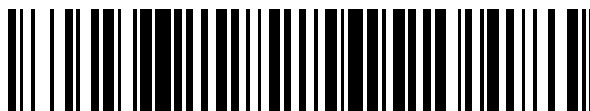


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 200**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/079 (2010.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 35/30 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2012** **PCT/US2012/068305**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013** **WO13086236**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012** **E 12856068 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** **EP 2788472**

54 Título: **Método de diferenciación dirigida que produce células endoteliales corneales**

30 Prioridad:

06.12.2011 US 201161567479 P

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

11.06.2019

73 Titular/es:

**ASTELLAS INSTITUTE FOR REGENERATIVE
MEDICINE (100.0%)
33 Locke Drive
Marlborough, MA 01752, US**

72 Inventor/es:

**MCCABE, KATHRYN, L.;
LU, SHI-JIANG y
LANZA, ROBERT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 200 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de diferenciación dirigida que produce células endoteliales corneales

Campo

- 5 Esta descripción se refiere, en general, a métodos para la diferenciación dirigida de células corneales a partir de células madre. También se describen composiciones de células endoteliales corneales, que incluyen composiciones farmacéuticas y sus usos. También se ofrecen ejemplos de terapias basadas en células para el tratamiento de trastornos visuales, que incluyen trastornos de la córnea.

Antecedentes

- 10 La córnea desempeña funciones fundamentales para la visión normal y el mantenimiento de la salud ocular, que incluyen proporcionar aproximadamente dos terceras partes de la potencia óptica del ojo y proteger al ojo de lesiones o infecciones. Las enfermedades y lesiones corneales son una causa principal de ceguera a nivel mundial. Muchas enfermedades y lesiones corneales pueden tratarse mediante el trasplante de córneas de donante. La córnea es el órgano más trasplantado del cuerpo y tiene una alta tasa de éxito de más de 15 años. Por ejemplo, se realizan aproximadamente 40.000 trasplantes de córnea anuales en EE. UU. Sin embargo, la demanda de córneas para el trasplante es muchísimo mayor que el actual suministro mundial, y la calidad y cantidad limitada de tejidos de donantes disponibles dificulta el tratamiento. Un factor que contribuye a un suministro inadecuado de córneas donadas consiste en que hasta 30% de las córneas donadas son rechazadas para el trasplante debido a la baja calidad del endotelio corneal. La calidad del endotelio corneal en general disminuye al aumentar la edad del donante, puesto que a medida que la córnea envejece o resulta lesionada, las células endoteliales mueren y no son reemplazadas. Por tanto, a medida que la población envejece, el suministro de tejido de donante que presente un endotelio corneal sano adecuado disminuye. Además, se espera que disminuya el número y la calidad de las córneas donadas a medida que aumenta la popularidad de la cirugía LASIK (estas córneas son rechazadas para el trasplante).

- 25 Las enfermedades de la córnea pueden implicar a una o más de las cinco capas de la córnea: el epitelio corneal, la capa de Bowman, el estroma corneal, la membrana de Descemet, y el endotelio corneal. El epitelio corneal, el estroma corneal y el endotelio corneal son capas celulares, mientras que la capa de Bowman y la membrana de Descemet están compuestas principalmente de fibrillas de colágeno. El epitelio corneal es una única capa de células sobre la superficie interna de la córnea. Se encuentra enfrentada a la cámara formada entre la córnea y el iris y mantiene a la córnea transparente mediante la regulación de los niveles de fluidos. Sin un endotelio corneal funcional, la córnea se vuelve turbia y se pierde la visión. Las células endoteliales corneales que funcionan de modo apropiado mantienen los niveles adecuados de fluidos en la córnea, por ejemplo, el equilibrio entre la "filtración" de fluido hacia el estroma y el bombeo activo que actúa continuamente para mover fluidos desde el estroma hacia la cámara anterior del ojo.

- 35 Se ha indicado que las células endoteliales corneales tienen poca o ninguna capacidad de proliferar *in vivo*, de modo que no son reemplazadas cuando se lesionan o se pierden de otro modo. En los seres humanos, la capa de células endoteliales corneales está más densamente compactada en el momento del nacimiento y después disminuye rápidamente a medida que crecen los ojos (que se refleja en que el mismo número de células cubre un área mayor). Después la densidad de células corneales disminuye gradualmente con la edad, lo cual refleja aparentemente la pérdida gradual de células que no son reemplazadas. A medida que disminuye la densidad celular, cada célula se expande y cubre un área mayor para mantener las funciones de barrera y de bomba de la capa de células. Sin embargo, cuando la densidad celular disminuye hasta un nivel demasiado bajo (menor que aproximadamente 500 a 1000 células/mm²), su función se ve comprometida, dando como resultado un enturbiamiento corneal, edema estromático, pérdida de agudeza visual y ceguera como resultado final. De modo específico, se ha indicado que la densidad celular del endotelio corneal muy compactado *in vivo* es tan alta como de 5624 células/mm² en niños de dos meses de edad, disminuyendo hasta 4252 células/mm² en el primer año desde el nacimiento, y posteriormente disminuyendo con rapidez durante la primera infancia (lo cual está asociado con el aumento en el tamaño corneal a medida que crecen los ojos). A los 5 años de edad, la densidad del endotelio corneal disminuye hasta aproximadamente 3591 más o menos 399 células/mm², y disminuye aún más hasta aproximadamente 2697 más o menos 246 células/mm² a los 10 años de edad, y disminuye aún más en aproximadamente 0,6% anual a lo largo de la vida adulta. Véase Peh *et al.*, Transplantation, 2011, 27 de abril, 91(8):811-9.

- 50 Las principales enfermedades que afectan al endotelio corneal incluyen la distrofia de Fuch, el síndrome endotelial iridocorneal, la distrofia polimorfa posterior, y la distrofia endotelial hereditaria congénita. Las enfermedades secundarias para las cuales el tratamiento más eficaz consiste en el reemplazo del endotelio corneal incluyen varias distrofias corneales, el uso de lentillas, la cirugía de cataratas y el fracaso endotelial tardío en el trasplante de córnea. Cuando solo está comprometido el endotelio corneal, el tratamiento preferido es el pelado de la membrana de Descemet con queratoplastia endotelial ("Descemet's stripping with endothelial keratoplasty", DSEK), que incluye la retirada de la membrana de Descemet y el endotelio corneal, y el posterior trasplante de tejido de donante. Como alternativa, en la queratoplastia penetrante ("penetrating keratoplasty", PKP) se retira la córnea completa y se reemplaza.

