

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 019**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/0793 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2013 PCT/US2013/044325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184809**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2013 E 13799830 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2882846**

54 Título: **Métodos y composiciones para la producción acelerada de células epiteliales pigmentadas retinianas a partir de células pluripotentes**

30 Prioridad:

05.06.2012 US 201261655977 P

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

30.10.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**CLEGG, DENNIS;
BUCHHOLZ, DAVID;
CROZE, ROXANNE;
PENNINGTON, BRITNEY;
COFFEY, PETER y
LEACH, LYNDISAY**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 688 019 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 composiciones para la producción acelerada de células epiteliales pigmentadas retinianas a partir de células pluripotentes

5

Campo de la invención

La invención se refiere al ámbito de los cultivos celulares; en concreto, el del cultivo de células epiteliales pigmentadas retinianas (EPR). La invención engloba métodos para la producción acelerada y eficiente de células EPR a partir de células pluripotentes. Además, la invención engloba métodos para la expansión, el mantenimiento y el cultivo eficientes de células EPR diferenciadas a partir de fuentes de células nativas y pluripotentes.

10

Antecedentes de la invención

El epitelio pigmentado retiniano (EPR) es una capa de células presente en el ojo. El EPR está superpuesto por las células sensoriales de la retina, que perciben la luz y transmiten la información visual al nervio óptico. Debajo del EPR está el tejido coroideo, una región vascularizada que suministra agua, nutrientes y otros compuestos a las células que cubren el ojo. El EPR desempeña numerosas funciones cruciales para el mantenimiento de la vista, entre las que figuran: aislar los tejidos oculares del sistema circulatorio general, mantener el entorno iónico adecuado, procesar los elementos externos de los fotorreceptores desechados por las células fotorreceptoras de la retina neural y proteger la retina del exceso de luz. Las células EPR forman un mosaico plano de células hexagonales unidas con firmeza a nivel de sus uniones.

15

Diversos trastornos pueden ocasionar lesiones y disfunciones de las células EPR. Por ejemplo, en algunas formas de retinitis pigmentaria, las células EPR muestran anomalías y disfunciones que afectan a la visión. Otro ejemplo es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), una enfermedad que reduce gradualmente la visión en la mácula (región central del ojo). La DMAE es una de las principales causas de pérdida de la visión en personas de 60 o más años de edad. Se calcula que, en Estados Unidos, el 30% de las personas de más de 75 años de edad padecen alguna forma de DMAE. Se dispone de escasos tratamientos para la DMAE, y de ninguno que cure o revierta eficazmente esta enfermedad. En algunas formas de DMAE, se forman depósitos de residuos celulares (drusas) entre el EPR y la coroides subyacente que alimenta a aquél, lo que tiene como consecuencia la muerte y la disfunción de las células EPR. La neovascularización coroidea (NVC) es un subtipo de DMAE caracterizado por una proliferación de vasos sanguíneos anómalos en el tejido coroideo, y la consiguiente pérdida de visión ocasionada por la lesión de las células retinianas suprayacentes. La atrofia geográfica es otra forma de DMAE, caracterizada por la atrofia de las células epiteliales pigmentadas retinianas y la consiguiente muerte de las células retinianas suprayacentes.

20

Se ha demostrado, en pruebas llevadas a cabo tanto en animales como en seres humanos, que el trasplante de células EPR sanas a zonas lesionadas o destruidas de la retina puede contribuir a restaurar la visión (da Cruz *et al.*, "RPE transplantation and its role in retinal disease", *Progress in Retinal and Eye Research* 26:598-635 (2007)). Por ejemplo, en pacientes con NVC, se demostró que se restaura la visión mediante intervención quirúrgica para retirar el tejido altamente vascularizado, seguida de trasplante de células EPR de los propios ojos del paciente (Chen *et al.*, "Long-term visual and microperimetry outcomes following autologous retinal pigment epithelium choroid graft for neovascular age-related macular degeneration", *Clinical and Experimental Ophthalmology* 37:275-285 (2009)).

25

30

A fin de maximizar el potencial terapéutico, sería beneficioso obtener grandes cantidades de células EPR inmunocompatibles para poder realizar trasplantes. Las células EPR obtenidas de células madre y de células pluripotentes inducidas representan una posible fuente de tejidos EPR abundantes para trasplantes. Por ejemplo, se han creado y trasplantado en ratas células EPR derivadas de células embrionarias y células madre pluripotentes inducidas humanas, y se demostró que eran funcionales (Carr *et al.*, "Protective Effects of Human iPS-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Transplantation in the Retinal Dystrophic Rat", *PLoS One* 4(12):e8152 (2009)). Actualmente se están usando células EPR obtenidas de células madre embrionarias humanas en estudios clínicos encaminados al tratamiento de la DMAE y de la Enfermedad de Stargardt (distrofia macular juvenil).

35

Ya se ha demostrado con anterioridad que se pueden obtener células EPR a partir de células pluripotentes, como, por ejemplo, conforme a lo descrito en Buchholz *et al.*, "Derivation of Functional Retinal Pigmented Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells", *Stem Cells* 27:2427-2434 (2009), y en Carr *et al.*, "Molecular Characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay", *Mol. Vis.* 15:283- 295 (2009). Sin embargo, los protocolos conocidos de obtención de EPR a partir de células pluripotentes son ineficientes; habitualmente, se obtiene de un 1% a un 5% de células EPR diferenciadas. Sólo un grupo ha comunicado producciones sustancialmente mayores; en concreto, dicho grupo ha comunicado una producción de un 33% de células EPR diferenciadas (Idelson, M., R. Alper, *et al.*, (2009), "Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells.", *Cell Stem Cell* 5(4): 396-408). Además de la baja productividad de los métodos conocidos hasta ahora en este campo del conocimiento, dichos métodos requieren de muchos meses para la producción de células EPR funcionales en cantidades que se puedan usar. Por eso, en este campo se necesitan métodos sencillos, de productividad alta y gran homogeneidad, para la creación de

40

45

50

55

60

65

células EPR viables a partir de células pluripotentes.

Características de la invención

5 Se describen en el presente métodos y composiciones nuevos para la producción de células EPR de gran calidad y con producciones muy altas (superiores al 80%). Además, el nuevo protocolo que se describe en el presente es extremadamente rápido, y se pueden producir cantidades utilizables de células en plazos tan cortos como de dos semanas. También se describen en el presente métodos y composiciones para la maduración, el mantenimiento y la expansión eficientes de células EPR diferenciadas. Las invenciones que se describen en el presente engloban el uso
10 de nuevas formulaciones de medios de cultivo, que engloban diversos elementos constituyentes y que se pueden aplicar siguiendo una secuencia concreta y una programación en el tiempo concreta, para la diferenciación acelerada de células EPR a partir de células pluripotentes. Además, se describe el uso de composiciones nuevas de medios de cultivo, y la suplementación de los medios con inhibidores de la proteína-quinasa asociada a Rho (ROCK, por sus siglas en inglés), para la maduración, el mantenimiento y la expansión de células EPR diferenciadas. En uno
15 de sus aspectos, la invención proporciona un método para la diferenciación de células madre pluripotentes de mamífero a células epiteliales pigmentadas retinianas, que comprende cultivar células madre pluripotentes en un primer medio que comprende un medio basal suplementado con IGF1, DKK1 y nogina y, posteriormente, cultivar las células en un segundo medio que comprende un medio basal suplementado con IGF1, DKK1, nogina y factor de crecimiento básico de los fibroblastos (BFGF, por sus siglas en inglés); posteriormente, cultivar las células en un
20 tercer medio que comprende un medio basal suplementado con IGF1, DKK1 y Activina A; y posteriormente, cultivar las células en un cuarto medio que comprende un medio basal suplementado con Activina A y SU5402, obteniéndose así células epiteliales pigmentadas retinianas.

25 Los medios de cultivo utilizados en la invención comprenden la suplementación de composiciones de medios conocidas con composiciones que contribuyen a la diferenciación acelerada y eficiente de células EPR a partir de células pluripotentes. En otro de sus aspectos, la invención comprende métodos de cultivo de células pluripotentes y en diferenciación en diversas composiciones de medios, para la diferenciación acelerada a células EPR funcionales, y maduración de esas células EPR funcionales, a partir de dichas células cultivadas. Se presentan kits integrados por varias formulaciones de medios, o varios suplementos de medios que se pueden añadir a un medio basal para
30 crear uno de los medios de la invención.

Además, se describe el uso de inhibidores de la ROCK en medios de cultivo durante diversas fases de la diferenciación, mantenimiento y expansión de los cultivos de células EPR.

35 Descripción detallada de la invención

EPR a partir de células pluripotentes. La invención proporciona métodos nuevos para la producción de células EPR a partir de células pluripotentes, utilizando diversos medios; dichos medios se usan siguiendo una secuencia y una programación en el tiempo que promueven una diferenciación muy rápida de las células EPR. Algunos de los
40 elementos constitutivos de los medios utilizados en los medios de la invención, que se usan para la diferenciación de las células EPR, son ya conocidos. Por ejemplo, se sabe que la nicotinamida promueve la diferenciación de las células EPR a partir de células pluripotentes (como se describe en Idelson M., Alper R., Obolensky A. *et al.*, "Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells.", *Cell Stem Cell* 2009;5:396 - 408). Igualmente, se ha utilizado ya previamente VIP (péptido intestinal vasoactivo) en la producción de células EPR (Koh SM. "VIP enhances the differentiation of retinal pigment epithelium in culture: From
45 cAMP and pp60(c-src) to melanogenesis and development of fluid transport capacity.", *Prog Retin Eye Res* 2000; 19:669 - 688). Sin embargo, las combinaciones de constituyentes de los medios en el presente descritas, y la programación en el tiempo de su aplicación, tienen como resultado la producción de EPR con una velocidad y una eficiencia sin precedentes. Aprovechando los conocimientos de la biología del desarrollo, del desarrollo de los progenitores retinianos, y de otros estudios sobre células madre, se ha optimizado la programación en el tiempo de la adición de factores, a fin de generar EPR de gran calidad dentro de un plazo de 14 días y con producciones altas.

50 Para los objetivos de esta especificación, el término "células EPR" se refiere a las células epiteliales pigmentadas retinianas nativas y a las células con fenotipo epitelial pigmentado retiniano obtenidas de fuentes de células pluripotentes. Tales células cultivadas tienen características de expresión genética similares a las de las células EPR nativas, y adoptan la morfología en forma de lámina plana poligonal de las células EPR nativas cuando se las cultiva hasta que alcanzan la confluencia, sobre un sustrato plano.

60 Para los objetivos de esta especificación, el término "células pluripotentes" se refiere a una célula que puede autorrenovarse y proliferar sin dejar de permanecer en un estado indiferenciado y que puede, en las condiciones adecuadas, ser inducida para que se diferencie a tipos de células especializadas, incluidas las células EPR. El término "células pluripotentes", tal y como se usa en el presente, engloba células madre embrionarias que pueden obtenerse mediante la no destrucción de embriones humanos, y otros tipos células madre, como, entre otras, células madre fetales, amnióticas o somáticas.

65 El término "células pluripotentes", tal y como se usa en el presente, engloba asimismo células madre pluripotentes

inducidas, un tipo de célula madre pluripotente obtenida de una célula no pluripotente, como, por ejemplo, una célula somática que ha sido reprogramada, mediante diversos métodos, para que induzca un fenotipo indiferenciado pluripotente. Se pueden crear células iPS (células madre pluripotentes inducidas) mediante inducción de la expresión de determinados genes reguladores o mediante aplicación exógena de determinadas proteínas. En este campo del conocimiento se conocen métodos para la inducción de células iPS; comprenden, entre otros, los métodos descritos en Zhou *et al.*, "Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells", *Stem Cells* 27 (11): 2667-74 (2009); Huangfu *et al.*, "Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds", *Nature Biotechnology* 26 (7): 795 (2008); Woltjen *et al.*, "piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells", *Nature* 458 (7239): 766-770 (2009); y Zhou *et al.*, "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins", *Cell Stem Cell* 8:381-384 (2009).

La invención engloba el uso de células pluripotentes de cualquier especie, entre las que figuran: humanas, murinas, porcinas, caninas, felinas, de rata, y de otras especies de mamíferos. Las células que se obtienen mediante el uso de la invención pueden aplicarse en cualquier uso terapéutico o para investigación, incluidos los usos médico y veterinario.

