

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 659**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/0797 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/FI2014/050053**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14162040**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14703899 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2828380**

54 Título: **Métodos y medios para la diferenciación de las células del ojo**

30 Prioridad:

03.04.2013 FI 20135318

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

08.03.2017

73 Titular/es:

**TAMPEREEN YLIOPISTO (100.0%)
33014 Tampereen Yliopisto, FI**

72 Inventor/es:

**MIKHAILOVA, ALEXANDRA;
ILMARINEN, TANJA y
SKOTTMAN, HELI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 604 659 T3

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

Descripción

Métodos y medios para la diferenciación de las células del ojo

Campo de la invención

5 El campo técnico en cuestión es el tratamiento y el estudio de los ojos, más específicamente, enfermedades y trastornos de la córnea. La presente descripción está relacionada con la diferenciación de células madre en células precursoras de los ojos y más en las células del ojo diferenciadas, tales como las células epiteliales de la córnea. En consecuencia, se proporciona en este documento medios y métodos que contribuyen a la inducción, la maduración y la diferenciación rápidas y eficaces.

Antecedentes de la invención

10 La córnea se encuentra en la superficie frontal del ojo, está compuesta por multicapas, y es transparente y avascular en su estructura. Las principales funciones de la córnea son proteger el globo ocular y su contenido, al tiempo que permite un enfoque preciso de la luz para producir una imagen nítida en la retina. La córnea se compone de tres capas celulares, es decir, el epitelio, el estroma y el endotelio, separadas por dos capas acelulares - la capa de Bowman, y la membrana de Descemet. Como la capa más externa, el epitelio corneal está expuesto al entorno
15 externo y por lo tanto tiene que ser rápidamente regenerado y estratificado. De manera similar a la epidermis, la lente y el epitelio conjuntival, el epitelio corneal se origina en el ectodermo de superficie. Sin embargo, los mecanismos de desarrollo detallados y las rutas de señalización siguen siendo desconocidos.

20 En una publicación de la técnica anterior, Hayashi et al 2012 publicó la diferenciación de células de la córnea en las células PA6 (células alimentadoras de origen de ratón) que tenían 12-16 semanas. La eficiencia de diferenciación medida con la expresión de la proteína CK12 era inferior al 15%. Todavía se desean condiciones de una mejor eficiencia y exentas de xeno.

Hanson et al, 2012 publicó la diferenciación de la membrana de Bowman durante 25 días. La eficiencia no fue, sin embargo, reportada. La membrana de Bowman se sabe que es inestable, lo que arroja incertidumbre al procedimiento.

25 Yoshida et al, 2011 logró producir células precursoras por la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas de ratón por el cultivo en células PA6 (células alimentadoras de origen de ratón). La diferenciación llevó aproximadamente 60 días. Todavía hay necesidad de condiciones de diferenciación exentas de xeno.

30 Ahmad et al, 2007 publicaron el cultivo de hESC en colágeno IV. Utilizaron medio condicionado por los fibroblastos del limbo lo que resultó en la pérdida de pluripotencia y diferenciación en las células tipo epitelial. Dieron una eficiencia de diferenciación del 50% en el día 5 y del 10% en el día 21, medido por expresión de las proteínas CK3/12. El uso de un medio que requiere de células limbares donadas puede ser considerado problemático. Por otra parte, hay una variación biológica significativa entre los lotes de las células limbares.

35 El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células epiteliales situada entre la retina neural y el coriocalpar. El EPR constituye un apoyo fundamental para la conservación a largo plazo de la integridad de la retina y las funciones visuales mediante la absorción de la luz parásita, la regeneración del pigmento visual, el suministro de nutrientes, la secreción de factores de crecimiento, y la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (POS) desprendidos. El EPR disfuncional provoca el deterioro y la muerte de las células fotorreceptoras, lo que lleva a un deterioro o pérdida total de la visión. Estos mecanismos juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades de la retina como la degeneración macular relacionada con la
40 edad (DME), que es la causa principal de ceguera en el mundo desarrollado.

45 Las células madre pluripotentes humanas pueden servir como una fuente ilimitada de células del EPR para el trasplante. Varios grupos han informado del éxito de la diferenciación de EPR que se origina a partir de células madre embrionarias humanas (hESCs) y células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs). Sin embargo, los métodos actuales para la diferenciación de las células del EPR se basan principalmente ya sea en procesos de diferenciación espontánea que favorecen el linaje neuroectodérmico, que es característico de hESCs, o ya sea en una mezcla compleja de varios diferentes factores de crecimiento, inhibidores u otros ingredientes funcionales.

50 Osakada et al., 2008 y 2009 tuvieron éxito en la mejora de la eficiencia de la diferenciación EPR con un período de cultivo prolongado y suplementos de cultivo celular. Los suplementos estudiados incluyen: nicotinamida (NIC), activina A, factor de crecimiento beta transformador (TGF β), inhibidor de caseína quinasa I del inhibidor de señalización de Wnt (CKI)-7, proteína-1 relacionada con Dickkopf (DKK-1), Lefty-A, antagonista Y-27632 del factor de crecimiento de fibroblastos, y el inhibidor de la señalización nodal SB431542. Independientemente de la mejora de la eficacia diferenciación, alcanzar una cantidad suficiente de células maduras con características EPR todavía exige procesos de diferenciación a largo plazo.

El documento WO 2013/184809 describe un método relativamente rápido para la derivación de células de EPR a partir de células pluripotentes. Sin embargo, el método es muy complejo con al menos cuatro etapas diferentes y cuatro medios de cultivo diferentes, cada uno caracterizado por una combinación única de suplemento activo.

5 Los xeno-productos y los factores no definidos utilizados en muchos procesos de diferenciación plantean nuevos retos, ya que los componentes de origen animal pueden llevar a factores tales como el ácido siálico o Neu5Gc, causando inmunogenicidad no deseada de las células o incluso patógenos animales. El suero bovino fetal (FBS) es ampliamente utilizado, al menos en algunas etapas del cultivo de células de EPR. EL reemplazo de suero KnockOut™ (KO-SR), que se utiliza para reemplazar FBS en muchos laboratorios, todavía contiene BSA (BSA) y transferrina bovina. Además, la mayoría de los métodos de diferenciación actuales utilizan un medio de cultivo
10 producido por células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) ampliamente utilizadas como células alimentadoras para hESCs y hiPSCs.

El documento WO 2010/144696 se refiere a métodos y composiciones para la producción de células neuronales a partir de células madre, mientras que el documento WO 2012/103012 se refiere a la generación de células del oído interno. Entre los posibles agentes inductores de la diferenciación, ambas publicaciones describen bFGF, un
15 inhibidor de TGF-beta, y un inhibidor de Wnt.

Todavía hay necesidad de suministros y métodos para el cultivo de células madre a través de la diferenciación controlada para producir células que contribuyan al tratamiento y la investigación de las condiciones del epitelio de la retina y de la córnea, enfermedades, patologías, así como la toxicología y el desarrollo de fármacos. Además, son igualmente deseables medios de cultivo celular para su uso en tales métodos. Además, la evitación de componentes
20 no definidos, tales como la membrana amniótica o medio acondicionado es también un objetivo importante.

Breve descripción de la invención

Es, por tanto, un objeto de la presente invención proporcionar medios y métodos eficaces para diferenciar células madre en células precursoras de los ojos y más en las células precursoras epiteliales de la córnea, que después pueden madurarse en células epiteliales de la córnea maduras o del epitelio estratificado de la córnea.

25 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir células de los ojos diferenciadas seleccionadas del grupo que consiste en células precursoras epiteliales de la córnea, células epiteliales de la córnea y el epitelio de la córnea estratificado. Dicho método comprende a) cultivar células madre pluripotentes en un medio de inducción que comprende el inhibidor TGF-beta, un inhibidor de Wnt y un factor de crecimiento de fibroblastos, produciendo mediante esto células precursoras del ojo; b) cultivar las células precursoras del ojo obtenidas en la etapa a) en un medio de cultivo celular que comprende uno o más suplementos
30 seleccionados del grupo que consiste en factor de crecimiento de epidérmico (EGF), hidrocortisona, insulina, isoproterenol, y tri-yodo-tironina, en donde el medio no contiene ninguno de los siguientes suplementos: un inhibidor de TGF-beta, un inhibidor de Wnt y un factor de crecimiento de fibroblastos, produciendo mediante esto células precursoras epiteliales de la córnea, en donde dichas células precursoras epiteliales de la córnea expresan el marcador p63 epitelial de la córnea, siendo dicha expresión preferiblemente cuantificada con tinción
35 inmunofluorescente; una maduración opcional de dichas células precursoras epiteliales de la córnea en células epiteliales de la córnea maduras o en el epitelio de la córnea estratificado.

Otros aspectos, realizaciones específicas, objetos, detalles y ventajas de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes y serán evidentes a partir de los siguientes dibujos, descripción detallada y ejemplos.