- 60 En general, el trasplante corneal incluye obtener una córnea de donante (por ejemplo, a partir de una donación anatómica post-mortem), determinar si la córnea del donante tiene la calidad suficiente y, por lo demás, es adecuada para su uso, y la sustitución quirúrgica de la córnea lesionada o enferma. Se han desarrollado procedimientos para

reemplazar la córnea completa (queratoplastia penetrante) o mantener la membrana de Descemet y el endotelio del paciente y reemplazar el resto de las capas por tejido de donante (queratoplastia laminar); este último procedimiento puede disminuir el riesgo de rechazo de trasplante, pero también puede provocar una menor agudeza visual después del trasplante. Además, la queratoplastia laminar puede no resultar adecuada para el tratamiento de algunos trastornos para los cuales el reemplazo del endotelio corneal y/o la membrana de Descemet del paciente puedan ser el tratamiento indicado. Véase, en general, la patente de EE. UU. n.º 5.755.785, la patente de EE. UU. n.º 5.649.944, la patente de EE. UU. n.º 7.147.648, la patente de EE. UU. n.º 7.300.653, la patente de EE. UU. n.º 5.584.881, la patente de EE. UU. n.º 5.686.414, la patente de EE. UU. n.º 7.300.654, la solicitud de patente de EE. UU. 10525391. Están desarrollándose otros métodos de reemplazo quirúrgico de endotelio corneal, que incluyen la queratoplastia endotelial de la membrana de Descemet ("Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty", DMEK), en la que el tejido de donante consiste solo en membrana de Descemet y endotelio corneal. Otra vía terapéutica potencialmente prometedora es la reconstrucción endotelial corneal, en la que se cultivan células endoteliales corneales *in vitro* antes del trasplante. Por ejemplo, se cultivaron células corneales humanas donadas sobre un polímero, se liberaron sobre un disco de gelatina bioadhesivo, y después se integraron con éxito en córneas de conejo desnudas, disolviéndose el disco de gelatina después del trasplante (Hsiue *et al.*, Transplantation, 2006, 15 de febrero, 81(3):473-6). Sin embargo, los métodos que utilizan células de cultivo presuponen una fuente de dichas células y, por tanto, se ven afectados por la escasez de tejidos donados adecuados, tal como se describió anteriormente. Además, debido a las diferencias entre las células donadas, puede resultar difícil producir cultivos de células endoteliales corneales de calidad y eficacia constantes. Los obstáculos legales también pueden hacer que estos métodos sean difíciles de llevar a cabo, desde el punto de vista logístico, debido a la posibilidad de que haya que realizar ensayos exhaustivos para determinar la seguridad y/o la eficacia de las células obtenidas de cada donante. Estos y otros métodos terapéuticos adicionales se describen más a fondo en Thomas John, Corneal Endothelial Transplant: DSAEK, DMEK & DLEK (JP Medical Ltd., 2010).

Otras descripciones relacionadas, en general, a métodos para obtener y usar células corneales, incluyendo métodos terapéuticos, métodos de cultivo, métodos de conservación, composiciones que las contienen o que pueden utilizarse junto con estas, y similares, se incluyen en los documentos 2007/0275365, US 2010/0209402, US 2010/0233240, US 2011/0009488, US 2009/0232772, la patente de EE. UU. n.º 5.166.048, los documentos US 2007/0092550, US 2005/0214259, US 2007/0148137, la patente de EE. UU. n.º 4.959.319, la patente de EE. UU. n.º 5.310.728, la patente de EE. UU. n.º 5.589.451, los documentos US 2010/0215717, la patente de EE. UU. n.º 5.703.047, los documentos US 2009/0222086, US 2009/0263465, US 2006/0228693, US 2006/0240552, US 2009/0270982, la patente de EE. UU. n.º 5.269.812, la patente de EE. UU. n.º 7.371.513, los documentos US 2010/0069915, y US 2011/0166650.

Sumario

La presente invención proporciona un método para producir células endoteliales corneales ("corneal endothelial cells", CEC), que comprende poner en contacto células madre de la cresta neural ("neural crest stem cells", NCSC) con al menos un agonista de la proteína 2 relacionada con dickkopf (DKK2) y/o al menos un agonista de la subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas ("platelet-derived growth factor subunit B", PDGFB) que induce la diferenciación de las NCSC en CEC,

en el que el agonista de DKK2 se selecciona del grupo que consiste en: DKK2; Dkk 1; Dkk 3; Dkk 4; Soggy; proteínas relacionadas con el encrespamiento segregadas ("secreted frizzled related proteins", Frzb); factor inhibidor de Wnt ("Wnt inhibitor factor", WIF); IWR; pirvinio; ICG-001; PKF115-584; IWP; Ant1.4Br/Ant 1.4Cl; niclosamida; apiculareno; bafilomicina; XAV939; NSC668036; 2,4-diaminoquinazolina; quercetina; proteínas de Wnt, ácidos nucleicos que codifican proteínas de Wnt, LiCl, norrina; R-espondina2; (hetero)arilpirimidinas; IQ1; BIO(6-bromoindirubina-3'-oxima); 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina; WAY-316606; QS11; SB-216763; SB-216763; DCA; y cualquiera de sus combinaciones; y/o

en el que el agonista de PDGFB se selecciona del grupo que consiste en: PDGFB; polipéptido de PDGFAA; un ácido nucleico que codifica PDGFAA; polipéptido de PDGFAB; un ácido nucleico que codifica PDGFAB; 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA); VEGF, y cualquiera de sus combinaciones.

Dicho al menos un agonista de DKK2 puede comprender un polipéptido de DKK2.

Dicho al menos un agonista de PDGFB puede comprender un polipéptido de PDGFB.

Dicho al menos un agonista de DKK2 puede comprender un polipéptido DKK2 y dicho al menos un agonista de PDGFB puede comprender un polipéptido de PDGFB.

La concentración de dicho polipéptido de DKK2 puede estar entre 1 ng/ml y 15 µg/ml, entre 10 ng/ml y 15 µg/ml, entre 1 ng/ml y 1 µg/ml, entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, entre 2 ng/ml y 20 ng/ml, entre 5 ng/ml y 20 ng/ml, o a aproximadamente 10 ng/ml.

La concentración de dicho polipéptido de PDGFB puede estar entre 0,1 ng/ml y 250 ng/ml, entre 0,5 ng/ml y 150 ng/ml, entre 1 ng/ml y 50 ng/ml, entre 2 ng/ml y 20 ng/ml, o a aproximadamente 10 ng/ml.

El método puede comprender cultivar dichas CEC sobre una matriz.

La matriz puede seleccionarse del grupo que consiste en: laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano,

entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, sulfato de heparano, Matrigel (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)), un extracto de membrana basal humana, y cualquiera de sus combinaciones.

La matriz puede ser de origen humano o de un animal no humano.

5 La matriz puede tener un origen bovino, de ratón o de rata.

La matriz puede comprender Matrigel.

Después de poner en contacto las células madre de la cresta neural (NCSC) con al menos un agonista de la proteína 2 relacionada con dickkopf (DKK2) y/o al menos un agonista de la subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB) (indicado en la presente como etapa (a)), dichas células pueden transferirse.

10 La transferencia puede realizarse entre 1 hora y 5 días, entre 2 horas y 4 días, entre 3 horas y 3 días, entre 4 horas y 2 días, o aproximadamente 1 día después de comenzar la etapa (a).

La transferencia puede realizarse mediante un método que puede comprender poner en contacto las células con un tampón de disociación de células, o mediante un método que puede comprender la disociación mecánica de las células, o de un subconjunto de estas, o mediante un método que puede comprender el aislamiento óptico de las células, o de un subconjunto de estas.