Las células pluripotentes se pueden cultivar, y diferenciar a células EPR, utilizando diversos métodos y condiciones de cultivo conocidos en este campo. Se pueden cultivar células pluripotentes en cualquier tipo de recipiente adecuado, incluidos recipientes hechos de vidrio, poliestireno y policarbonato. La invención engloba el uso de cualquier sistema de cultivo celular, incluidas las técnicas de cultivo bidimensional, tridimensional, y cultivo en suspensión líquida. Se prefieren las técnicas de cultivo bidimensional, por la facilidad de observación de las células y transferencia (subcultivo) de las mismas. Se pueden usar recipientes de cualquier tamaño, como, por ejemplo, frascos T-75 (75 cm² de área superficial/frasco), placas de 96 pocillos (0,32 cm² de área superficial/pocillo), placas de 24 pocillos (1,9 cm² de área superficial/pocillo), o placas de seis pocillos (9,5 cm² de área superficial/pocillo); por ejemplo, placas de poliestireno BD Falcon™. Los cultivos celulares deben mantenerse a una temperatura de 37 °C o cercana a 37 °C. Debe añadirse a cada recipiente un medio adecuado, a fin de evitar limitar el crecimiento, y debe cambiarse el medio a intervalos regulares, a fin de evitar el agotamiento de los nutrientes y la acumulación de sustancias de desecho. Por ejemplo, si se usan placas de seis pocillos estándar (diámetro de pocillo = 9,5 cm²), deben utilizarse unos 2 ml de medio por pocillo.

Sustratos. En realizaciones preferidas, se llevan a cabo los métodos de cultivo celular de la invención, usando un sustrato para cultivo celular. La invención engloba el uso de cualquier sustrato que posibilite el crecimiento de células pluripotentes, así como el crecimiento de células en diferenciación, progenitores (células progenitoras) del EPR, y células EPR. Entre los ejemplos posibles de sustratos figuran los que se usan comúnmente, como los siguientes: Matrigel, capas de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios murinos, fibroblastos embrionarios humanos, epitelio de trompas de Falopio humano, o capas alimentadoras de fibroblastos prepuciales humanos, que son conocidos en este campo. Pueden utilizarse sustratos libres de materiales extraños ("xeno-free"), como, por ejemplo, sustratos disponibles comercialmente como Synthmax™ (Corning Life Sciences), CELLstart™ (Invitrogen), GELstart™ (Invitrogen), y StemAdhere™ (Primorigen). Además, la vitronectina humana purificada a partir de plasma humano o producida mediante expresión recombinante, puede actuar como sustrato libre de materiales extraños para el cultivo y el crecimiento de células pluripotentes; por ejemplo, tal y como se describe en Braam *et al.*, "Recombinant Vitronectin Is a Functionally Defined Substrate That Supports Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal via α Vp5 Integrin", *Stem Cells* 26:2257-2265 (2008). Puede utilizarse laminina recombinante derivada de laminina humana; por ejemplo, Laminina 511 (BD) o Laminina 521 (Biolamina). Además, la poli-D-lisina puede actuar como sustrato; por ejemplo, tal y como se describe en Harb *et al.*, "The Rho-Rock-Myosin Signaling Axis Determines Cell-Cell Integrity of Self-Renewing Pluripotent Stem Cells.", *PLoS ONE* 3(8): e3001 (2008).

Caracterización molecular. Para llevar un control de la fase de la diferenciación a EPR, y para la posterior validación del fenotipo EPR, puede analizarse la expresión de diversos marcadores moleculares. Los marcadores moleculares pueden confirmarse mediante diversos métodos conocidos en este campo. Por ejemplo, la expresión de los marcadores moleculares puede cuantificarse mediante la cuantificación del ARNm de los genes marcadores; por ejemplo, utilizando métodos de qPCR (PCR cuantitativa), conforme a lo conocido en este campo. Como alternativa, puede evaluarse la expresión de los marcadores moleculares mediante cuantificación de los productos de traducción de los genes marcadores; por ejemplo, mediante inmunoensayo; por ejemplo, mediante ensayos inmunocitoquímicos y de inmunotransferencia ("immunoblot").

MEDIOS DE CULTIVO DE LA INVENCIÓN. Medios basales. El cultivo, incluido el mantenimiento de las células pluripotentes, la diferenciación de las células pluripotentes a EPR, y la expansión y el mantenimiento de los cultivos de EPR, se lleva a cabo en diversos medios, como se describe en el presente. Los medios de cultivo de la invención se elaboran añadiendo combinaciones nuevas de aditivos a un medio basal. El término "medio basal", tal y como se usa en el presente, se refiere a un medio de cultivo celular, o de crecimiento celular, en el que se cultivan las células pluripotentes y sus células derivadas en diferenciación/diferenciadas. "Medio basal", tal y como se usa en el presente, se refiere a cualquier solución de sales, azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento que sustente el crecimiento y el mantenimiento de las células pluripotentes y sus células derivadas diferenciadas, incluidas las células EPR derivadas de células pluripotentes y sus progenitores.

Constituyen ejemplos de medios basales, entre otros, los conocidos en este campo, como por ejemplo el medio de cultivo de células de mamífero Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) (Life Technologies). Otro ejemplo de medio es el medio Ham F12 (F12 de Ham). Otro ejemplo de medio es una mezcla 1:1 de DMEM y F12. Otro ejemplo de medio basal es el Medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, por sus siglas en inglés, comercializado por Life Technologies), como se describe en Iscove, N.N., Guilbert, L.J., y Weyman, C. (1980)., "Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM). Complete Replacement of Serum in Primary Cultures of Erythropoietin Dependent Red Cell Precursors [CFU-E] by Albumin, Transferrin, Iron, Unsaturated Fatty Acid, Lecithin and Cholesterol.", Exp. Cell Research., 126, 121-126.

Entre los ejemplos de medios libres de materiales extraños, disponibles comercialmente, figuran los siguientes: X-Vivo 10™ (Lonza Biosciences), X-Vivo 15™ (Lonza Biosciences), mTeSR2™ (Stem Cell Technologies), NutriStem™ (StemGent), y HEScGRO™ (Millipore). También puede utilizarse el X-Vivo 10 de Lonza, suplementado con un 5%-40% de sustitutivo de suero libre de materiales extraños Xeno-Free Knockout Serum Replacement™ (XF-KOSR™, Invitrogen), o con un sustitutivo de suero libre de materiales extraños similar. Son ejemplos adicionales de medios de cultivo libres de materiales extraños los siguientes: el descrito en Rajala *et al.*, "A Defined and Xeno-Free Culture Method Enabling the Establishment of Clinical-Grade Human Embryonic, Induced Pluripotent and Adipose Stem Cells", PLoS ONE 5:e10246 (2010), el medio descrito en Swistowski *et al.*, "Xeno-Free Defined Conditions for Culture of Human Embryonic Stem Cells, Neural Stem Cells and Dopaminergic Neurons Derived from Them", PLoS ONE 4:e6233 (2009), y el medio descrito en Amit *et al.*, "Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells", Biology of Reproduction 70:837 (2004). Además, los medios descritos en Thompson *et al.*, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts", Science 282:1145 (1998) o descritos en http://www.wicell.org/index.php?option=com_content&task=section&id=23&Itemid=273 pueden modificarse mediante la sustitución de suero fetal bovino o de KOSR (sustitutivo de suero Knockout™) estándar con sustitutivo de suero Xeno-Free Knockout Serum Replacement™ (XF-KOSR™, Invitrogen) o con un sustitutivo del XF-KOSR™ similar. También puede utilizarse el medio de crecimiento descrito en la patente estadounidense número 5.945.337, "Method for Culturing CD34 Cells in a Serum-Free Medium", por Brown *et al.*

Otro ejemplo de medio basal es el medio Neurobasal™, comercializado por Life Technologies. Constituyen otros ejemplos de medios basales los siguientes: Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM, por sus siglas en inglés), medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) y medio MCDB.

Los medios basales pueden suplementarse con suero; por ejemplo, con suero fetal bovino. También pueden utilizarse sustitutivos de suero definidos; por ejemplo, sustitutivo de suero Knockout™ [Knockout Serum Replacement™ (Life Technologies)]. Otro ejemplo de sustitutivo de suero es el B27 (Life Technologies). Otro ejemplo de sustitutivo de suero es el suplemento N-2, que se puede usar a razón del 1% en volumen. En general, el suero y los sustitutivos del suero pueden utilizarse a razón del 1%-20%, en volumen.

Los medios basales pueden también incluir suplementos adicionales conocidos en este campo, con los que aumentar la viabilidad de las células y la eficiencia de los cultivos celulares. Pueden utilizarse L-glutamina o sustitutivos de la misma, como, por ejemplo, suplemento GLUTAMAX-1™ (Life Technologies), a fin de evitar la acumulación de amoníaco en los cultivos, a razón, por ejemplo, de 1-5 mM. Además, puede utilizarse el Medio Mínimo Esencial de Eagle con aminoácidos no esenciales ("MEM-E NEAA", de Biological Industries), a concentraciones de 0,05-0,5 mM, aproximadamente. También puede utilizarse B-mercaptoetanol para conservar las proteínas presentes en el medio, a concentraciones, por ejemplo, de 0,05-0,5 mM, aproximadamente.

En una realización preferida, se usa como medio basal una mezcla 1:1 de DMEM y F12 suplementada con suplemento N-2 al 1%, B27 al 2%, GlutaMAX-I 2 mM y MEM NEAA 0,1 mM.

Aditivos para los medios. Los métodos de la invención engloban el uso de diversas composiciones de nuevos medios. Estos nuevos medios se formulan mediante la adición de determinados aditivos al medio basal. Los diversos aditivos se definen y describen a continuación.

Un aditivo utilizado para formular los nuevos medios que se usan en la invención es la nogina, un inhibidor proteico de la proteínas morfogenéticas óseas (BMP, por sus siglas en inglés) y de la señalización de los factores de crecimiento transformantes beta ("TGF-Beta"). Se puede obtener nogina recombinante de numerosos proveedores que la comercializan. Para el cultivo y la diferenciación de células pluripotentes humanas se prefiere la nogina recombinante derivada de humanos, aunque también se puede utilizar nogina derivada de otras especies de mamíferos. En los medios, la nogina puede ser sustituida por miméticos de la nogina. Es mimético de la nogina cualquier compuesto que produzca los mismos efectos que la nogina en la diferenciación y maduración de las células EPR a partir de células pluripotentes. Son miméticos de la nogina, entre otros, los siguientes compuestos: formas modificadas de la nogina, péptidos que engloban los dominios de unión de la nogina, y análogos de la nogina que comprenden aminoácidos sustituidos. Entre los ejemplos de miméticos de la nogina figuran los inhibidores de las BMP, es decir, cualquier molécula pequeña, péptido o proteína capaz de inhibir la vía de señalización de las BMP. Constituyen ejemplos de inhibidores de las BMP, entre otros, las moléculas pequeñas LDN-193189 (Stemgent) y Dorsomorfina (StemRD). Son proteínas que inhiben la señalización de las BMP la cordina y Cerberus (R&D

Systems).

Otro aditivo utilizado para formular los medios nuevos utilizados en la invención es el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF1). El IGF1, también denominado somatomedina C, es una proteína que tiene una estructura molecular similar a la de la insulina. Se puede adquirir IGF1 recombinante de numerosos proveedores que lo comercializan. Para el cultivo y la diferenciación de células pluripotentes humanas se prefiere el IGF1 recombinante derivado de humanos, aunque también se puede utilizar IGF1 derivado de otras especies de mamíferos. En los medios, el IGF1 puede ser sustituido por miméticos del IGF1. Es mimético del IGF1 cualquier compuesto que produzca los mismos efectos que el IGF1 en la diferenciación y maduración de las células EPR a partir de células pluripotentes. Son miméticos del IGF1, entre otros, los siguientes compuestos: formas modificadas del IGF1, péptidos que engloban los dominios de unión del IGF1, y análogos del IGF1 que comprenden aminoácidos sustituidos. Entre los ejemplos de miméticos del IGF1 figuran los que se describen en Fiab *et al.*, "The Rho-Rock-Myosin Signaling Axis Determines Cell-Cell Integrity of Self-Renewing Pluripotent Stem Cells.", PLoS ONE 3(8): e3001 (2008), o en la solicitud de patente estadounidense número de serie 12/659.546, por Chung *et al.*, "Peptides having activities of insulin like growth factor-1 and their uses".