40 Breve descripción de los dibujos

En lo que sigue, la invención se describirá con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La figura 1 es un ejemplo de estructuras de dos pequeños inhibidores TGF-b1 moleculares comerciales (D 4476 y SB 505124).

45 La Figura 2 es un ejemplo de dos pequeñas estructuras de Wnt-inhibidor moleculares disponibles en el comercio (IWP-2 y IWP-3).

La Figura 3 proporciona una visión general sobre la estrategia de los experimentos llevados a cabo para validar el presente método. En él se explica en función del tiempo las dos fases del cultivo, es decir, la etapa de inducción y la de diferenciación, para la producción de linajes del epitelio corneal (CE), y señala los puntos clave
50 tiempo. También muestra claramente los medios estudiados en cada prueba.

La Figura 4 ilustra los resultados obtenidos de diferenciación después de 4 días en la etapa de inducción, llevados a cabo en diferentes medios de cultivo. De izquierda a derecha: muestra de células madre indiferenciadas como control (indif.); medio comercial comercializado para el cultivo de las células epiteliales de la córnea (CNT-30); medio RegES modificado de acuerdo con la presente invención que comprende un inhibidor de TGF-beta, un inhibidor de
55 Wnt y un factor de crecimiento de fibroblastos (RegESinduction); medio sin suplementar RegES (RegESbasic). La

diferenciación fue seguida midiendo dos marcadores, POU5F1, que está presente en las células no diferenciadas y PAX6, lo que indica la diferenciación en linajes específicos de células de los ojos.

5 La Figura 5 ilustra el resultado de una realización del presente método de diferenciación, en el que las células madre de origen humano pluripotentes (hiPSC) o las células madre embrionarias humanas (hESC) se diferenciaron en células precursoras epiteliales de la córnea. La etapa de maduración se lleva a cabo ya sea en medio CNT-30 comercialmente disponible, ya sea en medio SHEM que contiene EGF, hidrocortisona, insulina, isoproterenol y tri-yodo-tironina. Se obtuvieron los resultados correspondientes, independientemente del medio de maduración y de la célula utilizada.

Descripción detallada de la invención

10 En algunos aspectos, la presente invención proporciona un método de diferenciación de dos etapas que comprende una etapa de inducción y una diferenciación adicional y la etapa de maduración para la diferenciación de dichas células precursoras de ojo en las células del ojo diferenciadas, tales como células precursoras epiteliales de la córnea, y además en células maduras corneales epiteliales. Tal como se usa en el presente documento, los términos "precursores" y "progenitores" se pueden usar indistintamente salvo indicación de lo contrario.

15 Etapa de inducción y medio

La presente etapa de inducción está dirigida a la inducción de células madre pluripotentes hacia el ectodermo de superficie y las células precursoras de ojo sometiendo dichas células madre, preferiblemente en un cultivo en suspensión, a un medio de inducción que comprende "suplementos de inducción" activos, es decir un inhibidor de TGF-beta, un inhibidor de Wnt y un factor de crecimiento de fibroblastos. Ambos dicha etapa de inducción y dicho medio de inducción se proporcionan en este documento.

20 Si la etapa de inducción debe ser llevada a cabo en un cultivo adherente, es ventajoso el uso de sustratos revestidos con proteínas de matriz extracelular (ECM) como generalmente son conocidas en la técnica y se discuten en más detalle más adelante bajo el título "método de diferenciación y medios".

25 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "célula madre pluripotente" se refiere a cualquier célula madre que tiene el potencial de diferenciarse en todos los tipos de células de un cuerpo humano o animal, sin incluir los tejidos extra-embrionarios. Estas células madre incluyen tanto células madre embrionarias (CME) como células pluripotentes inducidas (iPSCs). Por lo tanto, las células adecuadas para el método de la presente invención incluyen células madre seleccionadas de iPSCs y CME.

30 Las CME son de gran interés terapéutico, ya que son capaces de una proliferación indefinida en cultivo y por lo tanto capaces de suministrar células y tejidos para el reemplazo del tejido humano que falla o defectuoso. La producción de las células precursoras de los ojos a partir de células madre de embriones humanos puede responder a los desafíos éticos. Las células madre embrionarias humanas se pueden usar con la condición de que el método en sí o cualesquiera actos relacionados no incluyan la destrucción de embriones humanos.

35 Las células madre pluripotentes inducidas, abreviadas como células iPS, son un tipo de células madre pluripotentes derivadas artificialmente a partir de una célula pluripotente - por lo general una célula somática adulta - mediante la inducción de una expresión forzada de genes específicos. Uno de los beneficios del uso de células iPS es la evitación de la participación de células embrionarias por completo, y por lo tanto de cualquier cuestión ética de las mismas. Por lo tanto, de acuerdo con otra realización de la presente invención, para la producción de células precursoras de los ojos se prefiere el uso de células iPS.

40 Las células madre pluripotentes inducidas son similares a las células madre pluripotentes naturales, tales como las células madre embrionarias, en muchos aspectos, tales como la expresión de ciertos genes de células madre y proteínas, los patrones de metilación de cromatina, tiempo de duplicado, formación de cuerpos embrioides, la formación de teratoma, la formación de quimeras viables, y la potencia y diferenciabilidad, pero el alcance de su relación con las células madre pluripotentes naturales se está evaluando todavía. Las células pluripotentes inducidas se hacen típicamente a partir de células adultas de la piel, células de la sangre, estómago o hígado, aunque otras alternativas pueden ser posibles. Cualquier experto en la técnica está familiarizado con la investigación y el potencial de la terapia de las células iPS, es decir, desde la publicación de Bilic y Izpiua Belmonte (2012).

45 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "exento de xeno" se refiere a la ausencia de cualquier material o componentes ajenos. Por lo tanto, en el caso del cultivo de células humanas, esto se refiere a condiciones libres de componentes animales no humanos. En otras palabras, cuando se desean condiciones exentas de xeno para la producción de células precursoras del ojo, o cualquier célula madurada del mismo, para uso humano, las células ES o iPS se seleccionan para que sean de origen humano.

50 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "célula precursora del ojo" se refiere ampliamente a cualquier linaje de células del ojo inducido a partir de células madre pluripotentes utilizando el método de inducción presente y/o el medio de inducción. Las células precursoras de los ojos se caracterizan por la baja regulación del marcador de

pluripotencia OCT-4 (también conocido como POU5F1) y por la sobre-regulación de PAX6, un gen que indica la diferenciación en linajes de células específicas de los ojos.

En la etapa de inducción presente, las células madre pluripotentes se cultivan en el medio de inducción presente por un periodo de tiempo que puede variar en función de diferentes variables tales como la composición final del medio de inducción y el propósito del método de inducción. Típicamente, la duración de la inducción puede variar de un par de días a varios días. Un intervalo de tiempo preferido es de aproximadamente cuatro días a aproximadamente siete días, es decir, desde aproximadamente 96 horas a aproximadamente 168 horas. En la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a una variación del 10 por ciento del valor especificado. Por lo tanto, la expresión "aproximadamente cuatro días" conlleva una variación de 87 a 105 horas, mientras que la expresión "aproximadamente siete días" conlleva una variación de 152 hasta 186 horas. Si se utiliza un tiempo de inducción de menos de 4 a 7 días, la regulación a la baja de OCT4 y la sobre-regulación de PAX6 es débil lo que conduce a una diferenciación menos eficiente según lo determinado por la débil expresión de marcadores de precursores PAX6 y p63. Por otra parte, si se utiliza un tiempo de inducción más largo que 4 a 7 días, se puede esperar una diferenciación más neural, ya que las células madre pluripotentes humanas tienen una tendencia conocida a diferenciarse hacia linajes neuronales, especialmente en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos básico.

Como se ha expuesto anteriormente, el medio de inducción presente comprende un inhibidor de TGF-beta, un inhibidor de Wnt y un factor de crecimiento de fibroblastos como suplementos activos. Se encontró que estos suplementos de inducción mejoran la diferenciación de las células madre pluripotentes hacia las células precursoras de los ojos y mejoran su posterior eficiencia de diferenciación en células oculares clínicamente valiosas, tales como células precursoras de la córnea epiteliales, células epiteliales de la córnea, y el epitelio estratificado de la córnea.

El presente medio de inducción puede considerarse que consiste o comprende un medio basal y los presentes suplementos de inducción. Sin embargo, otros suplementos comunes en la técnica pueden ser aplicados. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "suplementos de cultivo celular común" se refiere a los ingredientes utilizados en prácticamente cada medio de cultivo celular, incluyendo antibióticos, L-glutamina, y suero, albúmina sérica o un reemplazo de suero, preferiblemente una sustitución de suero definida.