15

El tampón de disociación de células puede ser no enzimático.

El tampón de disociación de células puede comprender ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

La duración de dicho contacto de las NCSC con un factor que induce la diferenciación de dichas células de la cresta neural en CEC puede ser de al menos 2 días, entre 2 y 25 días, o puede ser de entre 2 y 10 días.

20 En otro ejemplo de realización, las CEC pueden purificarse usando una depuración basada en la afinidad de otros tipos de células, que puede realizarse al mismo tiempo que la transferencia o en un momento anterior o posterior. Los métodos de depuración pueden utilizar una molécula de unión que tenga afinidad por un marcador de un tipo de célula que no es CEC, por ejemplo, un anticuerpo o uno de sus fragmentos, que puede acoplarse directa o indirectamente a una esfera u otra sustancia, tal como una microesfera magnética. Por ejemplo, un sustrato puede acoplarse a uno o más anticuerpos que depuran las células madre o los fibroblastos. Los ejemplos de marcadores que pueden utilizarse incluyen CD271, SSEA-1, TRA-1-60, SSEA-4 y/o CD326. Los reactivos disponibles en el mercado potencialmente adecuados incluyen microesferas anti-SSEA-1 (Miltenyi Biotech, n.º de catálogo 130-094-530), el kit de microesferas anti-TRA-1-60 (Miltenyi Biotech, n.º de catálogo 130-095-816), microesferas anti-SSEA-4 (Miltenyi Biotech, n.º de catálogo 130-097-855), y CD326 antifibroblastos (Miltenyi Biotech, n.º de catálogo 130-050-601).

25

30 La etapa (a) puede comprender además cultivar dichas NCSC sobre una matriz, que puede seleccionarse del grupo que consiste en: laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, sulfato de heparano, Matrigel (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)), un extracto de membrana basal humana, y cualquiera de sus combinaciones, que puede tener un origen humano o de animal no humano, que puede tener un origen bovino, de ratón o de rata, o que puede comprender Matrigel.

35

Las NCSC pueden obtenerse a partir de un tejido animal, que puede seleccionarse del grupo que consiste en: intestino, ganglios de la raíz dorsal, médula ósea, piel, corazón, córnea, cuerpo caratoide, tubo neural, dientes y nervio ciático. El tejido animal puede ser un tejido humano.

Las NCSC pueden producirse mediante transdiferenciación de una célula somática.

40 Las NCSC pueden obtenerse a partir de cultivos de rosetas neurales.

Las células madre de la cresta neural pueden producirse a partir de células ES mediante un método que puede comprender cultivar células ES con células de soporte estromáticas MS5.

Las NCSC pueden producirse a partir de células ES.

45 Las células madre de la cresta neural pueden producirse a partir de células ES mediante un método que puede comprender poner en contacto las células ES con uno o más inhibidores de la señalización de proteínas SMA/Mothers Against Decapentaplegic ("madres contra decapentaplégico", SMAD).

Dichos uno o más inhibidores de la señalización de proteínas SMAD pueden evitar la unión de ligandos de la familia del TGF- β a su correspondiente receptor.

50 Dichos uno o más inhibidores de la señalización de proteínas SMAD pueden evitar la activación de un receptor de TGF- β .

Dichos uno o más inhibidores de la señalización de proteínas SMAD inhiben uno o más factores de transcripción/proteínas intracelulares SMAD.

Dichos uno o más inhibidores de la señalización de proteínas SMAD pueden comprender el factor inhibidor de leucemia ("Leukemia Inhibitory Factor", LIF), el inhibidor de GSK3 (CHIR 99021), el compuesto E (inhibidor XXI de y secretasa), SB431542, o cualquiera de sus combinaciones.

5 Dichos uno o más inhibidores de la señalización de proteínas SMAD pueden comprender cordina, folistatina, receptores negativos dominantes o anticuerpos bloqueantes que secuestran BMP2, BMP4 y/o BMP7, dorsomorfina (o compuesto C), SIS3 (6,7-dimetoxi-2-((2E)-3-(1-metil-2-fenil-1H-pirrol-2-yl)-2-propenoil))-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, inhibidor específico de Smad3 (SIS3), un inhibidor de SMAD, SMAD6, SMAD7, SMAD10, un antagonista de un receptor de SMAD, un antagonista de SMAD1, un antagonista de SMAD2, un antagonista de SMAD3, un antagonista de SMAD5, un antagonista de SMAD8/9, o cualquiera de sus combinaciones.

10 La duración de dicho contacto de las células ES con uno o más inhibidores de la señalización de proteínas SMAD puede ser de al menos 2 días, entre 1 y 10 días, o puede ser de entre 2 y 6 días.

Las células madre de la cresta neural pueden producirse a partir de células ES mediante un método que además puede comprender poner en contacto las células ES con al menos un agonista de Wnt.

15 Las células madre de la cresta neural pueden producirse a partir de células ES mediante un método que además puede comprender poner en contacto las células ES con al menos un agonista de Wnt que puede comprender (2',3'E)-6-bromoindirubina-3'-oxima (BIO) y/o Wnt3a.

20 Las células madre de la cresta neural pueden producirse a partir de células ES mediante un método que además puede comprender poner en contacto las células ES con al menos un agonista de Wnt seleccionado del grupo que consiste en: proteínas de Wnt, ácidos nucleicos que codifican proteínas de Wnt, LiCl, antagonistas de axina; antagonistas de APC; norrina; R-espondina2; (hetero)arilpirimidinas; IQ1; BIO(6-bromoindirubina-3'-oxima); 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina; un modulador de Wnt; WAY-316606; QS11; SB-216763; SB-216763; DCA; y cualquiera de sus combinaciones.

25 Las células madre de la cresta neural pueden producirse a partir de células ES mediante un método que puede comprender poner en contacto las células ES con un primer inhibidor de la señalización de proteínas SMAD y un segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD.

El primer inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede seleccionarse del grupo que consiste en: polipéptido de nogina, dorsomorfina, LDN-193189, y cualquiera de sus combinaciones.

El primer inhibidor de la proteína SMAD puede comprender un polipéptido de nogina.

30 El polipéptido de nogina puede estar presente a una concentración de entre 10 ng/ml y 5.000 ng/ml, entre 100 ng/ml y 700 ng/ml, entre 400 ng/ml y 600 ng/ml, o a aproximadamente 500 ng/ml.

El primer inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede seleccionarse del grupo que consiste en: antagonistas de BMP2; antagonistas de BMP4; antagonistas de BMP7; y antagonistas de TGFβ.

El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede comprender un inhibidor de la vía de señalización de quinasas del linfoma anaplásico.

35 El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD inhibe una vía de señalización seleccionada del grupo que consiste en Lefty, activina, y TGFβ.

El segundo inhibidor de la proteína SMAD inhibe la señalización de activina y nodal.

El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD inhibe las vías de Lefty/activina/TGFβ bloqueando la fosforilación de los receptores ALK4, ALK5 y ALK7.

40 El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede ser un inhibidor del receptor ALK4.

El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede seleccionarse del grupo que consiste en: 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-yl]benzamida (SB431542) y sus derivados.

