

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 620**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/079** (2010.01)

**A61K 35/30** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/JP2012/068538**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13012087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12815195 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2733201**

54 Título: **Método para preparar una célula endotelial corneal**

30 Prioridad:

**15.07.2011 JP 2011156641**

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

**11.05.2018**

73 Titular/es:

**OSAKA UNIVERSITY (100.0%)  
1-1 Yamadaoka  
Suita-shi, Osaka 565-0871, JP**

72 Inventor/es:

**HAYASHI, RYUHEI;  
HARA, SUSUMU;  
KAGEYAMA, TOMOFUMI y  
NISHIDA, KOHJI**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 667 620 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 preparar una célula endotelial corneal

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para hacer crecer selectivamente células progenitoras endoteliales corneales a partir de una población celular aislada a partir de tejido endotelial corneal, y a un método para obtener células endoteliales corneales a partir de las células progenitoras endoteliales corneales hechas crecer mediante el método mencionado anteriormente.

10 **Técnica anterior**

La córnea incluye cinco capas de una capa epitelial corneal, una membrana de Bowman, una capa estromal corneal, una membrana de Descemet y una capa endotelial corneal que aparecen en este orden desde el exterior. La capa endotelial corneal presente en la posición más interna entre estas capas es una monocapa celular, y mantiene constante el grosor corneal tomando una sustancia necesaria para la córnea del humor acuoso y descargando fluido de la córnea al humor acuoso, de modo que mantiene la transparencia de la córnea. Si se reduce el número de células endoteliales corneales, el fluido no puede descargarse suficientemente, lo que conduce a opacidad corneal o a una enfermedad endotelial corneal tal como queratitis vesicular.

En general, la densidad de células endoteliales corneales humanas es de aproximadamente 3000 células/mm<sup>2</sup>, pero disminuye hasta aproximadamente 500 células/mm<sup>2</sup> en un paciente que padece una enfermedad corneal endotelial. Sin embargo, las células endoteliales corneales humanas no crecen *in vivo*, y, por tanto, si alguna vez se dañan o se reducen, el único tratamiento básico es el trasplante.

Una enfermedad endotelial corneal resistente al tratamiento tal como queratitis vesicular se ha tratado convencionalmente mediante queratoplastia penetrante, pero este tratamiento tiene problemas de falta absoluta de donantes y de rechazo que se produce después del trasplante. Con el propósito de reducir el rechazo, se ha empleado un método en el que se recoge un endotelio corneal (que incluye parcialmente células estromales corneales) de una córnea importada de un banco de ojos humanos para trasplantarse a un ojo enfermo (queratoplastia endotelial con resección de la membrana de Descemet: DSEK, *Descemet stripping endotelial keratoplasty*), pero el problema de la falta de donantes no puede superarse mediante la DSEK.

Se ha intentado un método en el que se hacen crecer células endoteliales corneales *in vitro* para usarse para un tratamiento (por ejemplo, documento no de patente 1 y documentos de patente 1 y 2). Sin embargo, en un método de cultivo convencional que usa un suero, cambia la forma celular de las células endoteliales corneales perdiendo la función endotelial corneal a través de cultivo a largo plazo, y en última instancia, el crecimiento se detiene completamente, y, por tanto, las células pueden hacerse crecer generalmente hasta un número de pases de tan solo 5 a 7 (documento no de patente 2). Esto es probablemente porque, en el método existente, las células progenitoras endoteliales corneales no pueden hacerse crecer selectivamente y, por tanto, las células diferenciadas solas se hacen crecer temporalmente.

Se ha notificado que una esfera obtenida mediante cultivo en suspensión de células endoteliales corneales tiene las propiedades de una célula progenitora endotelial corneal (documento no de patente 3 y documento de patente 3). Sin embargo, la esfera así obtenida no expresa p75, un marcador para células madre de la cresta neural, que son el origen del endotelio corneal, y se desconoce su indiferenciación. P75 se expresa tan solo en células madre, incluyendo células madre de la cresta neural, presentes *in vivo* en un pequeño número, y es uno de los marcadores más fiables como índice de indiferenciación.

Tal como se ha descrito hasta la fecha, en las presentes condiciones, aunque existe una tecnología para hacer crecer células endoteliales corneales cultivadas maduras, no se realiza el trasplante de las células endoteliales corneales cultivadas. Por tanto, se desea desarrollar una técnica para obtener y hacer crecer células madre endoteliales corneales o células progenitoras endoteliales corneales, que pueden hacerse crecer de manera estable para inducirse en células endoteliales corneales con buena calidad.

50 **Lista de referencias**60 **Bibliografía de patentes**

Documento de patente 1: documento WO2004/073761

Documento de patente 2: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2003-038170

65 Documento de patente 3: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2006-187281

**Bibliografía no de patentes**

Documento no de patente 1: Ide T, *et al.*, *Biomaterials*, febrero de 2006, 27(4):607-614

5 Documento no de patente 2: Zhu C y Joyce NC, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, junio de 2004, 45(6):1743-1751

Documento no de patente 3: Yokoo S. *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, mayo de 2005, 46(5):1626-1631

**Sumario de la invención**

10

**Problema técnico**

Un objeto de la presente invención es solucionar los problemas de la falta de donantes y la aparición de rechazo en trasplante de córnea haciendo crecer selectivamente, a partir de una población celular derivada de tejido corneal, células progenitoras endoteliales corneales indiferenciadas, y aplicando células endoteliales corneales inducidas a partir de las mismas al tratamiento de una enfermedad corneal endotelial.

15

**Solución al problema**

Los presentes inventores han encontrado lo siguiente: cuando una población celular aislada mediante un tratamiento enzimático a partir de tejido endotelial corneal se cultiva a baja densidad durante un periodo de tiempo prolongado usando un medio de cultivo libre de suero específico, las células progenitoras endoteliales corneales pueden hacerse crecer selectivamente.

20

Específicamente, la presente invención se refiere a un método para preparar células progenitoras endoteliales corneales, tal como se define en la reivindicación 1, en el que una población celular aislada a partir de tejido de células endoteliales corneales se cultiva de manera adherente a baja densidad usando un medio libre de suero.

25

El cultivo se realiza con células sembradas a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> o menos, más preferiblemente de 20 a 2000 células/cm<sup>2</sup>, aún más preferiblemente de 50 a 1000 células/cm<sup>2</sup> y lo más preferiblemente de aproximadamente 100 a 500 células/cm<sup>2</sup>.

30

Según el método de la presente invención, se hace crecer selectivamente una población de células progenitoras endoteliales corneales indiferenciadas que tienen alta capacidad de proliferación. Se hace crecer la población de células progenitoras endoteliales corneales caracterizada por ser positiva para un marcador de cresta neural p75, usado como índice de indiferenciación, y, además, los marcadores de cresta neural FOXC2 y SOX9 y un marcador de endotelio corneal N-cadherina también se expresan en la misma. Estos marcadores se expresan altamente al comienzo del cultivo, pero desaparecen gradualmente a medida que progresa el crecimiento. Por otra parte, la población celular hecha crecer comienza a expresar altamente un marcador de crecimiento Ki-67, que no se expresa en la fase inicial del cultivo, y muestra una capacidad de proliferación extremadamente alta, de modo que una sola célula puede crecer en última instancia hasta al menos 1 x 10<sup>5</sup> células o más.

35

40

El medio usado en la presente invención contiene preferiblemente al menos una o más citocinas seleccionadas de bFGF, EGF, TGF, NGF y Wnt3a.

45

El medio puede contener un sustituto de suero tal como KSR. Además, el medio puede contener uno o más seleccionados de ácido retinoico, β-mercaptoetanol, piruvato de sodio y ácido ascórbico.

50

El cultivo adherente se realiza usando un recipiente de cultivo recubierto con colágeno, laminina, fibronectina, Matrigel (TM), poli-L-ornitina/laminina o poli-D-lisina (PDL).

55

Según el método de la presente invención, las células progenitoras endoteliales corneales con alta capacidad de proliferación pueden cultivarse en un estado indiferenciado durante un periodo de tiempo prolongado. Preferiblemente, el cultivo se realiza de manera continua durante 7 o más días.

60

El origen del tejido de células endoteliales corneales usado no está limitado, pero es preferiblemente de origen humano.

65

Las células progenitoras endoteliales corneales pueden obtenerse aislando una población celular positiva para p-75 a partir de la población celular cultivada mediante el método mencionado anteriormente.

La presente invención también proporciona un método para preparar células endoteliales corneales, tal como se define en la reivindicación 11, en el que se induce la diferenciación de la población de células progenitoras endoteliales corneales preparada mediante el método mencionado anteriormente para dar una población de células endoteliales corneales.

La inducción de diferenciación en una población de células endoteliales corneales puede realizarse usando, por ejemplo, un medio libre de suero que contiene TGF- $\beta_2$  o un medio que contiene un suero.

5 La inducción diferencial en una población de células endoteliales corneales puede realizarse mediante el cultivo adherente usando una placa de cultivo (recipiente) recubierta con colágeno, laminina, fibronectina, Matrigel (TM), poli-L-ornitina/laminina (PLO/LM), poli-D-lisina (PDL) o similares, y si va a producirse una lámina de células endoteliales corneales descrita más adelante, las células progenitoras endoteliales corneales pueden cultivarse sobre una membrana de polímero para inducir su diferenciación en células endoteliales corneales.

10 Además, la presente invención proporciona un método para producir una lámina de células endoteliales corneales, tal como se define en la reivindicación 13, cultivando la población de células progenitoras endoteliales corneales o población de células endoteliales corneales preparada mediante el método de la presente invención con una membrana de polímero usada como portador.

15 Un ejemplo de la membrana de polímero que va a usarse incluye una membrana que contiene uno o más seleccionados del grupo que consiste en glucosaminoglucano tal como sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, hialuronato, sulfato de heparano, sulfato de queratano y heparina; atelocolágeno, colágeno tratado con álcali y gelatina; queratina; proteoglicano; alginato, quitosano y hialuronato; poliaminoácidos (poli(ácido láctico)); celulosa; polímeros sensibles a la temperatura tales como compuestos de (met)acrilamida, derivados de (met)acrilamida  
20 sustituida con N-(o N,N-di)alquilo, derivados de vinil éter y copolímeros de estos.

### Efecto ventajoso de la invención

25 Según la presente invención, las células derivadas de tejido endotelial corneal pueden hacerse crecer en un estado más indiferenciado (al tiempo que se mantiene un estado positivo para p75). En otras palabras, según la presente invención, una población celular más indiferenciada (células progenitoras endoteliales corneales) puede hacerse crecer selectivamente y aislarse a partir de células derivadas de tejido endotelial corneal. La población de células progenitoras endoteliales corneales obtenida mediante la presente invención tiene una alta capacidad de proliferación y por tanto puede someterse a cultivo en pasajes durante un periodo de tiempo prolongado, y, por tanto,  
30 puede prepararse un mayor número de poblaciones de células progenitoras endoteliales corneales.