Otro aditivo utilizado para formular los nuevos medios de la invención es la proteína Dickkopf-1 (DKK1), un inhibidor de las proteínas secretadas por la vía de señalización WNT. Se puede adquirir DKK1 recombinante de numerosos proveedores que lo comercializan. Para el cultivo y la diferenciación de células pluripotentes humanas se prefiere la DKK1 recombinante derivada de humanos, aunque también se puede utilizar DKK1 derivada de otras especies de mamíferos. En los medios, la DKK1 puede ser sustituida por miméticos de la DKK1. Es mimético de la DKK1 cualquier compuesto que produzca los mismos efectos que la DKK1 en la diferenciación y maduración de las células EPR a partir de células pluripotentes. Son miméticos de la DKK1, entre otros, los siguientes compuestos: formas modificadas de la DKK1, péptidos que engloban los dominios de unión de la DKK1, y análogos de la DKK1 que comprenden aminoácidos sustituidos. Entre los ejemplos de miméticos de la DKK1 figuran cualesquiera inhibidores de la vía de señalización Wnt. Los inhibidores de Wnt pueden comprender moléculas pequeñas como, por ejemplo, IWP-2,1 WPG, IWP-4 y XAV939 (todas éstas, comercializadas por Stemgent). Son también inhibidores de Wnt los péptidos inhibidores de la vía de señalización Wnt como, por ejemplo, los descritos en Gregory *et al.*, "Dkk-1-derived Synthetic Peptides and Lithium Chloride for the Control and Recovery of Adult Stem Cells from Bone Marrow.", Journal of Biological Chemistry, 2005, Vol. 280, N.º 3, páginas 2309-2323. También pueden utilizarse como miméticos de la DKK1 las proteínas secretadas relacionadas con los receptores "Frizzled" que actúan como inhibidoras de la señalización Wnt; por ejemplo, SFRP1, SFRP2, y otras (comercializadas por R&D Systems). El factor inhibidor de Wnt 1 (WIF-1) es otra proteína inhibidora de Wnt.

Otro tipo de aditivo utilizado para formular los medios nuevos utilizados en la invención es la nicotinamida, una vitamina B. En los medios, la nicotinamida puede ser sustituida por miméticos de la nicotinamida. Es mimético de la nicotinamida cualquier compuesto que produzca los mismos efectos que la nicotinamida en la diferenciación y maduración de las células EPR a partir de células pluripotentes. Son miméticos de la nicotinamida, entre otros, los siguientes: formas modificadas de la nicotinamida, y análogos químicos de la nicotinamida. Entre los ejemplos de miméticos de la nicotinamida figuran el ácido benzoico, el ácido 3-aminobenzoico y la 6-aminonicotinamida. Otra clase de compuestos que pueden actuar como miméticos de la nicotinamida son los inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Entre los ejemplos de inhibidores de la PARP figuran los siguientes: 3-aminobenzamida, Iniparib (BSI 201), Olaparib (AZD-2281), Rucaparib (AG014699, PF-01367338), Veliparib (ABT-888), CEP 9722, MK 4827 y BMN-673.

Otro aditivo utilizado para formular los medios nuevos utilizados en la invención es el factor de crecimiento básico de los fibroblastos-1 (BFGF1). Se puede adquirir BFGF1 recombinante de numerosos proveedores que lo comercializan. Para el cultivo y la diferenciación de células pluripotentes humanas se prefiere el BFGF1 recombinante derivado de humanos, aunque también se puede utilizar BFGF1 derivado de otras especies de mamíferos. En los medios, el BFGF1 puede ser sustituido por miméticos del BFGF1. Es mimético del BFGF1 cualquier compuesto que produzca los mismos efectos que el BFGF1 en la diferenciación y maduración de las células EPR a partir de células pluripotentes. Son miméticos del BFGF1, entre otros, los siguientes compuestos: formas modificadas del BFGF1, péptidos que engloban los dominios de unión del BFGF1, y análogos del BFGF1 que comprenden aminoácidos sustituidos. Entre los ejemplos de miméticos del BFGF1 figuran otros miembros de la familia de los factores de crecimiento de los fibroblastos, como, por ejemplo: FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9 y FGF10. También la molécula pequeña SUN13837 puede actuar como sustituto del BFGF1. Entre los ejemplos de miméticos figuran los siguientes: el péptido sintético F2A4-K-NS (tal y como se describe en Lin *et al.*, "Synthetic peptide F2A4-K-NS mimics fibroblast growth factor-2 *in vitro* and is angiogenic *in vivo*", International Journal of Molecular Medicine 17:833-839 (2006)), y la tricostatina A (tal y como se describe en Durcova-Hills *et al.*, "Reprogramming Primordial Germ Cells into Pluripotent Stem Cells.", PLoS ONE 3(10) (2008)).

Otro aditivo utilizado para formular los medios nuevos utilizados en la invención es la Activina A. Puede adquirirse Activina A recombinante de numerosos proveedores que la comercializan. Para el cultivo y la diferenciación de células pluripotentes humanas se prefiere la Activina A recombinante derivada de humanos, aunque también se puede utilizar Activina A derivada de otras especies de mamíferos. En los medios, la Activina A puede ser sustituida por miméticos de la Activina A. Es mimético de la Activina A cualquier compuesto que produzca los mismos efectos

que la Activina A en la diferenciación y maduración de las células EPR a partir de células pluripotentes. Son miméticos de la Activina A, entre otros, los siguientes compuestos: formas modificadas de la Activina A, péptidos que engloban los dominios de unión de la Activina A, y análogos de la Activina A que comprenden aminoácidos sustituidos. Entre los ejemplos de miméticos de la Activina A figuran la Activina AB, la Activina B, y miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGFB) como, por ejemplo, BMP-4, BMP-7 y TGF-beta1.

Otro aditivo utilizado para formular los medios nuevos utilizados en la invención es el SU5401, un inhibidor de la señalización del FGF. En los medios, el SU5402 puede ser sustituido por miméticos del SU5402. Es mimético del SU5402 cualquier compuesto que produzca los mismos efectos que el SU5402 en la diferenciación y maduración de las células EPR a partir de células pluripotentes. Son miméticos del SU5402, entre otros, las formas modificadas del SU5402 y los análogos químicos del SU5402. Entre los ejemplos de los miméticos del SU5402 figuran cualesquiera inhibidores de la señalización del FGF. Por ejemplo, la proteína "Sprouty-2" puede actuar como mimético del SU5402. Otros miméticos del SU5402 son, entre otros, las moléculas pequeñas inhibitoras de la señalización del FGF, como, por ejemplo, AZD4547 y PD173074 (Stemgent).

Otro aditivo utilizado para formular los medios nuevos utilizados en la invención es el péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés), que es un "regulador al alza" del AMP cíclico (aumenta los niveles de AMP cíclico). Se puede adquirir VIP recombinante de numerosos proveedores que lo comercializan. Para el cultivo y la diferenciación de células pluripotentes humanas se prefiere el VIP recombinante derivado de humanos, aunque también se puede utilizar VIP derivado de otras especies de mamíferos. En los medios, el VIP puede ser sustituido por miméticos del VIP. Es mimético del VIP cualquier compuesto que produzca los mismos efectos que el VIP en la diferenciación y maduración de las células EPR a partir de células pluripotentes. Son miméticos del VIP, entre otros, los siguientes compuestos: formas modificadas del VIP, péptidos que engloban los dominios de unión del VIP, y análogos del VIP que comprenden aminoácidos sustituidos. Entre los ejemplos de los miméticos del VIP figuran cualesquiera reguladores al alza del AMP cíclico. Son miméticos del VIP, por ejemplo, moléculas pequeñas tales como la forskolina y el rolipram.

Composiciones de medios específicas

En algunas realizaciones, la invención comprende métodos para medios nuevos, que se utilizan en diversas fases de la diferenciación y propagación del EPR, como se describe a continuación.

MEDIO 1. El Medio 1 comprende medio basal suplementado con concentraciones biológicamente activas de los siguientes aditivos: nogina, por ejemplo, a una concentración de 1 a 100 ng/ml; IGF1, por ejemplo, a una concentración de 1 a 100 ng/ml; DKK1, por ejemplo, a una concentración de 1 a 50 ng/ml; y nicotinamida, por ejemplo, a una concentración de 1 a 100 mM. En el Medio 1, se puede usar un exceso de nogina o de DKK1, y no hay ningún límite superior real de la cantidad de nogina o de DKK1 que se puede usar. La nicotinamida no resulta necesaria para la diferenciación del EPR y puede omitirse, pero se la incluye para acelerar el proceso de diferenciación del EPR.

En una versión preferida del Medio 1, los aditivos se incluyen a las siguientes concentraciones: nogina, a 50 ng/ml; IGF1, a 10 ng/ml; DKK1, a 10 ng/ml; y nicotinamida, a 10 mM.

MEDIO 2. El Medio 2 comprende medio basal suplementado con concentraciones biológicamente activas de los siguientes aditivos: nogina, por ejemplo, a una concentración de 1 a 100 ng/ml; IGF1, por ejemplo, a una concentración de 1 a 100 ng/ml; DKK1, por ejemplo, a una concentración de 1 a 50 ng/ml; nicotinamida, por ejemplo, a una concentración de 1 a 100 mM; y BFGF, por ejemplo, a una concentración de 1 a 20 ng/ml.

Como en el Medio 1, en el Medio 2 se puede usar un exceso de nogina o de DKK1, y no hay ningún límite superior real de la cantidad de nogina o de DKK1 que se puede usar. De nuevo, la nicotinamida no resulta necesaria y puede omitirse, pero se la incluye para acelerar el proceso de diferenciación del EPR. De igual modo, puede omitirse el BFGF, aunque su inclusión en el medio aumenta la productividad y la eficiencia del proceso.

En una versión preferida del Medio 2, los aditivos se incluyen a las siguientes concentraciones: nogina, a 10 ng/ml; IGF1, a 10 ng/ml; DKK1, a 10 ng/ml; nicotinamida, a 10 mM; y bFGF, a 5 ng/ml.

MEDIO 3. El Medio 3 comprende medio basal suplementado con concentraciones biológicamente activas de los siguientes aditivos: IGF1, por ejemplo, a una concentración de 1 a 100 ng/ml; DKK1, por ejemplo, a una concentración de 1 a 50 ng/ml; y Activina A, por ejemplo, a una concentración de 10 a 200 ng/ml. En el Medio 3, se puede usar un exceso de DKK1, y no hay ningún límite superior real de la cantidad de DKK1 que se puede usar.

En una versión preferida del Medio 3, los aditivos se incluyen a las siguientes concentraciones: IGF1, a 10 ng/ml; DKK1, a 10 ng/ml; y Activina A, a 100 ng/ml.

MEDIO 4. El Medio 4 comprende medio basal suplementado con concentraciones biológicamente activas de los siguientes aditivos: Activina A, por ejemplo, a una concentración de 10 a 200 ng/ml; SU5402, por ejemplo, a una concentración de 1 a 100 µM; y VIP, por ejemplo, a una concentración de 0,1 a 100 µM. En el Medio 4, se puede usar un exceso de SU5402, y no hay ningún límite superior real de la cantidad de SU5402 que se puede usar. El VIP no resulta necesario y puede omitirse, pero su inclusión contribuye a acelerar el proceso de diferenciación del EPR.

En una versión preferida del Medio 4, los aditivos se incluyen a las siguientes concentraciones: Activina A, a 100 ng/ml; SU5402, a 10 µM; y VIP, a 1 µM.

Los expertos en la técnica comprenderán que los miméticos de cualquiera de los aditivos específicos que se usan en las formulaciones de medios descritas anteriormente pueden sustituir al aditivo original, en una cantidad biológicamente equivalente. Para los objetivos de la presente especificación, una "cantidad biológicamente equivalente" significa una cantidad de un mimético que tiene el mismo efecto biológico, sobre las células pluripotentes que se diferencian a células EPR, que la cantidad enumerada del aditivo citado. Por ejemplo, si se describe que un medio contiene 10 ng/ml del aditivo X, los expertos en la técnica comprenderán que, en vez del aditivo X, se puede utilizar un mimético del aditivo X, en una cantidad suficiente para ejercer el mismo efecto biológico que con el uso de 10 ng del aditivo X. Tal cantidad biológicamente equivalente puede ser determinada con facilidad, mediante diversos métodos, por los expertos en la técnica. Si el mimético tiene una estructura proteica o química muy similar a la del aditivo original, puede utilizarse la misma o casi la misma cantidad de dicho mimético que de dicho aditivo. Como alternativa, puede utilizarse el mimético a la concentración que se sabe que tiene un efecto biológico, como es conocido en este campo. Como alternativa, puede probarse el mimético en un protocolo de diferenciación del EPR a diversas concentraciones, y el intervalo de concentraciones en el que se replican los efectos del aditivo original será el intervalo adecuado de uso del mimético.

Además, los expertos en la técnica comprenderán que la invención comprende el uso de subconjuntos de los aditivos para medios que se describen para cada composición de medio. Por ejemplo, un medio en el que se omitan uno o más de los constituyentes del Medio 1, Medio 2, Medio 3, Medio 4, del Medio de maduración para EPR, o del Medio de proliferación para EPR, seguirá estando dentro del ámbito de la invención.

PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN DE EPR. En determinadas realizaciones, la programación en el tiempo de la inclusión o exclusión de diversas formulaciones de los medios o aditivos de los medios en los medios de cultivo se basa en la expresión de marcadores moleculares. La expresión de marcadores moleculares puede someterse a ensayo mediante diversas herramientas estándar conocidas en este campo, como, por ejemplo, mediante cuantificación del ARN mensajero, mediante cuantificación de las proteínas producto de los genes, o mediante ensayos funcionales (por ejemplo, actividad enzimática de las proteínas expresadas). Son marcadores moleculares, entre otros, la proteína de caja apareada ("Paired box", Pax6, también conocida como proteína aniridia de tipo II (AN2) u oculorhombina) que, en humanos, es codificada por el gen *PAX6*; el gen "homeobox" Rax (también conocido como Rx), codificado por el gen *RAX*; la proteína LIM/"homeobox" (Lhx2), una proteína que, en humanos, es codificada por el gen *LHX2*; la proteína "homeobox" SIX3, una proteína que, en humanos, es codificada por el gen *SIX3*; la enzima tirosinasa, que es codificada por el gen *TYR*; el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF, por sus siglas en inglés); el tripsinógeno catiónico humano, codificado por el gen *TRYP1*; la tripsina-1, también conocida como tripsinógeno catiónico que, en humanos, es codificada por el gen *PRSS1*; la tripsina-2 (tripsinógeno aniónico) que, en humanos, es codificada por el gen *PRSS2*; la proteína melanocítica PMEL 17, también conocida como proteína premelanosómica (PMEL 17) u homólogo de la proteína del locus "silver" (SILV) que, en humanos, es codificada por el gen *PMEL*; el homólogo que contiene el dominio homeo *ceh-10* (Chx10), también conocido como homólogo que contiene el homeodominio *Ceh-10*; y la bestrofina-1 que, en humanos, es codificada por el gen *BEST1*.

Para iniciar el protocolo de producción de EPR, se comienza cultivando las células pluripotentes en el Medio 1. El inicio del cultivo en el Medio 1 inicia el protocolo, y a ese momento se le denomina "Día 0". En un ejemplo de realización, el protocolo se inicia transfiriendo grupos de células pluripotentes, mantenidas conforme a lo conocido en el estado de la técnica, a un recipiente de cultivo nuevo, como, por ejemplo, el pocillo de una placa de 6 pocillos, y dichas células transferidas se emplazan de manera que cubran de un 50% a un 75% del pocillo de cultivo. A continuación, se añade una cantidad adecuada de Medio 1; por ejemplo, 2 ml para el pocillo de una placa de seis pocillos estándar. Se prefiere que, en el Día 1 (unas 24 horas tras el inicio del protocolo), se reponga con Medio 1 nuevo el medio del recipiente de cultivo. La teoría es que el cultivo en el Medio 1 inicia una inducción neural en las células pluripotentes. Las células empiezan a perder la morfología típica de las células pluripotentes (proporción alta entre núcleo y citoplasma) y se extienden "procesos" (prolongaciones) en una orientación radial.

A continuación, se cambia el medio presente en el recipiente de cultivo por Medio 2. La transición al Medio 2 puede tener lugar desde tan solo 24 horas tras el comienzo del cultivo en el Medio 1, hasta 3 días después del comienzo del cultivo en el Medio 1. En una realización preferida, la transición al Medio 2 se realiza el Día 2 o en torno al Día 2 (es decir, unas 48 horas después del comienzo del cultivo en el Medio 1). Como alternativa, la transición al Medio 2 puede realizarse dentro de un plazo de 0-24 horas tras la primera expresión o regulación al alza significativa detectable de cualquiera de los marcadores de los progenitores retinianos Pax6, Rax, Lhx2, Six3, o tras la detección de cualquier otro marcador molecular, fisiológico o morfológico de inducción neural.

La teoría es que, durante el cultivo en el Medio 2, las células cultivadas sufren especificación a células progenitoras retinianas o diferenciación temprana a campo ocular.

A continuación, se cambia el medio presente en el recipiente de cultivo por Medio 3. La transición al Medio 3 puede tener lugar desde tan temprano como en el Día 2, hasta tan tardíamente como en el Día 6. En una realización preferida, la transición al Medio 3 se realiza el Día 4 o en torno al Día 4. Como alternativa, la transición al Medio 3 puede realizarse al observarse un incremento notable (por ejemplo, de por 10) en la expresión de cualquiera de los marcadores de los progenitores retinianos Pax6, Rax, Lhx2 o Six3. Como alternativa, la transición al Medio 3 puede

realizarse dentro de un plazo de 0-24 horas tras la primera observación de la expresión de *Mitf* o de la expresión de *Chx10*. Como alternativa, la transición al Medio 3 puede realizarse al observarse la formación de estructuras de roseta, como, por ejemplo, las estructuras descritas en Panagiotakos *et al.*, "Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage.", *Genes Dev.* 2008 22(2):152-65. Como alternativa, la transición al Medio 3 puede realizarse poco después de la detección de cualquier otro marcador molecular, fisiológico o morfológico de especificación a células progenitoras retinianas o diferenciación temprana a campo ocular. La teoría es que, durante el cultivo en el Medio 3, las células cultivadas sufren especificación a EPR.

A continuación, se cambia el medio presente en el recipiente de cultivo por Medio 4. La transición al Medio 4 puede tener lugar desde tan temprano como en el Día 5, hasta tan tardíamente como en el Día 8. En una realización preferida, la transición al Medio 4 se realiza el Día 6 o en torno al Día 4. Como alternativa, la transición al Medio 3 puede realizarse al observarse una disminución sustancial de la expresión de *Mitf*, o al detectarse la expresión de cualquier marcador asociado al EPR, como, por ejemplo, tirosinasa (*TYR*), proteína melanocítica PMEL 17 (*SILV*), proteína celular de unión al retinaldehído (*CRALBP*), *Tryp1*, *Tryp2*, o bestrofina. Como alternativa, la transición al Medio 3 puede realizarse al observarse aplanamiento de las estructuras de roseta, con formación de láminas de células EPR inmaduras.

Tras la transición al Medio 4, pueden mantenerse en el Medio 4 las células en diferenciación y, preferiblemente, cambiarse el medio en días alternos.

La programación en el tiempo de las transiciones a los medios se retrasará si no se usa nicotinamida o un mimético de la nicotinamida en el Medio 1 y/o en el Medio 2. Sin nicotinamida (o sin un mimético de la nicotinamida), la transición de Medio 1 a Medio 2 debería producirse en el Día 4 o en torno al Día 4; la transición a Medio 3 debería tener lugar en el Día 8 o en torno al Día 8, y la transición a Medio 4, en el Día 12 o en torno al Día 12.

Los expertos en la técnica comprenderán que la invención no se limita a las composiciones concretas del Medio 1, Medio 2, Medio 3 o Medio 4, y que la invención engloba el uso de los diversos constituyentes de los medios (y sus miméticos y/o equivalentes), solos o en combinación con otros aditivos de medios. Por ejemplo, un medio para la diferenciación de células pluripotentes puede comprender cada uno de los siguientes aditivos, de manera unitaria o combinados: nogina, DKK1, IGF1, BFGF, nicotinamida, SU5402, VIP o Activina A.

En una realización, la invención comprende el uso de un medio basal para el cultivo de células pluripotentes o de células en diferenciación a células EPR, y dicho medio basal puede opcionalmente suplementarse con una concentración biológicamente activa de nogina y/o nicotinamida, y dicho medio basal no contiene una concentración biológicamente activa de Activina A. En diversos puntos en el tiempo (por ejemplo, a diario), se observa si hay expresión de uno o más de los siguientes marcadores moleculares en las células cultivadas: Pax6, Rax, Lhx2, Six3, *Mitf*, y *Chx10*. Tras observarse un incremento notable (por ejemplo, de por 10) en la expresión de cualquiera de los marcadores de células progenitoras retinianas Pax6, Rax, Lhx2 o Six3, o 0-24 horas tras observarse por primera vez la expresión de *Mitf* o de *Chx10* en las células cultivadas, dichas células cultivadas se cultivan, de ahí en adelante, en un medio que no contiene ni nogina ni nicotinamida, y que, opcionalmente, contiene una concentración biológicamente activa de Activina A. Como alternativa, la exclusión de nogina y/o de nicotinamida o la inclusión de Activina A puede realizarse al observarse que se forman estructuras de roseta.

En otra realización, las células pluripotentes o células pluripotentes en diferenciación a células EPR se cultivan en un medio que no contiene una concentración biológicamente activa de BFGF. En diversos puntos en el tiempo (por ejemplo, a diario), se observa si hay expresión de uno o más de los siguientes marcadores moleculares en las células cultivadas: Pax6, Rax, Lhx2, y Six3. Tras la primera expresión detectable de cualquiera de uno o más de los marcadores Pax6, Rax, Lhx2, o Six3, se cambian las células cultivadas a un medio que contiene una concentración biológicamente activa de BFGF.

En otra realización, la invención comprende el uso de un medio basal para el cultivo de células pluripotentes en diferenciación a células EPR, y dicho medio basal puede opcionalmente suplementarse con una concentración biológicamente activa de DKK1 y/o IGF1, y dicho medio basal no contiene una concentración biológicamente activa de SU5402 o VIP. En diversos puntos en el tiempo (por ejemplo, a diario), se observa si hay expresión de uno o más de los siguientes marcadores moleculares en las células cultivadas: *Mitf*, *TYR*, PMEL17, *CRALBP*, *Tryp1*, *Tryp2* o bestrofina. Tras observarse una disminución sustancial en la expresión de *Mitf*, o tras detectarse la expresión de *TYR*, PMEL 17, *CRALBP*, *Tryp1*, *Tryp2*, o bestrofina, se transicionan las células cultivadas a un medio que no contiene una concentración biológicamente activa de DKK1 o de IGF1, y que, opcionalmente, contiene una concentración biológicamente activa de SU5402 y/o de VIP. Como alternativa, la exclusión de DKK1 y/o de IGF1 o la inclusión de SU5402 y/o de VIP puede realizarse al observarse el aplanamiento de las estructuras de roseta, con formación de láminas de células EPR inmaduras.

En el protocolo preferido (con nicotinamida o un mimético de la nicotinamida tanto en el Medio 1 como en el Medio 2), para en torno al Día 10 se pueden apreciar láminas de células EPR inmaduras, que comprenden células planas con morfología de "guijarros", es decir, un mosaico, integrado por una lámina plana de sola capa celular, de células poligonales y hexagonales que es característico de las células EPR nativas. La morfología tipo EPR se vuelve

bastante aparente para en torno al Día 14. En general, en algún momento entre el Día 9 y el Día 16 aparece una pigmentación visible.

5 En cualquier momento posterior al Día 10, puede utilizarse el medio X-Vivo™ 10 (Lonza). Puede utilizarse X-Vivo 10 para la maduración continuada de las células EPR, y para la expansión y/o el mantenimiento de las células EPR diferenciadas.

10 Antes de aproximadamente el Día 14, habitualmente la mayoría de las células (>75%) tendrán la morfología de "guijarros" característica de las células EPR, y será observable una pigmentación ligera en algunas de dichas células o en la mayoría de ellas. Los medios utilizados en la invención parecen ser directores y selectivos del EPR. En momentos tempranos del proceso de diferenciación pueden ser visibles células que no tienen una morfología tipo EPR, pero, habitualmente, llegado el Día 28 o antes, mueren. La pigmentación de las células EPR en maduración seguirá intensificándose a lo largo del tiempo y, generalmente, dicha pigmentación alcanza un máximo desde en torno al Día 30 en adelante.

15 La maduración de las células EPR tiene lugar a lo largo de un período continuo de madurez creciente. La mejor manera de describir las células pigmentadas ligeramente o las células con morfología de guijarros es "células EPR inmaduras". A medida que las células maduran a lo largo del tiempo, su pigmentación aumenta. La maduración puede también determinarse por los cambios en la expresión génica que van teniendo lugar a lo largo del tiempo, y la aparición de expresión de los marcadores del EPR, o el aumento en los niveles de dicha expresión, como es conocido en este campo, indica un fenotipo más maduro. Además, la maduración puede determinarse mediante ensayos funcionales, como ya se sabe en este campo del conocimiento. Para los objetivos de esta especificación, la maduración puede determinarse por la pigmentación, la expresión de marcadores moleculares, o mediante ensayos funcionales.

20 La madurez del EPR puede determinarse por la presencia de marcadores genéticos asociados con el fenotipo funcional EPR, como, por ejemplo, MitF, tirosinasa, Tyrp1, Tyrp2, Best1, CRALBP y RPE65.