Por otra parte, en algunas realizaciones, el medio de inducción no contiene ingredientes distintos de los suplementos de inducción, medio basal, los antibióticos, L-glutamina, y un reemplazo de suero definido. En algunas realizaciones adicionales, los suplementos de inducción son un inhibidor de TGF-beta de Fórmula I o II, un inhibidor de Wnt de acuerdo con la Fórmula III, y bFGF. En una realización adicional más, los suplementos de inducción son SB-505124, IWP-2, y bFGF.

Cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente puede formar una base para realizaciones adicionales o alternativas, en la que el medio de inducción no comprende ningún suplemento generalmente conocido por ser inductiva para tipos de diferenciación distintos de la diferenciación hacia linajes ojo, tipos tales como la diferenciación neural. Tales suplementos generalmente conocidos incluyen, pero no se limitan a, ácido retinoico, ácido ascórbico, factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF, y factor neurotrófico derivado de la glía GDNF.

El medio basal puede ser cualquier medio de cultivo de células madre en el que las células madre efectivamente se pueden diferenciar. En una realización preferida, el medio basal es medio RegESbasic. En otras realizaciones preferidas, el medio basal es EPRbasic. De acuerdo con otra realización preferida, el medio de inducción está exento de xeno, exento de suero o definido, más preferiblemente una combinación de éstos y lo más preferiblemente exento de xeno, exento de suero y definido al mismo tiempo. Estos términos se definen a continuación.

En una composición preferida del medio de inducción, el contenido del inhibidor de TGF-beta es de 1 μM a 100 μM , preferiblemente de 1 μM a 30 μM , el inhibidor de Wnt es de 1 μM a 100 μM , preferiblemente de 1 μM a 30 μM , y el contenido del factor de crecimiento de fibroblastos es de 1 ng/ml a aproximadamente 1.000 ng/ml, preferiblemente aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, y más preferiblemente de aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml.

Inhibidor de TGF-beta (TGF- β)

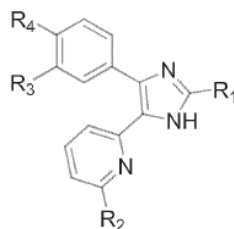
Tal como se usa en el presente documento, con "inhibidor de TGF-beta" se refiere funcionalmente a una sustancia capaz de inhibir el factor de crecimiento transformante β 1.

El factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) es un miembro de una gran superfamilia de citoquinas pleiotrópicas que están involucradas en muchas actividades biológicas, incluyendo el crecimiento, la diferenciación, la migración, la supervivencia celular, y la adhesión en estados de enfermedad y normales. Cerca de 30 miembros se han identificado en esta superfamilia. Estas se consideran incluidas en dos grandes ramas: TGFb/activina/Nodal y BMP/GDF (Proteína morfogenética ósea/factor de crecimiento y diferenciación). Tienen funciones muy diversas y, a menudo complementarias. Algunas se expresan sólo por periodos cortos durante el desarrollo embrionario y/o únicamente en tipos de células restringidas (por ejemplo, hormona anti-Mülleriana, AMH, inhibina), mientras que otras están muy extendidas durante la embriogénesis y en los tejidos adultos (por ejemplo, TGF β 1 y BMP4). TGF- β 1

es un potente regulador de la síntesis de la matriz extracelular (factor fibrótico) y juega un papel en la cicatrización de las heridas.

- 5 En términos químicos y estructurales, la función inhibidora de TGF-beta adecuada se puede encontrar entre las proteínas y moléculas orgánicas pequeñas. Cualquier experto en la técnica es consciente de los medios para el aislamiento de proteínas a partir de matrices biológicas o de producirlas, es decir, mediante técnicas recombinantes.

Los compuestos que presentan actividad inhibidora de TGF-beta se pueden encontrar por cribado. Preferiblemente, un inhibidor de TGF-beta es una molécula orgánica que tiene una masa molar relativamente baja, por ejemplo una molécula pequeña que tiene una masa molar de menos de 800 g/mol, preferiblemente menor que 500 g/mol. Como una estructura general, fórmula I, se puede describir un inhibidor de TGF de masa molar baja adecuado como:

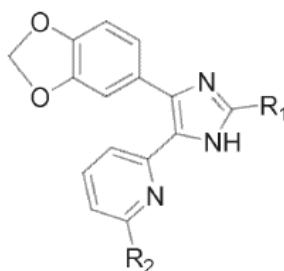


10

Fórmula I

en donde R₁ representa un grupo de alquilo alifático C₁-C₅, ácido carboxílico, amida, y R₂ representa un grupo alquilo alifático C₁-C₅, R₃ y R₄ representa alquilos alifáticos incluyendo heteroátomos, O o N, que pueden estar unidos entre sí para formar un heteroanillo de 5 ó 6 miembros.

- 15 Una estructura típica comprende un hetero anillo que tiene 2 átomos de oxígeno, cuando puede ser referido como una pequeña molécula de la fórmula general II:



Fórmula II

- 20 en la que, R₁ representa un grupo alquilo alifático C₁-C₅, un ácido carboxílico aromático o amida, y R₂ representa un grupo alquilo alifático C₁-C₅.

- 25 Un ejemplo de un tal inhibidor TGF-b1 es 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida; 4-[4-(3,4-metilendioxifenil)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida; hidrato de 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida, con la fórmula química en la figura 1, que está disponible comercialmente de los proveedores y se comercializa como un inhibidor selectivo del receptor de tipo I del factor de crecimiento transformante β (ALK5), y ALK4. Selectivamente inhibe la señalización de TGF-β y activina; no inhibe otros miembros de la familia de ALK. Otro ejemplo de inhibidores de TGF es el hidrato de hidrocloreuro 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina, la estructura del cual es dada en la figura 1 también.

- 30 Sin embargo, otras moléculas pequeñas que exhiben actividad inhibidora de TGF-beta o comercialmente comercializadas como inhibidores de TGF pueden ser igualmente adecuadas en el contexto de la presente invención. Al seleccionar dicho inhibidor de TGF-beta a partir de sustancias que se pueden obtener por síntesis química o producción recombinante, un medio definido puede ser proporcionado. También cumple con los requisitos de las condiciones exento de xeno y exento de suero.

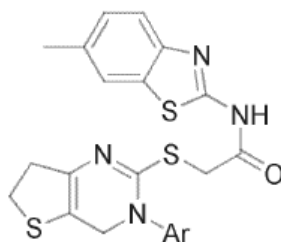
Inhibidor de Wnt

- 35 Como se usa en este documento, un "inhibidor de Wnt" se refiere a una sustancia capaz de inhibir la vía de señalización de Wnt. Más específicamente, las funciones Wnt-inhedoras se refieren a la prevención, es decir, la palmitilación de proteínas Wnt por porcupine (porc), una O-aciltransferasa unida a la membrana, bloqueando de este modo la secreción de Wnt y la actividad. Un inhibidor de Wnt también bloquea la fosforilación del receptor LRP6 y la

acumulación de tanto Dvl2 como β -catenin1. La inhibición de la ruta de Wnt a través del uso de un inhibidor de Wnt también se ha demostrado que promueve la formación de los cardiomiocitos a partir de células humanas derivadas de células madre embrionarias mesodérmicas.

5 Tanto los inhibidores de la proteína como de Wnt moleculares pequeños son conocidos en la técnica. En el contexto de la presente invención, se prefieren los inhibidores de Wnt moleculares pequeños.

Al seleccionar dicho inhibidor de Wnt a partir de sustancias que se pueden obtener por síntesis química, esto contribuye a proporcionar un medio definido. Se han descubierto compuestos adecuados mediante el cribado de un grupo de moléculas orgánicas. Preferiblemente dicho inhibidor es una molécula orgánica que tiene una masa molar relativamente baja, por ejemplo una pequeña molécula que tiene masa molar de menos de 800 g/mol, preferiblemente de menos de 500 g/mol. Como una estructura general, la Fórmula III, un inhibidor de Wnt molecular pequeño adecuado puede ser descrito como:



Fórmula III

en la que Ar se refiere a un grupo arilo sustituido o no sustituido.

15 Inhibidores de Wnt comercialmente conocidos se ejemplifican en la Figura 2.

Factor de crecimiento de fibroblastos

En el medio de la presente invención, se requiere un factor de crecimiento de fibroblastos para contribuir a la diferenciación. Los factores de crecimiento de fibroblastos, o FGF, son una familia de factores de crecimiento generalmente implicados en la angiogénesis, la curación de heridas y el desarrollo embrionario. Los FGF son proteínas de unión a heparina y las interacciones con proteoglicanos de sulfato de heparán asociados a la superficie celular han demostrado ser esencial para la transducción de señales de FGF. Los FGF son actores clave en los procesos de proliferación y diferenciación de amplia variedad de células y tejidos.

