que contenía suero desactivado para iniciar la diferenciación. Entonces se cambiaron los agregados a medio de inducción neural libre de suero suplementado con N2. Tras los 6 días iniciales de cultivo en suspensión, se dejó que los agregados se unieran a placas de cultivo recubiertas con laminina. Durante el cultivo adhesivo, se cambió el medio de medio de inducción neural que contenía suplemento de N2 a medio libre de suero suplementado con B27 en el día 16 de diferenciación. En este protocolo, el 25 % de las células alcanzan identidad de RPE (tal como se define mediante tinción con MiTF+) en el día 40. La pureza de células del RPE derivadas de células ES o iPS humanas es baja basándose en este protocolo.

**[0012]** El documento US 2007/0196919 A1 describe métodos para la diferenciación *in vitro* de células progenitoras retinianas humanas a partir de células madre embrionarias mediante las etapas de: a. cultivar células ES para dar cuerpos embrioides en presencia de un cóctel de factores que dirigen la diferenciación hacia un destino neural anterior, b. cultivar dichos cuerpos embrioides en medio de diferenciación retiniana que comprende un antagonista de rutas de señalización de proteínas morfogenéticas óseas (BMP); un antagonista de rutas de señalización de wnt; un agonista de 1GF1R; y una molécula que proporciona actividad de FGF2. Preferiblemente dichos cuerpos embrioides se siembran en placas para adherirse a un sustrato semisólido antes de cultivarse en medio de diferenciación retiniana. El cóctel de factores que dirigen la diferenciación hacia un destino neural anterior comprende un antagonista de rutas de señalización de proteínas morfogenéticas óseas (BMP); un antagonista de rutas de señalización de wnt; y un agonista de 1GF1R, en ausencia de actividad de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) básico.

**[0013]** Sin embargo, el patrón de células retinianas diferenciadas *in vitro* todavía está lejos de la estructura en capas *in vivo* de la retina neural (Osakada F *et al.* Nature Protocols 2009:4, 811-824; Lamba DA *et al.* PNAS 2006:34, 12769-74; Meyer JS *et al.* PNAS 2009:106, 16698-703; Lamba DA *et al.* Plos One 2010:5, e8763).

**[0014]** El documento EP 2 128 244 A1 describe un método de producción de células progenitoras retinianas de primate cultivando células madre embrionarias de primate como agregados en suspensión en un medio libre de

suero y obteniendo células progenitoras retinianas a partir del cultivo. Preferiblemente, el medio libre de suero contiene un inhibidor de señal Nodal y un inhibidor de señal Wnt. Describe además un método de producción de células precursoras de fotorreceptores cultivando células progenitoras retinianas aisladas diferenciadas a partir de células madre embrionarias, en condiciones adhesivas, en presencia de un inhibidor de gamma-secretasa, y obteniendo un precursor de fotorreceptores a partir del cultivo. La eficacia de la generación de células progenitoras retinianas a partir de células ES basada en este método es baja. Menos del 30 % de las células diferenciadas son positivas para los marcadores de células progenitoras retinianas tales como Rx, Pax6 y MiTF. Además, este método tarda mucho tiempo en lograr células del RPE y células precursoras de fotorreceptores (es decir, células Crx<sup>+</sup>). Las células pigmentarias derivadas de células ES humanas obtenidas mediante este método formaron estrechas uniones y tenían las características estructurales del RPE en el día 120. Se observaron células precursoras de fotorreceptores Crx<sup>+</sup> derivadas a partir de células ES humanas en el día 90.

[0015] Osakada F *et al.* (Nat. Biotechnol. 2008:26(2), 215 - 224) dan a conocer que la diferenciación de células del RPE y células fotorreceptoras puede inducirse cultivando células ES de ratón, de mono y de ser humano mediante tratamientos graduales en condiciones definidas. Con células ES humanas, el cultivo en suspensión libre de suero y de células alimentadoras en combinación con Dkk1 y LeftyA indujo la diferenciación de progenitores retinianos Rx+ o MiTF+, que produjeron células del RPE en condiciones adhesivas.

[0016] Lamba *et al.* (PNAS 2006:34, 12769-74) describen un método para la inducción retiniana mediante tratamiento de cuerpos embrioides con una combinación de nogina, Dickkopf-1 e IGF-1. Se cultivaron las hESC en diferenciación como cuerpos embrioides durante 3 días en el medio que contenía tres factores y después se transfirieron a placas de seis pocillos recubiertas con poli-D-lisina-Matrigel a las que se dejó que se unieran. Entonces se mantuvieron las células en presencia de DMEM:F12, suplemento de B27, suplemento de N2, nogina, Dkk-1, IGF-1 y bFGF durante 3 semanas adicionales. Este protocolo se centra principalmente en la diferenciación de hESC para dar células de la retina neural.

[0017] Hirano M *et al.* (Dev. Dyn. 2003:228(4), 664 - 671) describen un sistema de cultivo dependiente de células del estroma PA6 en el que se indujo eficazmente una estructura similar al ojo que consistía en células correspondientes al cristalino, la retina neural y la retina pigmentada, a partir de células madre embrionarias de ratón usando medio que contenía suero suplementado con bFGF, toxina del cólera y dexametasona. Sin embargo, al contrario que el ojo normal compuesto por un cristalino separado y una estructura en capas organizada de tipos de células retinianas individuales, la mayoría de los tipos de células retinianas estaban mezclados dentro de las masas celulares de múltiples capas inducidas a partir de células ES de ratón usando este método. Además, Aoki H *et al.* han demostrado que este método no podía aplicarse para células ES humanas. La eficacia de la generación de células retinianas mediante cultivos conjuntos de células ES humanas y células del estroma PA6 usando los mismos procedimientos fue muy baja y desventajosa para un análisis adicional (Aoki H *et al.* Dev Dyn. sep. de 2009; 238(9):2266-79).

[0018] El documento WO2011055855 A1 (publicado el 12.05.2011) da a conocer un método de inducción de la diferenciación de una célula madre para dar una célula progenitora nerviosa, que comprende: la etapa (1) de formar un agregado homogéneo de células madre en un medio libre de suero; y la etapa (2) de cultivar en suspensión el agregado homogéneo de células madre en presencia de un patrón de referencia de membrana basal.

[0019] En la tabla 1 se resumen los protocolos actualmente publicados para la diferenciación de células madre pluripotentes para dar RPC o RPE:

Tabla 1.

Artículo / documento de patente relacionado	Fuente de células madre	RPE o RPC	Método esencial	Tiempo	Eficacia
Klimanskaya I <i>et al.</i> (Vugler A)	Ser humano, ES	RPE	Diferenciación espontánea, 60 días	60 días	>1 %
Buchholz DE <i>et al.</i>	Ser humano, iPS	RPE	Diferenciación espontánea, 60 días	60 días	>1 %
Idelson <i>et al.</i>	Ser humano, ES	RPE	Flotación de agregados + activina y NIC,	6 semanas	33 %
Hirano <i>et al.</i>	Ratón	RPE	Cultivo conjunto con células PA6	11 días	mezcla con otros tejidos oculares
Meyer JS <i>et al.</i>	Ser humano	RPC, RPE	Flotación de agregados	16 días 40 días	>95 % de Rx+ 25 % de MiTF
Osakada <i>et al.</i> / documento EP 2 128 244 A1	Primate, ES	RPC, RPE	Flotación de agregados, DKK1, Lefty, SB431542, CKI-7	50 días 120 días	31 % de MiTF+ 34 % de ZO1+

Ikeda <i>et al.</i>	Ratón	RPC	Flotación de agregados + Dkk1 y Lefty	7 días	16 % de Rx+
Lamba <i>et al.</i> / documento US2007/0196919	Ser humano, ES	RPC	Flotación de agregados + IGF, Dkk1, nogina	21 días	80 % de Chx10

[0020] En resumen, los procedimientos conocidos para producir células progenitoras retinianas o células del RPE tienen muchas desventajas. Tardan muchas semanas en obtener células diferenciadas y su eficacia es muy baja.

[0021] Por tanto sigue existiendo una necesidad de métodos mejorados de diferenciación de células madre pluripotentes para dar células del RPE.

[0022] Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes para dar células progenitoras retinianas polarizadas, que comprende las etapas de:

a) cultivar colonias de células madre pluripotentes en cultivo celular tridimensional incluido en un gel proteico que comprende al menos tres proteínas seleccionadas del grupo que consiste en laminina, colágeno IV, entactina y perlecano y que comprende al menos dos, preferiblemente al menos tres, lo más preferiblemente al menos cuatro factores de crecimiento seleccionados de agonistas de la ruta de EGF, FGF2, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF-beta seleccionados de EGF, FGF2, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF-beta, hasta que se desarrollan quistes neurales polarizados, que contienen una luz y consisten en células polarizadas, y

b) disociar los quistes neurales polarizados para dar células progenitoras retinianas polarizadas dispersadas.

[0023] Los inventores encontraron sorprendentemente que cultivando colonias de células madre pluripotentes incluidas en un gel proteico podían obtenerse quistes polarizados de células progenitoras retinianas. Ventajosamente, un alto porcentaje de estas células pueden diferenciarse adicionalmente para dar células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) cultivándolas adicionalmente en medio de RPE.

[0024] Otra ventaja de la presente invención en comparación con métodos conocidos es que, dado que todas las células progenitoras retinianas monocelulares obtenidas mediante disociación de los quistes tienen aproximadamente la misma edad, es posible preparar células del RPE que tienen una edad definida.

[0025] Las colonias de células madre pluripotentes que se usan para el método según la invención pueden obtenerse mediante métodos de cultivo conocidos en el estado de la técnica. Las células iPS y células ES humanas crecen como colonias en condiciones adhesivas. Las colonias celulares pueden usarse directamente para el método según la invención. Opcionalmente pueden disociarse parcialmente para dar grupos menores con tratamiento enzimático (por ejemplo, dispasa).