30 Como alternativa, la madurez de las células EPR puede determinarse mediante ensayos funcionales. Por ejemplo, en la función normal de las células EPR, las células EPR fagocitan los segmentos externos desprendidos de los bastones (ROS, por sus siglas en inglés), lo que impide la acumulación de dichos segmentos desprendidos. La capacidad para fagocitar los ROS es indicativa de un EPR funcional. Son conocidos en este campo algunos ensayos para medir la capacidad de las células EPR putativas cultivadas de fagocitar los ROS; por ejemplo, como se describe detalladamente en Haruta *et al.*, "In Vitro and In Vivo Characterization of Pigment Epithelial Cells Differentiated from Primate Embryonic Stem Cells", IVOS 45:1020-1045 (2004), y en Carr *et al.*, "Molecular characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay", Mol. Vis. 15: 283-295 (2009). Además, se sabe que el EPR maduro convierte eficientemente el transretinol a 11-cisretinol. En este campo del conocimiento se conocen ensayos en los que se determina la capacidad de conversión de transretinol a 11-cisretinol. Son ensayos adicionales para determinar la madurez los ensayos de determinación de la secreción polarizada de factores del crecimiento y la creación, por parte de las uniones estrechas, de una barrera eléctrica, como se describe en Vaajasaari *et al.*, Mol. Vis. 2011, "Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells".

45 La madurez y la pigmentación se aceleran mediante el uso de VIP en el medio de cultivo de mantenimiento (por ejemplo, Medio 4, o un medio de mantenimiento al que se transfieran las células después del Medio 4), como, por ejemplo, a una concentración de 0,1 a 100 µM, y una concentración preferida de 1 µM. Los cultivos sin VIP tienden a aumentar su pigmentación y a alcanzar la madurez a una velocidad menor.

50 Puede promoverse la pigmentación cambiando el medio a medio X-Vivo 10 (Lonza Biosciences) después del Día 12, aproximadamente. Para el Día 30, aproximadamente, en los cultivos cambiados al medio X-Vivo 10 se observará una pigmentación oscura generalizada. No obstante, cambiar a dicho medio puede ocasionar una proliferación de células que no son del tipo EPR: el porcentaje de células del tipo EPR se reduce al 50% (aproximadamente) del área del recipiente de cultivo.

55 Reemplacado, expansión y maduración de las células EPR. En cualquier momento posterior al Día 10, se pueden transferir las células EPR a un sustrato nuevo, para la expansión de los cultivos o para enriquecer en EPR los cultivos. Por ejemplo, se pueden enriquecer los cultivos de células EPR mediante retirada mecánica de las células no-EPR, por ejemplo, mediante punta de pipeta, y a continuación, reemplacarse las células EPR en maduración sobre sustrato fresco, como se describe a continuación.

60 En una realización, las láminas de EPR pueden tratarse ligeramente con proteasa, y fragmentarse en trozos pequeños. Por ejemplo, pueden utilizarse proteasas tales como dispasa o colagenasa. Por ejemplo, se añade al recipiente de cultivo dispasa a una concentración de 1,5 U/ml; por ejemplo, 1 ml por pocillo en placas de seis pocillos estándar (diámetro de pocillo = 9,5 cm²). Las láminas de EPR empezarán a disociarse del sustrato después de unos 5 minutos a 37 °C. A continuación, dichas láminas, de monocapa celular, se aspiran usando una pipeta de 5 ml y se

trituran con suavidad a fin de disociar las células, que forman secciones pequeñas que, entonces, se colocan sobre sustrato fresco. Las secciones reemplacadas de monocapa se pueden emplacar a cualquier densidad: por ejemplo, al 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o una cobertura mayor del sustrato nuevo. Una densidad preferida está en torno al 50% de cobertura del sustrato nuevo. Normalmente, las secciones de monocapas de EPR reemplacadas mantendrán su estado diferenciado en la parte central, crecerán hasta la confluencia a partir de los bordes, y seguirán madurando hacia mayores niveles de pigmentación.

Como alternativa, las monocapas de células EPR en maduración pueden disociarse a células sueltas mediante tratamiento con una proteasa u otro agente disociador. En un ejemplo de realización se utiliza la proteasa TrypLE, a la concentración en que es suministrada por Life Technologies; por ejemplo, añadiendo 1 ml de la solución de proteasa por pocillo a una placa de seis pocillos estándar (diámetro de pocillo = 9,5 cm²). Se expone las células a la proteasa durante 5 minutos a 37 °C, se trituran de manera que se obtienen células sueltas usando un dispositivo Pipetman™ P1000, se aspiran del recipiente de cultivo, se lavan en tampón PBS, se centrifugan, y se resuspenden en medio.

Puede cuantificarse la concentración, en las suspensiones, de las células EPR sueltas disociadas, mediante cualquier método; entre otros, usando contadores de células, hematocítopos, y otros métodos de cuantificación de células conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse un contador de células con un diámetro de apertura establecido en un valor de entre 6 y 20 µm. A continuación, pueden reemplacarse las células sueltas a cualquier densidad que se desee. Por ejemplo, para la expansión de las células, pueden reemplacarse éstas a una densidad de en torno a 2,5 x 10⁴ células/cm² y transferirse estas células cuando se alcanza un 90% de confluencia. Para la maduración, se puede sembrar las células a una densidad de en torno a 1 x 10⁵ células/cm².

Se puede hacer crecer a las células reemplacadas sobre cualquier combinación adecuada de sustrato y medio conocida para el mantenimiento de los cultivos de EPR. Por ejemplo, se puede suplementar el medio basal de las células con FBS o B27, X-Vivo 10, o cualquier otro medio compatible conocido en este campo. Otros ejemplos de medios para el crecimiento y cultivo de células EPR se describen en Maminishkis *et al.*, "Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue.", Invest Ophthalmol Vis Sci. (2006); en Gamm *et al.*, "A novel serum-free method for culturing human prenatal retinal pigment epithelial cells.", Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; en Ahmado *et al.*, "Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19.", Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; y en Hu y Bok., "A cell culture medium that supports the differentiation of human retinal pigment epithelium into functionally polarized monolayers.", Mol. Vis. 2001.

Como alternativa, las células reemplacadas se pueden expandir y mantener en un nuevo medio de proliferación desarrollado por los inventores de la presente especificación ("Medio de proliferación para EPR"). El Medio de proliferación para EPR se puede usar para la proliferación, el mantenimiento o la expansión de células EPR obtenidas de cualquier fuente, como, por ejemplo, las células EPR obtenidas mediante los protocolos que se describen en el presente, las células EPR obtenidas mediante otros protocolos de producción de EPR conocidos en este campo, o las células EPR nativas aisladas de retinas (por ejemplo, de tejidos oculares fetales o adultos). Durante la proliferación, las células EPR que se cultivan en medio que contiene suero fetal bovino tienden a sufrir una transición de células tipo epitelial a células tipo mesenquimal, y tras varias transferencias, son incapaces de volver a adoptar la morfología EPR. Se ha descubierto, como ventaja, que el uso de un medio sin suero, para la proliferación de EPR, no ocasiona esa transición no deseada. El nuevo Medio de proliferación para EPR se compone de un medio basal como, por ejemplo, Medio de Dulbecco modificado por Iscove (conocido en este campo), suplementado con uno o más de los siguientes compuestos: insulina, por ejemplo a unos 1-100 µg/ml; holo-transferrina, por ejemplo a unos 1-10 µg/ml; selenio, por ejemplo a unos 0,001-0,3 µg/ml; albúmina, por ejemplo a unos 4 µg/ml - 10 µg/ml; y Concentrado de lípidos químicamente definidos ("Chemically Defined Lipid Concentrate", de Life Technologies), presente, por ejemplo, a una dilución de en torno a 1:100 - 1:2000.

El selenio puede omitirse. Si hay selenio ya presente en el medio basal, debe tenerse en cuenta dicho selenio ya presente a la hora de determinar la cantidad de selenio que se puede añadir al medio. Por ejemplo, si ya hay selenio presente en el medio IMDM a una concentración de en torno a 0,17 µg/ml, pueden añadirse cantidades suplementarias de selenio de 0,001 - 0,1, además del selenio ya presente en ese medio. En lugar del Concentrado de lípidos químicamente definidos de Life Technologies, pueden utilizarse ácido linoleico y colesterol, por ejemplo a una concentración de en torno a 10 µg/ml y 4-500 µg/ml, respectivamente. Los expertos en la técnica comprenderán que el medio y los suplementos arriba citados pueden sustituirse por otros medios basales y/o suplementos biológicamente equivalentes.

El EPR desarrollado en el Medio de proliferación para EPR antes descrito tiende a crecer en forma de racimos clonales y a mantener una morfología más de tipo EPR durante la proliferación, mientras que las células EPR que se hacen crecer en un medio que contiene suero adoptan una morfología fibroblástica alargada y no crecen en contacto entre sí.

En una versión preferida del Medio de proliferación para EPR, se suplementa un medio basal (por ejemplo, IMDM) con lo siguiente: insulina, a unos 10 µg/ml; holo-transferrina, a unos 5,5 µg/ml; selenio, a unos 0,18 µg/ml (0,0067

µg/ml si se añade al IMDM); albúmina, a unos 4 µg/ml; y Concentrado de lípidos químicamente definidos (de Life Technologies), presente a una dilución de en torno a 1:1000.

Maduración de las células EPR cultivadas.

5 Los inventores de la presente especificación han desarrollado un nuevo medio de maduración del EPR ("Medio de maduración para EPR"), para una maduración eficiente y óptima. El Medio de maduración para EPR se compone de un medio basal (por ejemplo, Medio de Dulbecco modificado por Iscove), suplementado con B27 (por ejemplo, como se describe en Brewer *et al.*, "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination", *Neurosci. Res.* 35: 567-576 (1993)) o, por ejemplo, con el suplemento 50X B27 de Life Technologies a una dilución de 1:50, y también, opcionalmente, suplementado con taurina, por ejemplo, a una concentración de 1-500 µg/ml, y con una concentración preferida de 250 µg/ml. En lugar del B27, puede utilizarse una combinación de progesterona (por ejemplo, a 2 µM), Vitamina A (por ejemplo, a 0,5 µM) y triyodotironina (por ejemplo, a 10 nM).

15 El nuevo Medio de maduración para EPR se utiliza de la siguiente manera. Las células EPR que crecen en el Medio de proliferación para EPR se mantienen sobre el mismo sustrato hasta una semana después de alcanzarse la confluencia, en cuyo momento el Medio de proliferación para EPR se sustituye por el Medio de maduración para EPR. Dentro de un plazo de 2-3 semanas tras el cambio de medio, las células EPR se vuelven maduras con una frecuencia alta, con la madurez descrita y ensayada como antes se ha descrito en el presente. Tanto la velocidad de maduración, como el porcentaje de células que se vuelven maduras, aumentan significativamente mediante el uso de este medio, en comparación con las células EPR que se siguen cultivando en el Medio de proliferación para EPR.

25 Inhibidores de la ROCK. Los inventores de la presente especificación han descubierto, como ventaja, que en el cultivo de células EPR en proliferación pueden utilizarse, opcionalmente, medios suplementados con un inhibidor de la quinasa asociada a Rho (ROCK, por las siglas de ésta en inglés). El uso de inhibidor de la ROCK puede emplearse de manera ventajosa en el mantenimiento, la expansión y la maduración de las células EPR obtenidas de cualquier fuente, como, por ejemplo, obtenidas a partir de células pluripotentes o células EPR nativas aisladas de retinas, como, por ejemplo, de los ojos de pacientes, donantes u otras fuentes (por ejemplo, de tejidos oculares fetales o adultos).

35 Entre los ejemplos de inhibidores de la ROCK figuran los siguientes: Y-27632, tiazovivina, GSK429286A, y fasudilo. El Y-27632 puede usarse a una concentración comprendida entre 500 nM y 50 µM. El Y-27632 es un inhibidor selectivo de la quinasa asociada a Rho, p160ROCK y ROCK-II, con un valor de la $K_i = 140$ nm. Además, el Y-27632 inhibe la PKC, la proteína quinasa dependiente de AMPc, y la quinasa de la cadena ligera de la miosina, aunque con valores de K_i mucho menores: 26, 25 y >250 µM, respectivamente.