Los factores de crecimiento de fibroblastos adecuados para uso en la presente invención incluyen factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como FGF básico (bFGF o FGF-2). Mientras que FGF se usa preferiblemente, otros materiales, tales como ciertos pequeños péptidos sintéticos (producidos, por ejemplo, mediante variantes de ADN recombinantes o mutantes) diseñados para activar los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos, se pueden usar en lugar de FGF. Los factores de crecimiento de fibroblastos se pueden incluir en la sustitución del suero utilizado como medio basal o pueden añadirse separadamente al medio de cultivo celular final de acuerdo con la presente invención.

30 Método de diferenciación y medios

El presente método de diferenciación es un método de dos etapas que comprende la etapa de inducción descrita anteriormente, preferiblemente, pero no necesariamente llevada a cabo en un cultivo en suspensión, seguida de una etapa de diferenciación en cultivo adherente. En esta última etapa, las células precursoras de los ojos producidas en la etapa de inducción se diferencian en células precursoras epiteliales de la córnea.

35 En algunas otras realizaciones, el presente método de diferenciación es un método de tres etapas que comprende la etapa de inducción descrita anteriormente, preferiblemente, pero no necesariamente llevada a cabo en cultivo en suspensión, seguida de una etapa de diferenciación y una etapa de maduración aún más en cultivo adherente. En la etapa de maduración, las células precursoras epiteliales de la córnea son maduras en células epiteliales corneales maduras o incluso en epitelio estratificado de la córnea.

40 En la práctica, la etapa de diferenciación y la etapa de maduración se llevan a cabo sucesivamente en la misma forma; sólo se diferencian una de la otra respecto a la sincronización, como se explica con más detalle a continuación. Incluso el medio de cultivo que se utiliza en estas etapas es el mismo. Por lo tanto, las expresiones "medio de diferenciación" y "medio de maduración" son intercambiables. Lo mismo ocurre con las expresiones "suplementos de diferenciación" y "suplementos de maduración". Si se desea, el paso de una etapa de diferenciación a una etapa de maduración se referirá exclusivamente a una subpoblación seleccionada de células obtenidas de la etapa de diferenciación.

Preferiblemente, las condiciones de diferenciación y maduración están exentas de xeno, exentas de suero o definidas, más preferiblemente una combinación de éstos, y lo más preferiblemente exentas de xeno, exentas de suero y definidas al mismo tiempo.

5 Ya que las etapas de diferenciación y maduración se llevarán a cabo en un cultivo adherente y la capacidad para unirse a la matriz extracelular (ECM) se considera que es importante para las células epiteliales, es ventajoso el uso de sustratos, tales como placas de cultivo celular o botellas, recubiertos con proteínas ECM como se conoce generalmente en la técnica. De hecho, la adhesión al colágeno IV se utiliza generalmente para seleccionar células precursoras epiteliales de las poblaciones de células epiteliales del limbo y la diferenciación de células madre pluripotentes. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, el sustrato de cultivo celular se recubre con colágeno IV. Otros ejemplos no limitativos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen colágeno I, laminina, vitronectina, fibronectina, y Matrigel™. Cuando se desean condiciones exentas de xeno para uso humano, el sustrato se recubre con una proteína ECM de origen humano. Medios y métodos para el revestimiento sustratos de cultivo de células están generalmente disponibles en la técnica.

Diferenciación del epitelio corneal

15 En la presente invención, las células precursoras de los ojos que pueden obtenerse mediante la presente etapa de inducción se diferencian además en células precursoras epiteliales de la córnea. Este método puede ser denominado como un método de diferenciación dos etapas.

20 En este contexto, la expresión "células precursoras epiteliales de la córnea" se refiere a células que son positivas para, es decir, expresan el marcador epitelial de la córnea p63, que puede ser cuantificado con la ayuda de tinción inmunofluorescente. De acuerdo con una realización, las células precursoras epiteliales corneales que expresan dicho marcador de p63 representan al menos 65%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 90% de la población celular total. La población de células precursoras epiteliales de la córnea puede ser utilizada clínicamente.

25 Típicamente, la obtención de células precursoras epiteliales de la córnea requiere cultivar células precursoras del ojo bajo las presentes condiciones de diferenciación de la córnea de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 días, preferiblemente durante aproximadamente 25 días. En algunas realizaciones preferidas, las células precursoras epiteliales de la córnea se obtienen llevando a cabo la etapa de inducción aproximadamente de cuatro a aproximadamente siete días, seguido de la etapa de diferenciación de la córnea aproximadamente de 23 a 26 días. La población de células p63 positivas más pura se puede obtener después de una etapa de diferenciación de este tiempo. Menos tiempo de diferenciación produce poblaciones de células más heterogéneas, mientras que la diferenciación con un mayor tiempo da como resultado una maduración terminal hacia células epiteliales de la córnea.

35 En algunas realizaciones más, dichas células precursoras epiteliales de la córnea pueden ser maduras aún más en las células epiteliales de la córnea maduros o epitelio corneal estratificado, como se demuestra por una expresión del marcador característico y morfología. Tal maduración adicional puede ser obtenida por la continua ING culturalmente celular, típicamente para un adicional de 10 a 20 días, en las presentes condiciones de maduración de la córnea, que en la práctica se corresponden con las condiciones de diferenciación de la córnea. Esta realización puede ser denominada como un método de diferenciación de tres etapas.

40 Un medio de cultivo adecuado para uso en las etapas de diferenciación y maduración puede ser, por ejemplo, cualquier medio corneal disponibles, tal como CnT-30 que está disponible comercialmente de CELLnTECH, o cualquier medio epitelial hormonal suplementario (SHEM) adecuado para el cultivo de células del epitelio corneal. En algunas otras realizaciones, el medio de diferenciación y maduración puede estar compuesto por ingredientes tales como uno o más suplementos de diferenciación y maduración seleccionados del grupo que consiste en factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona, insulina, isoproterenol y tri-yodo tironina, en cualquier medio basal adecuado. En algunas realizaciones, el medio de la diferenciación de la córnea y de maduración no contiene ingredientes distintos de dicho uno o más suplementos de diferenciación y maduración, medio basal, antibióticos, L-glutamina, y un reemplazo de suero definido. En algunas realizaciones adicionales, el medio basal es una mezcla 1:1 de DMEM y mezcla de nutrientes F12 de Ham.

50 Cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente puede formar una base para realizaciones adicionales o alternativas, en la que el medio de diferenciación y maduración no comprende ninguno de los suplementos, que en general se saben que causan la diferenciación hacia tipos de células distintas de las células oculares, tipos tales como la diferenciación neural. Tales suplementos generalmente conocidos incluyen, pero no se limitan a, ácido retinoico, ácido ascórbico, factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF, y el factor neurotrófico derivado de la glía GDNF.

55 Es importante destacar que la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras epiteliales de la córnea y la posterior maduración en células epiteliales de la córnea, o el epitelio corneal estratificado es significativamente mejor cuando las células se diferencian por la presente etapa de inducción seguido de la presente diferenciación de la córnea y la etapa de maduración que cuando se realiza la diferenciación de la córnea y de la

etapa de maduración sin inducción previa. Se obtuvieron resultados mejorados, por ejemplo, con respecto a una mejor adherencia a sustratos recubiertos con colágeno IV, la morfología de las células epiteliales de la córnea fue uniforme, y una mayor expresión de p63, así como otros marcadores clave (más notablemente citoqueratinas 3, 12 y 15), tanto en el nivel de los genes como en el de las proteínas.

5 Características generales de los presentes medios

El medio de cultivo se puede considerar que consiste en medio basal y suplementos. En el presente medio de inducción, los tres suplementos esenciales son el inhibidor de TGF-beta, un inhibidor de Wnt y un factor de crecimiento de fibroblastos. En el presente medio de diferenciación y maduración epitelial corneal, suplementos ejemplares o preferidos adicionales a los suplementos de cultivo celular comunes se seleccionan del grupo que consiste en EGF, hidrocortisona, insulina, isoproterenol, y tri-yodo-tironina. En el presente medio de diferenciación y maduración EPR, los suplementos ejemplares o preferidos adicionales a los suplementos de cultivo celular comunes se seleccionan del grupo que consiste en taurina, hidrocortisona, tri-yodo-tironina, activina A, insulina, transferrina, selenito de sodio, putrescina, y progesterona. Sin embargo, en los medios de cultivo de contexto, otros suplementos comunes en la técnica pueden ser aplicados, a menos que se sepa que la diferenciación va directa hacia tejidos distintos de los del ojo. Cuando se hace referencia a los componentes de un medio, el término incluye tanto los suplementos como los ingredientes para el medio basal.