[0026] Los quistes que se obtienen mediante el método según la invención son estructuras altamente organizadas. Contienen una luz, es decir una cavidad llena de líquido dentro del quiste, y consisten en células polarizadas. El lado basal de las células en el quiste está dirigido hacia el exterior del quiste, mientras que el lado apical está dirigido hacia la luz. No deben confundirse con los cuerpos embrioides conocidos a partir del estado de la técnica, que se usan habitualmente para iniciar la diferenciación *in vitro* de hESC/iPSC. Los cuerpos embrioides representan una mezcla de diferentes tipos de células, incluyendo células de diferente origen de capa germinal tal como mesodermo, endodermo y ectodermo. Sin embargo, no están tan organizados, polarizados y definidos como los quistes obtenidos mediante el método según la invención. Durante la formación de cuerpos embrioides, éstos contienen una mezcla de células de diferentes edades y en diferentes fases de desarrollo. Los quistes tampoco deben confundirse con agregados en flotación en cultivo líquido tal como se describen por Idelson *et al.*, Meyer JS *et al.* u Osakada *et al.* Los quistes neurales polarizados se disocian entonces para dar células progenitoras retinianas polarizadas dispersadas mediante medios conocidos. Células progenitoras retinianas polarizadas disociadas o dispersadas significan una preparación o suspensión de células que está compuesta por células individuales o agrupaciones que contienen un máximo de 7, preferiblemente de 2 a 3 células.

[0027] Por consiguiente, la presente invención también proporciona un método para diferenciar las células progenitoras retinianas polarizadas para dar células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) cultivando las células individuales que se obtienen mediante disociación de los quistes neurales polarizados en cultivo celular bidimensional, preferiblemente en pocillos recubiertos, usando un medio de cultivo que se suplementa con activina A.

[0028] En el presente contexto, el término "cultivo celular" se refiere a cualquier cultivo *in vitro* de células. Dentro de este término se incluyen líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas) y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*, incluyendo ovocitos y embriones no humanos.

[0029] Tal como se usa en el presente documento, se pretende que "cultivo celular bidimensional" indique cultivo bidimensional (2D) convencional en el que se cultivan células adherentes en una monocapa sobre una superficie bidimensional.

[0030] Tal como se usa en el presente documento, se pretende que "cultivo celular tridimensional" indique un modelo de cultivo tisular que imita la arquitectura tisular *in vivo* mediante cultivo de células incluidas en un gel proteico que imita a una matriz extracelular.

[0031] Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "gel proteico" indique una estructura de hidrogel compuesta por una red de proteínas, preferiblemente proteínas fibrosas, que están dispersadas en un disolvente acuoso, preferiblemente un medio de cultivo celular adecuado. En el gel proteico, pueden estar presentes componentes proteicos y no proteicos adicionales, tales como factores de crecimiento o polisacáridos tales como

glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparano, heparina, hialuronano, sulfato de queratano, sulfato de dermatano, sulfato de condroitina).

**[0032]** Los materiales de partida para el método según la invención son células madre pluripotentes. Las células madre pluripotentes son preferiblemente de vertebrados, en particular de mamíferos, preferiblemente de origen de ser humano, de primate o de roedor. Se seleccionan células pluripotentes preferidas de células madre embrionarias no obtenidas mediante la destrucción de embriones humanos, células madre pluripotentes inducidas, células madre derivadas del líquido amniótico o células madre derivadas de fetos, en particular células germinales embrionarias derivadas de fetos, células madre de línea germinal (en particular de los testículos) y células madre somáticas pluripotentes.

**[0033]** Las posibles fuentes de células pluripotentes incluyen células madre obtenidas a partir del amnios y/o la sangre del cordón umbilical, gESC, es decir células similares a células madre embrionarias derivadas de los testículos (Kanatsu-Shinohara M *et al.* Ann N Y Acad Sci. dic de 2007; 1120:59-71; Conrad S *et al.* Nature. 20 de nov. de 2008; 456(7220):344-9; Guan K *et al.* Nature Protocolos. 2009; 4(2):143-54) y células madre muy pequeñas similares a las embrionarias (VSEL) (Kucia M *et al.* Leukemia. mayo de 2006; 20(5):857-69).

**[0034]** Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "célula madre pluripotente" o "célula pluripotente" indique una célula que tiene preferiblemente el potencial para diferenciarse para dar cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, sistema genitourinario) o al menos el ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Por tanto, preferiblemente las células madre pluripotentes pueden dar lugar a cualquier tipo de célula fetal o adulta. Para llevar a cabo la invención es importante que las células madre usadas tengan la capacidad para formar células del ectodermo y en particular para formar células del sistema nervioso.

**[0035]** El término "células pluripotentes" puede incluir células totipotentes, es decir células que pueden dividirse y producir todas las células diferenciadas en un organismo, incluyendo tejidos extraembrionarios. Sin embargo, por motivos éticos, se excluyen las células totipotentes que se derivan de fuentes humanas, en particular de embriones humanos.

**[0036]** Las células madre pluripotentes preferidas se caracterizan por la expresión de los siguientes marcadores moleculares: Oct-4, Nanog, KLF4, ESRRB, TDGF1 (también conocido como CRIPTO), Sox2 y c-Myc (también conocido como MYC). Un ejemplo preferido de células madre pluripotentes son células madre embrionarias (células ES) no obtenidas mediante la destrucción de embriones humanos. La invención tal como se define por las reivindicaciones no implica la destrucción de embriones humanos. Preferiblemente, las células ES se derivan de mamíferos, más preferiblemente de ratones, ratas, conejos, cobayas, cabras, cerdos, vacas, monos y seres humanos. Se prefieren células ES humanas no obtenidas mediante la destrucción de embriones humanos y células ES murinas o derivadas de rata. La invención no implica el uso de embriones humanos para fines industriales o comerciales. Otro ejemplo preferido de células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "célula iPS" o "célula madre pluripotente inducida" indique células pluripotentes similares a células madre que se derivan de células somáticas reprogramadas (véase, por ejemplo, Takahashi K. *et al.* Cell 2007:131, 861-872; Yu J *et al.* Science 2007:318, 1917-1920; Feng, B *et al.* Cell Stem Cell 2009:4, 301-312), preferiblemente derivadas de un organismo desarrollado, tales como fibroblastos adultos.

**[0037]** En muchos aspectos, las células madre pluripotentes inducidas presentan las mismas propiedades que las células madre pluripotentes naturales, tales como la expresión de determinados genes y proteínas de células madre, patrones de metilación de cromatina, tiempo de duplicación, formación de cuerpos embrioides, formación de teratomas, formación de quimeras viables, y potencia y capacidad de diferenciación.

**[0038]** La transformación de células no pluripotentes en células pluripotentes se logra o bien induciendo una expresión "forzada" de determinados genes asociados a células madre en la célula respectiva o bien exponiendo las células con las proteínas asociadas a células madre correspondientes, preferiblemente canalizando las proteínas al interior de las células. La transfección se logra normalmente mediante vectores virales, tales como retrovirus, adenovirus o lentivirus, o mediante vectores episómicos. Preferiblemente, se transfectan las células con genes asociados a células madre seleccionados de uno o varios (preferiblemente de 3 a 4) reguladores maestros de la transcripción seleccionados del grupo que consiste en Oct-3/4, Sox1, Sox2, Sox3, Sox15, Sox18, c-Myc, N-myc, L-myc, Nanog, LIN28, Klf1, Klf2, Klf4 y Klf5, más preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en Oct-3/4, Nanog, c-myc y Sox2. Alternativamente, se exponen las células a las proteínas correspondientes.

**[0039]** Preferiblemente, se retiran oncogenes tales como c-myc tras la inducción de pluripotencia, aumentando así el posible uso de células iPS en enfermedades de seres humanos. Incluso más preferiblemente, las células iPS usadas en el método según la invención son las denominadas piPS (células madre pluripotentes inducidas por proteínas), es decir, se generan mediante un tratamiento repetido de las células con proteínas asociadas a células madre, preferiblemente canalizadas al interior de las células mediante elementos de anclaje de poli-arginina (Zhou H. *et al.* Cell Stem Cell, volumen 4, número 5, 2009:381-384) o fusionándolas con otros péptidos de penetración celular (CPP). La generación de células iPS puede ayudarse mediante el uso de inhibidores o activadores farmacológicos de determinadas rutas.

**[0040]** Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "células progenitoras retinianas" indique células progenitoras que tienen la capacidad para diferenciarse para dar o bien células del RPE, células de la retina neural, células del margen ciliar, células del epitelio pigmentario ciliar o bien células del tallo óptico dorsal y ventral.

**[0041]** Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "células progenitoras retinianas"

polarizadas” indique células progenitoras que tienen la capacidad para diferenciarse para dar o bien células del RPE o bien otras células del linaje retiniano, células del margen ciliar, células del epitelio pigmentario ciliar o células del tallo óptico dorsal y ventral y muestran una polaridad apical-basal que es una de las caracterizaciones clave de células epiteliales. Las células progenitoras retinianas polarizadas son positivas para la expresión de al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente cuatro, de los siguientes genes marcadores Rx, Pax6, Six3, ET, Lhx2, tll, Optx2, Otx2, MiTF, Chx10, ZO1, prominina 1 y cadherina-C, y negativas para la expresión de al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente cuatro, de los siguientes genes marcadores En1, Krox20, Gbx2, Hoxb1, Hoxc5 y Hoxc8.

**[0042]** Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “células del epitelio pigmentado retiniano (RPE)” indique la capa celular pigmentada justo en el exterior de la retina neural, y están firmemente unidas a la coroides subyacente y a las células visuales retinianas suprayacentes. Las células del RPE son positivas para la expresión de al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente cuatro, de los siguientes genes marcadores Pax6, MiTF, RPE65, bestrofina, CRALBP, PEDF y Z01 y negativas para la expresión de al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente cuatro, de los siguientes genes marcadores tubulina  $\beta$ 111, NeuN, Chx10, Brn3a, recoverina, rodopsina, calbindina y calretinina.