El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede comprender SB431542.

45 El SB431542 puede estar presente a una concentración de entre 10 nM y 100 μM, entre 0,1 μM y 50 μM, entre 0,1 y 20 μM, entre 1 y 20 μM, o a aproximadamente 10 μM.

El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD bloquea la fosforilación de los receptores ACTR1B, TGFβR1, y ACTR1C.

El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD inhibe la señalización de TGFβ/activina/nodal.

El segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD bloquea las señales de activina y BMP endógenas.

50 El primer inhibidor de la señalización de proteínas SMAD y/o dicho segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede cada uno seleccionarse del grupo que consiste en: cordina, folistatina, receptores negativos

dominantes o anticuerpos bloqueantes que secuestran BMP2, BMP4 y/o BMP7, dorsomorfina (o compuesto C), SIS3 (6,7-dimetoxi-2-((2E)-3-(1-metil-2-fenil-1H-pirrol-2-enoil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, inhibidor específico de Smad3 (SIS3), un inhibidor de SMAD, SMAD6, SMAD7, SMAD10, un antagonista de un receptor de SMAD, un antagonista de SMAD1, un antagonista de SMAD2, un antagonista de SMAD3, un antagonista de SMAD5, y un antagonista de SMAD8/9.

El primer inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede comprender nogina y dicho segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede comprender SB431542.

La duración de dicho contacto de las células ES con dicho primer inhibidor de la señalización de proteínas SMAD y dicho segundo inhibidor de la señalización de proteínas SMAD puede ser de al menos 2 días, entre 1 y 10 días, o puede ser de entre 2 y 6 días.

Las células ES pueden ser células ES humanas.

Las células ES pueden ser células iPS.

Las células ES pueden no mostrar cambios o mutaciones en genes asociados con una enfermedad de células endoteliales corneales.

Las células ES pueden mostrar un cariotipo normal.

Antes de la diferenciación en NCSC, dichas células ES pueden mantenerse en cultivo en ausencia de células de soporte.

Antes de la diferenciación en NCSC, dichas células ES pueden cultivarse sobre una matriz, que puede seleccionarse del grupo que consiste en: laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, sulfato de heparano, Matrigel (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)), un extracto de membrana basal humana, y cualquiera de sus combinaciones, o puede tener un origen humano o de animal no humano, o puede tener un origen bovino, de ratón o de rata, o puede comprender Matrigel.

Las NCSC pueden expresar uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: Sox10, AP2, HNK1, PAX7, p75 (NGFR), y cualquiera de sus combinaciones.

Las CEC pueden expresar uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: Na⁺/K⁺ATPasa, ZO-1, KLF13, AQP1, colágeno VIII, SLC16A3, CFTR, NBC1, CA2, AE2/SCL4A2, SCL16A1, CA12, CA4, FoxC1, y cualquiera de sus combinaciones.

Las CEC pueden expresar los marcadores colágeno VIII, bomba de Na⁺/K⁺ATPasa, y ZO-1, y pueden no expresar los marcadores vWF y CD31.

Las CEC pueden expresar uno o más marcadores de la bomba endotelial corneal.

Las CEC pueden expresar uno o más marcadores de la cresta neural periocular.

Las CEC pueden expresar una o más proteínas de adhesión celular y de matriz.

Las CEC pueden expresar al menos un marcador de la bomba endotelial corneal, al menos un marcador de la cresta neural periocular, y al menos una proteína de adhesión celular y de matriz.

Dichos uno o más marcadores de la bomba endotelial corneal pueden seleccionarse del grupo que consiste en: AQP1, CA2, CA4, CA12, SCL14A2, SLC16A1, SLC16A3, SLC16A7, CFTR, NHE1, ADCY10, canales aniónicos dependientes del voltaje VDAC2 y VDAC3, proteínas del canal de cloruro CLCN2 y CLC.

Los marcadores de la cresta neural periocular pueden seleccionarse del grupo que consiste en: PITX2, y FOXC1.

Las proteínas de adhesión celular y de matriz pueden seleccionarse del grupo que consiste en: ocludina, conexina 43, antígeno 9.3E, colágeno III, colágeno IV, N cadherina, VE cadherina, E cadherina, beta-catenina, p120, p190 laminina alfa 4, nidógeno-2, y netrina 4.

Las CEC pueden expresar los marcadores colágeno VIII, bomba de Na⁺/K⁺ATPasa, AQP1, CA2, CA4, CA12, SCL14A2, SLC16A1, SLC16A3, SLC16A7, CFTR, NHE1, ADCY10, PITX2, y FOXC1, y pueden no expresar los marcadores vWF y CD31.

Las CEC pueden formar una monocapa de células con un tamaño uniforme con una forma predominantemente hexagonal, tal como al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de dichas CEC que pueden mostrar dicha forma hexagonal.

Las CEC pueden permitir la filtración unidireccional de solutos y nutrientes.

Las CEC pueden bombear activamente agua en la dirección opuesta a dicha filtración unidireccional.

Las CEC pueden mostrar un alto nivel de actividad metabólica que puede ser comparable a las CEC derivadas de animales.

Las CEC pueden ser CEC humanas.

5 Las CEC pueden mostrar una densidad de cultivo de al menos 1000 células/mm², al menos 2000 células/mm², al menos 3000 células/mm², al menos 4000 células/mm², al menos 5000 células/mm², al menos 6000 células/mm², al menos 7000 células/mm², al menos 8000 células/mm², al menos 9000 células/mm², entre 2000 y 9000 células/mm² entre 2000 y 8000 células/mm² entre 2000 y 7000 células/mm², entre 2000 y 6000 células/mm², entre 2000 y 5.000 células/mm², entre 2000 y 4000 células/mm², entre 2000 y 3500 células/mm², o de aproximadamente 2500 células/mm².

10 Las CEC pueden mostrar un nivel menor de estrés oxidativo acumulado y/o daños en el ADN, comparado con CEC aisladas a partir de un hospedante vivo.

El nivel de estrés oxidativo y/o daños en el ADN puede detectarse midiendo la cantidad de uno o más de: focos de daños en el ADN nuclear; nivel de expresión de p21Cip1, nivel de expresión de p16INK4a; nivel de expresión de la proteína citoglobina, nivel de expresión de la proteína GPX-1, y nivel de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG).

15 Las CEC pueden comprender al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de las células en el cultivo resultante.

En la presente también se describe una composición que comprende células endoteliales corneales (CEC) producidas según cualquier método descrito en la presente.

20 La composición que comprende una lámina de CEC puede presentar una densidad de cultivo de al menos 1000 células/mm², al menos 2000 células/mm², entre 2000 y 6000 células/mm², entre 2000 y 5.000 células/mm², entre 2000 y 4000 células/mm², entre 2000 y 3500 células/mm², o de aproximadamente 2500 células/mm².

La composición que comprende CEC puede mostrar un nivel menor de estrés oxidativo acumulado y/o daños en el ADN, comparado con CEC aisladas a partir de un hospedante vivo.

25 La composición que comprende células endoteliales corneales (CEC) puede haber sido producida a partir de células madre de la cresta neural (NCSC).