20 Cuando está en uso o cuando esté listo para su uso, los presentes medios de cultivo comprenden los suplementos esenciales apropiados indicados anteriormente. Sin embargo, según la práctica común en el campo, los ingredientes para un medio se pueden proporcionar como un concentrado que comprende dichos componentes o un conjunto de viales a partir de los cuales se prepara una combinación adecuada en un laboratorio de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

Como se menciona en este documento, "medio de cultivo" se refiere ampliamente a cualquier formulación líquida o de gel diseñada para apoyar el crecimiento de microorganismos, células o plantas pequeñas. Cuando se hace referencia a la formulación diseñada para el mantenimiento y el crecimiento celular, se utiliza la expresión "medio de cultivo celular". En la técnica, expresiones tales como medio de inducción, medio de crecimiento, medio de diferenciación, medio de maduración, etc. pueden ser consideradas como subespecies respecto al medio general del cultivo de expresión. Cualquier experto en la técnica está familiarizado con los componentes básicos necesarios para mantener y alimentar a los sujetos que viven en el medio de cultivo, y los medios básicos comerciales están ampliamente disponibles. Típicamente, tales componentes básicos se conocen como "medios basales", que contienen los aminoácidos necesarios, minerales, vitaminas y compuestos orgánicos. En general, se pueden obtener de fuentes biológicas, tales como suero o combinarse con ingredientes aislados y puros. Si se desea, el medio basal puede ser suplementado con sustancias que contribuyan a características especiales o funciones del medio de cultivo. Suplementos muy comunes incluyen a los antibióticos, que se utilizan para limitar el crecimiento de contaminantes.

35 Los ejemplos no limitantes de medios basales adecuados para su uso en el presente medio de cultivo celular de diversas realizaciones incluyen de Medio Eagle Modificado de Dulbecco de KnockOut (KO-DMEM), Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo (MEM), medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), medio de Dulbecco modificado de Iscove y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones preferidas, el medio REgES alterado por la omisión de retinol, bFGF y la activina A (denominado en este documento RegESbasic) se utiliza como el medio basal. En algunas realizaciones más preferidas, se utiliza RegESbasic como medio basal en el presente medio de inducción.

45 Para una mejor aceptación clínica, todos los medios de cultivo utilizados en el presente documento están preferiblemente sustancialmente exentos de xeno, sustancialmente exentos de suero o definidos, más preferiblemente combinaciones de estos y más preferiblemente o exentos de xeno, exentos de suero y definidos al mismo tiempo. Con sustancialmente se quiere decir en este documento que las trazas no intencionales son irrelevantes y que lo que está bajo las regulaciones clínicas o de laboratorio consideradas y aceptadas como exento de xeno, o exento de suero o definido, es lo que se aplica en este documento también.

Tradicionalmente, el suero, especialmente el suero bovino fetal (FBS) se ha valorado en cultivos de células que proporcionan los componentes de crecimiento y supervivencia esenciales para el cultivo celular in vitro de las células eucariotas. Se produce a partir de sangre recogida en los mataderos comerciales de ganado criado para suministrar la carne destinada al consumo humano. "Exento de suero" indica que el medio de cultivo no contiene suero, ya sea animal o humano. El medio definido se valora cuando hay contradicciones para el uso de los medios indefinidos, por ejemplo, "medio condicionado", que se refiere a los medios gastados recogidos a partir de células cultivadas que contienen metabolitos, factores de crecimiento y proteínas de matriz extracelular secretadas en el medio por las células cultivadas. Los medios indefinidos pueden estar sujetos a diferencias considerables debido a la variación natural en la biología. Los componentes indefinidos en un cultivo celular comprometen la repetibilidad de los experimentos de modelos de células, por ejemplo, en el descubrimiento de fármacos y estudios de toxicología. Por lo tanto, "medio definido" o "medio de cultivo definido" se refiere a una composición, en la que el medio ha conocido cantidades de todos los ingredientes. Típicamente, el suero que normalmente se añade al medio de cultivo para el cultivo celular se sustituye por cantidades conocidas de los componentes del suero, tales como, por ejemplo,

albúmina, insulina, transferrina y factores de crecimiento posiblemente específicos (es decir, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento transformante o factor de crecimiento derivado de plaquetas).

5 Un medio químicamente definido es un medio de crecimiento adecuado para el cultivo de células in vitro de células humanas o animales en el que se conocen todos los componentes químicos. Un medio químicamente definido está totalmente libre de componentes derivados por animales y representa el ambiente de cultivo celular más puro y consistente. Por definición, los medios químicamente definidos no pueden contener suero fetal bovino, albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano, ya que estos productos son derivados de fuentes bovinas o humanas y contienen mezclas complejas de albúminas y lípidos.

10 Los medios químicamente definidos difieren de los medios exentos de suero por la albúmina de suero bovino o la albúmina de suero humano, ya sea con una versión químicamente definida recombinante (que carece de los lípidos asociados a la albúmina) o químico sintético, tal como el alcohol de polivinilo polímero que puede reproducir algunas de las funciones de BSA/HSA. El siguiente nivel de los medios definidos, por debajo de los medios químicamente definido es un medio exento de proteínas. Estos medios contienen hidrolizados de proteína animal y son complejos para formular aunque se utilizan comúnmente para el cultivo de insectos o de células CHO.

15 De acuerdo con algunas realizaciones, el presente medio comprende una formulación de reemplazo de suero exento de xeno. Una formulación de reemplazo de suero exento de xeno definida o composición se pueden usar para complementar cualquier medio basal adecuado para su uso en la derivación, el mantenimiento, la proliferación, o la diferenciación in vitro de células madre. Dicha sustitución de suero se puede utilizar para complementar cualquiera de los medios basales que contienen suero o exentos de suero, o cualesquiera combinaciones de los mismos.

20 Cuando el medio basal exento de xeno se complementa con la presente sustitución de suero exento de xeno, el medio de cultivo final está exento de xeno también. Un ejemplo se describe en Rajala et al. 2010, que se incorpora en este documento como referencia para describir un reemplazo de suero exento de xeno aplicable en el contexto de la presente invención. Otro ejemplo no limitante de un reemplazo de suero definido es el reemplazo de suero KnockOut™ (Ko-SR) comercialmente disponible de Life Technologies.

25 Cualquier experto en la técnica está familiarizado con las diferentes concentraciones del medio de cultivo. A menudo, el medio de cultivo se diluye y se prepara a la composición final inmediatamente antes de su uso. Por lo tanto, se entiende que cualquier solución madre o kit de preparación adecuado para uso en tal preparación inmediata está incluido en el alcance de la presente invención también. Por ejemplo, para la preparación de un medio de cultivo de acuerdo con la presente descripción, un kit de cultivo celular comprende el inhibidor de TGF-beta, el inhibidor de Wnt y el factor de crecimiento de fibroblastos cada uno en un recipiente separado o cualquiera de sus combinaciones como suplementos, y opcionalmente otros componentes, tales como el medio basal o suministros para su preparación, también.

30

Parte experimental de referencia

Materiales y métodos

35 Línea celular y medios de cultivo celular

La línea de células madre pluripotentes indiferenciada se deriva y se caracteriza como se ha descrito previamente (Skottman 2010). La línea celular se cultivó en fibroblastos de prepucio humano inactivados mitóticamente (hFF) de células alimentadoras (CRL-2429, ATCC). Las células madre pluripotentes no diferenciadas se mantuvieron en un medio de cultivo que consistía en medio Eagle modificado de Dulbecco Knock-Out (KO DMEM) suplementado con

40 20% de reemplazo de suero Knock-Out (KO-SR), Glutamax-I 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM (todos de Invitrogen), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 50 U/ml de penicilina/estreptomicina (ambos de Lonza Group Ltd) y 8 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humano básico (bFGF, PeproTech). El medio de cultivo se cambió cinco veces a la semana y las colonias no diferenciadas fueron pasadas enzimáticamente sobre capas de células de alimentación frescas a intervalos de diez días.

45 Tres medios diferentes se utilizaron para la diferenciación del epitelio corneal: A) medio definido comercialmente disponible y exento de suero de epitelio corneal CNT-30 (CELLnTEC Advanced Cell Systems) suplementado con los suplementos apropiados suministrados con el medio y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina. B) medio RegES exento de suero y exento de xeno desarrollados originalmente para el cultivo de células madre indiferenciadas (Rajala et al., 2010). La composición del medio fue alterada por la omisión de retinol, bFGF y activina A, y el medio de

50 diferenciación resultante se denomina como medio RegESbasic. La composición de dicho medio RegESbasic fue como se da en la Tabla 1. C) medio RegESbasic suplementado con inhibidor de TGF-beta 10 μ M (SB-505124 Sigma), Wnt-inhibidor 10 μ M (IWP-2 Merck Biosciences) y 50 ng/ml de bFGF y el medio de inducción resultante se refiere como medio RegESinduction.

55 Tabla 1. Medio RegESbasic que representa un ejemplo de medio de cultivo celular exento de xeno de acuerdo con Rajala et al., 2010.