**[0043]** Se obtienen células madre pluripotentes inducidas preferidas mediante reprogramación de fibroblastos, células neurales, ectodérmicas y/o del folículo piloso. Preferiblemente se usan células iPS a partir de líneas de células iPS establecidas. Se seleccionan líneas de células iPS establecidas preferidas a partir de la siguiente lista (tabla tomada de Hu BY *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2 de marzo de 2010; 107(9):4335-40):

Líneas de IPS	Fuentes	N.º de cat.	Naturaleza	Edad	Sexo	Factores	Métodos	Teratoma	Ref.
IPS(IMR90)-1	IMR-90	ATCC-CCL-188	Fibroblasto de pulmón	16 semanas	M	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28	Lentivirus	Si	1
IPS(IMR90)-4	IMR-90	ATCC-CCCL-188	Fibroblasto de pulmón	16 semanas	M	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28	Lentivirus	Si	1
IPS-M4-10	CCD-1090Sk	ATCC-CRL-2106	Fibroblasto de piel	46 años	M	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28	Lentivirus	Si	2
IPS-M4-8	CCD-1090Sk	ATCC-CRL-2106	Fibroblasto de piel	46 años	M	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28	Lentivirus	Si	2
IPS-M3-6	CCD-1090Sk	ATCC-CRL-2106	Fibroblasto de piel	46 años	M	OCT4, SOX2, NANOG	Lentivirus	Si	2
IPS-DF6-9_9	CCD-1079Sk	ATCC-CRL-2097	Fibroblasto de piel	Recién nacido	H	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, KLF4	Vectores episómicos	Si	3
IPS-DF6-9_12	CCD-1079Sk	ATCC-CRL-2097	Fibroblasto de piel	Recién nacido	H	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, KLF4	Vectores episómicos	Si	3
IPS-DF19-9_11	CCD-1079Sk	ATCC-CRL-2097	Fibroblasto de piel	Recién nacido	H	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, KLF4	Vectores episómicos	Si	3
IPS-DF19-9_19	CCD-1079Sk	ATCC-CRL-2097	Fibroblasto de piel	Recién nacido	H	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, KLF4	Vectores episómicos	Si	3
IPS-DF4-3_7	CCD-1079Sk	ATCC-CRL-2097	Fibroblasto de piel	Recién nacido	H	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, KLF4	Vectores episómicos	Si	3
IPS-108	Coriell	GM03814	Fibroblasto	Adulto	M	OCT4, SOX2, c-Myc, KLF4	Retrovirus	NA	
IPS-109	Coriell	GM03814	Fibroblasto	Adulto	M	OCT4, SOX2, c-Myc, KLF4	Retrovirus	NA	

Bibliografía (1-3):

1. Yu J, et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
2. Choi KD, et al. (2009) Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27:559-567.
3. Yu J, et al. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324:797-801.

**[0044]** En la invención pueden usarse células ES de líneas de células ES establecidas no humanas. Se seleccionan líneas de células ES establecidas preferidas de la siguiente lista:

Designación	Proveedor	Organismo
ES-C57BU6	ATCC SCRC-1002	<i>Mus musculus</i> (ratón)
J1	ATCC SCRC-1010	<i>Mus musculus</i> (ratón)
R1	ATCC SCRC-1011	<i>Mus musculus</i> (ratón)
RW.4	ATCC SCRC-1018	<i>Mus musculus</i> (ratón)
B6/BLU	ATCC SCRC-1019	<i>Mus musculus</i> (ratón)
SCC#10	ATCC SCRC-1020	<i>Mus musculus</i> (ratón)
EDJ#22	ATCC SCRC-1021	<i>Mus musculus</i> (ratón)
AB2.2	ATCC SCRC-1023	<i>Mus musculus</i> (ratón)
Ainv15	ATCC SCRC-1029	<i>Mus musculus</i> (ratón)
7AC5/EYFP	ATCC SCRC-1033	<i>Mus musculus</i> (ratón)
R1/E	ATCC SCRC-1036	<i>Mus musculus</i> (ratón)
G-Olig2	ATCC SCRC-1037	<i>Mus musculus</i> (ratón)
CE-1	ATCC SCRC-1038	<i>Mus musculus</i> (ratón)
CE3	ATCC SCRC-1039	<i>Mus musculus</i> (ratón)

5 **[0045]** Ejemplos de referencia para células ES establecidas humanas son:

Designación	Proveedor	Organismo
hESC BG01V	ATCC SCRC-2002	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
SCED 461	Cellartis, Gotemburgo, SE	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
SA01 (SA001)	WiCell, Cellartis, Gotemburgo, SE	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
SA02 (SA002)	WiCell, Cellartis, Gotemburgo, SE	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
ES01 (HES-1)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
ES02 (HES-2)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
ES03 (HES-3)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
ES04 (HES-4)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
ES05 (HES-5)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
ES06 (HES-6)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
BG01 (BGN-01)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
BG02 (BGN-02)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
BG03 (BGN-03)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
TE03 (I3)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
TE04 (I4)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
TE06 (I6)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
UC01 (HSF1)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
UC06 (HSF6)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
WA01 (H1)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
WA07 (H7)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
WA09 (H9)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
WA13 (H13)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
WA14 (H14)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
iPS - DF19 - 9	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
iPS - DF4 - 3	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
iPS - DF6 - 9	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
iPS (prepucio)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
iPS (IMR90)	WiCell, ESI	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
MEL - 1	Millipore	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)
MEL - 2	Millipore	<i>Homo sapiens</i> (ser humano)

ATCC = Colección americana de cultivos tipo, VA, EE. UU.  
 ESI = ES cell International PtE Ltd, Singapur  
 WiCell = WiCell Research Institute, Madison, WI, EE. UU. Líneas de células madre embrionarias humanas  
 Millipore = Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, EE. UU.

**[0046]** Pueden obtenerse líneas de células ES humanas establecidas adicionales (ejemplos de referencia, por ejemplo tal como se describe en Cowan, C.A. *et al*, (New England Journal of Medicine. 2004. 350; 13 y sig.) a partir de la colección de células madre embrionarias humanas (HUES), HUES Facility / Melton Laboratory / HHMI Harvard University Cambridge, MA 02138, EE. UU. y el WiCell Research Institute, Madison, WI, EE. UU.

**[0047]** En Loeser P *et al*. Stem Cells 2010; 28:240-246) y datos complementarios se facilita un resumen de las líneas de células ES humanas actualmente disponibles (ejemplos de referencia).

[0048] Un ejemplo de referencia para una línea de células ES humanas es H9 (WA09). Para la diferenciación neural, se disocian parcialmente colonias de células pluripotentes para dar grupos con enzimas adecuadas tales como colagenasa o dispasa, si es necesario. El diámetro de los grupos de células está preferiblemente en el intervalo de 20-200  $\mu\text{m}$ , se prefieren particularmente grupos de células con un diámetro en el intervalo de 50-100  $\mu\text{m}$ . Los grupos de células se lavan preferiblemente una vez con medio de cultivo celular.

[0049] Preferiblemente se incluyen entre  $2 \times 10^5$  y  $10 \times 10^5$ , más preferiblemente de  $3 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  células en un volumen de 100 a 1000  $\mu\text{l}$ , preferiblemente de 200 a 500  $\mu\text{l}$ , más preferiblemente de 250 a 350  $\mu\text{l}$  de un gel proteico.

[0050] El gel proteico está compuesto por al menos dos, preferiblemente al menos tres proteínas seleccionadas del grupo que consiste en laminina, colágeno IV, entactina y perlecano. Preferiblemente, el gel proteico está compuesto por proteínas de la matriz extracelular, más preferiblemente proteínas de la membrana basal. Incluso más preferiblemente se usa como gel proteico Matrigel, una mezcla de proteínas gelatinosas comercialmente disponible secretada por células de sarcoma de ratón Engelbret-Holm-Swarm (EHS). Matrigel es una mezcla de proteínas gelatinosas que se asemeja al complejo entorno extracelular encontrado en muchos tejidos y lo usan los biólogos celulares como sustrato para el cultivo celular, especialmente como sustrato de unión en cultivo de células madre embrionarias, para mantener el estado pluripotente, no diferenciado, de células madre embrionarias en ausencia de células alimentadoras.

[0051] El gel proteico comprende además al menos dos, preferiblemente tres, lo más preferiblemente cuatro, factores de crecimiento seleccionados de agonistas de las rutas de EGF, FGF2, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF-beta seleccionados de EGF, FGF2, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF-beta. Un componente preferido particular es IGF-1. Entonces se siembra en placas el gel proteico en el que se incluyen los grupos de células pluripotentes como capa de gel de aproximadamente 0,5 a 5 mm, preferiblemente de 1 a 2 mm de grosor sobre placas.

[0052] Tras dejar que gelifique el gel proteico, se añade a la placa un medio de cultivo celular adecuado para la diferenciación neural denominado adicionalmente medio de diferenciación neural o NDM. El medio de diferenciación neural es preferiblemente un medio esencialmente libre de suero que contiene al menos dos, preferiblemente al menos tres, componentes seleccionados del grupo que consiste en insulina, transferrina, progesterona, putrescina y una sal de selenito, más preferiblemente al menos transferrina e insulina. Las proteínas son preferiblemente proteínas nativas aisladas o se producen de manera recombinante. Ejemplos preferidos de NDM son medios de cultivo celular que contienen un suplemento seleccionado del grupo que consiste en N2, B27, N2B27 y/o G5.

[0053] Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "esencialmente libre de suero" indique un medio que comprende suero a menos del, o igual al, 2 %, preferiblemente suero a menos del, o igual al, 1 %, más preferiblemente suero a menos del, o igual al, 0,5 %, y todavía más preferiblemente nada de suero.

[0054] Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "medio que contiene suero" indique un medio que comprende suero a al menos el 5 %, preferiblemente suero a aproximadamente del 5 % al 15 %, pero posiblemente más, por ejemplo al 20 % o más.

[0055] Ventajosamente, el medio libre de suero o medio esencialmente libre de suero no requiere la adición de un inhibidor de señal Nodal (como Dkk), un inhibidor de señal Wnt (como Lefty) y un inhibidor de señal de BMP (como nogina) ni otros factores especiales tales como ácido retinoico, taurina y nicotinamida.

[0056] Las células pluripotentes se cultivan durante de 4 a 7, preferiblemente de 5 a 6 días, hasta que forman quistes neurales polarizados que consisten en células progenitoras neurales polarizadas.

[0057] En comparación con protocolos conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, tal como se da a conocer en Lamba *et al*), el método según la invención usa cultivo celular tridimensional en una matriz de gel proteico para inducir polaridad celular y por tanto da ventajosamente como resultado un alto porcentaje de progenitores retinianos polarizados tras tan sólo de 4 a 7 días de diferenciación.

[0058] En esta fase, la gran mayoría de las células expresan conjuntamente Rx y Pax6. La expresión de prominina 1 y ZO-1 se restringe al lado apical de los quistes. La polaridad celular se confirma mediante migración nuclear intercinética, es decir, el movimiento apical-basal de núcleos en fase con el ciclo celular, que es una característica polarizada importante de diferentes tipos de células que surgen durante el neurodesarrollo, tales como células neuroepiteliales, células de la glía radial o progenitores basales.

[0059] Para la diferenciación para dar células del epitelio pigmentario retiniano (RPE), se sacan los quistes neurales polarizados del gel proteico mediante incubación con disolución de recuperación de células sobre hielo. Preferiblemente, se lavan una vez o varias veces en el medio de cultivo.