Cuando la población de células progenitoras endoteliales corneales obtenida mediante la presente invención se cultiva en condiciones adecuadas, puede inducirse su diferenciación en células endoteliales corneales maduras. Por tanto, según la presente invención, puede suministrarse una fuente de células endoteliales corneales estable  
35 durante un periodo de tiempo prolongado, lo que puede solucionar el problema de la falta grave de donantes (con 10 millones de pacientes en lista de espera) en la ingeniería de tejidos de la córnea.

### Breve descripción de los dibujos

40 [Figura 1] Las figuras 1A y 1B ilustran células obtenidas a partir de tejido endotelial corneal mediante un método de la presente invención (específicamente, la figura 1A ilustra un cultivo primario en el día 14 y la figura 1B ilustra un cultivo primario en el día 21).

45 [Figura 2] La figura 2 ilustra la expresión de marcadores de cresta neural p75, SOX9 y FOXC2 y un marcador endotelial corneal N-cadherina en células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención. En cada gráfico, las expresiones en las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención, células obtenidas mediante un método conocido y células endoteliales corneales presentes *in vivo* se ilustran en este orden desde la izquierda.

50 [Figura 3] La figura 3 es un gráfico que ilustra el nivel de expresión de p75 en las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención en comparación con los logrados en otras células. En este gráfico, los niveles de expresión logrados en las células progenitoras endoteliales corneales obtenidos mediante el método de la presente invención, células obtenidas mediante cultivo en suspensión en lugar del método de la presente invención, células obtenidas mediante un método conocido y células endoteliales corneales presentes  
55 *in vivo* se ilustran en este orden desde la izquierda.

[Figura 4] Las figuras 4A, 4B y 4C ilustran la capacidad de proliferación de las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención. La figura 4A ilustra fotografías, tomadas en el segundo día de cultivo, de células de cultivo primario (izquierda) y células de primer pase (derecha), la figura 4B  
60 ilustra la expresión de un marcador de crecimiento Ki-67 (específicamente, una figura cromática de Ki-67 (izquierda) y una figura cromática de Ki-67 y tinción nuclear (derecha)) y la figura 4C ilustra las capacidades de proliferación de células de pase respectivo (una curva de crecimiento).

[Figura 5] La figura 5A ilustra imágenes de células endoteliales corneales diferenciadas a partir de las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención (específicamente, las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención (izquierda) y las  
65

células endoteliales corneales cultivadas de manera habitual (derecha)). La figura 5B ilustra la expresión de un marcador endotelial corneal, colágeno de tipo VIII (COL8A2) (en las células progenitoras endoteliales corneales, las células endoteliales corneales diferenciadas a partir de las células progenitoras endoteliales corneales, células obtenidas mediante un método conocido y células endoteliales corneales presentes *in vivo* en este orden desde la izquierda).

[Figura 6] Las figuras 6A a 6F ilustran resultados de análisis de una lámina de células endoteliales corneales preparada sobre una lámina de atelocolágeno (específicamente, la figura 6A ilustra una lámina de células endoteliales corneales preparada sobre una lámina de atelocolágeno, la figura 6B ilustra una imagen de contraste de fases, la figura 6C ilustra una imagen teñida con alizarina, la figura 6D ilustra la expresión de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, la figura 6E ilustra la expresión de ZO-1 y la figura 6F ilustra la expresión de N-cadherina).

[Figura 7] Las figuras 7A y 7B ilustran resultados de análisis de una función de bomba de una lámina de células endoteliales corneales mediante un sistema de evaluación *in vitro* (sistema de cámara de Ussing) (específicamente, la figura 7A ilustra el cambio a lo largo del tiempo de una corriente de cortocircuito y la figura 7B ilustra la comparación de la corriente de cortocircuito entre las células endoteliales corneales diferenciadas a partir de las células progenitoras endoteliales corneales (izquierda) y el endotelio corneal cultivado (derecha).

[Figura 8] Las figuras 8A y 8B ilustran resultados de verificación realizada en un modelo de queratitis vesicular de conejo que tiene una lámina de células endoteliales corneales trasplantada, y específicamente, la figura 8A ilustra resultados de verificación de transparencia de una córnea (de un grupo de trasplante mostrado en una porción superior y un grupo de control mostrado en una porción inferior, ambos con una imagen obtenida antes del trasplante mostrada en el lado izquierdo e imágenes obtenidas 28 días después del trasplante mostradas en el medio y en el lado derecho) y la figura 8B ilustra resultados de verificación de la mejora en el grosor corneal (con resultados del grupo de trasplante mostrados con  $\blacklozenge$  y los del grupo de control mostrados con  $\blacksquare$ ).

## Descripción de la realización

### 1. Definiciones

Se describirán ahora los términos usados en la presente invención.

#### (1) Células endoteliales corneales

La córnea tiene una estructura de tres capas que consiste en una capa epitelial corneal, una capa estromal corneal y una capa endotelial corneal que aparecen en este orden desde el lado superficial. Las "células endoteliales corneales" son una población celular que forma la capa más interna de la córnea, y no se regeneran *in vivo* cuando se dañan. Las "células endoteliales corneales" se derivan de una cresta neural, tienen una forma similar a adoquines y se caracterizan por la expresión de marcadores de diferenciación para las células endoteliales corneales, colágeno de tipo VIII, ZO-1,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, y similares.

#### (2) Células progenitoras endoteliales corneales

"Células progenitoras endoteliales corneales" de la presente invención quiere decir células indiferenciadas que pueden diferenciarse en un endotelio corneal. Las "células progenitoras endoteliales corneales" son células de una forma dendrítica y tienen una alta capacidad de proliferación. Además, en la fase inicial de cultivo (crecimiento), no expresan un marcador de diferenciación, sino que se caracterizan por la expresión de p75, es decir, un marcador específico para células indiferenciadas tales como células madre de la cresta neural. Existe la posibilidad de que las "células progenitoras endoteliales corneales" obtenidas en la presente invención tengan también propiedades como células madre (pluripotencia y capacidad de autorrenovación). En ese sentido, las "células progenitoras endoteliales corneales" pueden describirse como "células progenitoras/células madre endoteliales corneales".

#### (3) Medio libre de suero

Un "medio libre de suero" usado en la presente invención quiere decir un medio que no contiene componentes de suero de otras especies. En el uso de un medio libre de suero, no hay ningún temor de infección con un patógeno derivado de un suero animal, y, por tanto, las células o el cultivo resultantes pueden usarse con seguridad en una aplicación clínica. Por tanto, en consideración de la aplicación de las células endoteliales corneales obtenidas en la presente invención para ingeniería de tejidos o similar, se usa preferiblemente un medio libre de suero como medio. Por otro lado, un medio libre de suero puede contener un sustituto de suero artificial descrito a continuación.

#### (4) Sustituto de suero

Un "sustituto de suero" usado en la presente invención quiere decir un sustituto de suero artificial que puede usarse en lugar de un suero, y los ejemplos incluyen KSR (sustituto de suero inactivado: fabricado por Invitrogen (GIBCO)) mencionado anteriormente, albúmina tal como albúmina rica en lípidos, transferrina, ácido graso, insulina,

precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol y 3'-tioglicerol, y equivalentes de estos.

(5) Citocina

5 "Citocina" es un nombre genérico para factores proteicos liberados a partir de células y que median en diversas interacciones celulares. En la presente invención, se añade citocina a un medio con el propósito de acelerar el crecimiento y la inducción de diferenciación de células.

10 Los ejemplos de la "citocina" usada en la presente invención incluyen un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), un factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$  (incluyendo TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$ , etc.), interferones (tales como IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  e IFN $\gamma$ ), interleucinas, un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), trombopoyetina (TPO), un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y un factor de crecimiento nervioso (NGF), y la citocina no está limitada a estos ejemplos siempre que sea adecuada para el objeto y el efecto de la presente invención.

15 (6) Marcador celular

20 En la presente invención, con el propósito de identificar las células progenitoras endoteliales corneales y las células endoteliales corneales cuya diferenciación se ha inducido a partir de las mismas, se usan proteínas (marcadores celulares) expresadas específicamente en las cepas celulares respectivas. Específicamente, en la fase inicial del cultivo, se determina que la población de células progenitoras endoteliales corneales de la presente invención es positiva para p75, FOXC2, SOX9 y N-cadherina. Estos marcadores pueden retenerse en el sistema de cultivo de la presente invención durante un periodo de tiempo prescrito, pero desaparecen gradualmente a medida que progresa el crecimiento. Por otra parte, las células progenitoras endoteliales corneales no expresan Ki-67 en la fase inicial del cultivo, pero expresan altamente Ki-67 en el momento del crecimiento. Por otra parte, una población celular que contiene las células endoteliales corneales cuya diferenciación se ha inducido se determina que es positiva para colágeno de tipo VIII.

30 P75, es decir, un receptor de factor de crecimiento nervioso y un receptor para neurotrofinas, se conoce como receptor de neurotrofinas de baja afinidad, y se usa como marcador para células de la cresta neural en migración. P75 se expresa en células madre solamente, incluyendo las células madre de la cresta neural, presentes en un pequeño número *in vivo*, y es uno de los marcadores más fiables como índice de indiferenciación. Como marcadores para las células de la cresta neural, se conocen también FOXC2 (proteína C2 de la caja Forkhead), SOX9, SOX10, AP2 $\beta$ , AB2 $\alpha$ , Snail, Slug, PITX2, FOXC1 y similares.

35 La N-cadherina es una proteína que pertenece a las moléculas de adhesión celular dependientes de calcio, y se conoce que desempeñan un papel significativo en la adhesión celular a través de un enlace al citoesqueleto de actina a través de la interacción de catenina y cadherina alógena, y que afecta al estadio de desarrollo/diferenciación. La N-cadherina es un marcador mesenquimatoso expresado en diversos tejidos tales como nervios, músculo cardíaco, músculo esquelético, endotelios vasculares y endotelios corneales.

40 El colágeno de tipo VIII es colágeno no fibrilar, se expresa en gran medida en tejidos activos morfogénicamente y se conoce como marcador para células endoteliales corneales diferenciadas. Otro ejemplo del marcador para células endoteliales corneales diferenciadas incluye ZO-1.

45 2. Método de cultivo celular - método para hacer crecer selectivamente una población de células progenitoras endoteliales corneales

50 2.1 Aislamiento de células

En primer lugar, el tejido corneal endotelial aislado se trata con una enzima tal como tripsina o colagenasa mediante un método habitual para aislar células. Las células aisladas se suspenden en un medio basal tal como DMEM, seguido por centrifugación para eliminar trozos de tejido. La población celular así preparada derivada del tejido endotelial corneal se cultiva tal como sigue.

55 2.2 Cultivo celular

Características principales del método de la presente invención son (1) un medio libre de suero, (2) cultivo de densidad baja y (3) cultivo adherente.