Las NCSC pueden producirse a partir de células madre embrionarias ("embryonic stem", ES).

Las NCSC pueden producirse a partir de células ES mediante un método que puede comprender poner en contacto las células ES con uno o más inhibidores de la señalización de proteínas SMAD.

30 En la presente también se describe una composición que contiene células endoteliales corneales (CEC) producidas a partir de células madre embrionarias (ES).

Las células ES pueden ser células ES humanas.

Las células ES pueden ser células iPS.

Las células ES pueden no mostrar cambios o mutaciones en genes asociados con una enfermedad de células endoteliales corneales.

35 Las células ES pueden mostrar un cariotipo normal.

Antes de la diferenciación en NCSC, dichas células ES pueden mantenerse en cultivo en ausencia de células de soporte.

40 Antes de la diferenciación en NCSC, dichas células ES pueden cultivarse sobre una matriz, tal como una matriz que puede seleccionarse del grupo que consiste en: laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, sulfato de heparano, Matrigel (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)), un extracto de membrana basal humana, y cualquiera de sus combinaciones, que puede tener un origen humano o de animal no humano, tal como un origen bovino, de ratón o de rata, o Matrigel.

45 Las NCSC pueden expresar uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: Sox10, AP2, HNK1, PAX7, p75 (NGFR), y cualquiera de sus combinaciones.

Las CEC pueden expresar uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: Na⁺/K⁺ATPasa, ZO-1, KLF13, AQP1, colágeno VIII, SLC16A3, CFTR, NBC1, CA2, AE2/SCL4A2, SCL16A1, CA12, CA4, FoxC1, y cualquiera de sus combinaciones.

50 Las CEC pueden expresar los marcadores colágeno VIII, bomba de Na⁺/K⁺ATPasa, y ZO-1, y pueden no expresar los marcadores vWF y CD31.

Las CEC pueden expresar uno o más marcadores de la bomba endotelial corneal.

Las CEC pueden expresar uno o más marcadores de la cresta neural periorcular.

Las CEC pueden expresar una o más proteínas de adhesión celular y de matriz.

Las CEC pueden expresar al menos un marcador de la bomba endotelial corneal, al menos un marcador de la cresta neural periorcular, y al menos una proteína de adhesión celular y de matriz.

- 5 Dichos uno o más marcadores de la bomba endotelial corneal pueden seleccionarse del grupo que consiste en: AQP1, CA2, CA4, CA12, SCL14A2, SLC16A1, SLC16A3, SLC16A7, CFTR, NHE1, ADCY10, canales aniónicos dependientes del voltaje VDAC2 y VDAC3, proteínas del canal de cloruro CLCN2 y CLC.

Los marcadores de la cresta neural periorcular pueden seleccionarse del grupo que consiste en: PITX2, y FOXC1.

- 10 Las proteínas de adhesión celular y de matriz pueden seleccionarse del grupo que consiste en: ocludina, conexina 43, antígeno 9.3E, colágeno III, colágeno IV, N cadherina, VE cadherina, E cadherina, beta-catenina, p120, p190 laminina alfa 4, nidógeno-2, y netrina 4.

Las CEC pueden expresar los marcadores colágeno VIII, bomba de Na⁺/K⁺ATPasa, AQP1, CA2, CA4, CA12, SCL14A2, SLC16A1, SLC16A3, SLC16A7, CFTR, NHE1, ADCY10, PITX2, y FOXC1, y pueden no expresar los marcadores vWF y CD31.

- 15 Las CEC pueden formar una monocapa de células con un tamaño uniforme con una forma predominantemente hexagonal, tal como al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de dichas CEC que pueden mostrar dicha forma hexagonal.

Las CEC pueden permitir la filtración unidireccional de solutos y nutrientes.

Las CEC pueden bombear activamente agua en la dirección opuesta a dicha filtración unidireccional.

- 20 Las CEC pueden mostrar un alto nivel de actividad metabólica que puede ser comparable a las CEC derivadas de animales.

Las CEC pueden ser CEC humanas.

- 25 Las CEC pueden mostrar una densidad de cultivo de al menos 1000 células/mm², al menos 2000 células/mm², al menos 3000 células/mm², al menos 4000 células/mm², al menos 5000 células/mm², al menos 6000 células/mm², al menos 7000 células/mm², al menos 8000 células/mm², al menos 9000 células/mm², entre 2000 y 9000 células/mm² entre 2000 y 8000 células/mm² entre 2000 y 7000 células/mm², entre 2000 y 6000 células/mm², entre 2000 y 5.000 células/mm², entre 2000 y 4000 células/mm², entre 2000 y 3500 células/mm², o de aproximadamente 2500 células/mm².

- 30 Las CEC pueden mostrar un nivel menor de estrés oxidativo acumulado y/o daños en el ADN, comparado con CEC aisladas a partir de un hospedante vivo, lo cual puede detectarse, por ejemplo, midiendo la cantidad de uno o más de: focos de daños en el ADN nuclear; nivel de expresión de p21Cip1, nivel de expresión de p16INK4a; nivel de expresión de la proteína citoglobina, nivel de expresión de la proteína GPX-1, y nivel de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG).

- 35 Las CEC pueden comprender al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de las células en el cultivo en que están contenidas.

Las CEC pueden estar contenidas en una lámina de CEC.

La lámina de células puede comprender o consistir fundamentalmente en un disco aproximadamente circular que tiene un diámetro de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 mm.

- 40 Las CEC pueden mostrar una densidad de cultivo de al menos 1000 células/mm², al menos 2000 células/mm², al menos 3000 células/mm², al menos 4000 células/mm², al menos 5000 células/mm², al menos 6000 células/mm², al menos 7000 células/mm², al menos 8000 células/mm², al menos 9000 células/mm², entre 2000 y 9000 células/mm² entre 2000 y 8000 células/mm² entre 2000 y 7000 células/mm², entre 2000 y 6000 células/mm², entre 2000 y 5.000 células/mm², entre 2000 y 4000 células/mm², entre 2000 y 3500 células/mm², o de aproximadamente 2500 células/mm².

- 45 El número total de células (por ejemplo, en una lámina o como células disociadas) puede estar entre aproximadamente 800 y aproximadamente 800.000 células, por ejemplo, al menos aproximadamente 10.000, al menos aproximadamente 20.000, al menos aproximadamente 50.000, al menos aproximadamente 100.000, al menos aproximadamente 200.000, al menos aproximadamente 300.000, al menos aproximadamente 400.000, al menos aproximadamente 500.000, al menos aproximadamente 600.000 o al menos aproximadamente 700.000 células, tal como entre aproximadamente 100.000 y aproximadamente 800.000 células, entre aproximadamente 150.000 células y aproximadamente 675.000 células, entre aproximadamente 250.000 células y aproximadamente 550.000 células, así como otros intervalos numéricos dentro de estos valores.
- 50

Las CEC pueden estar situadas sobre un soporte.

Las CEC pueden cultivarse sobre un sustrato y liberarse sobre un soporte.

El sustrato puede comprender un polímero que responde al calor o una superficie injertada con poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) que responde al calor.