[0060] Entonces se disocian los quistes neurales polarizados para dar células individuales. En el contexto de la presente invención, se pretende que el término "células dispersadas" no sólo indique células individuales, sino que también incluya agrupaciones de hasta siete, más preferiblemente hasta cinco, incluso más preferiblemente hasta tres células. En el estado de la técnica se conocen métodos para disociar quistes neurales. Por ejemplo, la incubación con enzimas tales como TrypLE, tripsina (EDTA), Accutase, dispasa o colagenasa opcionalmente en combinación con volteo del recipiente, el pipeteo de la suspensión celular, el paso de la suspensión celular a través de un tamiz celular, son métodos que pueden usarse para obtener células individuales.

[0061] En comparación con métodos conocidos en el estado de la técnica (véase la tabla 1), el método según la invención proporciona ventajosamente de manera satisfactoria la diferenciación con un alto porcentaje de células para dar células progenitoras retinianas. Tras tan sólo 5 días de cultivo en cultivo celular tridimensional más del 90 % de las células expresan conjuntamente Rx y Pax6.

[0062] Para obtener células del RPE, se siembran las células progenitoras retinianas obtenidas mediante las etapas descritas anteriormente sobre placas, preferiblemente filtros Transwell, que preferiblemente se recubren previamente con un gel proteico, tal como gelatina, laminina, poli-D-lisina, explante de membrana de Bruch o fibronectina.

- 5 **[0063]** Más preferiblemente, dicho gel proteico usado para recubrir previamente los pocillos se somete a reducción de factores de crecimiento, es decir, se reduce la concentración de factores de crecimiento dentro del gel en comparación con la mezcla de proteínas en su estado original, o carece completamente de factores de crecimiento. Incluso más preferiblemente se recubren previamente las placas con Matrigel sometido a reducción de factores de crecimiento.
- 10 **[0064]** En una realización preferida de la invención, se siembran en placa las células progenitoras retinianas disociadas sobre un soporte o membrana microporosa permeable, preferiblemente de poliéster y/o policarbonato, que puede colocarse en una placa o un pocillo que contiene medio de cultivo celular, dejando que las células se unan a un soporte mientras están rodeadas por medio, permitiendo el crecimiento de células polarizadas. Preferiblemente, se recubre la membrana microporosa permeable con un gel proteico, preferiblemente Matrigel sometido a reducción de factores de crecimiento.
- 15 **[0065]** Preferiblemente, se siembran en placa las células progenitoras retinianas con una densidad de  $1 \times 10^5$  a  $6 \times 10^5$  células/ $0,3 \text{ cm}^2$  (área de crecimiento celular), más preferiblemente de  $2 \times 10^5$  a  $4 \times 10^5$  células/ $0,3 \text{ cm}^2$  (área de crecimiento celular).
- 20 **[0066]** Preferiblemente, se hacen crecer las células progenitoras retinianas en NDM durante aproximadamente un día más para dejar que las células se adapten al nuevo entorno.
- 25 **[0067]** Posteriormente, se cultivan las células unidas en un medio adecuado para mantener las células del RPE en cultivo que se suplementa con activina A durante de 10 días a 4 semanas adicionales para obtener células del RPE. El medio que es adecuado para mantener células del RPE en cultivo y que además se denomina medio de RPE (RPEM) es preferiblemente un medio esencialmente libre de suero que se suplementa con sustitución de suero o un medio basal, tal como DMEM, que se suplementa con un porcentaje menor (preferiblemente del 1 al 2 % en volumen) de suero/FBS desactivado o DMEM/F12 suplementado con B27.
- 30 **[0068]** Preferiblemente, dicho RPEM se suplementa con activina A humana de 10 a 1000 ng/ml, más preferiblemente de 20 a 500 ng/ml, incluso más preferiblemente de 50 a 200 ng/ml. Preferiblemente el RPEM se cambia regularmente.
- 35 **[0069]** Cuando aparece el primer signo de pigmentación, puede extraerse la activina A.
- 40 **[0070]** Las células del RPE obtenidas según el método de la invención se caracterizan por la expresión de los genes marcadores Pax6, MiTF, ZO-1, bestrofina y RPE-65. Además son negativas para la expresión del marcador de células progenitoras de la retina neural, Chx10.
- 45 **[0071]** Al contrario que los protocolos conocidos en el estado de la técnica (véase la tabla 1), el método según la invención proporciona ventajosamente una gran mayoría de células del RPE a las 4 semanas observándose la primera pigmentación a los 18 días.
- 50 **[0072]** Las RPC y/o células del RPE obtenidas mediante el método según la invención son particularmente adecuadas para su uso en la selección, especialmente selección de alto rendimiento, de compuestos candidatos que modifican el destino, crecimiento, diferenciación y función de RPC y/o células del RPE. Con este fin se ponen en contacto las RPC y/o células del RPE con una biblioteca de compuestos candidatos y se determina su respuesta, tal como expresión o regulación por disminución de uno o más genes, mediante métodos conocidos en la técnica tales como inmunofluorescencia, análisis de microalineamientos o citometría de flujo en combinación con constructos indicadores adecuados.
- 55 **[0073]** Por tanto, las RPC y/o células del RPE pueden usarse para seleccionar compuestos candidatos que modulan el destino, crecimiento, diferenciación y función de RPC y/o células del RPE. Esto se lleva a cabo poniendo en contacto una célula con un compuesto candidato y detectando la expresión o actividad de un determinado gen o proteína, en el que una alteración de la expresión o actividad de ese gen o proteína en comparación con un control indica que dicho compuesto candidato es un compuesto que modula el destino, crecimiento, diferenciación y función de RPC y/o células del RPE.
- 60 **[0074]** La detección de una respuesta de una RPC y/o célula del RPE puede incluir detectar dinámicas de membrana tales como secreción, endocitosis/fagocitosis o transcitosis, transporte de iones, detectar un ácido nucleico y ribonucleico, preferiblemente mediante hibridación de ácido nucleico, detectar una proteína, su ubicación o detectar interacción entre dos o más proteínas en la que un aumento o disminución de dicha interacción, en comparación con un control, indica que dicho compuesto candidato modula el destino celular, crecimiento, diferenciación y función de RPC y/o células del RPE.
- 65 **[0075]** Los ejemplos de ensayos de hibridación de ácido nucleico útiles en el método de selección incluyen una transferencia de tipo Northern, una transferencia de tipo Southern, una hibridación de alineamientos, una cromatografía por afinidad y una hibridación *in situ*.
- [0076]** La detección de una proteína en el método de selección puede lograrse uniendo una proteína con una etiqueta detectable. Los ejemplos de ensayos basados en proteínas útiles en el método de selección incluyen electroforesis capilar, una inmunotransferencia de tipo Western, espectrometría de masas, ELISA, inmunocromatografía e inmunocitoquímica.
- [0077]** Preferiblemente, el control empleado en los métodos de selección incluye una célula que se pone en contacto con el compuesto candidato a una concentración inferior o una célula que no se pone en contacto con el compuesto candidato.
- [0078]** La detección de una interacción de proteínas se lleva a cabo detectando la unión específica de dicho compuesto candidato con uno o más de dichos componentes. Los ejemplos de ensayos que pueden emplearse en el método de selección incluyen un sistema de dos híbridos y un ensayo de desplazamiento en gel.
- [0079]** Además las RPC y/o células del RPE obtenidas mediante el método según la invención serán útiles para

preparar RPC y/o células del RPE a partir de células iPS derivadas de pacientes con formas genéticas de diversas enfermedades de la retina para modelar la enfermedad *in vitro* y seleccionar sustancias que previenen o revierten la degeneración celular. El método según la invención también puede usarse para generar RPC y/o células del RPE mutantes modificando genéticamente las células madre pluripotentes iniciales y sometiendo al método según la invención. Las RPC y/o células del RPE modificadas genéticamente así obtenidas son útiles para investigar y dilucidar la función del gen modificado respectivo.

[0080] Otro objeto de la invención es el uso de un gel proteico que comprende al menos dos, preferiblemente al menos tres, componentes seleccionados del grupo que consiste en laminina, colágeno IV, entactina y perlecano y que comprende al menos dos, preferiblemente tres, lo más preferiblemente cuatro, factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en EGF, FGF2, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF-beta, para diferenciar células pluripotentes para dar quistes neurales polarizados que comprenden células progenitoras retinianas polarizadas en un método según la invención.

[0081] Preferiblemente la invención combina el uso de una matriz 3-D y cultivo 2-D sobre membranas de filtro para diferenciar células pluripotentes para dar células del RPE.

[0082] Las células obtenidas son particularmente adecuadas para su uso en trasplante en la generación de tejido para trasplante.

[0083] Las células del RPE obtenidas mediante el método según la invención pueden usarse para el trasplante subretiniano para prevenir y/o limitar la progresión de la degeneración de la retina y para conservar y/o mejorar la función visual.

[0084] Ahora se ilustrará la invención mediante el siguiente ejemplo de referencia, con referencia a las figuras, en las que:

La figura 1 muestra el linaje celular de células del RPE.

La figura 2 muestra la formación de quistes a partir de grupos de células ES humanas cultivadas en el modelo de diferenciación tridimensional durante 5 días. La luz dentro de los quistes es claramente visible.

La figura 3 demuestra que los quistes derivados de células ES humanas son progenitores neurales polarizados. **(A)** Los quistes derivados de células ES humanas en el día 1 expresaron marcadores de progenitores neurales nestina y Sox2. Proliferina 1 sólo se expresó en el lado apical de los quistes lo que indica polaridad celular. **(B)** La expresión del marcador neuroectodérmico Pax6 se expresa fuertemente en quistes en el día 5. **(C)** La migración nuclear intercinética confirmó la polaridad celular dentro de los quistes derivados de células ES humanas. Las células en fase M se marcaron con PH3. Las células en fase S se marcaron con EdU. EdU es un análogo de timidina que reacciona con un fluoróforo para su visualización. La fase M se produjo en el lado apical de los quistes y la fase S en el lado basolateral.

La figura 4 muestra que una gran mayoría de los quistes derivados de células ES humanas estaban entrando en, y mantenían, identidad de campo ocular. **(A)** Inmuntinción de marcadores de progenitores retinianos. **(B)** Porcentaje de células positivas para marcadores retinianos mediante inmuntinción. Tras 5 días de diferenciación en el modelo tridimensional, más del 90 % de las células expresaron conjuntamente genes de campo ocular Otx2, Pax6 y Rx. En el día 15, aproximadamente el 60 % de las células expresaron el marcador específico de células progenitoras de la retina neural Chx10.

La figura 5 ilustra que la mayoría de las células se pigmentaron sobre filtros Transwell con tratamiento con activina A a una determinada densidad celular. Una densidad celular demasiado alta provocó agrupaciones pigmentadas regionales. Una densidad celular demasiado baja provocó muerte celular tras el tratamiento con activina A.