40 Se pueden utilizar inhibidores de la ROCK en la maduración, el mantenimiento, la expansión o la proliferación de las células EPR, mediante inclusión de una cantidad fisiológicamente eficaz de inhibidor de la ROCK como suplemento en cualquier medio conocido para el mantenimiento, la proliferación y la maduración de las células EPR. Por ejemplo, el Y27632 puede usarse a una concentración comprendida entre unos 500 nM y 50 µM. El uso de inhibidores de la ROCK permite reemplazar las células EPR de modo que retengan su fenotipo EPR durante un número mayor de transferencias y expansiones que las células reemplacadas en medios sin inhibidores de la ROCK. Por ejemplo, en el protocolo descrito en el presente, el uso de medios suplementados con inhibidores de la ROCK, para células reemplacadas entre el Día 10 y aproximadamente el Día 20, incrementa sustancialmente la supervivencia y la viabilidad de las células. Cuando las células EPR se disocian en forma de células sueltas, a menudo pierden muchas de sus características tipo EPR cuando posteriormente se las siembra y hace proliferar sobre sustratos nuevos. El cultivo de células sueltas sembradas en medio suplementado con un inhibidor de la ROCK mejora tanto su supervivencia como su expansión. La inclusión de un inhibidor de la ROCK durante las transferencias en serie del EPR posibilita una expansión mucho mayor de las células que las transferencias en serie sin inhibidor de la ROCK. Por ejemplo, las células cultivadas en X-VIVO™10, emplacadas a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm² y transferidas cuando dichas células alcanzan un 90% de confluencia aproximadamente, pueden transferirse más de 14 veces cuando se incluye un inhibidor de la ROCK. Si no se incluye un inhibidor de la ROCK, los cultivos dejan de dividirse en la transferencia 4-7. En los casos en los que se desea la rediferenciación, puede retirarse el inhibidor de la ROCK del medio; por ejemplo, cuando se alcanza la confluencia. De ahí en adelante, normalmente las células se rediferenciarán a células EPR maduras dentro de un plazo de dos a cuatro semanas. Con anterioridad se han utilizado inhibidores de la ROCK para la supervivencia y la expansión de células madre embrionarias humanas (hESC, por sus siglas en inglés), células endoteliales de la córnea, queratinocitos y otras células epiteliales, por ejemplo como se describe en Watanabe *et al.*, "A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells.", *Nat. Biotechnol.* 25:681-686 (2007), y en Okumura *et al.*, "The new therapeutic concept of using a Rho kinase inhibitor for the treatment of corneal endothelial dysfunction.", *Cornea* 30 (Suppl 1):S54-S59 (2011), pero no se han utilizado, con anterioridad, de la manera que aquí se presenta.

65 Como alternativa, en lugar de inhibidores de la ROCK pueden utilizarse inhibidores de la vía ROCK-miosina II. Por ejemplo, la blebistatina, un inhibidor de la cadena ligera de la miosina II, puede utilizarse a una concentración comprendida entre 1 µM y 100 µM. En una realización preferida, la blebistatina se usa a 10 µM.

En general, el EPR maduro producido mediante los métodos de la invención puede transferirse y expandirse hasta 14 veces (14 transferencias) mediante la inclusión de un inhibidor de la ROCK. A continuación, esas células pueden utilizarse con fines de investigación o para usos terapéuticos, o bien, pueden crioconservarse para uso posterior.

En algunas realizaciones, la invención comprende un método de uso del Medio 1, Medio 2, Medio 3 y Medio 4, en forma de secuencia, para promover la diferenciación rápida de EPR a partir de células pluripotentes. En otra realización, la invención comprende una composición concreta de medio como, por ejemplo, el Medio 1, Medio 2, Medio 3, Medio 4, el Medio de maduración para EPR, o el Medio de proliferación para EPR. También se presentan, en esta invención, kits que son combinaciones de los medios arriba enumerados. Por ejemplo, se presenta un kit compuesto de Medio 1, Medio 2, Medio 3 y Medio 4. Además, se presentan kits de suplementos de medios, compuestos de los aditivos de medio para un medio específico como, por ejemplo, los aditivos que se combinan con un medio basal para formar el Medio 1, Medio 2, Medio 3, Medio 4, el Medio de maduración para EPR, o el Medio de proliferación para EPR.

Por ejemplo, el kit de suplementos de medios para el Medio 1 comprendería DKK1, nogina, IGF1 y, opcionalmente, nicotinamida. Los kits de suplementos de medios podrían adoptar la forma de una solución única que contenga todos los aditivos de un medio dado, o bien, adoptar la forma de varios recipientes que contengan aditivos diferentes. En tales kits de suplementos de medios, los aditivos están presentes en cantidades tales que, cuando se añade una cantidad especificada del kit de aditivos de medios a un volumen especificado de medio basal, se forma una composición de medio eficaz (por ejemplo, de Medio 1, Medio 2, etc.).

EJEMPLO 1.

En este Ejemplo, se demuestra que los medios y métodos de la invención producen células EPR rápidamente. Se describe información adicional sobre los experimentos de este Ejemplo 1 en Buchholz *et al.*, "Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium", *Stem Cells Trans Med* 2(5): 384-393 (2013).

Cultivo de células madre pluripotentes

La línea de células madre pluripotentes inducida iPS(IMR90)-4 (IMR904) se mantuvo en DMEM/F12 que contenía 2 mM de GlutaMAX-I, 20% de sustitutivo de suero Knockout, 0,1 mM de MEM NEAA, 0,1 mM de beta-mercaptoetanol (Invitrogen) y 100 ng/ml de bFGF recombinante de pez cebra sobre una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios murinos tratados con mitomicina C (Sigma-Aldrich).

Diferenciación a epitelio pigmentado retiniano (EPR). Se transfirieron directamente las células madre pluripotentes a Matrigel (BD Biosciences) en DMEM/F12 con 1X B27, 1X N2, y 1X NEAA (Invitrogen). Desde el día 0 al 2, se añadieron 50 ng/ml de nogina, 10 ng/ml de Dkk1, y 10 ng/ml de IGF1 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, <http://www.rndsystems.com>), así como, en algunos experimentos, 10 mM de nicotinamida o 5 mM de 3-aminobenzamida (Sigma-Aldrich), al medio base. Desde el día 2 al 4, se añadieron 10 ng/ml de nogina, 10 ng/ml de Dkk1, 10 ng/ml de IGF1, y 5 ng/ml de bFGF, así como, en algunos experimentos, 10 mM de nicotinamida o 5 mM de 3-aminobenzamida, al medio base. Desde el día 4 al 6, se añadieron 10 ng/ml de Dkk1 y 10 ng/ml de IGF1, así como, en algunos experimentos, 100 ng/ml de Activina A (R&D Systems), al medio base. Desde el día 6 al 14, se añadieron 100 ng/ml de Activina A, 10 µM de SU5402 (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania, <http://www.emdmillipore.com>), y 1 mM de VIP (Sigma-Aldrich) al medio base. También se realizaron experimentos de control en el medio base (DMEM/F12, B27, N2, y NEAA) por sí solo.

Se enriquecieron mecánicamente las células mediante raspado, eliminándose las células que presentaban una morfología no EPR. A continuación, el EPR que quedó se dirigió usando TrypLE Express (Invitrogen) durante ~5 minutos a 37 °C. Se pasaron las células a través de un filtro de 30-µm para células sueltas y se sembraron esas células en membranas Transwell (Corning Enterprises, Corning, NY, <http://www.corning.com>) de plástico para cultivo tisular revestidas de Matrigel o portaobjetos con cámara, tratados con CC2. Las células enriquecidas se cultivaron en DMEM rico en glucosa con suero fetal bovino (FBS) al 1%, GlutaMAX, y piruvato sódico (Invitrogen) durante 30 días, como se describe en Ahmado A, Carr AJ, Vugler AA *et al.*, "Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19.", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7148-7159.

Se cultivaron células Hs27 y células EPR humanas fetales cultivadas sobre membranas Transwell revestidas de Matrigel en DMEM rico en glucosa con FBS al 1%, GlutaMAX, y piruvato sódico (Invitrogen). Se cultivaron células MeWo en DMEM/F12 GlutaMAX1 (Invitrogen) con suero fetal bovino al 10% (HyClone, Logan, UT, <http://www.hyclone.com>).

El ARN total resultante de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real de los genes marcadores del EPR se aisló usando cebadores basados en las secuencias de ARNm de dichos genes. Se llevaron a cabo métodos de QPCR con el kit "RNeasy Plus Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Alemania, <http://www.qiagen.com>). Se sintetizó ADNc a partir de 1 µg de ARN usando el kit de síntesis de ADNc "iScript cDNA

Synthesis Kit" (Bio-Rad, Hercules, CA, <http://www.bio-rad.com>). Se diseñaron pares de cebadores para crear un producto de 75-200 pares de bases (Beacon Design 4.0; Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, <http://www.premierbiosoft.com>). Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real en un sistema de detección para PCR en tiempo real monocolor "Bio-Rad MyIQ Single Color Real-Time PCR Detection System" usando el método del SYBR® Green (verde SYBR), como se describe en Woo TH, Patel BK, Cinco M *et al.*, "Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product.", *J Microbiol Methods* 1999;35:23-30. Se efectuaron reacciones de 20 µl por triplicado en una placa de 96 pocillos, usándose la mitad de la reacción de síntesis de ADNc por placa. La especificidad de los cebadores se confirmó mediante análisis de la temperatura de fusión, electroforesis en gel, y secuenciación directa (Iowa State DNA Facility, Ames, Iowa). Se normalizaron los datos a la media geométrica de los genes "housekeeping" (genes endógenos): gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), hidroximetilbilano sintasa (HMBS), y glucosafosfato isomerasa (GPI), como se describe en Radeke MJ, Peterson KE, Johnson LV *et al.*, "Disease susceptibility of the human macula: Differential gene transcription in the retinal pigmented epithelium/choroid.", *Exp Eye Res* 2007;85:366-380.

Inmunocitoquímica. Se hicieron crecer las células en placas de cultivo tisular de 12 pocillos revestidas de Matrigel (días 0-14) o se enriquecieron las células en portaobjetos con cámara revestidos de Matrigel y se las cultivó durante 1 mes. Para la fijación, se lavaron las placas y los portaobjetos con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón cacodilato sódico 0,1 M, pH 7,4, durante 15 minutos a 4 °C, y se conservaron en PBS a 4 °C hasta el marcado. Los portaobjetos se lavaron con PBS, bloquearon con PBS que contenía BSA al 5% y NP40 al 0,1% en PBS durante 1 hora a 4 °C, se trataron con metanol muy frío ("frío helado") al 90% durante 5 minutos, y se incubaron con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C. A continuación, los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor® (Invitrogen) adecuado (1:300) durante 30 minutos a 4 °C, se tiñeron con Hoechst (2 µg/ml) (Invitrogen) durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS, y luego se obtuvieron imágenes de los mismos a temperatura ambiente usando un microscopio de fluorescencia Olympus IX71 o un microscopio confocal Olympus Fluoview FV10i (Olympus, Center Valley, Pensilvania, <http://www.olympusamerica.com>).

Citometría de flujo. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvania, <http://www.emsdiasum.com/microscopy>) y se permeabilizaron con Triton X-100 (Roche, Indianapolis, Indiana, <http://www.roche.com>) al 0,2%. Las muestras se marcaron con anticuerpos primarios o isotipo de control durante 30 minutos a 4 °C. Los anticuerpos primarios o isotipo de control que no se conjugaron con fluoróforos se marcaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos durante 30 minutos a 4 °C. Las muestras marcadas se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6 con software de recolección CFlow (BD Biosciences). Se realizó un análisis de datos con el software "FCS Express 4 Flow Research Edition" (De Novo Software, Thornhill, Ontario, Canadá, <http://www.denovosoftware.com>). El porcentaje de positivos se basó en un nivel de fondo establecido en una expresión de positivos del 1% en muestras marcadas con anticuerpos isotipo de control.

Fagocitosis de los segmentos externos desprendidos de los bastones. Los ensayos de la fagocitosis de los segmentos externos desprendidos de los bastones (ROS, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo como se describió con anterioridad en Lin H, Clegg DO, "Integrin alphavbeta5 participates in the binding of photoreceptor rod outer segments during phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium.", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1703-1712. Se obtuvieron ojos bovinos frescos de Sierra Medical Inc. (Whittier, California, <http://www.sierra-medical.com>); se purificaron ROS de extractos de retina y se marcaron fluorescentemente dichos ROS usando el kit de marcado con fluoresceína 5-isotiocianato "FluoReporter FITC Protein Labeling Kit" (Invitrogen). Las células se sembraron por cuadruplicado en pocillos revestidos de gelatina en una placa de 96 pocillos, a una concentración de 25000-50000 células por pocillo, y se dejó que crecieran hasta la confluencia, durante 4 semanas. A continuación, las células se expusieron a 1×10^6 ROS marcados con fluoresceína isotiocianato por pocillo, con o sin 50 µg/ml de anticuerpos anti-αvβ5 (ab24694; Abcam, Cambridge, Reino Unido, <http://www.abcam.com>) o 50 µg/ml de control IgG1 (ab9404; Abcam) durante 5 horas a 37 °C en CO₂ al 5%. A continuación, se lavaron vigorosamente los pocillos cinco veces con PBS templado, a fin de eliminar los ROS no unidos. Para determinar el nivel de internalización de los ROS, se añadió un volumen igual de azul de tripano al 0,4% al PBS durante 10 minutos, a fin de amortiguar la fluorescencia extracelular. Se aspiró el azul de tripano, y se añadieron 40 µl de PBS al pocillo, a fin de evitar que las células se secasen. A continuación, en fotomicrografos de fluorescencia, se documentaron los ROS internalizados. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó mediante densitometría de píxeles, usando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) para el análisis de fotomicrografos. En cada ensayo, se promediaron fotomicrografos de tres pocillos para cada condición. Se normalizaron experimentos por separado a la línea celular ARPE-19 de control positivo (que se ensayó en cada experimento).