60 (1) Composición del medio (medio libre de suero)

En el método de la presente invención, se usa un medio libre de suero que no contiene suero para cultivar células. Un medio basal puede ser cualquier medio que pueda usarse para cultivar células animales, tal como un medio DMEM, un medio BME, un medio BGJb, un medio CMRL 1066, un medio Glasgow MEM, un medio MEM Zinc Option mejorado, un medio IMDM, un medio Medium 199, un medio Eagle MEM, un medio  $\alpha$  MEM, un medio de

Dulbecco MEM, un medio HAM, un medio RPMI 1640, un medio de Fischer, un medio de McCoy, un medio de Williams E, o un medio mixto de estos.

5 Un medio usado en el método de cultivo de la presente invención se prepara añadiendo, al medio basal descrito anteriormente, diversos nutrientes necesarios para el mantenimiento y el crecimiento de las células y diversos componentes necesarios para la inducción de diferenciación. El medio contiene preferiblemente una citocina o un sustituto de suero para estimular el crecimiento de las células. Los ejemplos de la citocina que va a contenerse en el medio incluyen un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), un factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interferones (tales como IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  e IFN $\gamma$ ), interleucinas, un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), trombopoyetina (TPO), un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y un factor de crecimiento nervioso (NGF).

15 Los ejemplos del sustituto de suero incluyen albúmina (tal como albúmina rica en lípidos), transferrina, ácido grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos,  $\beta$ -mercaptoetanol, 3'-tioglicerol y productos comercialmente disponibles de sustituto de Suero inactivado (KSR), lípido químicamente definido concentrado (fabricado por Gibco) y Glutamax (fabricado por Gibco).

20 Además, pueden añadirse ácido pirúvico, un agente reductor de aminoácidos tal como  $\beta$ -mercaptoetanol, aminoácido, o similares al medio según lo exija la ocasión.

25 Además de lo anterior, el medio puede contener, como nutrientes, una fuente de carbono tal como glicerol, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, miel, almidón o dextrina; un hidrocarburo tal como ácido grasos, grasas y aceites, lecitina o alcoholes; una fuente de nitrógeno tal como sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, urea o nitrato de sodio; una sal inorgánica tal como cloruro de sodio, sal de potasio, fosfato, sal de magnesio, sal de calcio, sal de hierro o sal de manganeso; fosfato de monopotasio, fosfato de dipotasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, molibdato de sodio, tungstato de sodio, sulfato de manganeso, diversas vitaminas o similares.

30 El medio obtenido mezclando estos componentes tiene un pH de 5,5 a 9,0, preferiblemente de 6,0 a 8,0 y más preferiblemente de 6,5 a 7,5.

#### (2) Cultivo de densidad baja

35 En el cultivo de células endoteliales corneales, en general, las células se siembran o se cultivan en explantes con la membrana de Descemet incluida a una densidad alta de 10 000 a 100 000 células/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, en el método de la presente invención, se realiza el cultivo con células sembradas a baja densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> o menos, más preferiblemente de 20 a 2000 células/cm<sup>2</sup>, aún más preferiblemente de 50 a 1000 células/cm<sup>2</sup> y lo más preferiblemente de aproximadamente 100 a 500 células/cm<sup>2</sup>.

#### 40 (3) Cultivo adherente

En el método de la presente invención, se usa una placa de cultivo (recipiente) recubierta con colágeno, laminina, fibronectina, Matrigel (TM), poli-L-ornitina/laminina (PLO/LM), poli-D-lisina (PDL) o similar para realizar el cultivo adherente.

45 El cultivo se realiza en las condiciones mencionadas anteriormente a de 36 °C a 38 °C y preferiblemente de 36,5 °C a 37,5 °C en unas condiciones de O<sub>2</sub> a del 1 % al 25 % y CO<sub>2</sub> a del 1 % al 15 %. Con el medio intercambiado cada de 2 a 3 días, el cultivo se realiza durante al menos 7 días y preferiblemente durante de 7 a 14 días.

#### 50 2.3 Crecimiento selectivo de la población de células progenitoras endoteliales corneales

55 En un método convencional método usando un medio que contiene un suero, la forma celular cambia a medida que se hacen pases del cultivo, y por tanto llega a ser difícil conservar la función endotelial corneal y la capacidad de proliferación. Sin embargo, en el método de la presente invención, la forma celular no cambia incluso cuando se hacen pases de cultivo, y, por tanto, el cultivo puede realizarse durante un periodo de tiempo prolongado manteniéndose la capacidad de proliferación alta. Esto es porque las células derivadas del tejido endotelial corneal pueden hacerse crecer al tiempo que se mantiene el estado indiferenciado en el método de la presente invención. En otras palabras, en el método de la presente invención, puede hacerse crecer selectivamente una población celular más indiferenciada que tiene una alta capacidad de proliferación.

60 La población de células progenitoras endoteliales corneales que se hacen crecer selectivamente en la presente invención se distingue, en un punto en que es positiva para el marcador de indiferenciación p75, de una población celular derivada de endotelio corneal cultivada mediante un método conocido convencionalmente. Aunque la expresión de p75 desaparece gradualmente a medida que progresa el crecimiento, una población celular de este tipo tiene una alta capacidad de proliferación y por tanto puede hacerse crecer en última instancia hasta 65 100 000 veces.

Esta población celular se distingue de la población celular derivada de endotelio corneal cultivada mediante el método conocido convencionalmente también en un punto en que los marcadores de cresta neural SOX9 y FOXC2 se expresan al comienzo del cultivo y se expresa también el marcador endotelial corneal N-cadherina. Las expresiones de SOX9, FOXC2 y N-cadherina desaparecen también gradualmente a medida que progresa el crecimiento.

La población de células progenitoras endoteliales corneales que se hacen crecer mediante el método de la presente invención es una población celular que tiene una capacidad de proliferación excesivamente alta que expresa el marcador de crecimiento Ki-67 y tiene una capacidad de proliferación celular tal que una única célula puede hacerse crecer en última instancia hasta  $1 \times 10^5$  células o más. Esta población celular puede diferenciarse en células endoteliales corneales en condiciones adecuadas. En la presente invención, esta población celular que puede diferenciarse en células endoteliales corneales se designa como "(población) de células progenitoras endoteliales corneales".

3. Inducción de diferenciación de células progenitoras endoteliales corneales a células endoteliales corneales.

Tal como se describió anteriormente, la población de células progenitoras endoteliales corneales obtenida mediante el método de la presente invención puede diferenciarse en células endoteliales corneales maduras cultivándola en condiciones adecuadas.

(1) Composición del medio

Un medio basal puede ser cualquier medio que pueda usarse para cultivar células animales, tal como un medio DMEM, un medio BME, un medio BGJb, un medio CMRL 1066, un medio Glasgow MEM, un medio MEM Zinc Option mejorado, un medio IMDM, un medio Medium 199, un medio Eagle MEM, un medio  $\alpha$ -MEM, un medio Dulbecco MEM, un medio HAM, un medio RPMI 1640, un medio de Fischer, un medio de McCoy, un medio Williams E o un medio mixto de estos.

El medio usado para la inducción de diferenciación a las células endoteliales corneales se prepara añadiendo, al medio basal descrito anteriormente, un factor para estimular la inducción de diferenciación a las células endoteliales corneales, diversos nutrientes necesarios para el mantenimiento y crecimiento de las células y diversos componentes necesarios para la inducción de diferenciación.

Los ejemplos del factor para estimular la inducción de diferenciación a las células endoteliales corneales incluyen TGF- $\beta_2$ , toxina colérica, transferrina, insulina, EGM (factor de crecimiento epidérmico) y un suero o un sustituto de suero, KSR (sustituto de suero inactivado).

Preferiblemente, se usa un medio libre de suero que contiene TGF- $\beta_2$  (véase la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2009-268433) o un medio que contiene un suero tal como BSA para la inducción de diferenciación a las células endoteliales corneales.

Además, pueden añadirse al medio un antibiótico tal como penicilina o estreptomina, una citocina, ácido pirúvico, un agente reductor de aminoácidos tal como  $\beta$ -mercaptoetanol, un antioxidante tal como ácido ascórbico, aminoácido, o similares según lo exija la ocasión.

Además de lo anterior, el medio puede contener, como nutrientes, una fuente de carbono tal como glicerol, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, miel, almidón o dextrina; un hidrocarburo tal como ácido graso, gases y aceites, lecitina o alcoholes; una fuente de nitrógeno tal como sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, urea o nitrato de sodio; una sal inorgánica tal como cloruro de sodio, sal de potasio, fosfato, sal de magnesio, sal de calcio, sal de hierro o sal de manganeso; fosfato de monopotasio, fosfato de dipotasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, molibdato de sodio, tungstato de sodio, sulfato de manganeso, diversas vitaminas y similares.

El medio obtenido mezclando estos componentes tiene un pH de 5,5 a 9,0, preferiblemente de 6,0 a 8,0 y más preferiblemente de 6,5 a 7,5.

(2) Condiciones de cultivo

El cultivo se realiza usando una placa de cultivo (recipiente) recubierto con colágeno, laminina, fibronectina, Matrigel (TM), poli-L-ornitina/laminina, poli-D-lisina (PDL) o similar a de 36 °C a 38 °C y preferiblemente de 36,5° a 37,5 °C en unas condiciones de O<sub>2</sub> a del 1 % al 25 % y CO<sub>2</sub> a del 1 % al 15 %. Con el medio intercambiado cada de 2 a 3 días, el cultivo se realiza durante al menos 7 días y preferiblemente durante de 1 a 8 semanas.

La inducción de diferenciación de la población de células progenitoras endoteliales corneales a las células endoteliales células endoteliales corneales maduras puede confirmarse por el cambio en la forma (cambio a células con una forma similar a adoquines) y por la expresión del marcador de células endoteliales corneales maduras, colágeno de tipo VIII o similar.



4. Purificación de células

5 La población de células progenitoras endoteliales corneales que se hacen crecer mediante el método de la presente invención puede aislarse fácilmente (purificarse) usando un marcador de superficie, p75 o similar. Las células pueden aislarse mediante separación usando, por ejemplo, perlas inmunomagnéticas marcadas con un anticuerpo específico de p75, una columna en la que se inmoviliza un anticuerpo contra p75 o un clasificador celular (FACS) usando un anticuerpo contra p75 marcado fluorescente.

10 Además, la población de células endoteliales corneales cuya diferenciación se ha inducido mediante el método de la presente invención puede aislarse usando, como índice, la expresión del marcador, colágeno de tipo VIII o similar, que no es un marcador de superficie sino un marcador específico para las células endoteliales corneales.

15 5. Aplicación a ingeniería de tejidos

5.1 Cultivo

20 Puede usarse un cultivo que contiene la población de células progenitoras endoteliales corneales obtenida mediante el método de la presente invención y/o la población de células endoteliales corneales cuya diferenciación se ha inducido a partir de la población celular mencionada anteriormente para estudios, la ingeniería de tejidos o como material de una preparación celular descrita a continuación.