La figura 6 muestra la expresión de Pax6, MiTF y Chx10 en células del RPE inmaduras derivadas de células ES humanas. La pigmentación se observó por primera vez aproximadamente 18 días tras la diferenciación inicial de células ES humanas. Durante la diferenciación, Pax6 se expresó de manera estable. La expresión del factor de transcripción específico de RPE, MiTF, aumentó progresivamente. El factor de transcripción específico de la retina neural, Chx10, estaba regulado por disminución en células pigmentadas. Las células positivas para MiTF fueron exclusivamente negativas para Chx10.

La figura 7 contiene una caracterización de células del RPE derivadas de células ES humanas más maduras. A. Las células del RPE derivadas de células ES humanas pigmentadas tienen una forma poligonal. B. Inmuntinción de ZO1, RPE65 y bestrofina en secciones de 10 µm de células del RPE derivadas de células ES humanas. RPE65 y bestrofina se localizaron principalmente en el lado basal de las células.

La figura 8 muestra un análisis con microscopio electrónico de células del RPE derivadas de células ES humanas. Las microvellosidades fueron abundantes en el lado apical de las células. Los gránulos de melanina en diferentes fases de maduración estaban en la mitad apical de las células con los núcleos ubicados en la mitad basal de las células.

La figura 9 y la figura 10 demuestran la baja eficacia de formación de quistes a partir de hESC en colágeno I. La figura 9 muestra una imagen de contraste de fases que muestra que grupos de hESC formaron de manera ineficaz quistes en colágeno I (1,8 mg/ml) tras 5 días de diferenciación. Muchos grupos de células no pudieron formar quistes (flechas). La figura 10 muestra imágenes fluorescentes de pocos quistes formados inmunorreactivos tanto con Pax6 como con ZO-1 tras 5 días de diferenciación en colágeno I.

Ejemplo de referencia – Protocolo experimental

Cultivo de células ES humanas sin diferenciar

**[0085]** Se mantuvieron las células madre embrionarias (ES) humanas, H9, en medio mTeSRTM1 (StemCell Technologies) a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % y se sometieron a pase con dispasa (StemCell Technologies). Para mejorar la supervivencia celular durante los pases, se añadió el inhibidor de Rho cinasa, Y-27632 (Calbiochem), en los medios de cultivo durante las primeras 24 h tras la siembra en placas. Para el almacenamiento, se suspendieron las colonias de células ES humanas en mFreSRTM (Stem Cell Technologies), se congelaron en un recipiente de congelación con isopropanol a -80 °C durante la noche y se transfirieron a nitrógeno líquido al día siguiente.

**[0086]** Diferenciación neural de células ES humanas en un modelo tridimensional (3D):

Para la diferenciación neural, se disociaron parcialmente colonias de células ES humanas para dar grupos con dispasa. El diámetro de los grupos de células estaba en el intervalo de 50-100 µm. Se lavaron los grupos de células ES humanas una vez con medio N2B27 y se sedimentaron mediante centrifugación (700 g, 3 min). Se resuspendieron aproximadamente 8X10<sup>5</sup> células en 30 µl de medio N2B27 y se incluyeron en 300 µl de Matrigel (BD). Se sembró en el Matrigel enfriado con hielo que contenía grupos de células ES humanas como capa de gel de aproximadamente 1 mm de grosor sobre placas. Se dejó gelificar el Matrigel a 37 °C durante 10 min seguido por la adición de medio N2B27 en cada placa. Se incubaron las células en una incubadora humidificada a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, durante cinco días para formar quistes neurales polarizados (figura 2).

**[0087]** Diferenciación adicional para dar células del RPE sobre filtros Transwell:

Para la determinación del epitelio pigmentario retiniano (RPE), se sacaron los quistes neurales polarizados del Matrigel usando disolución de recuperación de células (BD) y se lavaron en PBS una vez tras 5 días de diferenciación en el Matrigel. Para deshacerse de las pocas células que no eran quistes, se permitió que los quistes grandes se hundieran al fondo del tubo por gravedad en lugar de centrifugación. Entonces se usó TrypLE (Gibco) para disociar los quistes derivados de células ES humanas para dar células individuales mediante incubación en un baño de agua a 37 °C durante 4 min con volteo frecuente. Se pipetearon suavemente las células para obtener células individuales, seguido por centrifugación (1000 g, 2 min), resuspensión en medio N2B27 y paso a través de un tamiz celular de 40 µm (BD) para obtener una suspensión de células individuales. Se sedimentaron una vez más las células disociadas mediante centrifugación y se sembraron sobre placas Transwell® de 6,5 mm con inserto de membrana de poliéster de 0,4 µm de poro (Corning Costar) recubiertas con Matrigel sometido a reducción de factores de crecimiento (BD) en medio N2B27 a una densidad de 2-4X10<sup>5</sup> células/pocillo.

**[0088]** En el día 6, se lavaron las células unidas dos veces con medio de RPE y se mantuvieron en medio de RPE con activina A humana 100 ng/ml (Peprotech). Se cambió el medio cada 3 días.

#### Medios:

##### Medio N2B27

###### [0089]

200 ml de medio neurobasal (Gibco)

200 ml de medio DMEM/F12 (Gibco)

4 ml de suplemento de B27 (Gibco)

2 ml de suplemento de N-2

400 µl de β-mercaptoetanol (concentración final de 0,1 mM)

1 ml de glutamato (concentración final de 0,2 mM)

N2B27 debe almacenarse a 4 °C y usarse dentro del plazo de 1 semana.

##### Suplemento de N2 (100X)

###### [0090]

625 µl de disolución madre de insulina

500 µl de disolución madre de apo-transferrina

335 µl de disolución madre de BSA

16,5 µl de disolución madre de progesterona

50 µl de disolución madre de putrescina

5 µl de disolución madre de selenito de sodio

3,468 ml de medio DMEM/F12 (Gibco)

**[0091]** Los lotes de suplemento de N2 pueden almacenarse en alícuotas a -20 °C durante no más de 3 semanas.

Disolución madre de insulina (25 mg/ml, Sigma): disolver 100 mg/4 ml de HCl estéril 0,01 M. La insulina debe resuspenderse durante la noche a 4 °C.

Disolución madre de apo-transferrina (100 mg/ml, Sigma): disolver 500 mg/5 ml de H<sub>2</sub>O estéril.

Disolución madre de BSA (75 mg/ml): disolver en PBS estéril.

Disolución madre de progesterona (0,6 mg/ml, Sigma): disolver 6 mg/10 ml de etanol y filtrarlo.

Disolución madre de putrescina (160 mg/ml, Sigma): disolver 1,6 g/10 ml de H<sub>2</sub>O y filtrarlo.

Disolución madre de selenito de sodio (3 mM, Sigma): disolver 2,59 mg/5 ml de H<sub>2</sub>O y filtrarlo.

**[0092]** Las disoluciones madre se almacenan a -20 °C.

##### Medio de RPE

**[0093]**

200 ml de DMEM+GlutaMax™-1 (Gibco)

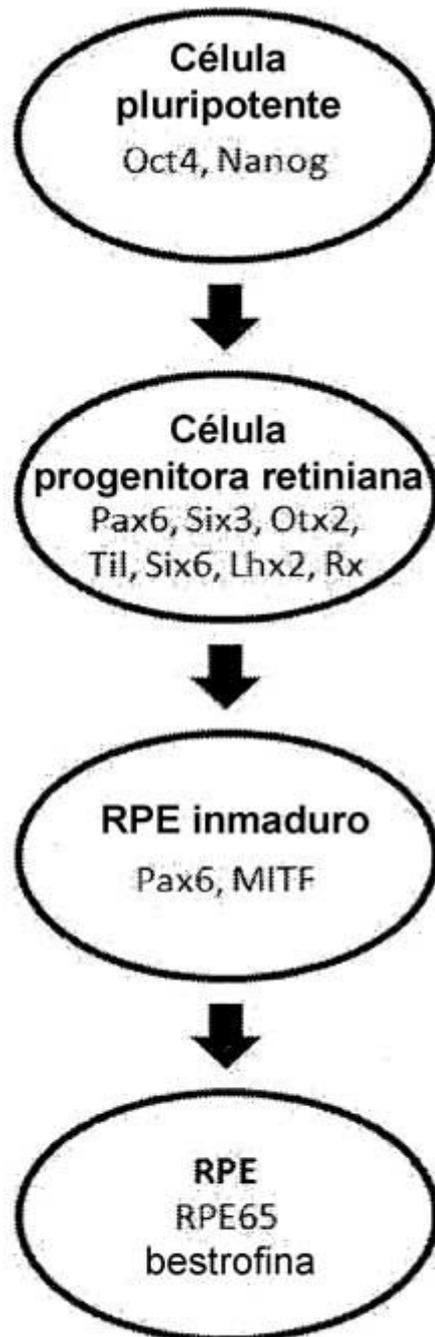
50 ml de sustitución de suero Knockout™ (Gibco)

5 2,5 ml de aminoácidos no esenciales (Gibco)

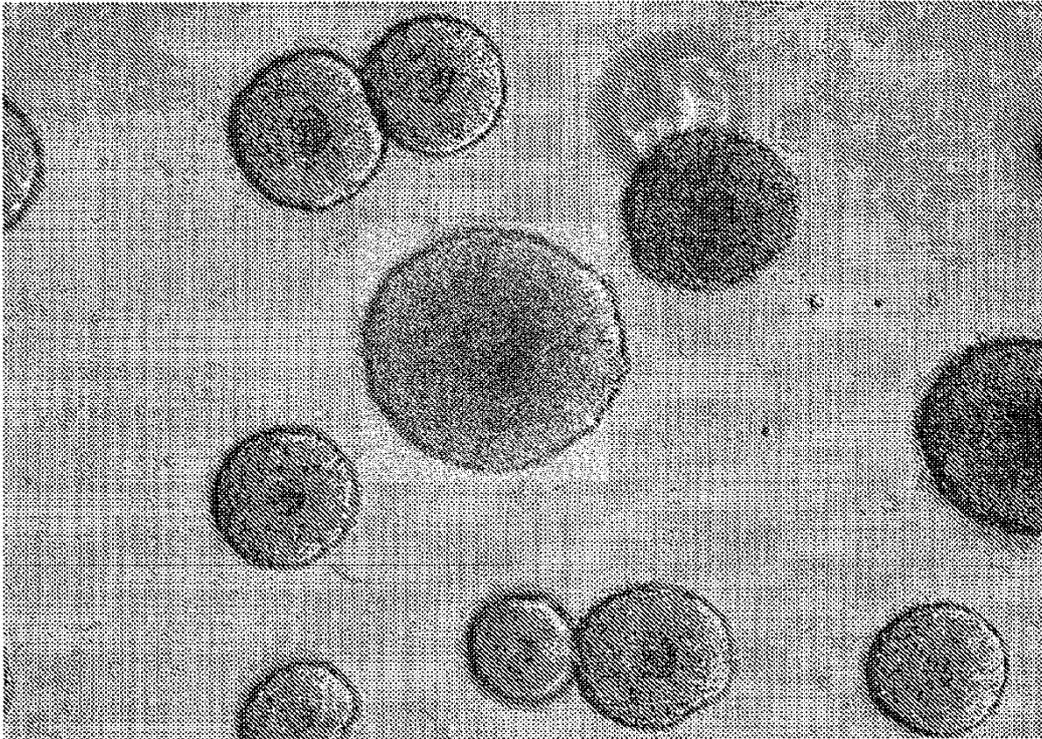
1,25 ml de glutamato+ β-mercaptoetanol (5 ml de glutamato 200 mM + 7 μl de β-mercaptoetanol)