5 El soporte puede comprender gelatina, matrices basadas en fibrina, botones corneales desnudos de endotelio, membrana de Descemet desnuda, córnea estromática desvitalizada, discos estromáticos corneales frescos y/o una membrana amniótica.

Las CEC pueden estar en suspensión.

La composición puede comprender además un inhibidor de la quinasa asociada a Rho ("Rho-associated kinase", ROCK).

10 El inhibidor de la quinasa asociada a Rho puede comprender Y-27632.

15 Las CEC pueden mostrar un nivel menor de estrés oxidativo acumulado y/o daños en el ADN, comparado con CEC aisladas a partir de un hospedante vivo, lo cual puede detectarse, por ejemplo, midiendo la cantidad de uno o más de: focos de daños en el ADN nuclear; nivel de expresión de p21Cip1, nivel de expresión de p16INK4a; nivel de expresión de la proteína citoglobina, nivel de expresión de la proteína GPX-1, y nivel de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG).

20 La composición puede comprender al menos 2000, al menos 3000, al menos 8000, al menos 11000, al menos 18000, al menos 25000, al menos 31000, al menos 44000, al menos 49000, al menos 69000, al menos 71000, al menos 96000, al menos 99000, al menos 126000, al menos 135000, al menos 159000, al menos 176000, al menos 196000, al menos 223000, al menos 275000, al menos 237000, al menos 283000, al menos 332000, o al menos 396000 CEC.

La composición puede comprender al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% CEC.

La composición puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición puede comprender además un agente inmunosupresor o inmunotolerizante.

25 El agente inmunosupresor o inmunotolerizante puede comprender uno o más de: células madre mesenquimáticas, anticuerpo policlonal antiglobulina de linfocitos (ALG), anticuerpo policlonal antiglobulina de timocitos (ATG), azatioprina, BASILIXIMAB® (anticuerpo antirreceptor de IL-2Rα), ciclosporina (ciclosporina A), DACLIZUMAB® (anticuerpo antirreceptor de IL-2Rα), everolimus, ácido micofenólico, RITUXIMAB® (anticuerpo anti-CD20), sirolimus, tacrolimus, micofemolato mofetilo, y corticosteroides.

30 La composición puede estar exenta de contaminantes bacterianos, contaminantes micoplásmicos y virus detectables.

La composición puede comprender CEC humanas.

La composición puede ser adecuada para el trasplante al ojo de un paciente que lo necesita, tal como un paciente humano.

35 La composición puede usarse en la fabricación de un medicamento.

El medicamento puede ser para el tratamiento de una enfermedad de células endoteliales corneales.

40 La enfermedad de las células endoteliales corneales puede comprender la distrofia de Fuch, síndrome endotelial iridocorneal, distrofia polimorfa posterior, o distrofia endotelial hereditaria congénita y/o enfermedades secundarias para las cuales un tratamiento eficaz puede ser el reemplazo del endotelio corneal, que incluyen las distrofias corneales, el uso de lentes, la cirugía de cataratas y el fracaso endotelial tardío en el trasplante de córnea.

La enfermedad de las células endoteliales corneales puede comprender pleomorfismo, una alteración significativa en el patrón hexagonal regular del endotelio que provoca una disminución en la estabilidad del mosaico endotelial. El pleomorfismo puede aparecer secundariamente a otra enfermedad de la córnea, tal como un estrés fisiológico como resultado de una enfermedad ocular, el uso de lentes o los cambios normales del envejecimiento.

45 El medicamento puede estar adaptado para la administración mediante un método que puede comprender el pelado de la membrana de Descemet con queratoplastia endotelial ("Descemet's stripping with endothelial keratoplasty", DSEK), la queratoplastia penetrante ("Penetrating Keratoplasty", PKP), la queratoplastia laminar, la queratoplastia endotelial de la membrana de Descemet ("Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty", DMEK), DSAEK, y DLEK.

50 En la presente se describe un método de tratamiento de una enfermedad de las células endoteliales corneales o de células endoteliales corneales dañadas, que puede comprender administrar una composición que comprende CEC a un paciente que lo necesite.

Las CEC pueden administrarse mediante un método que puede comprender el pelado de la membrana de Descemet con queratoplastia endotelial (DSEK), la queratoplastia penetrante (PKP), la queratoplastia laminar, la queratoplastia endotelial de la membrana de Descemet (DMEK), DSAEK, y DLEK.

La enfermedad de las células endoteliales corneales puede seleccionarse del grupo que consiste en: distrofia de Fuch, síndrome endotelial iridocorneal, distrofia polimorfa posterior, o distrofia endotelial hereditaria congénita, y enfermedades secundarias para las cuales un tratamiento eficaz puede ser el reemplazo del endotelio corneal, que incluyen las distrofias corneales, el uso de lentes, la cirugía de cataratas y el fracaso endotelial tardío en el trasplante de córnea.

El método de tratamiento puede comprender administrar un agente inmunosupresor o un agente inmunotolerizante a dicho paciente.

El agente inmunosupresor o agente inmunotolerizante puede administrarse en una cantidad suficiente para reducir el riesgo de rechazo de dichas CEC.

El agente inmunosupresor o agente inmunotolerizante puede administrarse antes, al mismo tiempo y/o después de la administración de dichas CEC a dicho paciente.

La composición que comprende CEC puede comprender además un agente inmunosupresor o un agente inmunotolerizante.

El agente inmunosupresor o inmunotolerizante puede comprender uno o más de: células madre mesenquimáticas, anticuerpo policlonal antiglobulina de linfocitos (ALG), anticuerpo policlonal antiglobulina de timocitos (ATG), azatioprina, BASILIXIMAB® (anticuerpo antirreceptor de IL-2R α), ciclosporina (ciclosporina A), DACLIZUMAB® (anticuerpo antirreceptor de IL-2R α), everolimus, ácido micofenólico, RITUXIMAB® (anticuerpo anti-CD20), sirolimus, tacrolimus, micofenolato mofetilo, y corticosteroides.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A ilustra esquemáticamente dos métodos que se usaron para generar células endoteliales corneales a partir de células madre embrionarias. La figura 1B es una micrografía de fase que muestra el campo circular de endotelio corneal derivado de hES (rodeado por un círculo discontinuo), que puede identificarse por su morfología hexagonal (Hex). El campo circular de endotelio corneal está rodeado por células no hexagonales (P) que se cree que incluyen células progenitoras que no han adoptado una morfología corneal hexagonal. Las células endoteliales corneales en la figura 1B se generaron a partir de hESC usando el método descrito en el ejemplo 1 y se muestran en el día 9. La figura 1C es una micrografía que muestra un campo de endotelio corneal derivado de hESC (Hex) que se generó usando el método descrito en el ejemplo 2 (es decir, con la etapa de la transferencia). Con relación al método descrito en el ejemplo 1, el método descrito en el ejemplo 2 produce una mayor proporción de células endoteliales corneales, con pequeños parches de células no hexagonales (P) presentes entre las células endoteliales corneales.