5.2 Preparación celular para el tratamiento de enfermedad endotelial corneal

25 La población de células progenitoras endoteliales corneales cuya diferenciación se ha inducido y aislada mediante el método de la presente invención y/o la población de células endoteliales corneales cuya diferenciación se ha inducido a partir de la población celular mencionada anteriormente puede usarse como preparación celular para una enfermedad endotelial corneal.

30 El método para administrar la preparación celular de la presente invención no está especialmente limitado, y puede administrarse mediante trasplante local con medios quirúrgicos, administración intravenosa o administración de inyección local según el sitio de aplicación.

35 La preparación celular de la presente invención puede contener un material de andamiaje o un componente para ayudar al mantenimiento/crecimiento de las células y a la administración a un paciente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 Los ejemplos de un componente necesario para el mantenimiento/crecimiento de las células incluyen componentes de medio tales como una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales, sales y diversas citocinas, y una preparación de matriz extracelular tal como Matrigel (TM).

45 La preparación celular de la presente invención puede contener un material de andamiaje o un componente para ayudar al mantenimiento/crecimiento de las células y a la administración a un paciente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de un componente necesario para el mantenimiento/crecimiento de las células incluyen componentes de medio tales como una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales, sales y diversas citocinas, y una preparación de matriz extracelular tal como Matrigel (TM).

50 Los ejemplos de un material de andamiaje o un componente para ayudar a la administración a un paciente incluyen un polímero biodegradable tal como colágeno, poli(ácido láctico), hialuronato, celulosa, un derivado de cualquiera de estos, o un complejo de dos o más de estos; y una disolución acuosa inyectable tal como una solución salina, un medio, un tampón biológico tal como PBS, o una disolución isotónica que contiene glucosa u otro adyuvante (tal como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol o cloruro de sodio), y puede usarse conjuntamente con un agente solubilizante apropiado, por ejemplo, alcohol tal como etanol, polialcohol tal como propilenglicol o polietilenglicol, o un detergente no iónico tal como polisorbato-80 y HCO-50.

60 Además, la preparación celular puede contener, según exija la ocasión, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliácido de sodio, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, carboximetilalmidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábiga, caseína, agar, polietilenglicol, diglicerina, glicerina, propilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, manitol, sorbitol, lactosa, un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, un tampón, un emulsionante, un agente de suspensión, un agente calmante, un estabilizador y similares.

65 Los aditivos usados realmente se seleccionan de los ejemplos anteriormente mencionados individualmente o como una combinación apropiada según la forma de dosificación de un agente de tratamiento de la presente invención,

pero los aditivos no se limitan a estos ejemplos. Cuando se usa la preparación celular, por ejemplo, como una preparación para inyección, se disuelve un anticuerpo purificado en un disolvente, tal como una solución salina, un tampón o una disolución de glucosa, y se añade a la disolución resultante un agente que evita la adsorción tal como Tween 80, Tween 20 o gelatina.

5

### 5.3 Lámina de células

Cuando la población de células progenitoras endoteliales corneales obtenida mediante el método de la presente invención se cultiva sobre una membrana de polímero adecuada (portador) para que se induzca su diferenciación a células endoteliales corneales, o cuando la población de células endoteliales corneales obtenida mediante el método descrito en el punto 3 anterior se cultiva sobre una membrana de polímero adecuada (portador), puede producirse una lámina de células endoteliales corneales.

10

Los ejemplos de la membrana de polímero que va a usarse incluyen membranas de biopolímeros tales como colágeno, atelocolágeno, colágeno tratado con álcali, gelatina, queratina, hialuronato, glucosaminoglucono (tal como sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, hialuronato, sulfato de heparano, sulfato de queratano o heparina); proteoglucono; alginato, quitosano, poliaminoácidos (poli(ácido láctico)) y celulosa; y polímeros sensibles a la temperatura tales como compuestos de (met)acrilamida, derivados de (met)acrilamida sustituida con N-(o N,N-di)alquilo, derivados de vinil éter y copolímeros de estos.

15

Los ejemplos de enfermedades a las que se aplica la administración de la preparación celular de la presente invención o el trasplante de la lámina celular de la presente invención obtenida mediante los métodos mencionados anteriormente incluyen disfunción endotelial corneal incluyendo queratitis vesicular, distrofia corneal, glaucoma evolutivo, anomalía de Rieger, distrofia endotelial corneal hereditaria congénita, quiste dermoide limbal, esclerocórnea, anomalía de la forma de la córnea tal como queratocono y degeneración corneal marginal pelúcida, cicatrización corneal, infiltración corneal, precipitación corneal, edema corneal, úlcera corneal, lesiones oculares incluyendo los provocados por una sustancia química o calor, enfermedades oculares tales como queratitis, degeneración corneal e infección corneal, neuroblastoma, enfermedad de Hirschsprung, síndrome de Waardenburg, albinismo localizado y enfermedad de Recklinghausen.

20

25

30

### Ejemplos

La presente invención se describirá ahora específicamente en referencia a los ejemplos, y se indica que la presente invención no se limita a estos ejemplos.

35

[Materiales y métodos]

#### 1. Cultivo y mantenimiento de células progenitoras endoteliales corneales

##### Medio para establecer/mantener células progenitoras endoteliales corneales

- DMEM/F-12 (Invitrogen, medio basal)
- Sustituto de suero inactivado al 20 % (Invitrogen, sustituto de suero)
- L-glutamina 2 mM (Invitrogen)
- Aminoácido no esencial al 1 % (Invitrogen)
- 2-mercaptoetanol 100  $\mu$ M (Invitrogen)
- FGF básico 4 ng/ml (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

45

50

##### Agente de recubrimiento para su uso en el cultivo de células progenitoras endoteliales corneales

- Matriz cualificada para hESC (BD) Matrigel (TM)

55

Se diluyó Matrigel (TM) fundida sobre hielo o a 4 °C con un medio DMEM/F12 enfriado (Invitrogen) 30 veces, y se añadió el producto resultante a una placa de cultivo, seguido por incubación realizada a 37 °C durante 1 hora, para recubrir la placa de cultivo.

60

- Laminina 511 (Veritas Corporation)

Se diluyó laminina 511 con PBS hasta una concentración de 20  $\mu$ g/ml, y se añadió el producto resultante a una placa de cultivo, seguido por incubación realizada a 37 °C durante 2 horas, para recubrir la placa de cultivo. Después de lavar la placa de cultivo recubierta dos veces con PBS y dos veces con el medio que va a usarse, se añadió el medio

65

a la placa de cultivo.

Preparación de células progenitoras endoteliales corneales a partir de tejido endotelial corneal humano

5 Se extirpó tejido endotelial corneal humano junto con la membrana de Descemet, se puso en una placa de cultivo de 3,5 cm que tenía DMEM (Invitrogen) que contenía Y-27632 10  $\mu$ M (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., inhibidor de ROCK; inhibidor de la apoptosis), y se mantuvo el producto resultante a 37 °C durante 30 minutos.

10 Posteriormente, se añadió a lo mismo 1 ml de Stem Pro Accutase (Invitrogen, disolución de disociación celular), seguido por un tratamiento a 37 °C durante 30 minutos, se añadieron a lo mismo 4 ml de DMEM (Invitrogen), y se transfirió el producto resultante a un tubo de 15 ml. Se centrifugó el tubo a 1500 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se añadieron a lo mismo 200  $\mu$ l del medio anteriormente descrito. Se sembró el producto resultante en una placa de cultivo recubierta con Matrigel (TM) o laminina 511 (a una densidad de siembra de 50 a 1000 células/cm<sup>2</sup>) y se cultivó con el medio intercambiado cada de 2 a 3 días. Aparecieron colonias en  
15 aproximadamente de 7 a 14 días.

Pase de células progenitoras endoteliales corneales

20 Se añadió Y-27632 (Wako Chemical Industries, Ltd., inhibidor de la apoptosis) a células cultivadas hasta fuesen subconfluentes, hasta una concentración final de 10  $\mu$ M, y el producto resultante se dejó reposar a 37 °C durante 60 minutos. Se lavaron las células resultantes una vez con PBS, se añadieron a las mismas 0,25 ml de Stem Pro Accutase (Invitrogen, disolución de disociación celular), y el producto resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante de 2 a 5 minutos.

25 Se añadió a lo mismo un volumen de 5 veces de medio, y se transfirió el producto resultante a un tubo de 15 ml. Se centrifugó el tubo a 1000 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se añadió a lo mismo el medio. Se sembró el producto resultante en una placa de cultivo recubierta con Matrigel (TM) o laminina 511 (a una densidad de siembra de 5000 a 20 000 células/cm<sup>2</sup>) y se cultivó con el medio intercambiado cada de 2 a 3 días.

30 2. Inducción de diferenciación de células progenitoras endoteliales corneales a células madre endoteliales corneales

Medio usado para la inducción de diferenciación de células progenitoras endoteliales corneales a células endoteliales corneales maduras

35 - DMEM con bajo contenido en glucosa (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.)

- FBS al 10 % (Japan Bio Serum)

40 - L-glutamina 2 mM (Invitrogen)

- Penicilina-estreptomina al 1 % (Invitrogen)

Agente de recubrimiento para su uso en la inducción de diferenciación a células endoteliales corneales

45 - Mezcla de recubrimiento de FNC (Athena ES)

Se añadió mezcla de recubrimiento de FNC (un agente de recubrimiento que contiene fibronectina y colágeno de tipo I) a una placa de cultivo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 segundos.

Diferenciación de células progenitoras endoteliales corneales a células endoteliales corneales maduras

50 Se añadió Y-27632 (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) a las células progenitoras endoteliales corneales cultivadas mediante el método anteriormente descrito hasta una concentración final de 10  $\mu$ M, para poder realizar un tratamiento a 37 °C durante 60 minutos. Se lavó el producto resultante una vez con PBS, y se añadieron al mismo  
55 0,25 ml de Stem Pro Accutase (Invitrogen, disolución de diferenciación celular), seguido por incubación realizada a temperatura ambiente durante de 2 a 5 minutos.

60 Se añadió a lo mismo un volumen de 5 veces de medio, y se transfirió el producto resultante a un tubo de 15 ml. Se centrifugó el tubo a 1000 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se añadió a lo mismo el medio. Se sembró el producto resultante en una placa de cultivo recubierta con mezcla de recubrimiento de FNC o sobre una lámina de atelocolágeno (AteloCell, KOKEN Co., Ltd.) (a una densidad de siembra de 3000 a 5000 células/cm<sup>2</sup>) y se cultivó con el medio intercambiado cada de 2 a 3 días. En de 1 a 4 semanas, aparecieron células con una forma similar a endotelio corneal (forma similar a adoquines).