**REIVINDICACIONES**

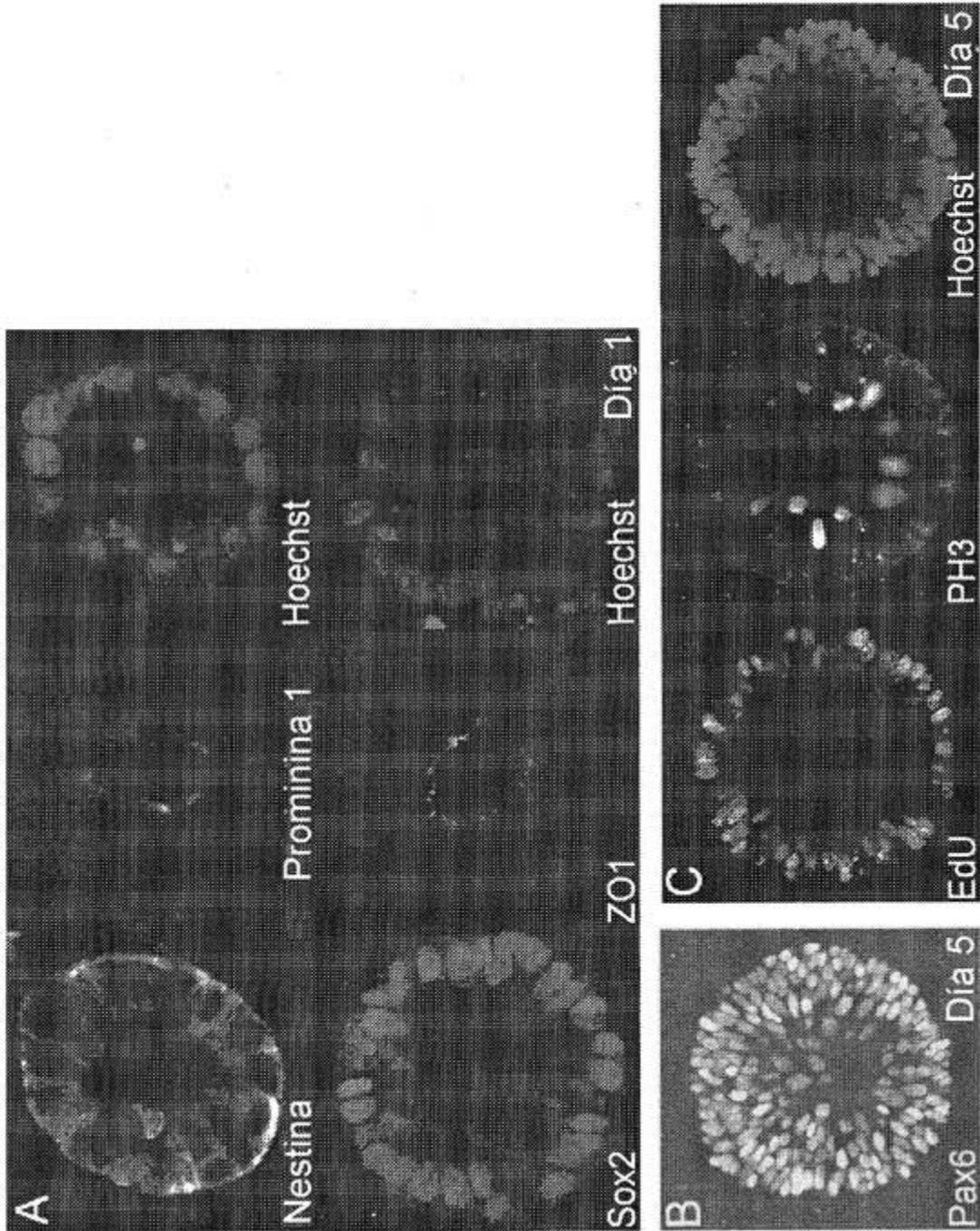
1. Método para diferenciar células madre pluripotentes para dar células progenitoras retinianas polarizadas, que comprende las etapas:
- 5 a) cultivar colonias de células madre pluripotentes en cultivo celular tridimensional incluido en un gel proteico que comprende al menos tres proteínas seleccionadas del grupo que consiste en laminina, colágeno IV, entactina y perlecano y que comprende al menos dos, preferiblemente al menos tres, lo más preferiblemente al menos cuatro factores de crecimiento seleccionados de EGF, FGF2, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF-beta hasta que se desarrollan quistes neurales polarizados, que contienen una única luz y consisten en células polarizadas, y
- 10 b) disociar los quistes neurales polarizados para dar células progenitoras retinianas polarizadas dispersadas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que las colonias de células madre pluripotentes se cultivan en medio libre de suero incluido en un gel proteico durante de 4 a 7, preferiblemente de 5 a 6 días.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado por** el hecho de que las células pluripotentes se seleccionan de células madre pluripotentes inducidas.
4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, que incluye la diferenciación posterior de las células progenitoras retinianas polarizadas obtenidas en la etapa b) para dar células diferenciadas adicionalmente del linaje retiniano.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, que incluye la diferenciación posterior de las células progenitoras retinianas polarizadas obtenidas en la etapa b) para dar células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) cultivando las células progenitoras retinianas polarizadas dispersadas en cultivo celular bidimensional en un medio de cultivo celular suplementado con activina A.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, **caracterizado porque** las células progenitoras retinianas polarizadas dispersadas se cultivan sobre una membrana microporosa permeable colocada en una placa o un pocillo que contiene medio de cultivo celular.
- 30 7. Uso de los quistes neurales polarizados que contienen una única luz y consisten en células polarizadas obtenidas mediante el método según una etapa de una las reivindicaciones 1 a 3 para fines de selección.
8. Uso de un gel proteico que comprende al menos dos, preferiblemente al menos tres, componentes seleccionados del grupo que consiste en laminina, colágeno IV, entactina y perlecano y que comprende al menos dos, preferiblemente al menos tres, lo más preferiblemente al menos cuatro, factores de crecimiento seleccionados de EGF, FGF2, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF-beta, para diferenciar células pluripotentes para dar quistes neurales polarizados que comprenden células progenitoras retinianas polarizadas en un método según una de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35 9. Uso de un kit que comprende
- un gel proteico o una mezcla de proteínas para preparar un gel proteico
  - medio de diferenciación neural (NDM), para diferenciar células madre pluripotentes para dar células progenitoras retinianas polarizadas en un método según una de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 10. Uso según la reivindicación 9, comprendiendo el kit además medio de RPE (RPEM) suplementado con activina A o una disolución madre de la misma.
- 45 11. Cultivo celular *in vitro* producido mediante el método según la etapa a) de una de las reivindicaciones 1 a 3 y que comprende al menos el 80 % de células progenitoras retinianas polarizadas y que forma quistes neurales polarizados, que contienen una única luz y consisten en células polarizadas, mientras que la expresión de prominina 1 y ZO-1 se restringe al lado apical de los quistes.
- 50