RESULTADOS

La nicotinamida acelera la diferenciación temprana del campo ocular. Puesto que se ha demostrado anteriormente que la nicotinamida incrementa la diferenciación de EPR a partir de células madre pluripotentes, como se describe en Idelson M, Alper R, Obolensky A *et al.*, "Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells.", *Cell Stem Cell* 2009;5:396-408, se sometió a prueba si la nicotinamida influye sobre

la diferenciación en fases tempranas del desarrollo del campo ocular. En este primer segmento de diferenciación, se diseccionan mecánicamente grupos de células de colonias de células madre pluripotentes, y se siembran dichos grupos de células sobre Matrigel, en presencia de IGF1, nogina y DKK1. El día 2, se añade bFGF. La adición de nicotinamida a IGF1, nogina, Dkk1 y bFGF redujo significativamente la expresión de los genes de pluripotencia Oct4 y Nanog en el día 4, en comparación con los controles. La expresión de los marcadores de fase temprana neural/fase temprana del campo ocular Lhx2 y Rax aumentó en presencia de nicotinamida en el día 4, en comparación con los controles; sin embargo, el incremento de Rax no fue significativo. Un hecho interesante es que la expresión de Pax6(-5a) fue similar en presencia de nicotinamida y en las condiciones de control. En presencia de nicotinamida, las células adoptaron con rapidez una morfología radial/de roseta, en comparación con las células de control, que seguían conteniendo un alto porcentaje de células con morfología indiferenciada. Las células de control se expandieron más rápidamente que las células en nicotinamida.

La nicotinamida puede tener muchos efectos sobre las células cultivadas, como, entre otros, la inhibición de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), que puede proteger a las células frente al estrés oxidativo. Para examinar el mecanismo de la diferenciación inducida por la nicotinamida, se sometió a prueba la capacidad de la 3-aminobenzamida, un inhibidor de la PARP, para ejercer los mismos efectos que la nicotinamida. La 3-aminobenzamida redujo los niveles de Oct4 y Nanog, en comparación con los controles en el día 4, pero no tanto como la nicotinamida. De manera similar, la 3-aminobenzamida aumentó significativamente los niveles de Lhx2 y Rax, en comparación con los controles en el día 4, pero no tanto como la nicotinamida. En conjunto, la 3-aminobenzamida fue capaz de ejercer en parte los mismos efectos que la nicotinamida.

La activina A, el SU5402 y el VIP dirigen las células del campo ocular temprano a células EPR. Después de la adquisición de los marcadores del campo ocular temprano llegado el día 4 (Fig. 1B), se intentó dirigir la célula a EPR en vez de a retina neural. Con ello en mente, se cesó la adición de nicotinamida (añadida los días 0-4), nogina (añadida los días 0-4), bFGF (añadido los días 2-4), IGF1 (añadido los días 0-6) y Dkk1 (añadida los días 0-6), y se sometió a prueba el efecto de la Activina A, el SU5402 y el VIP sobre la especificación de EPR.

La adición de Activina A en los días 4-10 tuvo escaso efecto sobre la expresión génica de Mitf, un marcador de la vesícula óptica y del EPR. La expresión de Rax, un marcador del campo ocular temprano y de la retina neural temprana, se vio reducida significativamente. La adición de SU5402 en los días 6-10 tuvo escaso efecto sobre la expresión de Mitf o Rax; sin embargo, en combinación con la Activina A, la expresión de Rax se redujo aún más. Se había demostrado, con anterioridad, que el VIP acelera la maduración del EPR primario cultivado, mediante incremento del AMPc intracelular y activación de pp60(c-src), como se describe en Koh SM., "VIP enhances the differentiation of retinal pigment epithelium in culture: From cAMP and pp60(c-src) to melanogenesis and development of fluid transport capacity.", *Prog Retin Eye Res* 2000;19:669 - 688. La adición de VIP en los días 6-10 incrementó significativamente la expresión de los genes marcadores del EPR Mitf, tirosinasa, y PEDF. De conformidad con las funciones de Mitf y de la tirosinasa en la síntesis de pigmento, la pigmentación aumentó en los cultivos que contenían VIP entre los días 10 y 14. Para el día 10, eran visibles láminas de células con morfología de guijarros y bordes definidos.

La diferenciación a EPR es muy eficiente. Tras 4 días más en cultivo con Activina A, SU5402 y VIP, los bordes de las láminas con morfología de guijarros se volvieron más definidos, y algunas células empezaron a pigmentarse. La inmunocitoquímica para la proteína melanosómica Pmel17 (sobre la que se deposita el pigmento melanina) marcó exclusivamente dichas láminas de células en pigmentación. El análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) mostró que, comparadas con las células diferenciadas en B27/N2 que sólo contenía medio basal (sin diferenciación mediante factores), las células que habían sido expuestas a factores de diferenciación a EPR (nicotinamida, IGF1, DKK1, nogina, bFGF, Activina A, SU5402 y VIP) mostraban niveles significativamente mayores de los genes marcadores del EPR Mitf, Tirosinasa, Tyrp2, PEDF, BEST1 y Pmel17. Mediante inmunocitoquímica adicional se observó expresión de Mitf exclusivamente en las láminas de células en pigmentación; se encontró Lhx2 y ZO1 tanto en las láminas en pigmentación como en las células no-EPR. Un hecho interesante es que, además de expresar Lhx2, algunas células no-EPR expresaron Oct4. Cuando se aislaron y se reemplacaron en condiciones de células madre pluripotentes esas células, no formaron colonias con la morfología indiferenciada típica de las células madre, y muchas de esas células parecían diferenciarse a neuronas.

Para determinar la eficiencia de la diferenciación, se efectuó citometría de flujo usando el anticuerpo anti-Pmel17, que es muy sensible y que, en la inmunocitoquímica, sólo marca láminas de células en pigmentación. Además, se examinó mediante citometría de flujo la pérdida del marcador de pluripotencia Oct4. Se descubrió que las células H9 de referencia podían ser diferenciadas a células Pmel17+ llegado el día 14 (día 14, o antes), con una eficiencia media del 78,5% ($\pm 1,2\%$, $n = 6$, H9-EPR). Este hecho era muy significativo, en comparación con las células H9 de referencia indiferenciadas ($12,8\% \pm 2,4\%$, $n = 3$, H9) o con las células diferenciadas únicamente en medio basal ($25,2\% \pm 1,6\%$, $n = 3$, sin diferenciación mediante factores). Se sometió a prueba el protocolo de diferenciación en dos líneas de células madre pluripotentes adicionales: la línea de células madre embrionarias UCSF4 y la línea de células madre pluripotentes inducidas IMR904. La línea UCSF4 produjo células Pmel17+ con una eficiencia similar a la de las células H9 de referencia ($79,8\% \pm 0,88\%$, $n = 3$, UCSF4-EPR), mientras que la línea IMR904 se mostró ligeramente menos eficiente ($63\% \pm 0,88\%$, $n = 3$, IMR904-EPR). El porcentaje de células Oct4+ fue inferior al 5% en todas las condiciones excepto en las células H9 de referencia indiferenciadas ($98,1\% \pm 0,6\%$, $n = 3$, H9).

El examen de los histogramas de citometría de flujo representativos revela los niveles de expresión en la población de Pmel17 y proteína Oct4 en el día 14. Se compararon las células H9-EPR de referencia diferenciadas en medio basal (sin diferenciación mediante factores), las células H9 de referencia indiferenciadas, la línea celular de melanocitos MeWo (un control positivo para Pmel17), y la línea de fibroblastos Hs27 (un control negativo tanto para Oct4 como para Pmel17). Un hecho interesante es que las células H9 de referencia indiferenciadas parecían expresar niveles bajos de Pmel17. Este hecho se corresponde con un descubrimiento realizado en nuestro propio laboratorio, y en otros laboratorios: que las células madre indiferenciadas expresan niveles bajos de dicho transcripto. Sólo se observó un nivel alto de expresión de la proteína Pmel17 en las células H9-EPR de referencia y en las células de control positivo MeWo (melanocitos).

Otro hecho interesante es que dejar las células en cultivo más allá del día 14 con Activina A, SU5402 y VIP, tuvo como consecuencia la muerte de las células no-EPR. Parece desprenderse de ello que las condiciones de cultivo son tanto directoras a EPR, como selectivas para EPR. Puesto que uno de los objetivos era determinar el periodo más breve en el que podían generarse cultivos homogéneos de EPR, la investigación se centró en el día 14 como el punto final de la diferenciación dirigida.

Los plazos de tiempo para proteína y ARNm revelan las fases del desarrollo del EPR. Con el fin de comprender mejor la naturaleza de nuestro protocolo de diferenciación, se analizó la expresión de proteína y de ARNm de un grupo de genes, a lo largo de 14 días de diferenciación. Como se esperaba, la expresión de los genes de pluripotencia y de las proteínas correspondientes (Oct4 y Nanog) disminuyó rápidamente a lo largo de los primeros 4 días. Como hecho interesante, la expresión de Oct4 y Nanog aumentó ligeramente entre los días 4 y 6; durante ese tiempo, se añadió Activina A al protocolo. Los marcadores de fase temprana neural/fase temprana del campo ocular (Lhx2, Pax6(-5a), Pax6(+5a), y Rax) se expresaron muy pronto (el día 2), y su expresión aumentó a lo largo del período de tiempo de 14 días, con la excepción de Rax. La expresión de Rax fue transitoria; aumentó a partir de los días 2-6 y luego disminuyó con rapidez entre los días 6 y 8. El día 6, se retiraron el IGF1 y la DKK1 del protocolo, y se añadieron SU5402 y VIP, lo que podría explicar la disminución de la expresión de Rax. Los genes marcadores del EPR se expresaron poco a continuación, en dos fases: entre los días 4 y 6 (Mitr, PEDF, y BEST1), y entre los días 6 y 8 (Pmel17, Tirosinasa, y Tyrp2). Un hecho interesante es que el ARNm y la proteína correspondientes a Otx2 se expresaron a niveles relativamente constantes a lo largo de la diferenciación.

Las células diferenciadas pueden enriquecerse el día 14 para formar cultivos homogéneos de EPR funcional. A fin de generar poblaciones más homogéneas de EPR, el día 14 se aislaron mediante medios mecánicos láminas fácilmente visibles, se disociaron para obtener células sueltas, y se reemplacaron éstas en un medio para EPR que se describe en Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ *et al.*, "Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells.", STEM CELLS 2009;27:2427-2434, en portaobjetos de plástico con cámara para cultivo tisular o soportes Transwell, revestidos de Matrigel. Sorprendentemente, el EPR enriquecido el día 14 fue sensible a la disociación a células sueltas en los medios probados, lo que tenía como consecuencia la muerte o senescencia celular. Puesto que se ha demostrado con anterioridad que el inhibidor Y27632 de la proteína-quinasa asociada a Rho (ROCK) es compatible con la disociación de células epiteliales, incluidas las células madre pluripotentes, a células sueltas, se sometió a prueba la capacidad de esta molécula pequeña para rescatar el EPR disociado. La adición de Y27632 a 10 μ M durante los primeros 3 días tras la transferencia facilitó la supervivencia y maduración del EPR.

Tras enriquecer el EPR el día 14, se dejó que las células se rediferenciasen durante 30 días, y luego se analizó la expresión génica y proteínica y la fagocitosis de los segmentos externos desprendidos de los bastones (ROS). Para analizar la expresión génica se cultivaron células hESC-EPR, EPR fetal humano cultivado (fRPE, por sus siglas en inglés), y fibroblastos Hs27 en soportes Transwell durante 30 días. El análisis mediante qPCR mostró niveles similares de expresión de todos los genes marcadores del EPR en las células hESC-EPR y fRPE. Las células Hs27 se utilizaron como control negativo para los genes específicos de EPR; no obstante, se detectó cierto nivel de expresión de Mitr, PEDF y BEST1 en dichas células Hs27. En comparación con las células H9 indiferenciadas, la expresión de Oct4 fue ~1000 veces menor en todas las demás líneas celulares.

La inmunocitoquímica de las células enriquecidas el día 14 y hechas crecer en los portaobjetos con cámara durante 30 días mostró poblaciones homogéneas de EPR, sobre la base de la expresión de Mitr, Otx2, Lhx2, ZO1, y Pmel17. La expresión de BEST 1 y RPE65, que son marcadores de EPR más maduro, fue heterogénea, lo que indica niveles variables de madurez en estos cultivos. La integrina α v estaba situada apicalmente, en comparación con la expresión nuclear de Otx2, lo que indica un tráfico de proteínas polarizado adecuado en estas células (Fig. 4B, recuadro en el panel integrina α v/Otx2). Aunque algunas células Oct4⁺ estaban presentes el día 14 de la diferenciación inicial, no se observaron células Oct4⁺ después del enriquecimiento y 30 días de cultivo.