Medio usado para mantener células endoteliales corneales maduras

- DMEM con bajo contenido en glucosa (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., medio basal)

- FBS al 10 % (Japan Bio Serum)

5 - L-glutamina 2 mM (Invitrogen)

- Penicilina-estreptomicina al 1 % (Invitrogen)

10

- bFGF 2 ng/ml (Invitrogen)

4. Células endoteliales corneales obtenidas mediante el método conocido

Se aislaron células a partir del tejido corneal de la misma manera que se describió en el punto 1 anteriormente, y se cultivaron las células mediante un método conocido (mencionado anteriormente, Yokoo *et al.*, IVOS, 2005). Específicamente, se sembraron las células endoteliales corneales aisladas en una placa de cultivo no adherente usando un medio que contiene DMEM/F12, suplemento de B27, bFGF 40 ng/ml y EGF 20 ng/ml. Se cultivaron las células durante 10 días en total con bFGF 40 ng/ml y EGF 20 ng/ml añadidos cada 2 días.

15

5. PCR en tiempo real

20

Extracción de ARN

Se extrajo ARN de las células usando el kit RNeasy Micro Plus (QIAGEN).

25

Síntesis de ADNc

A partir del ARN obtenido tal como se describió anteriormente, se preparó ADNc usando SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix para qRT-PCR (Invitrogen).

30

PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo real usando mezcla maestra de PCR universal Taq-Man Fast (Applied Biosystems) y sondas de TaqMan (Applied Biosystems) mostradas en la tabla 1 y usando un sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems).

35

Se realizó el análisis de datos mediante un método de  $\Delta\Delta$  Ct con GAPDH usado como control endógeno.

[Tabla 1]

40

Tabla 1. Lista de sondas de TaqMan

Gen	ID de ensayo
GAPDH	Hs99999905_m1
COL8A2	Hs00697025_m1
p75	Hs00609976_m1
FOXC2	Hs00270951_s1
SOX9	Hs00165814_m1
N-cadherina	Hs00983062_m1

6. Inmuntinción

45

Las células progenitoras endoteliales corneales o las células endoteliales corneales preparadas tal como se describió anteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4 % (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos o con metanol enfriado (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) a -30 °C durante 30 minutos. Se lavó el producto resultante dos veces con tampón Tris (TBS, Takara Bio Inc.), seguido por un tratamiento con NST al 5 % (cuya composición se muestra en la tabla 2) a temperatura ambiente durante 1 hora.

50

[Tabla 2]

Tabla 2. Composición de NST

55

	NST al 5 %	NST al 1 %
Suero de asno normal	5 %	1 %
Tritón-X 100	0,3 %	0,3 %

Se incubó durante la noche un anticuerpo primario, ajustado a cada concentración óptima con NST al 1 %, a 4 °C (véase la tabla 3), y se lavó el producto resultante con TBS tres veces. Posteriormente, se añadió a lo mismo un anticuerpo secundario (Invitrogen, anticuerpo anti-IgG conjugado con AlexaFluor 488 o 568), que se había diluido 200 veces con NST al 1 %, y se incubó el producto resultante a temperatura ambiente durante 2 horas.

Se realizó tinción nuclear usando Hoechst 33342 0,2 mg/ml (Invitrogen), y se lavó el producto resultante con TBS tres veces y después se preparó en un medio de preparación microscópica soluble en agua (Perma Fluor, Thermo Fisher Scientific K.K.). Se observaron las células preparadas con un microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1, Zeiss) y se obtuvieron imágenes usando AxioVision (Zeiss).

[Tabla 3]

Tabla 3. Lista de anticuerpos

	Número de catálogo	Dilución
N-cadherina	Santa Cruz, sc-7939	1:100
ZO-1	Invitrogen, 339100	1:100
Ki-67	Abcam, ab833	1:100
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa	Millipore, 05-369	1:100

#### 7. Tinción con alizarina

Se ajustó rojo de alizarina S (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) para que tuviese NaCl al 0,9 % (pH 4,2). Se tiñeron las células con la tinción durante 5 minutos, después, se fijaron con paraformaldehído al 4 %, y se observaron con un microscopio.

#### 8. Medida de la función de bomba

Se midió la función de bomba usando una cámara de Ussing. Se incubó una lámina de células endoteliales corneales inducidas cultivada sobre atelocolágeno con tampón de Krebs-Ringer (NaCl 120,7 mM, NaHCO<sub>2</sub> 24 mM, KCl 4,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, glucosa 10 mM, pH 7,4). Se usó un sistema de cámara de Ussing disponible de WPI. Se añadió a lo mismo un inhibidor de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, uabaína 1 mM (Sigma), y se calculó la corriente de cortocircuito.

#### 9. Trasplante para modelo de herida endotelial corneal de conejo

Como modelo de herida endotelial corneal de conejo, se exfolió el endotelio corneal de un ojo de un conejo mediante un criométrido. Después de 1 semana, se adhirió la lámina endotelial corneal inducida sobre una superficie endotelial corneal mediante queratoplastia endotelial automatizada con resección de la membrana de Descemet (DSAEK), y se ajustó firmemente mediante inyección de aire. Se midió el grosor corneal a lo largo del tiempo con un paquímetro (SP-100, Tomey), y se observó una imagen ocular anterior con una lámpara de hendidura (AIP-20, Topcon Corporation).

[Resultados]

#### (1) Células obtenidas mediante el método de la presente invención

Las células aisladas a partir del tejido endotelial corneal humano (número de células endoteliales: de aproximadamente 1 a 4 x 10<sup>4</sup> células) se cultivaron a una densidad de 50 a 1000 células/cm<sup>2</sup> en condiciones libres de suero, y aparecieron colonias en de aproximadamente 7 a 14 días del cultivo (incidencia: aproximadamente del 0,1 %: de aproximadamente 10 a 40 células por ojo).

La forma de las células hechas crecer a partir del tejido endotelial corneal mediante el método de la presente invención era extremadamente similar a la de células de la cresta neural inducidas a partir de células iPS, y, por tanto, se sugería que estas células podrían ser posiblemente células progenitoras endoteliales corneales (figura 1).

#### (2) Análisis del gen marcador de células progenitoras endoteliales corneales

En las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención, la expresión de los marcadores de cresta neural p75, SOX9 y FOXC2 derivados de la generación endotelial corneal, y la expresión de N-cadherina, es decir, uno de los marcadores endoteliales corneales, estaban aumentadas en comparación con las mismas en células endoteliales cultivadas mediante un método conocido y en células presentes *in vivo* (figura 2).

## (3) Comparación entre células progenitoras endoteliales corneales y células obtenidas mediante el método conocido

Aunque p75 no se expresaba en células obtenidas a partir de tejido endotelial corneal mediante un método conocido o en células simplemente aisladas a partir de un organismo (*in vivo*), se expresaba p75 en las células madre/células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención (figura 3). P75 (CD271/NGFR) es un marcador expresado solamente en células madre, incluyendo células madre de la cresta neural, presentes *in vivo* en un pequeño número, y se usa como índice de indiferenciación. Estos resultados revelan que las células progenitoras endoteliales corneales pueden hacerse crecer en un estado más indiferenciado mediante el método de la presente invención.

Además, cuando se empleó el cultivo en suspensión (mencionado anteriormente, Yokoo *et al.*, IVOS, 2005), es decir, un método de cultivo conocido para células progenitoras endoteliales corneales, no se expresó p75 en las células resultantes (figura 3). Esto revela que las células progenitoras corneales pueden aislarse y hacerse crecer en un estado más indiferenciado mediante el método de la presente invención que mediante el método conocido.

## (4) Capacidad de proliferación de células progenitoras endoteliales corneales

En las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención, se expresó el marcador de crecimiento (figura 4B). Además, puede hacerse crecer una única célula hasta  $10^8$  células como máximo a través de pases de cultivo repetidos (figura 4C). Esto significa que teóricamente pueden prepararse láminas de  $8 \times 10^4$  células como máximo a partir de un donante. Por el contrario, las células obtenidas mediante el método conocido tienen una forma celular cambiada y una capacidad de proliferación degradada, y por tanto es difícil repetir pases de cultivo (anteriormente mencionado, Yokoo *et al.*, IVOS, 2005).

## (5) Inducción de diferenciación de células progenitoras endoteliales corneales a células endoteliales corneales

Las células endoteliales corneales diferenciadas a partir de las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención estaban en una forma celular en mosaico (figura 5A), y aumentó la expresión del marcador endotelial corneal, colágeno tipo VIII (COL8A2) (figura 5B). Basándose en esto, se confirmó que las células progenitoras endoteliales corneales obtenidas mediante el método de la presente invención pueden diferenciarse en células endoteliales corneales.

## (6) Preparación de lámina de células endoteliales corneales inducidas

Una lámina de atelocolágeno es una lámina de colágeno médica altamente segura, y es uno de los candidatos de un portador para el trasplante de un endotelio corneal. Cuando las células endoteliales corneales inducidas a partir de las células progenitoras endoteliales corneales se sembraron sobre una lámina de atelocolágeno, pudo prepararse una lámina transparente de células endoteliales corneales (figura 6A), en la que las células estaban en una forma similar a adoquines (figuras 6B y 6C).

## (7) Análisis de expresión en lámina de células endoteliales corneales inducidas

En las células endoteliales corneales sembradas sobre una lámina de atelocolágeno, de la misma manera que en las células endoteliales corneales cuya diferenciación se ha inducido a partir de las células progenitoras endoteliales corneales, se expresaron los marcadores de endotelio corneal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, ZO-1 y N-cadherina (figuras 6D, 6E y 6F). Esto revela que la lámina de células endoteliales corneales inducidas contiene células endoteliales corneales maduras y puede usarse como material de ingeniería de tejidos.

## (8) Análisis de función de bomba de la lámina de células endoteliales corneales inducidas

La lámina de células endoteliales corneales inducidas obtenida mediante la presente invención se analizó para determinar la función de bomba usando una cámara de Ussing (figura 7A). Como resultado, se encontró que la función de bomba era equivalente a la de las células endoteliales corneales cultivadas (figura 7B).

## (9) Experimento de trasplante de lámina de células endoteliales corneales inducidas a modelo de herida endotelial corneal de conejo

Cuando la lámina de células endoteliales corneales inducidas obtenida mediante la presente invención se trasplantó a un modelo de herida endotelial corneal de conejo, el grosor corneal se redujo notablemente a partir de dos semanas después del trasplante en comparación con el de un grupo de control en el que se trasplantó atelocolágeno solo (figuras 8A y 8B). Esto revela que la lámina de células endoteliales corneales inducidas contiene células endoteliales corneales maduras y puede usarse como material de ingeniería de tejidos.

[Conclusión]

5 Se confirmó que las células derivadas de tejido endotelial corneal pueden hacerse crecer en un estado más indiferenciado (positivo para p75, FOXC2 y SOX9) mediante el método de la presente invención. Las células progenitoras endoteliales corneales así obtenidas tenían una alta capacidad de proliferación, y, por tanto, podrían prepararse aproximadamente 330 láminas de células endoteliales corneales teóricamente a partir de un donante. Se confirmó que estas células son células progenitoras endoteliales corneales que tienen capacidad de diferenciación a células endoteliales corneales maduras.