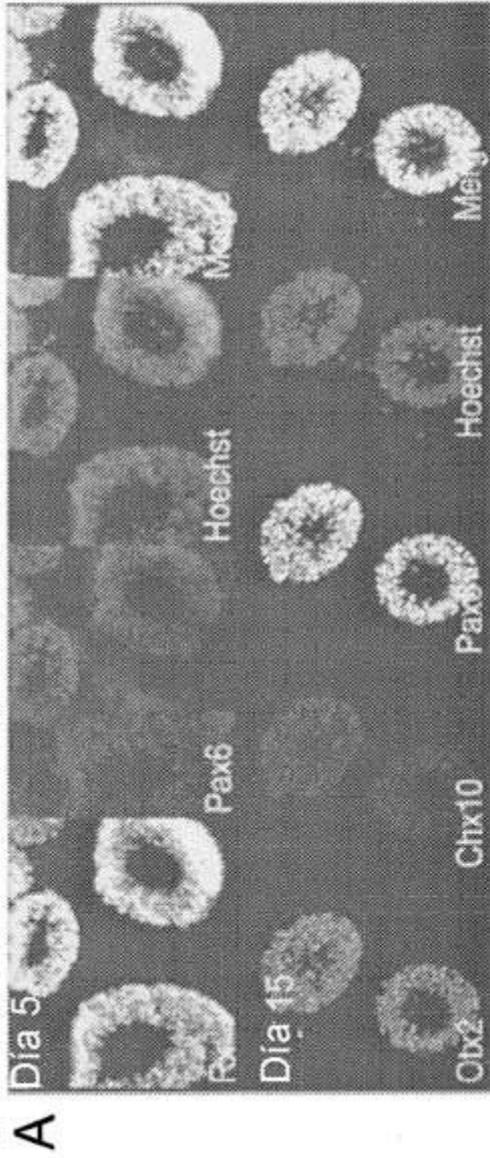
**Fig. 1**



**Fig. 2**



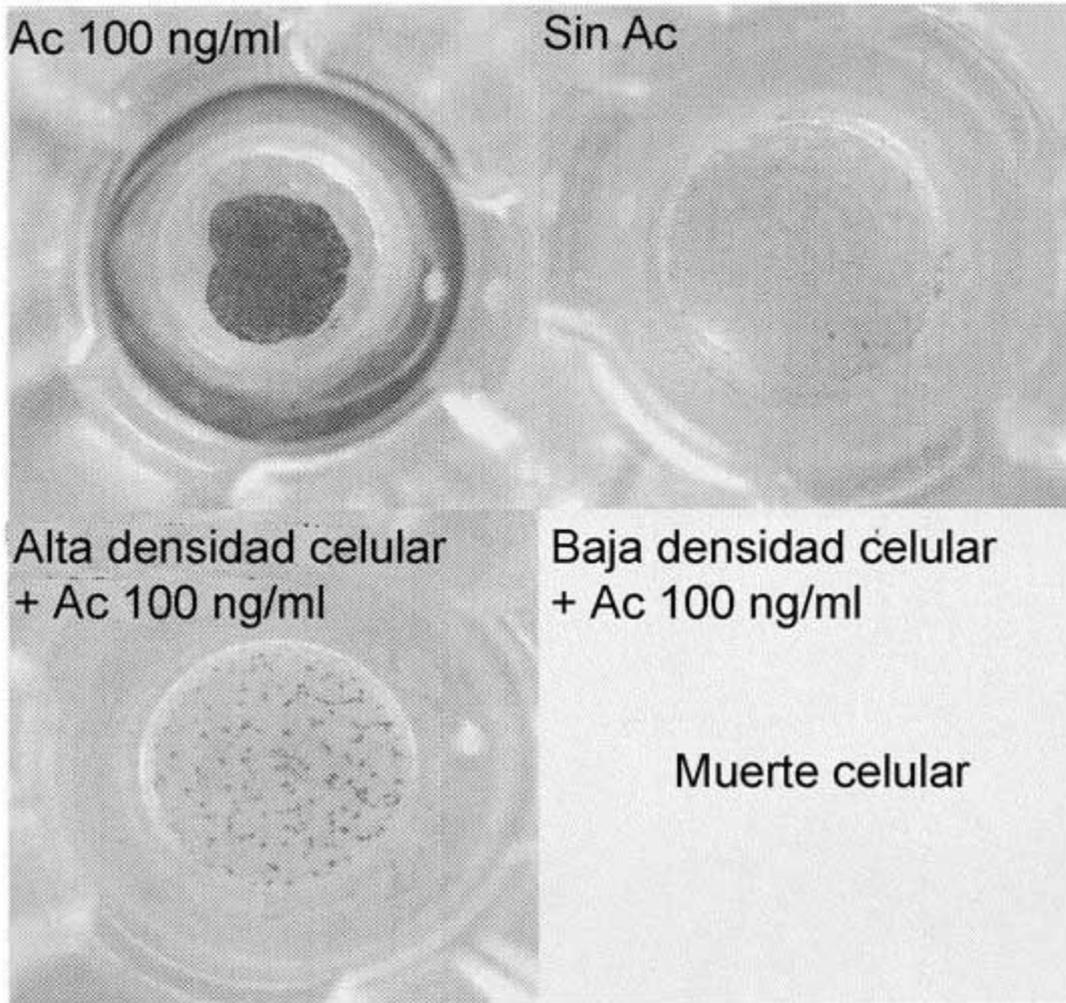
**Fig. 3**



**B** Porcentaje de células positivas para marcadores retinianos mediante inmunotinción

	Otx2	Pax6	Rx	Chx10
Día 5	100%	99%	91%	0%
Día 15	100%	100%	N.A.	60%

**Fig. 4**



**Fig. 5**

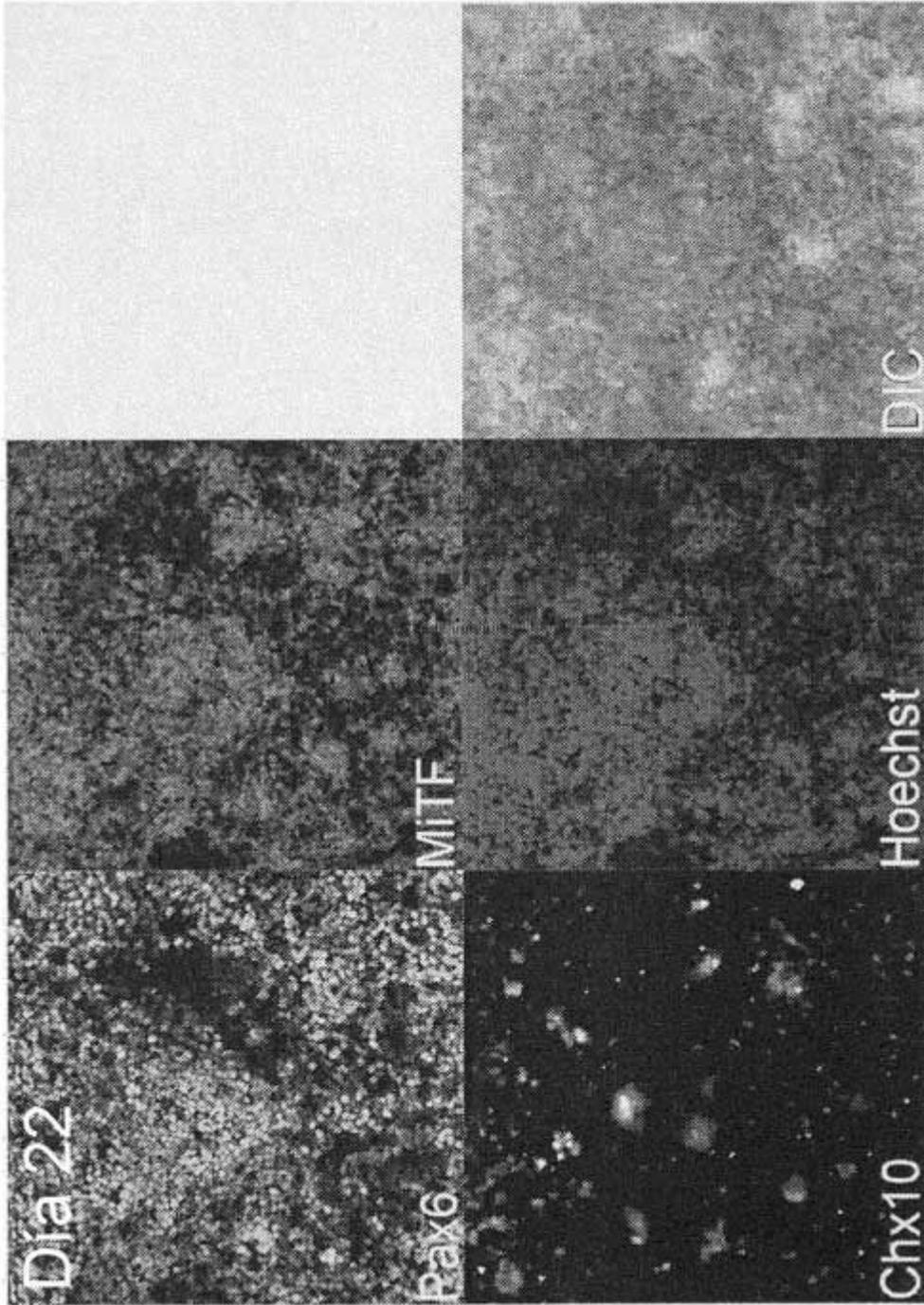
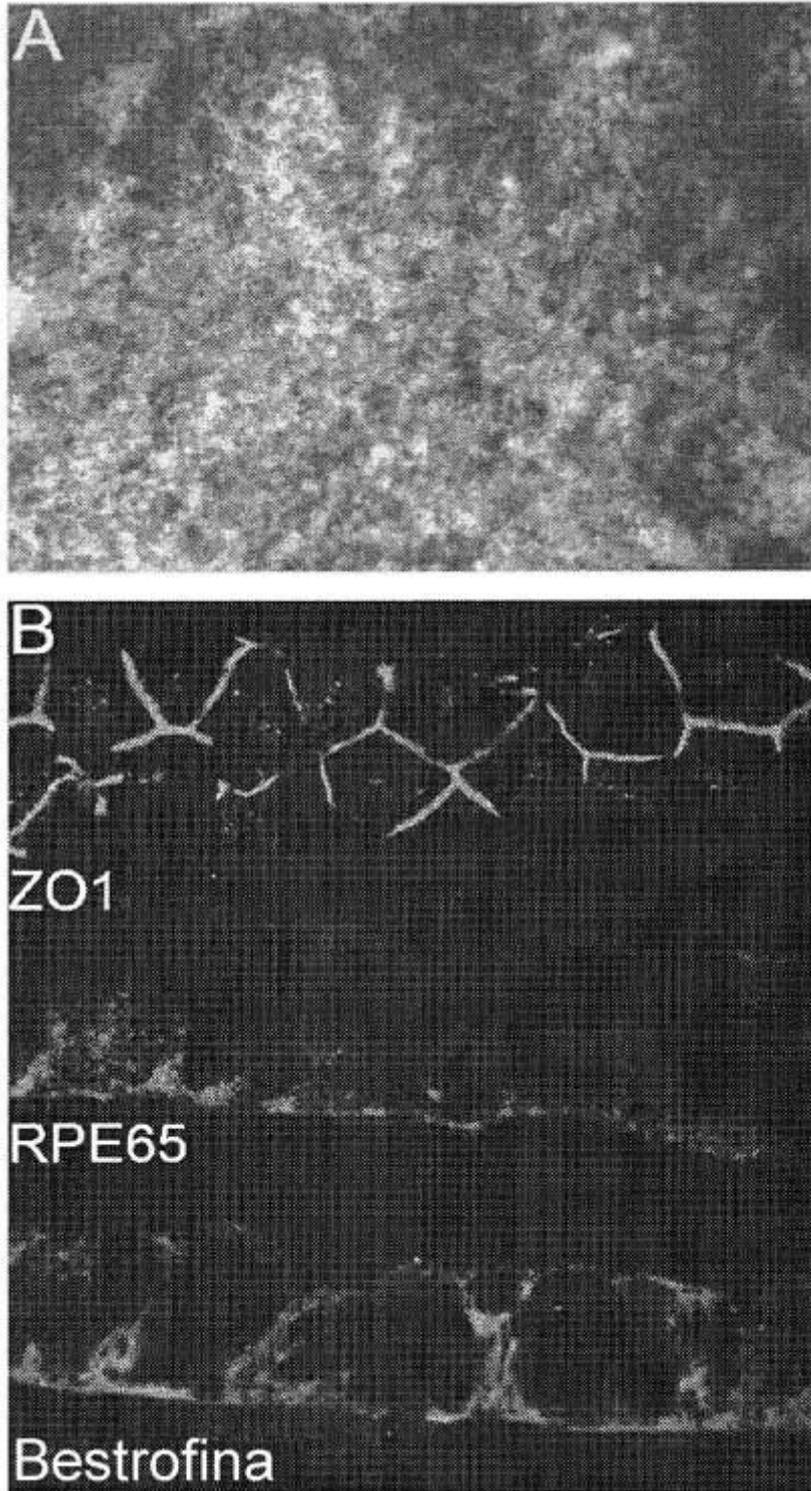