ES 2 604 659 T3

| Componente | Concentración (mg/L) | Fabricante |
|---|----------------------|------------|
| Aminoácidos | | |
| Glicina | 53 | Sigma |
| L-histidina | 183 | Sigma |
| L-isoleucina | 615 | Sigma |
| L-metionina | 44 | Sigma |
| L-fenilalanina | 336 | Sigma |
| L-prolina | 600 | Sigma |
| L-hidroxiprolina | 15 | Sigma |
| L-serina | 162 | Sigma |
| L-treonina | 425 | Sigma |
| L-triptófano | 82 | Sigma |
| L-tirosina | 84 | Sigma |
| L-valina | 454 | Sigma |
| Vitaminas, antioxidantes y oligoelementos | | |
| Ácido ascórbico | 50 | Sigma |
| Glutati6n | 1,5 | Sigma |
| Selenio | 1 x 10 ⁻⁵ | Sigma |
| Tiamina | 9 | Sigma |
| Oligoelementos B | 1:1000 | Cellgro |
| Oligoelementos C | 1:1000 | Cellgro |
| Proteínas | | |
| Albúmina de suero humano* | 10 000 | Sigma |
| Insulina | 100 | Invitrogen |
| Transferrina | 8 | Sigma |
| Otros componentes | | |
| AANE (100x) | 1% | Lonza |
| Glutamax-I | 2 mM | Invitrogen |
| β-mercaptoetanol | 0,1 mM | Invitrogen |

Medio basal: KO-DMEM (Invitrogen)

*Para proporcionar una mejor consistencia y menos variaci6n, HSA puede ser sustituido con HSA recombinante.

Inducci6n del precursor de los ojos

- 5 El diseño experimental se presenta esquemáticamente en la Figura 3. Para iniciar la diferenciaci6n del precursor del ojo de células madre pluripotentes, las colonias no diferenciadas se disecaron manualmente y se transfirieron a un cultivo en suspensi6n en placas de 6 pocillos (fijaci6n ultra-baja de Corning). Las células se cultivaron como grupos de células tridimensionales de cuatro a siete días, cambiando el medio de cultivo todos los días. Esta etapa de inducci6n se llevó a cabo en RegESinduction (diferenciaci6n córnea epitelial) y en condiciones de control en

comparación sin moléculas inductivas. También hubiera sido posible llevar a cabo la inducción mediante el uso de EPRinduction para la diferenciación del epitelio corneal.

Diferenciación del epitelio corneal y maduración

5 Después de la etapa de inducción, los grupos de células se sembraron en sustrato de cultivo celular recubierto con colágeno IV de placenta humana ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma) a una densidad de aproximadamente 50 grupos/ cm^2 . Se utilizaron ya sea placas de 24 pocillos (Corning Cellbind) como insertos de cultivo celular colgantes de 24 pocillos (Millipore, $1 \mu\text{m}$ de tamaño de poro). Las células se mantuvieron en cultivo adherente durante 40 días más en cualquiera de medio CNT-30 (condiciones A-C) o medio RegESbasic (control), con sustitución del medio de cultivo tres veces a la semana. Alternativamente, el medio CNT-30 fue reemplazado con medio epitelial hormonal suplemental (SHEM), que consta de medio basal DMEM/F12 suplementado con 15% KO-SR, Glutamax-I 2 mM, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hidrocortisona (Sigma), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina (Invitrogen), 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de isoproterenol (Sigma), 1,35 ng/ml de tri-yodo-tironina (Sigma), 10 ng/ml EGF (PeproTech) y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina.

Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR)

15 Fue extraído el ARN total de células madre pluripotentes no diferenciadas, y de agregados de células recogidas después de la fase de inducción, usando el kit de NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, GmbH & Co). La concentración de ARN de cada muestra se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies). De cada muestra de ARN, 200 ng se utilizaron para sintetizar cDNA utilizando el kit de alta capacidad de cDNA RT (Applied Biosystems). Las muestras de ADNc resultantes se analizaron con qPCR utilizando ensayos de expresión génica TaqMan específicos de secuencia (Applied Biosystems) para POU5F1 (Hs00999632_g1) y PAX6 (Hs010881_12_m1). Todas las muestras y los controles se llevaron a cabo como reacciones por triplicado con el sistema de PCR 7300 en tiempo real. Los resultados se analizaron con el software 7300 System SDS (Applied Biosystems) y Microsoft Excel. Según los valores del umbral del ciclo (TC) proporcionados por el software, la cuantificación relativa de cada gen se calculó aplicando el método $-2\Delta\Delta\text{Ct}$. Los resultados se normalizaron a GAPDH (Hs99999905_m1), con las células madre pluripotentes no diferenciadas como calibrador para determinar las cantidades relativas (RQ) de la expresión del gen en cada muestra. El análisis se repitió cuatro veces.

Inmunofluorescencia

30 Para evaluar la diferenciación del epitelio corneal, la expresión de la proteína de p63 fue analizada y cuantificada en tres puntos de tiempo (10, 20 y 30 días en cultivo de diferenciación) de las células cultivadas en insertos colgantes recubiertos de colágeno IV. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (Sigma) durante 20 minutos y las membranas celulares permeabilizadas con 0,1% de Triton-X-100 durante 10 minutos. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con 3% de BSA durante 1 hora. El anticuerpo de cabra anti-p63 primario (Santa Cruz) se diluyó 1:100 en 0,5% de BSA, y se incubó con las células durante 1 hora a temperatura ambiente, o durante la noche a 4. La detección del anticuerpo primario se realizó con anticuerpo secundario anti-cabra de burro Alexa Fluor 568-conjugado (Molecular Probes) diluido 1:800 en 0,5% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron montadas en objetivos en medio de montaje Vectashield que contenía DAPI para la visualización de los núcleos. Las imágenes fueron capturadas con el microscopio de fluorescencia de múltiples áreas seleccionadas al azar. El número de células totales se determinó contando el número de núcleos teñidos con DAPI, y los porcentajes de núcleos p63-positivos fueron, en consecuencia, cuantificados. En el punto final del estudio, un total de 44 días en el cultivo de diferenciación, la expresión de varias proteínas se analizó con inmunofluorescencia. Las membranas de insertos de cultivo celular colgantes se cortaron en varias piezas y se trataron de la manera descrita anteriormente. La unión de los anticuerpos primarios utilizados se visualizó usando anticuerpos secundarios contra las especies apropiadas marcadas con Alexa Fluor 488 o 568.

45 Las células cultivadas en placas de 24 pocillos se utilizaron para el análisis de inmunofluorescencia cuantitativa en el punto final del estudio. Las células se enjuagaron con PBS y se separaron mediante TrypLE Select (Gibco) durante 5 minutos a 37. Las suspensiones celulares fueron coladas a través de coladores de células de $40 \mu\text{m}$ y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS frío, y los volúmenes de suspensión de una sola célula se ajustaron para contener 50 000 células/150 μl de muestra. Las células se centrifugaron en objetivos usando una citocentrífuga (CellSpin II). Las tinciones de inmunofluorescencia se realizaron para las muestras resultantes del Cytospin como se ha descrito anteriormente. Imágenes de múltiples áreas seleccionadas al azar fueron capturadas con un microscopio de fluorescencia. Los porcentajes de células positivas para cada marcador se cuantificaron en relación con las células teñidas con DAPI. Este análisis se repitió tres veces.

Resultados

55 La inhibición de las rutas de señalización de TGF- β y Wnt dirige la diferenciación de células madre pluripotentes hacia linajes específicos del ojo

Para estudiar los efectos del medio de inducción sobre la diferenciación en etapa temprana, la expresión de POU5F1, un marcador de células no diferenciadas, y PAX6, un gen importante para el desarrollo del ojo, se estudió usando qPCR. Los resultados se muestran en la figura 4. Después de la fase de inducción de cuatro días en cultivo

en suspensión, la expresión de POU5F1 disminuyó en todas las condiciones, mientras que la expresión de PAX6 aumentó. Las diferencias en los niveles de expresión en comparación con las células no diferenciadas fueron significativamente mayores ($p < 0,05$, determinado mediante pruebas de Mann-Whitney U) en las células que se sometieron a la inducción con SB-505124, IWP-2 y bFGF, que en los otros medios de inducción, sugiriendo una mayor grado de diferenciación en estas condiciones.