**Aplicabilidad industrial**

10 Según la presente invención, las células derivadas de tejido endotelial corneal pueden hacerse crecer al tiempo que mantienen un estado indiferenciado. En otras palabras, pueden hacerse crecer selectivamente células progenitoras endoteliales corneales más indiferenciadas que tienen una alta capacidad de proliferación a partir de células derivadas de tejido endotelial corneal. Pude inducirse la diferenciación de una población de células progenitoras endoteliales corneales obtenida mediante la presente invención para dar células endoteliales corneales maduras  
15 mediante cultivo realizado en condiciones adecuadas. Por consiguiente, la presente invención puede aplicarse como tecnología fundamental para ingeniería de tejidos para tratar, por ejemplo, queratitis vesicular.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para preparar células progenitoras endoteliales corneales en el que una población celular aislada a partir de tejido de células endoteliales corneales se hace crecer en cultivo adherente a baja densidad usando un medio libre de suero, obteniéndose de ese modo las células progenitoras endoteliales corneales, en el que el cultivo se realiza con la población celular sembrada a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> o menos.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el cultivo se realiza con la población celular sembrada a una densidad de 20 a 2000 células/cm<sup>2</sup>.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el cultivo se realiza durante al menos 7 días o más.
- 15 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células progenitoras endoteliales corneales que van a obtenerse son positivas para Ki-67.
- 20 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se hacen crecer células progenitoras endoteliales corneales caracterizadas por ser positivas para p75.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se hacen crecer células progenitoras endoteliales corneales caracterizadas por ser positivas para FOXC2, SOX9 y N-cadherina.
- 25 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio contiene al menos una o más citocinas seleccionadas de bFGF, EGF, TGF, NGF y Wnt3a.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medio contiene un sustituto de suero.
- 30 9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que el medio contiene además uno o más seleccionados de ácido retinoico,  $\beta$ -mercaptoetanol, piruvato de sodio y ácido ascórbico.
- 35 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se usa un recipiente de cultivo recubierto con colágeno, laminina, fibronectina, Matrigel (TM), poli-L-ornitina/laminina o poli-D-lisina (PDL) para el cultivo de adhesión.
- 40 11. Método para preparar células endoteliales corneales en el que se preparan células progenitoras endoteliales corneales mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y se induce la diferenciación de las células progenitoras endoteliales corneales para dar las células endoteliales corneales.
12. Método según la reivindicación 11, en el que se usa un medio libre de suero que contiene TGF- $\beta$ <sub>2</sub> o un medio que contiene un suero para la inducción de diferenciación.
- 45 13. Método para preparar una lámina de células endoteliales corneales en el que se preparan células progenitoras endoteliales corneales mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o se preparan células endoteliales corneales mediante el método según la reivindicación 11 o 12, y las células progenitoras endoteliales corneales o las células endoteliales corneales se cultivan sobre una membrana de polímero.
- 50 14. Método según la reivindicación 13, en el que la membrana de polímero contiene uno o más seleccionados del grupo que consiste en glucosaminoglucano tal como sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, hialuronato, sulfato de heparano, sulfato de queratano o heparina; atelocolágeno, colágeno tratado con álcali y gelatina; queratina; proteoglucano; alginato, quitosano y hialuronato; poliaminoácidos (poli(ácido láctico)); celulosa; polímeros sensibles a la temperatura tales como compuestos de (met)acrilamida, derivados de (met)acrilamida sustituida con N-(o N,N-di)alquilo, derivados de vinil éter y copolímeros de los mismos.
- 55