Fig. 6



**Fig. 7**



**Fig. 8**

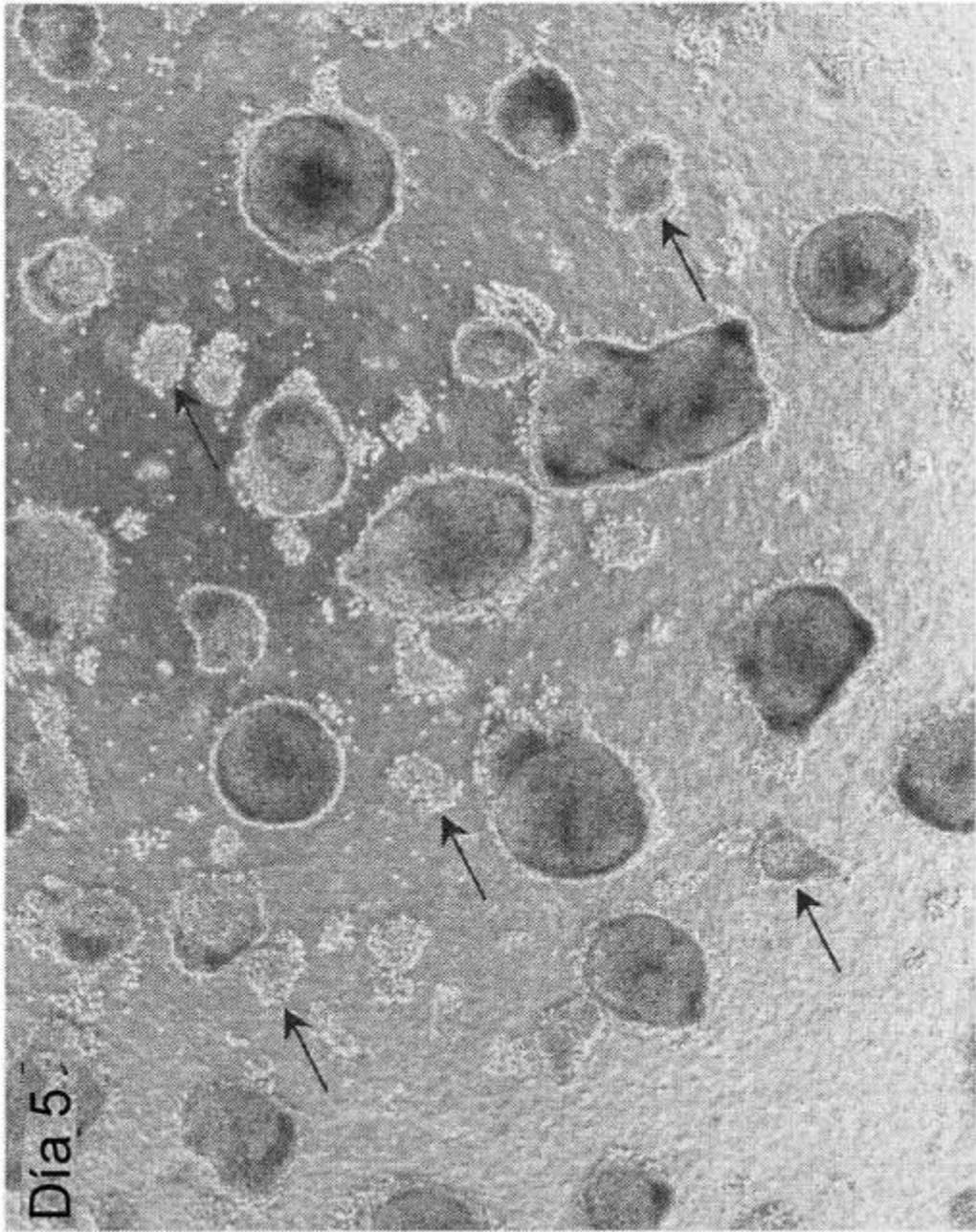


Fig. 9

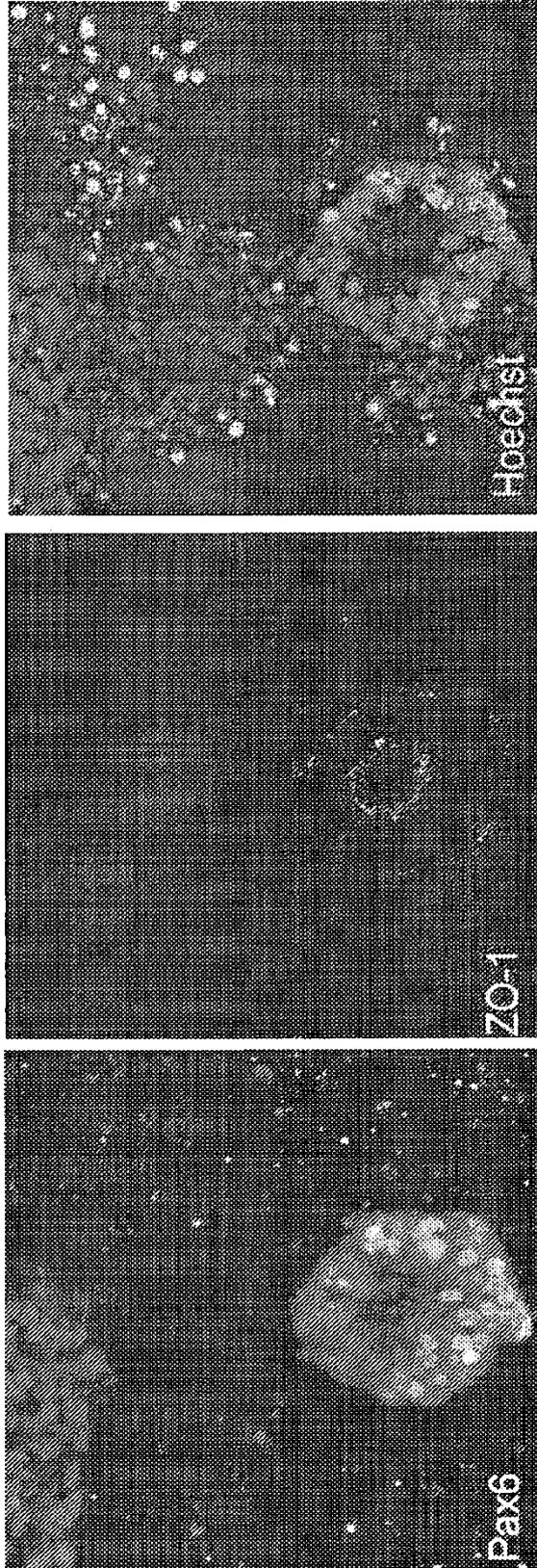


Fig. 10

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

5

**Documentos de patente citado en la descripción**

- US 20070196919 A1 [0012]
- EP 2128244 A1 [0014] [0019]
- WO 2011055855 A1 [0018]
- US 20070196919 A, Lamba [0019]

10

**Bibliografía de patentes citada en la descripción**

- COFFEY, PJ et al. *Nat. Neurosci.*, 2002, vol. 5, 53-56 [0004]
- LIN, N et al. *Curr. Eye Res.*, 1996, vol. 15, 1069-1077 [0004]
- LITTLE CW et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1996, vol. 37, 204-211 [0004]
- SAUVE, Y et al. *Neuroscience*, 2002, vol. 114, 389-401 [0004]
- MARTIN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 7634-7638 [0008]
- EVANS ; KAUFMAN. *Nature*, 1981, vol. 292, 154-156 [0008]
- CHUNG Y et al. *Cell Stem Cell*, 2008, 113-117 [0008]
- LIN et al. *Cell Res*, 2007, vol. 17, 999-1007 [0008]
- MAI et al. *Cell Res*, 2007, vol. 17, 1008-1019 [0008]
- TAKAHASHI K et al. *Cell*, 2007, vol. 131, 861-872 [0009] [0036]
- YU J et al. *Science*, 2007, vol. 318, 1917-1920 [0009] [0036]
- VUGLER A et al. *Exp Neurol.*, December 2008, vol. 214 (2), 347-61 [0010]
- KLIMANSKAYA I et al. *Cloning Stem Cells*, 2004, vol. 6 (3), 217-45 [0010]
- BUCHHOLZ DE et al. *Stem Cells*, October 2009, vol. 27 (10), 2427-34 [0010]
- IDELSON et al. *Cell Stem Cell*, 2009, vol. 5, 396-408 [0010]
- MEYER JS et al. *PNAS*, 2009, vol. 106, 16698-703 [0011] [0013]
- OSAKADA F et al. *Nature Protocols*, 2009, vol. 4, 811-824 [0013]
- LAMBA DA et al. *PNAS*, 2006, vol. 34, 12769-74 [0013]
- LAMBA DA et al. *Plos One*, 2010, vol. 5, e8763 [0013]
- OSAKADA F et al. *Nat. Biotechnol.*, 2008, vol. 26 (2), 215-224 [0015]
- LAMBA et al. *PNAS*, 2008, vol. 34, 12769-74 [0016]
- HIRANO M et al. *Dev. Dyn.*, 2003, vol. 228 (4), 664-671 [0017]
- AOKI H et al. *Dev Dyn.*, September 2009, vol. 238 (9), 2266-79 [0017]
- KANATSU-SHINOHARA M et al. *Ann N Y Acad Sci.*, December 2007, vol. 1120, 59-71 [0033]
- CONRAD S et al. *Nature*, 20 November 2008, vol. 456 (7220), 344-9 [0033]
- GUAN K et al. *Nature Protocols*, 2009, vol. 4 (2), 143-54 [0033]
- KUCIA M et al. *Leukemia*, May 2006, vol. 20 (5), 857-69 [0033]
- FENG, B et al. *Cell Stem Cell*, 2009, vol. 4, 301-312 [0036]
- ZHOU H. et al. *Cell Stem Cell*, 2009, vol. 4 (5), 381-384 [0039]
- HU BY et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 02 March 2010, vol. 107 (9), 4335-40 [0043]
- YU J et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, vol. 318, 1917-1920 [0043]
- CHOI KD et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2009, vol. 27, 559-567 [0043]
- YU J et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, vol. 324, 797-801 [0043]
- COWAN, C.A. *New England Journal of Medicine*, 2004, vol. 350, 13ff [0046]
- LOESER P et al. *Stem Cells*, 2010, vol. 28, 240-246 [0047]