5

La inducción de pequeñas moléculas aumenta la eficiencia de la diferenciación epitelial de la córnea y la reproducibilidad

La expresión de proteínas del marcador p63 progenitor epitelial corneal de uso común se analizó a intervalos de diez días por medio de la tinción de inmunofluorescencia. El primero punto de tiempo fue después de seis días en cultivo adherente, un total de diez días en cultivo de diferenciación, dando el tiempo a los grupos de células para adherirse adecuadamente al sustrato de colágeno IV revestido. El siguiente punto del tiempo se obtuvo el día 20, y el último el día 30. La expresión de p63 no se detectó en células cultivadas en condiciones de diferenciación espontánea en RegESbasic durante todo el curso del estudio, lo que sugiere que la diferenciación de células precursoras del epitelio corneal no tiene lugar de forma espontánea. Las células se mantuvieron en p63 expresado en medio CNT-30 en cada punto de tiempo, y los niveles de expresión fueron claramente afectados por el medio de inducción. Con el fin de cuantificar las diferencias entre las condiciones de cultivo, las cantidades de células p63 positivas fueron contadas en cada punto de tiempo. Después de la inducción con CNT-30, la expresión de p63 fue bastante variada entre las réplicas biológicas, enmascarando las diferencias globales entre los puntos de tiempo. Por el contrario, después de la inducción con medio RegESinduction, el número de células p63 positivas aumentó con el tiempo de aproximadamente 50% el día 10, a aproximadamente 90% el día 30, con la variación de menos interreplicado de todas las condiciones estudiadas. La población de células precursoras de la córnea después del cultivo 30 demostró de este modo curiosamente un alto grado de diferenciación. La inducción con medio RegESbasic resultó en los niveles de expresión de p63 más bajos en promedio, 25-50% durante todo el curso del estudio, con bastante alta variación entre las repeticiones.

10

15

20

25

La maduración en SHEM produjo cantidades comparables de células p63 positivas después de un total de 20 días en cultivo de diferenciación, como se verificó mediante tinción de inmunofluorescencia (Figura 5).

Las células epiteliales de la córnea pueden ser diferenciadas a partir de células madre pluripotentes

Debido a que el medio de inducción afectaba el rendimiento posterior de las células precursoras p63 positivas corneales epiteliales, la expresión de varias proteínas típicas de los precursores de la córnea (p63 y CK15) y el epitelio maduro (CK3 y CK12) se cuantificó también en el punto final del estudio.

30

Después de un total de 44 días en cultivo de diferenciación, las células se analizaron con inmunofluorescencia, tinción positiva para los marcadores progenitores p63 y CK15, y marcadores específicos del epitelio corneal, CK3 y CK12. Los resultados que muestran los porcentajes de diferenciación se compilan en la Tabla 2, donde se da la relación entre células diferenciadas y el número total de células; las escalas indican que 0% significa que ninguna de las células (de la población estudiada) expresan el marcador de diferenciación, y 100 % significa que todas las células expresan el marcador de diferenciación. Se detectaron los dos marcadores del epitelio corneal maduro especialmente en las regiones estratificadas, lo que sugiere que se requiere una estratificación para la completa maduración del epitelio corneal. La expresión de marcadores progenitores y marcadores maduros fue en su mayor parte mutuamente excluyente.

35

40

Tabla 2. Resultados que representan la eficiencia de diferenciación (44 días en cultivo de diferenciación).

| Marcador | Tipo celular | Expresión en el punto final del estudio |
|----------|--|---|
| p63 | Células precursoras del epitelio corneal | 70% (desv. est. 4%) |
| CK15 | | 60% (desv. est. 11%) |
| CK3 | Células epiteliales de la córnea maduras | 35% (desv. est. 25%) |
| CK12 | | 70% (desv. est. 5%) |

A partir de estos resultados, se puede concluir que el presente método para cultivar células precursoras epiteliales de la córnea o células epiteliales de la córnea maduras, que comprende cultivar células madre en un medio de cultivo que comprende un inhibidor de TGF-beta, un Wnt-inhibidor y un factor de crecimiento de fibroblastos como suplementos, ha demostrado un potencial interesante.

45

De acuerdo con una realización, dicho método se caracteriza por la expresión del marcador p63 corneal epitelial, preferiblemente siendo al menos el 65% y más preferiblemente al menos el 70% de las células de la población positivas con dicho marcador. De acuerdo con otra realización, dicho método se caracteriza por la expresión de marcadores epiteliales de la córnea CK15, preferiblemente siendo al menos el 50% y más preferiblemente al menos el 70% de las células de la población positivas con dicho marcador. De acuerdo con una realización adicional, dicho

método se caracteriza por la expresión simultánea del marcador p63 de la córnea epitelial, preferiblemente siendo al menos 65% y más preferiblemente al menos 70%, y el marcador epitelial corneal CK15, preferiblemente siendo al menos 50% y más preferiblemente al menos 70% de las células de la población positiva con dicho marcador.

5 De acuerdo con otra realización, dicho método se caracteriza por la expresión del marcador CK3 de la córnea epitelial, preferiblemente siendo al menos 50% y más preferiblemente al menos 60% de las células de la población positivas con dicho marcador. De acuerdo con otra realización más, dicho método se caracteriza por la expresión del marcador epitelial de la córnea CK12, preferiblemente con al menos 65% y más preferiblemente al menos 75% de las células de la población positivas con dicho marcador. De acuerdo con una realización adicional, dicho método se caracteriza por la expresión simultánea del marcador CK3 de la córnea epitelial, preferiblemente con al menos 50%
10 y más preferiblemente al menos 60%, y el marcador epitelial corneal CK12, preferiblemente con al menos 65% y más preferiblemente al menos 75% de las células de la población positiva con dicho marcador.

Sin embargo, estos resultados, que representan el punto final del presente estudio, junto con los resultados que describen la expresión de p63 en todo el curso del estudio, indican que está dentro de la competencia de un experto en la técnica determinar el punto de tiempo que proporciona la población enriquecida deseada, tanto de células precursoras oculares, precursores del epitelio corneal o células epiteliales de la córnea.
15

Por lo tanto, el presente medio de cultivo puede ser utilizado para la producción de células precursoras del ojo o una población de las mismas, células precursoras epiteliales de la córnea o una población de las mismas, células tipo epiteliales de la córnea o una población de las mismas, o del epitelio corneal estratificado a partir de células madre pluripotentes.

20 Será obvio para cualquier experto en la técnica que, según avance la tecnología, el concepto inventivo podrá implementarse de varias maneras. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos anteriormente sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Referencias

25 Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, Figueiredo F & Lako M (2007): Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelium stem cell niche. *Stem Cells* 25: 1145-1155.

Bilic J, Izpisua Belmonte JC (2012), Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart? *Stem Cells*. 2012 Jan;30(1):33-41. doi: 10.1002/stem.700.

30 Hanson C, Hardarson T, Ellerstrom C, Nordberg M, Caisander G, Rao M, Hyllner J and Stenevi U (2012), Transplantation of human embryonic stem cells onto a partially wounded human cornea in vitro. *Acta Ophthalmol* 1-4.

Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, et al. (2012) Generation of Corneal Epithelial Cells from Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Dermal Fibroblast and Corneal Limbal Epithelium. *PLoS ONE* 7(9): e45435. doi:10.1371/journal.pone.0045435.

35 Maminishkis A, Chen S, Jalickee S, Banzon T, Shi G, Wang FE, Ehalt T, Hammer JA, and Miller SS (2006), Confluent Monolayers of Cultured Human Fetal Retinal Pigment Epithelium Exhibit Morphology and Physiology of Native Tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47(8): 3612-3624.

Osaka F, Ikeda H, Mandai M, Wataya T, Watanabe K, Yoshimura N, Akaike A, Sasai Y, Takahashi M. Toward the Generation of Rod and Cone Photoreceptors from Mouse, Monkey and Human Embryonic Stem Cells. *Nat Biotechnol*. 2008 Feb;26(2):215-24.

40 Osakada F, Jin ZB, Hiram Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, Sasai Y, Takanashi M. in vitro Differentiation of Retinal cells from Human Pluripotent Stem Cells by Small-Molecule Induction. *J Cell Sci*. 2009 Sep 1;122(pt 17):3169-79.

45 Rajala, K., Lindroos, B., Hussein, S. Lappalainen, RS., Pekkanen-Mattila, M., Inzunza, H., Miettinen, M., Narkilahti, S., Kerkelä, E., Aalto-Setälä, K., Otonkoski, O., Suuronen, R., Hovatta O., Skottman, H. A Defined and Xeno-free Culture Method Enabling the Establishment of Clinical-grade Human Embryonic, Induced Pluripotent and Adipose Derived Stem Cells. *PLoS One*. 2010.

Skottman, H. Derivation and characterization of three new human embryonic stem cell lines in Finland. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010 Apr;46(3-4):206-9 . Epub 2010 Feb 23.

50 Vaajasaari H, Ilmarinen T, Juuti-Uusitalo K, Rajala K, Onnela N, Narkilahti S, Suur-onen R, Hyttinen J, Uusitalo H, Skottman H. Toward the defined and xeno-free differ-entiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis*. 2011 Feb 22;17:558-75.

Yoshida S, Yasuda M, Miyashita H, Ogawa Y, Yoshida T, et al. (2011) Generation of Stratified Squamous Epithelial Progenitor Cells from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. PLoS ONE 6(12): e28856. doi:10.1371/journal.pone.0028856.