Las figuras 2A-D muestran poblaciones de células endoteliales recién diferenciadas. La figura 2A muestra poblaciones de células producidas usando el método descrito en el ejemplo 1, en la que, en el día 9, las células endoteliales forman colonias circulares (flecha), estando presentes células endoteliales corneales aisladas fuera de las colonias circulares (4 $\times$ aumento). La figura 2B muestra células representativas obtenidas usando el método descrito en el ejemplo 1 a mayor aumento (20 $\times$) para ilustrar la forma hexagonal o poligonal indicativa de células endoteliales (flecha). La figura 2C muestra poblaciones de células producidas como se describe en el ejemplo 2, en las que, en el día 10, las células endoteliales corneales cultivadas se encontraban predominantemente en el cultivo (4 $\times$ aumento). La figura 2D muestra células representativas obtenidas según se describe en el ejemplo 2 a mayor aumento (20 $\times$) para ilustrar la forma hexagonal o poligonal indicativa de células endoteliales (flecha).

Las figuras 3A-F muestran la expresión positiva y la localización en la zona de unión estrecha del marcador ZO-1 en células endoteliales corneales diferenciadas a partir de la línea de hESC H1GFP, que proporciona confirmación de su identidad endotelial corneal. Las células endoteliales corneales (CEC) se tiñeron para el marcador ZO-1 de la zona de unión estrecha (rojo; figura 3A, 10 $\times$; figura 3D, 40 $\times$) y usando el tinte nuclear DAPI (azul; figura 3B, 10 $\times$; figura 3E, 40 $\times$). ZO-1 muestra una localización poligonal o hexagonal coherente con la tinción esperada en las zonas de unión estrecha. Las vistas fusionadas (figura 3C, 10 $\times$; figura 3F, 40 $\times$) demuestran la relación espacial esperada entre la tinción de ZO-1 y DAPI, es decir, en general un único núcleo contenido dentro de cada célula teñida con ZO-1 poligonal o hexagonal. Las células endoteliales corneales en esta figura se produjeron usando el método descrito en el ejemplo 1 y se muestran en el día 9.

Las figuras 4A-F muestran la expresión y la localización del marcador Na⁺/K⁺ATPasa en células diferenciadas a partir de la línea de hESC H1GFP, que proporciona confirmación de su identidad endotelial corneal. Las hESC H1GFP no diferenciadas muestran una distribución relativamente desorganizada de Na⁺/K⁺ATPasa (figura 4A, se muestra la tinción con Na⁺/K⁺ATPasa en rojo; figura 4B, se muestra la tinción con DAPI en azul; figura 4C, vista fusionada de los paneles A y B). Por contraste, las CEC (diferenciadas a partir de la línea de hESC H1GFP) muestran una distribución localizada de Na⁺/K⁺ATPasa (figura 4D, se muestra la tinción con Na⁺/K⁺ATPasa en rojo; figura 4E, se muestra la tinción con DAPI en azul; figura 4F, vista fusionada de los paneles D y E). La tinción con Na⁺/K⁺ATPasa en las CEC muestra una localización poligonal o hexagonal coherente con la tinción esperada en las zonas de unión estrecha, en general con un único núcleo dentro de cada célula. Las células endoteliales corneales

en esta figura se produjeron como se describe en el ejemplo 1 y se muestran en el día 9.

Las figuras 5A-D muestran la expresión y la localización del marcador KLF13 en células diferenciadas a partir de la línea de hESC H1GFP, que proporciona confirmación de su identidad endotelial corneal, y además demuestran que las células adoptan una forma hexagonal más regular y uniforme después de pasar más tiempo en cultivo. Las células endoteliales corneales se diferenciaron a partir de hESC según se describe en el ejemplo 1 y se muestran después de 25 días en cultivo (CEC Largo). Las células se tiñeron para el factor de transcripción KLF13 (figura 5A, rojo) y con el tinte nuclear DAPI (figura 5C, azul). También se visualizó la fluorescencia de GFP (figura 5B, verde) que fue visible en el núcleo de la célula y perfilando los límites de las células. Con relación a los cultivos del día 9, las células CEC Largo adoptan una forma hexagonal más regular y uniforme. La vista fusionada (figura 5D) muestra la expresión de KLF13 tal como se esperaba.

La figura 6A-D muestra la ausencia de expresión de marcadores endoteliales vasculares en células endoteliales corneales derivadas de hESC H9 (CEC). Se emplearon células endoteliales vasculares humanas ("human vascular endothelial cells", HUVEC) como control positivo. Las células se tiñeron para el marcador de células endoteliales vasculares factor de von Willebrand (vWF, rojo), el marcador de células endoteliales corneales ZO-1 (verde), y el tinte nuclear DAPI (azul). Las vistas fusionadas demuestran que las HUVEC (figura 6A) fueron positivas para vWF y negativas para ZO-1, mientras que las CEC (figura 6B) fueron negativas para vWF y positivas para ZO-1. Las células se tiñeron para el marcador de células endoteliales vasculares CD31 (rojo), el marcador de células endoteliales corneales ZO-1 (verde), y el tinte nuclear DAPI (azul). Las vistas fusionadas demuestran que las HUVEC (figura 6C) fueron positivas para CD31 y negativas para ZO-1, mientras que las CEC (figura 6D) fueron negativas para CD31 y positivas para ZO-1. Las células endoteliales corneales en esta figura se produjeron como se describe en el ejemplo 1 y se muestran en el día 9. Estos resultados demuestran que las CEC no expresan de modo detectable los marcadores endoteliales vasculares CD31 y vWF, confirmando aún más su identidad como células endoteliales corneales.

Las figuras 7A-C muestran la sobreexpresión de ARNm característica de las células endoteliales corneales diferenciadas en células endoteliales corneales derivadas de hESC. La expresión génica se detectó mediante qPCR y se normalizó al nivel de expresión detectado en hESC y el control endógeno PGK1. La expresión del colágeno VIII, un componente principal de la membrana de Descemet que es segregado por las células endoteliales corneales, fue sobreexpresada en aproximadamente 20 veces (figura 7A); la expresión de los marcadores de células endoteliales corneales CFTR, NBC1, y SLC16A3 fue sobreexpresada en aproximadamente 3, 6 y 23 veces, respectivamente (figura 7B, izquierda, centro, y barra derecha en cada grupo, respectivamente); y la expresión de AQP1, un componente principal de la bomba endotelial corneal, fue sobreexpresada en aproximadamente 1500 veces. RQ indica la cantidad detectada con relación a la cantidad detectada en hESC (promedio de múltiples mediciones, las barras de error indican el mínimo y el máximo de RQ). Las CEC en este experimento se produjeron como en el ejemplo 1.

La figura 8 muestra la sobreexpresión de los genes de la cresta neural NGFR y Sox 10 a lo largo de seis días después de comenzar la exposición de hESC a los inhibidores de SMAD duales nogina y SB431542 (4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida). La expresión de cada gen aumentó notablemente en el día 2 ("DS2") y permaneció elevada hasta el día 6 ("DS6"). RQ indica la cantidad detectada con relación a la cantidad detectada en hESC y el control endógeno PGK1 (promedio de múltiples mediciones, las barras de error indican el mínimo y el máximo de RQ); los valores se indican con símbolos cuadrados para NGFR y símbolos triangulares para Sox 10. La expresión génica se midió mediante un análisis de qPCR de muestras recogidas en los días indicados (DS2 a DS6 que se refieren a los días 2 a 6, respectivamente, después de comenzar la exposición de hESC a los inhibidores de SMAD duales).