**FIG.1**

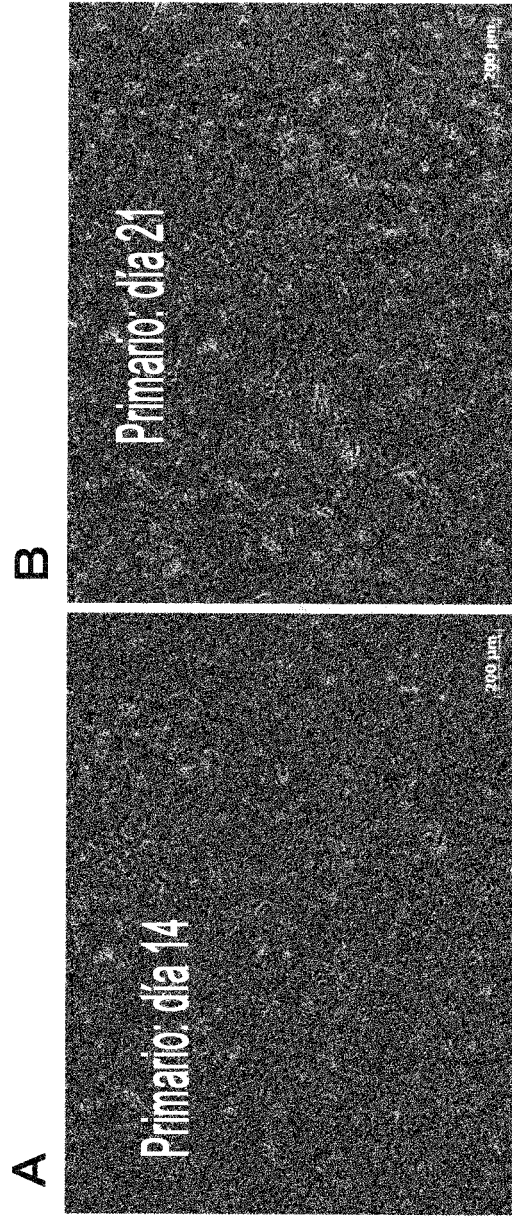


FIG.2

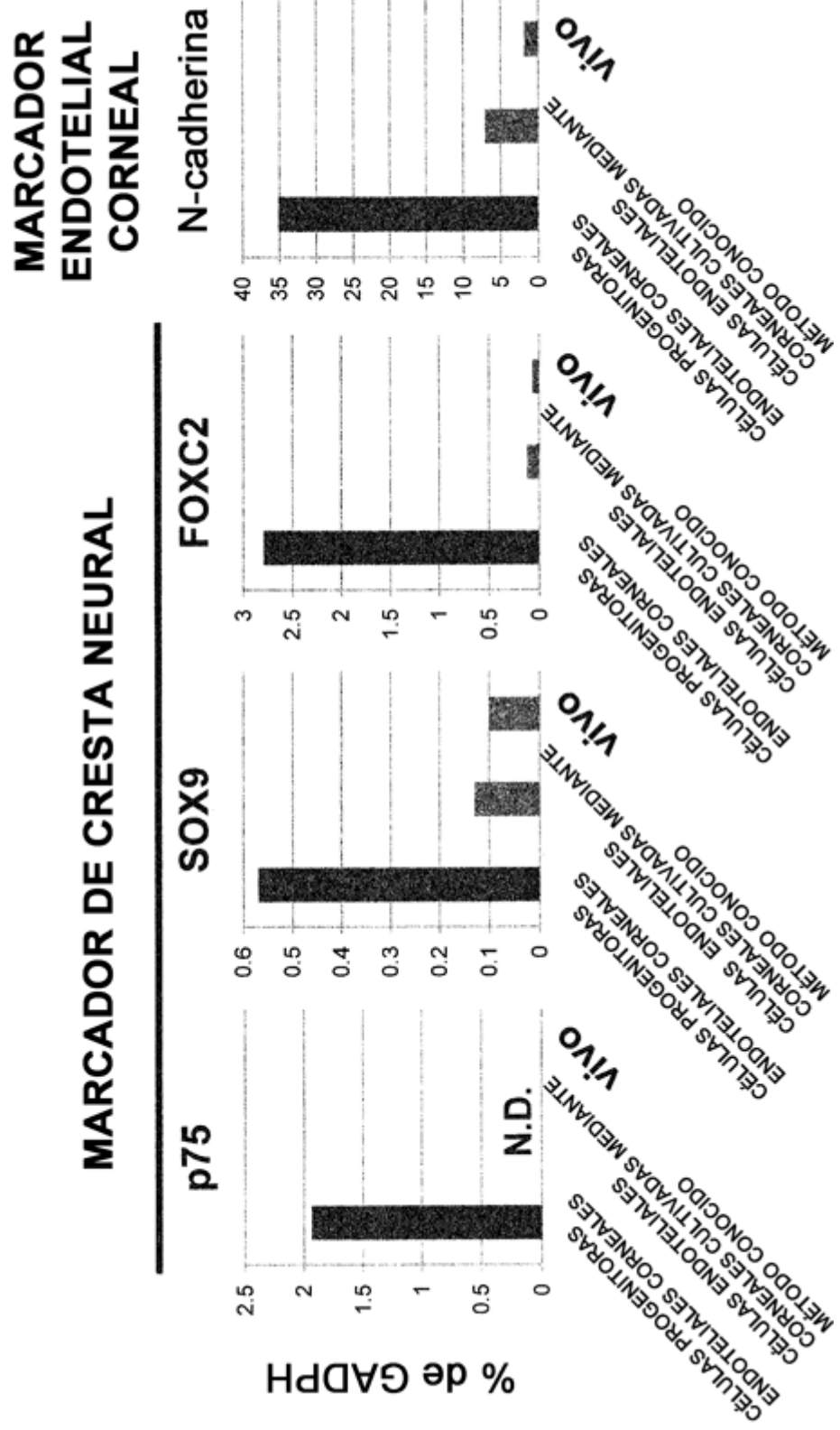


FIG.3

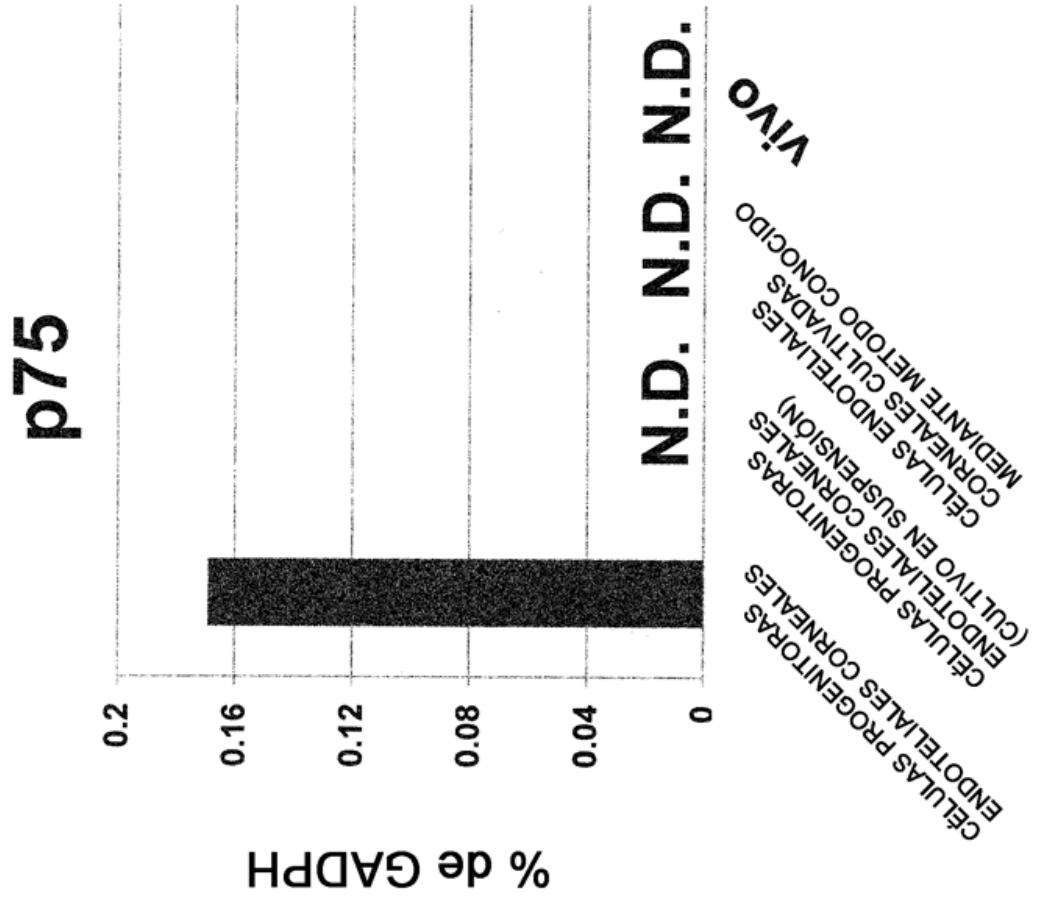
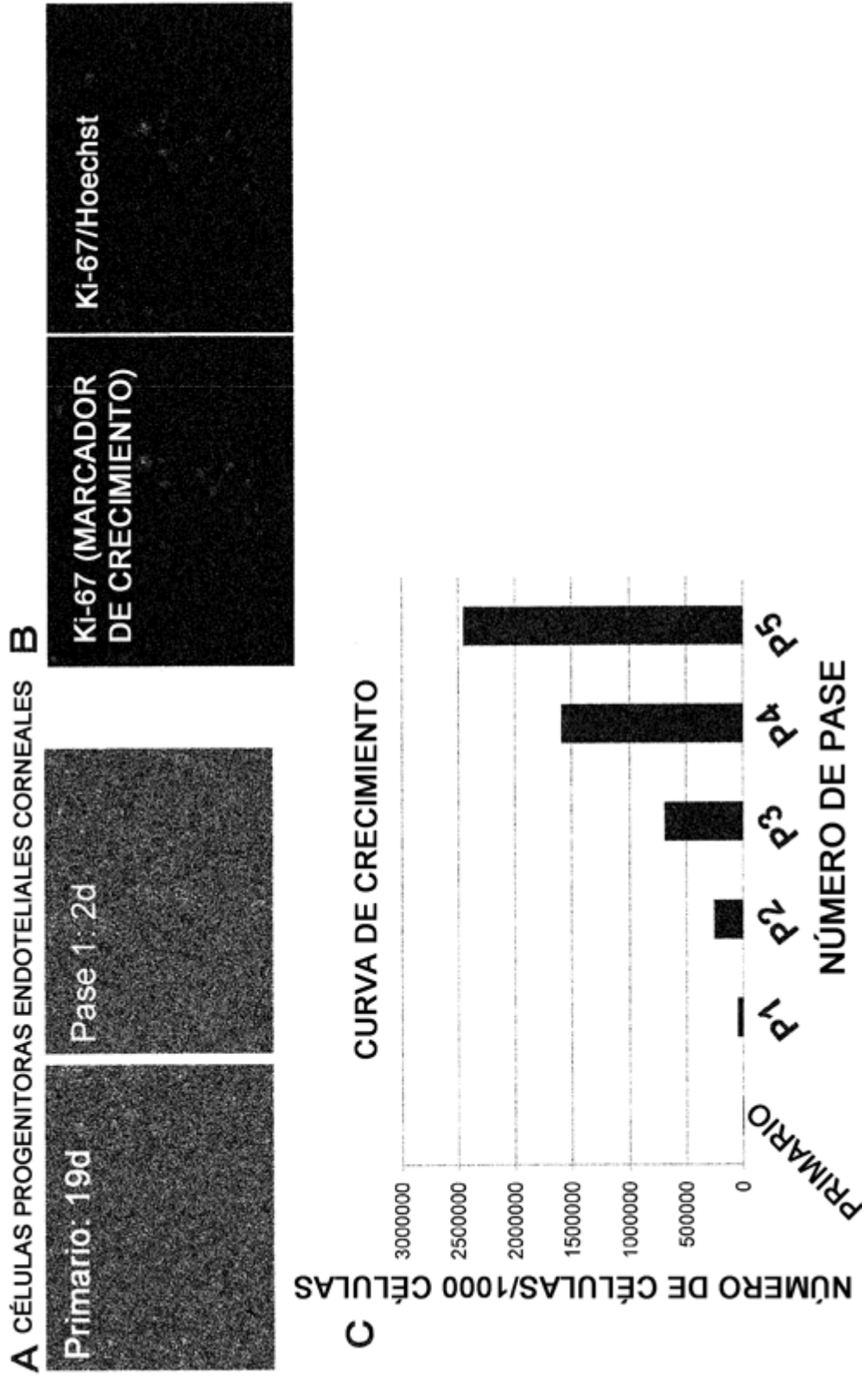


FIG.4



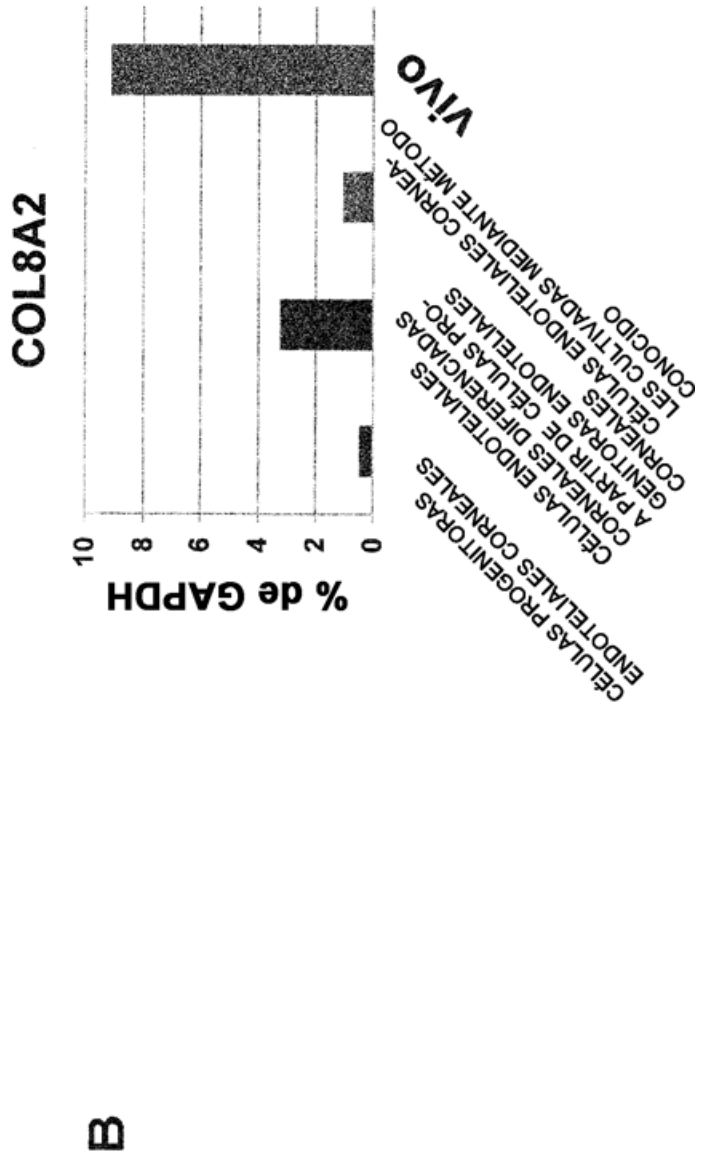
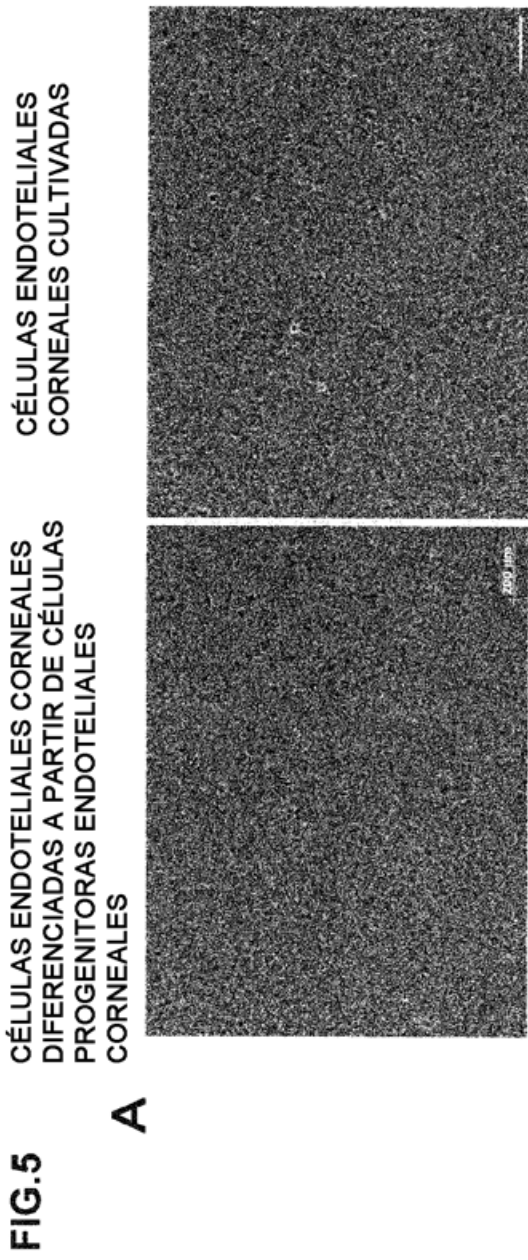