Reivindicaciones

1. Un método para producir células diferenciadas de los ojos seleccionadas del grupo que consiste en células precursoras epiteliales de la córnea, células epiteliales de la córnea y epitelio estratificado de la córnea, comprendiendo el método:

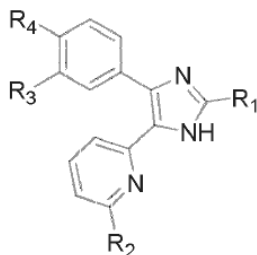
5 a) cultivar células madre pluripotentes en un medio de inducción que comprende un inhibidor de TGF-beta, un inhibidor de Wnt y un factor de crecimiento de fibroblastos, produciendo con esto células precursoras del ojo;

10 b) cultivar las células precursoras del ojo obtenidas en la etapa a) en un medio de cultivo celular que comprende uno o más suplementos seleccionados del grupo que consiste en factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona, insulina, isoproterenol, y tri-yodo-tironina, en donde el medio no contiene ninguno de los siguientes suplementos: un inhibidor de TGF-beta, un inhibidor de Wnt y un factor de crecimiento de fibroblastos, por el que se producen células precursoras epiteliales de la córnea, en donde dichas células precursoras epiteliales de la córnea expresan el marcador epitelial de la córnea p63, siendo dicha expresión preferiblemente cuantificada con tinción inmunofluorescente, y

15 opcionalmente madurando dichas células precursoras epiteliales de la córnea en células epiteliales de la córnea maduras o en el epitelio estratificado de la córnea.

2. El método según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de TGF-beta se selecciona de inhibidores de TGF-beta que tienen una masa molar de menos de 800 g/mol, preferiblemente menor que 500 g/mol.

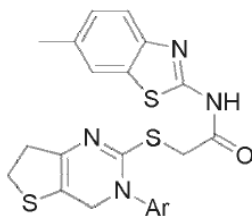
20 3. El método según la reivindicación 2, en el que el inhibidor de TGF-beta se selecciona de moléculas orgánicas de acuerdo con la Fórmula I:



en donde R₁ representa un grupo alquilo alifático C₁-C₅, ácido carboxílico, amida, y R₂ representa un grupo alquilo alifático C₁-C₅, R₃ y R₄ representan alquilos alifáticos incluyendo heteroátomos, O o N, que pueden estar unidos entre sí para formar un heteroanillo de 5 ó 6 miembros.

25 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el inhibidor de Wnt se selecciona de inhibidores de Wnt que tienen una masa molar de menos de 800 g/mol, preferiblemente menor que 500 g/mol.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el inhibidor de Wnt se selecciona de entre moléculas orgánicas según la Fórmula III:



30 Fórmula III

en la que Ar se refiere a un grupo arilo sustituido o no sustituido.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el factor de crecimiento de fibroblastos se selecciona del FGF básico y pequeños péptidos sintéticos que presentan actividad tipo factor de crecimiento de fibroblastos.

35 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenido del inhibidor de TGF-beta es de 1 μM a 100 μM, preferiblemente de 1 a 30 μM, el inhibidor de Wnt es de 1 μM a 100 μM, preferiblemente de 1 μM a 30 μM, y el contenido del factor de crecimiento de fibroblastos es de 1 ng/ml a

aproximadamente 1.000 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, y más preferiblemente de aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml.

- 5 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células madre son seleccionadas a partir de células madre pluripotentes inducidas (IPS) y células madre embrionarias (ES), con la condición de que si se utilizan células madre embrionarias humanas (hES), el método no incluye la destrucción de embriones humanos.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células madre pluripotentes se cultivan durante aproximadamente cuatro a aproximadamente siete días.
- 10 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cultivo en la etapa b) se lleva a cabo sobre un sustrato revestido con una proteína de la matriz extracelular (ECM) seleccionada a partir de colágeno IV, colágeno I, laminina, vitronectina, fibronectina, y Mat-Rigel™.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células precursoras epiteliales corneales, que expresan dicho marcador p63, representan al menos 65%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 90% de la población celular total obtenida.
- 15 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que se realiza en condiciones sustancialmente exentas de xeno, sustancialmente exentas de suero y/o definidas.

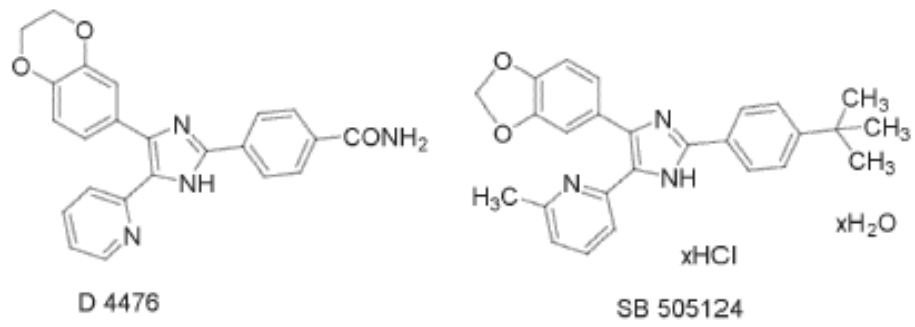


Figura 1

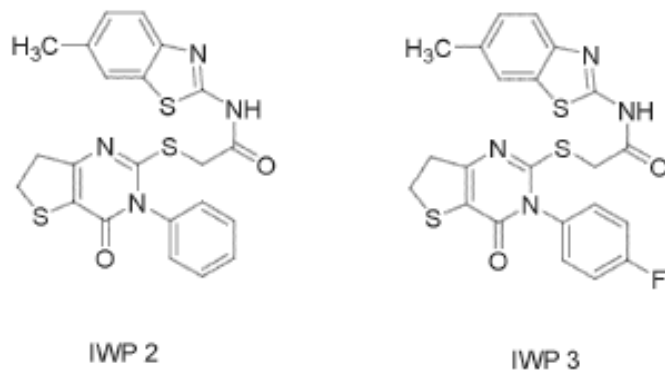


Figura 2

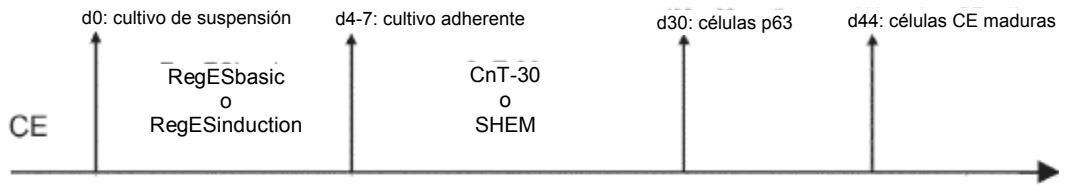


Figura 3

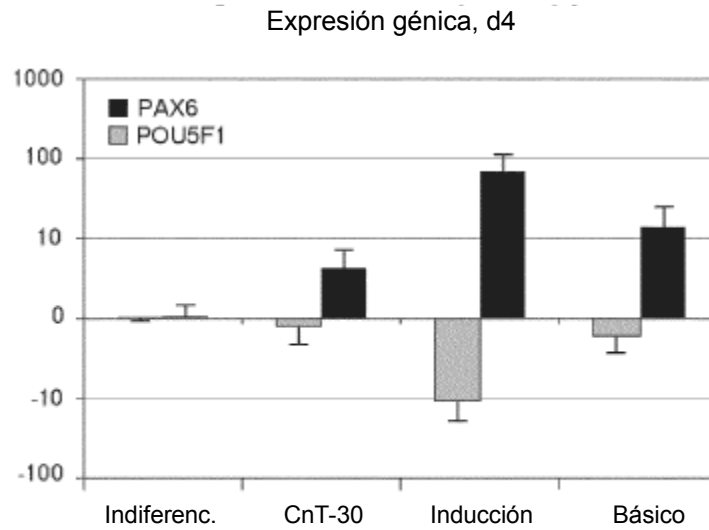


Figura 4

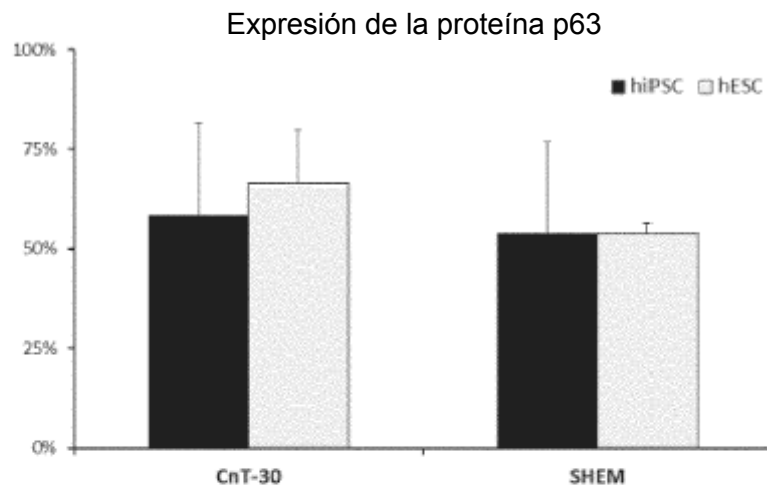


Figura 5