Para determinar si estas células hESC-EPR eran funcionales, se sometió a prueba su capacidad para llevar a cabo la fagocitosis de ROS marcados fluorescentemente. En comparación con las células Hs27 (control negativo), las células hESC-EPR internalizaron una cantidad significativamente mayor de ROS. Dicha internalización se bloqueó mediante un anticuerpo anti-integrina α vB5, lo que indica que las células hESC-EPR y las células fRPE usan el mismo receptor para la fagocitosis de ROS. La fagocitosis de ROS por parte de las células hESC-EPR fue incluso

mayor que la de las células fRPE, aunque ambas líneas de EPR internalizaron una cantidad significativamente mayor de ROS que las células Hs27.

DISCUSIÓN. Estos resultados demuestran la generación de células EPR de gran calidad dentro de un plazo de 14 días, con producciones altas.

Se ha utilizado con anterioridad la nicotinamida para diferenciar células madre pluripotentes a EPR. Se demostró que la nicotinamida tenía un efecto antiapoptótico tras 2 semanas de diferenciación, en línea con otros estudios en los que se demostró protección neural por parte de la nicotinamida. Sobre la base de investigaciones previas, se sugirió que esta acción podría estar mediada por la inhibición de la poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP1), que se descubrió que regula la muerte celular tras la inducción neural de células hESC. En estos experimentos, la adición de nicotinamida a los factores inductores retinianos IGF1, DKK1, nogina y bFGF redujo la expresión de los genes de pluripotencia y, a la vez, aumentó la expresión de los genes neurales/de fase temprana del campo ocular en torno al día 4 (o antes). Puesto que se sabe que un protocolo con IGF1, DKK1, nogina y bFGF induce la expresión de Lhx2, Rax y Pax6, los cambios en la expresión de estos genes sugieren que la adición de nicotinamida acelera la diferenciación. Un hecho interesante es que no todos los genes neurales/de fase temprana del campo ocular fueron afectados por la nicotinamida. Aunque la expresión de Lhx2 y Rax aumentó con la adición de nicotinamida el día 4, la expresión de Pax6 fue ligeramente menor, aunque este cambio no fue significativo. De ello parece desprenderse que es posible que la nicotinamida no tenga un efecto sobre Pax6 y que puede actuar sobre un factor posterior.

En presencia de nicotinamida, se observaron menos células, lo que podría deberse a muerte celular o a una disminución de la proliferación. Se ha comunicado con anterioridad una disminución de la proliferación tras la exposición de células hESC a la nicotinamida. Aunque estos resultados sugieren que la nicotinamida desempeña una función no relacionada con la supervivencia celular, se sometió a prueba la función de la inhibición de la PARP1. Para examinar la función de la inhibición de la PARP1 en la diferenciación inducida por la nicotinamida, se sometió a prueba la capacidad de otro inhibidor de la PARP1, la 3-aminobenzamida, para inducir diferenciación. Se observó que la 3-aminobenzamida era capaz de ejercer, en parte, los mismos efectos que los observados con la nicotinamida.

Aunque queda por explicar el mecanismo exacto de la diferenciación neuronal inducida por nicotinamida, está claro que la nicotinamida puede potenciar la diferenciación, y dicha potenciación parece actuar, al menos en parte, mediante la inhibición de la PARP. Es posible que los efectos neuroprotectores/antiapoptóticos de la inhibición de la PARP desempeñen también una función. Se observó que la nicotinamida resultaba ser una herramienta útil para acelerar la diferenciación neural inicial, y que era posible que se pudiera aplicar a otros protocolos de diferenciación neural.

La adición de Activina A y del inhibidor del FGFR1 SU5402 tuvo como consecuencia únicamente ligeros incrementos de los genes del EPR, mientras que la expresión del marcador de fase temprana del campo ocular/de la retina neural Rax disminuyó significativamente para el día 10. Lo primero puede atribuirse a las potentes propiedades de inducción retiniana del IGF1, y lo segundo confirma las funciones que desempeñan la señalización de la Activina A y la señalización del FGF en las fases de vesícula óptica a copa óptica del desarrollo del ojo. Esto se observa en modelos tanto animales como de hESC, en los que la señalización de la Activina y la inhibición del FGF dirigen a las células progenitoras hacia EPR (Rax) en vez de hacia retina neural (Rax⁺). La adición de VIP incrementa significativamente la expresión de Mitf, Tirosinasa y PEDF, de conformidad con los resultados descubiertos en cultivos primarios de EPR. VIP ocasionó un aumento de la pigmentación en puntos temporales más tempranos.

Antes del día 14 de la diferenciación, se pueden ver claramente láminas de EPR con bordes definidos, que expresan varios genes marcadores y proteínas del EPR. Llegado ese momento, las células han empezado a pigmentarse. Un hecho interesante es que la velocidad de pigmentación parece estar correlacionada inversamente con la eficiencia de la diferenciación a EPR o con el tamaño de la lámina de EPR. Las láminas pequeñas (< 500 μm) tendieron a pigmentarse más deprisa que las láminas grandes (> 5 mm). Ello sugiere que es posible que las señales procedentes de las células no-EPR tengan un efecto positivo sobre la pigmentación.

La eficiencia de la generación de EPR a partir de células madre pluripotentes inducidas IMR904 (iPS) fue del 60%.

Las células que no expresaron la Pmel17 el día 14 de la diferenciación expresaron Oct4 y Lhx2. Cuando se aislaron el día 14 y volvieron a disponer en condiciones de células madre embrionarias, estas células no formaron colonias cuya morfología se pareciera a la morfología de las células madre embrionarias, y muchas parecían diferenciarse a neuronas. Parece que estas células pueden quedarse estancadas en un estado parcialmente diferenciado. Si se mantenían cultivos para diferenciación más de 14 días, estas células no-EPR empezaban a morir. Por lo tanto, se considera que el medio suplementado con Activina A, SU5402 y VIP dirige la diferenciación y selecciona células EPR, más que células no-EPR, lo que tiene como resultado poblaciones prácticamente homogéneas de EPR tras un plazo de 3 semanas.

El análisis de la expresión de genes y proteínas a lo largo del período de diferenciación de 14 días reveló varias tendencias interesantes. En primer lugar, como se esperaba, se expresaron primero los genes de fase temprana

neural y de fase temprana del campo ocular, y a continuación, se expresaron marcadores más tardíos de la vesícula óptica y del EPR. Un hecho interesante es que, aunque la expresión génica siguió la secuencia de desarrollo ya conocida, la transición de campo ocular temprano a vesícula óptica y EPR fue bastante rápida. Esto parece apuntar a que, durante el desarrollo normal, la capacidad de una célula para responder a indicadores de desarrollo puede preceder a esas señales por un margen de tiempo significativo, quizás para dar tiempo al crecimiento de los tejidos. Entre los días 4 y 6, se observó un ligero aumento en la expresión génica de Oct4 y Nanog. Probablemente ello se debiera a la adición de Activina A el día 4, dado que se ha demostrado que la señalización de la Activina A mantiene la pluripotencia. En línea con observaciones realizadas recientemente en células madre pluripotentes Rax-GFP que sufren morfogénesis ocular, se observó una expresión transitoria de Rax entre los días 2 y 8. Ello parecería corresponderse con la expresión en el campo ocular temprano, seguida de regulación a la baja (disminución de la expresión) en el EPR. Un hecho interesante es que Otx2, que se ha demostrado que es reprimido por Rax específicamente en el campo ocular temprano de *Xenopus*, mantuvo un nivel bastante constante de expresión de ARNm y de proteína a lo largo del período de 14 días. De hecho, la expresión de ARNm de Otx2 aumentó cuando la expresión de ARNm de Rax estaba en su nivel más alto. Estas observaciones, junto con los resultados de otros protocolos de diferenciación retiniana de células hESC, sugieren que Otx2 se expresa en el campo ocular temprano de los seres humanos. Como alternativa, se conocen dos isoformas de la proteína de Otx2 en los seres humanos, así como varios transcritos diferentes, que es posible que se regulen alternativamente. Estos experimentos no hacen distinción entre dichas isoformas. Existe también la posibilidad de que la expresión mantenida de Otx2 a lo largo de la diferenciación ocular sea un artefacto del cultivo celular, que posiblemente no tenga lugar *in vivo*.

Dado que se hicieron visibles láminas morfológicamente definidas de EPR entre los días 10 y 14 y, con la adición del inhibidor de la ROCK Y27632, a lo largo de los primeros pocos días de cultivo, el EPR podría enriquecerse en ambos puntos en el tiempo, y dicho EPR maduraría hasta EPR funcional al reemplazarlo. No obstante, en el día 10 los bordes de las láminas de EPR eran más difíciles de distinguir. Las estrechas uniones existentes entre las células no-EPR hicieron fácil retirar éstas en forma de láminas, arrastrando una punta de pipeta a lo largo de los bordes con el EPR.

Se ha utilizado satisfactoriamente la inhibición de la ROCK para mantener la supervivencia de las células hESC disociadas en forma de células sueltas, y también para aumentar la proliferación de determinados tipos de células epiteliales. Se ha esclarecido el mecanismo de la inhibición de la ROCK en células hESC, en las que la ROCK media la detección de la adhesión celular por E-cadherinas. Los cultivos primarios de EPR, cuando se disocian formándose células sueltas tras varias transferencias, pierden su capacidad para rediferenciarse a EPR maduro, y se vuelven fibroblásticos en cuanto a su morfología. Ello podría ser una respuesta a las heridas, para un epitelio que normalmente no existe como células sueltas, y es posible que sea similar al efecto que se observa tras la disociación a células sueltas el día 14 de la diferenciación. Aunque se desconoce el mecanismo, el enriquecimiento de las células EPR el día 14, en presencia de inhibidor de la ROCK, es capaz de generar poblaciones homogéneas que expresan los genes marcadores del EPR a niveles similares a los del EPR fetal humano cultivado, expresan las proteínas de EPR correctas, están polarizadas, y muestran fagocitosis, dependiente de integrina $\alpha\beta 5$, de los segmentos externos desprendidos de los bastones.

Las realizaciones aquí descritas se presentan con fines ilustrativos y no tienen un carácter limitativo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la diferenciación de células madre pluripotentes de mamífero a células de epitelio pigmentado retiniano, el cual comprende:
 - 5 el cultivo de células madre pluripotentes en un primer medio que comprende un medio basal suplementado con IGF1, DKK1 y nogina;
 - posteriormente, el cultivo de las células en un segundo medio que comprende un medio basal suplementado con IGF1, DKK1, nogina y BFGF;
 - posteriormente, el cultivo de las células en un tercer medio que comprende un medio basal suplementado con IGF1, DKK1 y Activina A; y
 - 10 posteriormente, el cultivo de las células en un cuarto medio que comprende un medio basal suplementado con Activina A y SU5402, obteniéndose así células de epitelio pigmentado retiniano.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el medio basal se selecciona de un grupo que consiste en: medio de cultivo de células de mamífero Medio Eagle modificado por Dulbecco, medio Ham F12, una mezcla 1:1 de medio de cultivo de células de mamífero Medio Eagle modificado por Dulbecco y F12, Medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio Neurobasal™, medio X- Vivo™ 10, Medio Mínimo Esencial de Eagle, medio Roswell Park Memorial Institute 1640 y medio MCDB.

3. El método de la reivindicación 1, en el que:
 - 20 la nogina está presente en el primer medio y en el segundo medio a una concentración comprendida entre 1 y 100 ng/ml;
 - IGF1 está presente en el primer medio, en el segundo medio y en el tercer medio a una concentración comprendida entre 1 y 100 ng/ml;
 - 25 DKK1 está presente en el primer medio, en el segundo medio y en el tercer medio a una concentración comprendida entre 1 y 50 ng/ml;
 - BFGF está presente en el segundo medio a una concentración comprendida entre 1 y 20 ng/ml;
 - la Activina A está presente en el tercer medio y en el cuarto medio a una concentración comprendida entre 10 y 200 ng/ml; y
 - 30 SU5402 está presente en el cuarto medio a una concentración comprendida entre 1 y 100 µM.

4. El método de la reivindicación 1, en el que hay nicotinamida presente en el primer medio, en el segundo medio, o tanto en el primer como en el segundo medio.

5. El método de la reivindicación 4, en el que la nicotinamida está presente a una concentración comprendida entre 1 y 100 mM.

6. El método de la reivindicación 1, en el que hay VIP presente en el cuarto medio.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el VIP está presente a una concentración comprendida entre 0,1 y 100 µM.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la transición se realiza del primer al segundo medio 24-72 horas tras el inicio del cultivo en el primer medio.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la transición se realiza del segundo al tercer medio 48-144 horas tras el inicio del cultivo en el primer medio.

10. El método de la reivindicación 1, en el que la transición se realiza del tercer al cuarto medio 60-192 horas tras el inicio del cultivo en el primer medio.