FIG.6

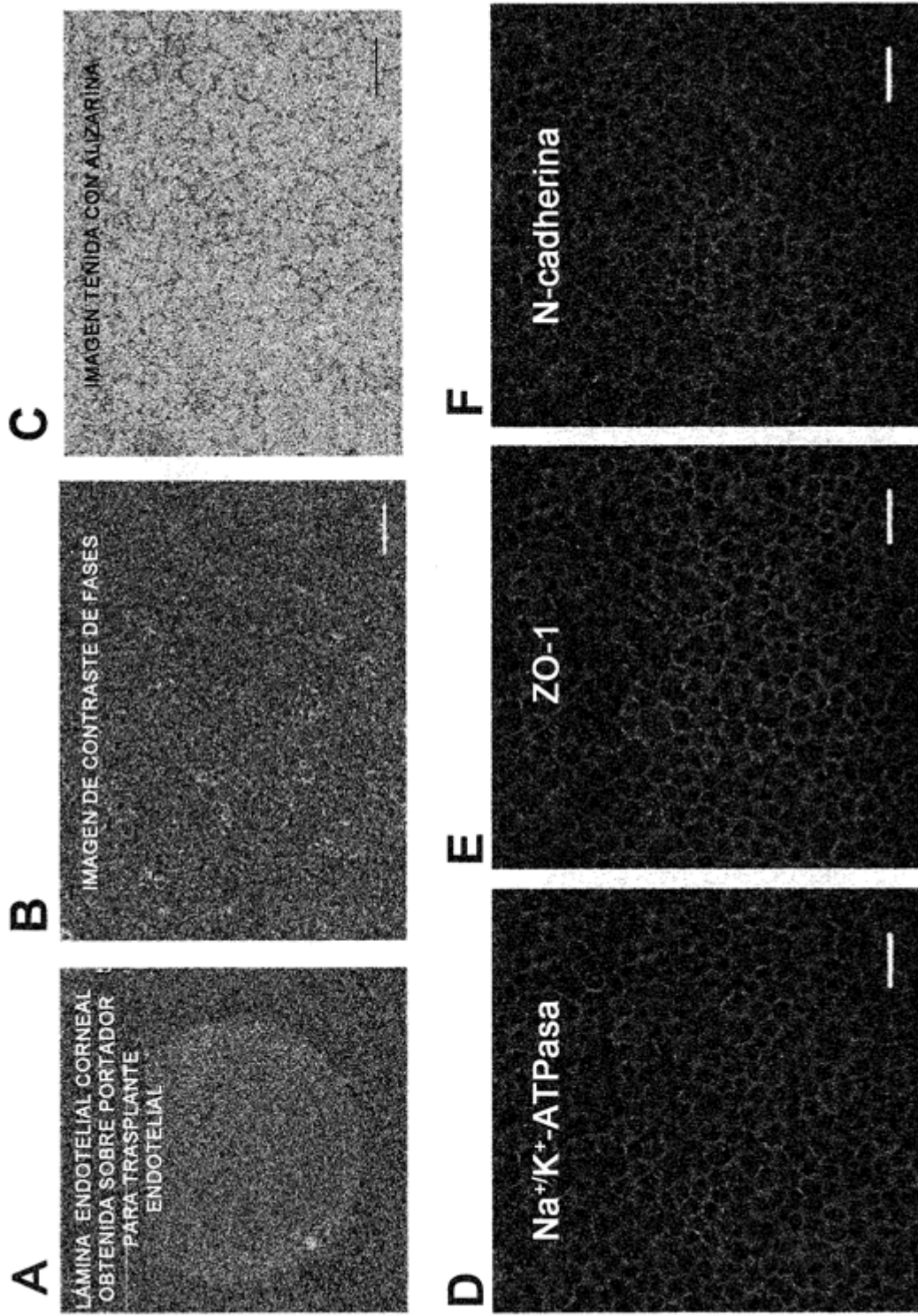
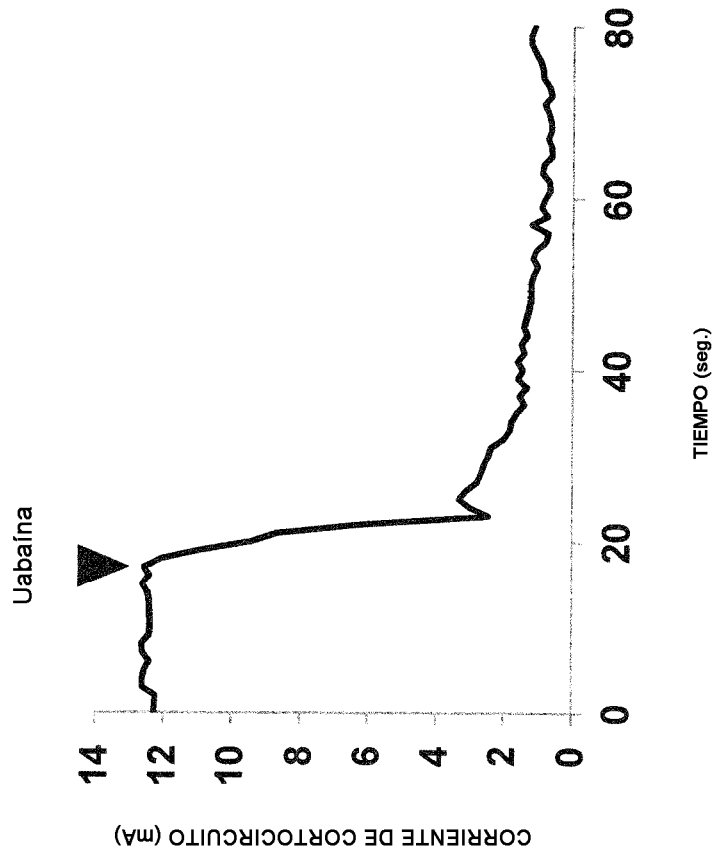
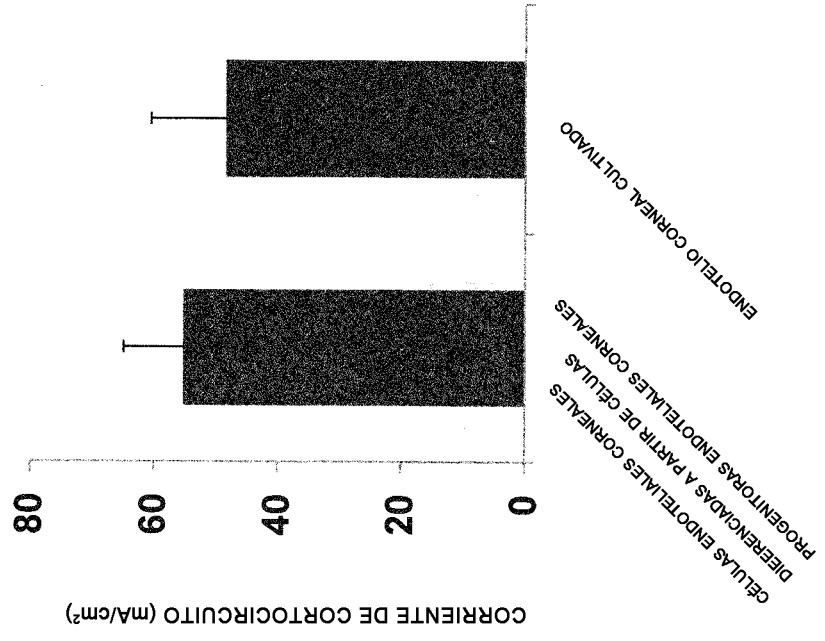


FIG.7

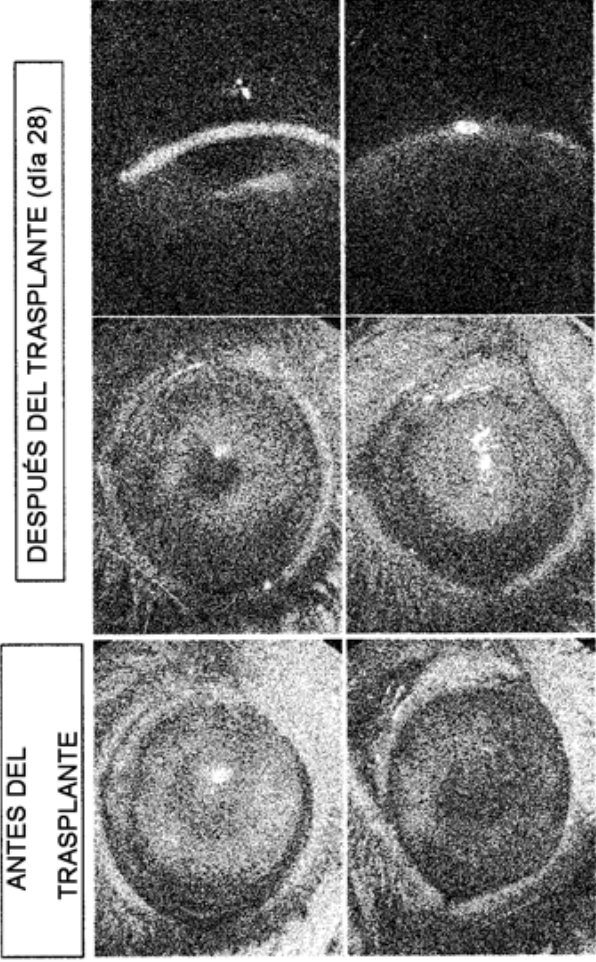
A



B

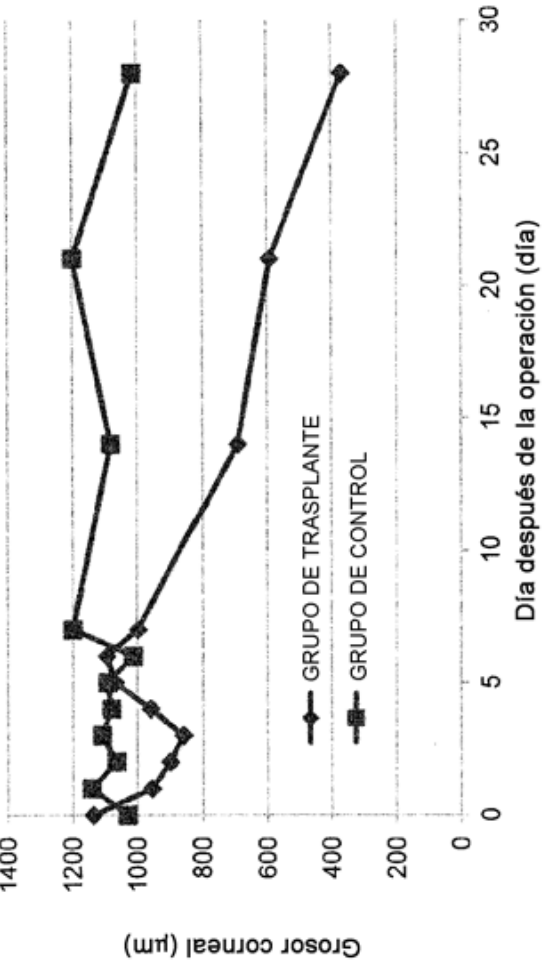


**FIG.8 A**



GRUPO DE TRASPLANTE

GRUPO DE CONTROL



**B**