La figura 9 muestra la inducción de la expresión de genes de la cresta neural y corneales a lo largo de la producción de células endoteliales corneales a partir de células madre embrionarias según se describe en el ejemplo 1. El colágeno VIII (ColVIII), un gen del endotelio corneal, se expresó a niveles elevados después de dos días de exposición al inhibidor de SMAD dual. Los genes de la cresta neural NGFR y SOX10 fueron expresados de modo temprano y se mantuvieron durante el período de cultivo. Nanog (un gen indicativo de la pluripotencia) se redujo mucho en el proceso de cultivo. La expresión génica se midió mediante qPCR en los días indicados del protocolo de diferenciación o para hESC sin tratar, según estén marcadas. RQ indica la cantidad detectada con relación a la cantidad detectada en hESC, es decir, el nivel de expresión en hESC se ajusta a 1. Los valores de RQ mostrados son el promedio de múltiples mediciones, y las barras de error indican el mínimo y el máximo de RQ; los valores se indican con símbolos cuadrados para ColVIII, con símbolos en forma de diamante para NGFR, con símbolos triangulares para SOX10, y con símbolos circulares para Nanog.

La figura 10 muestra la expresión de los factores de transcripción PITX2 y FOXC1 (marcadores de la cresta neural ocular) en el día 9 de inducción de la diferenciación de células endoteliales corneales usando el método según se describe en el ejemplo 1. RQ indica la cantidad detectada con relación a la cantidad detectada en hESC y el control endógeno PGK1, es decir, el nivel de expresión en hESC se ajusta a 1. Los valores de RQ mostrados son el promedio de múltiples mediciones, y las barras de error indican el mínimo y el máximo de RQ.

Figura 11. La forma poligonal continúa refinándose a lo largo del tiempo. Fotografías de contraste de fase a potencia baja (4x, paneles A-D) y alta (20x, paneles E-H) de células endoteliales corneales derivadas de hESC después de aumentar el tiempo en cultivo para células producidas como se describe en el ejemplo 2. A., E. Las células endoteliales corneales derivadas de hESC poligonales son claramente visibles después de una semana de

diferenciación. B., F. La forma de las células continúa siendo más regular tras 2 semanas de diferenciación. C., G. Las células fueron más uniformes en tamaño y forma tras 3 semanas de diferenciación. D., H. Está presente una uniformidad aún mayor en la forma de las células tras 4 semanas de diferenciación.

Figura 12. En las células endoteliales corneales derivadas de hESC están presentes zonas de unión estrecha. ZO-1 (rojo) perfila las zonas de unión estrecha entre las células endoteliales corneales. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). Las flechas indican células hexagonales. A, E, I. Tal como se esperaba, ZO-1 está presente a una intensidad en general uniforme en las zonas de unión entre células, y las células contienen un único núcleo teñido. Las células positivas a ZO-1 fueron poligonales después de una semana de diferenciación. B, F, J. Las células ZO-1 poligonales continuaban presentes con alguna variación en el tamaño celular tras 2 semanas de diferenciación. C, G, K. Después de 3 semanas de diferenciación, las CEC fueron más regulares en tamaño y aparece un número creciente de células hexagonales en el cultivo, lo cual indica un cambio de la morfología poligonal a la hexagonal. D, H, L. Después de 4 semanas de diferenciación continuó el refinamiento de las zonas de unión estrecha entre células y se observó un número creciente de células hexagonales.

Figura 13. Las células endoteliales corneales derivadas de hESC expresan la bomba de agua acuaporina1 (AQP1), lo cual indica su identidad como CEC. AQP1 (rojo) se localizó en los límites de las células en todos los momentos examinados. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). Las flechas indican células hexagonales. A, E, I. 1 semana de diferenciación. B, F, J. 2 semanas de diferenciación. C, G, K. 3 semanas de diferenciación. D, H, L. 4 semanas de diferenciación. De modo coherente con los niveles de expresión de ARNm mostrados a continuación (véase la figura 15), la proteína AQP1 está presente entre las semanas 1 y 4.

Figura 14A-C. La expresión del ARNm de AQP1 (columna izquierda en cada grupo) y COL8A1 (columna derecha en cada grupo) en CEC derivadas de hESC (generadas usando el método del ejemplo 2) difiere dependiendo del método utilizado para recolectar las células. Se detectaron los niveles de expresión de estos genes usando qPCR y se normalizaron a las células madre (hESC) y se compararon con células endoteliales corneales derivadas de hESC generadas usando el método del ejemplo 2 antes de la recolección (PD1T). Todos los métodos de recolección aumentaron los niveles de COL8A1 y disminuyeron la cantidad de AQP1, comparado con las células antes de la recolección. Man = disociación manual (rascado de células); "0,05% T" = tripsina al 0,05%; "0,25% 5 min" = tripsina al 0,25% durante 5 minutos; "0,25% T" = tripsina al 0,25% durante 10 minutos; "0,25% T_EDTA" = tripsina al 0,25% diluida 1:1 con tampón de disociación de células, Acc = acutasa, ColB = colagenasa B durante la noche; ColB_EDTA = tratamiento de colagenasa B 1 h, seguido de tampón de disociación de células.

Figura 15. Niveles de ARNm de COL8A1 y AQP1 en CEC de hESC cultivadas durante 1-4 semanas. Todas las muestras se normalizaron a las células madre (hESC). "PD" indica las células producidas como en el ejemplo 1, es decir, sin transferencia durante la diferenciación. "PD1T" indica las células producidas como en el ejemplo 2, es decir, con la etapa de volver a cultivar en placa durante la diferenciación. A. COL8A1 se expresó en alto grado en todos los momentos ensayados. El aumento temporal en la expresión de COL8A1 detectado en la semana 2 coincide con la transferencia a un nuevo pocillo de cultivo de tejidos y se cree que refleja la producción de matriz extracelular. B. La expresión de ARNm de AQP1 aumenta a lo largo del tiempo en el cultivo a medida que las células maduran y tiene una evolución paralela al desarrollo en el tiempo de la adopción de una morfología hexagonal, tal como se ilustra en la anterior figura 11.

Figura 16. Muchas bombas endoteliales corneales están sobrerreguladas tras 1-4 semanas de cultivo. Todas las muestras se normalizaron a las células madre (hESC). "PD1T" indica las células producidas como en el ejemplo 2, es decir, con la etapa de volver a cultivar en placa durante la diferenciación. A. Expresión de las bombas no reguladas a lo largo del tiempo. B. Marcadores de bomba endotelial corneales que están presentes, pero no a mayor nivel comparado con las hESC. C. La expresión de COL8A2 es menor que la del gen relacionado, COL8A1.

Figura 17. Un inhibidor de Rock mejora la morfología de CEC de hESC después de recolectar y volver a cultivar en placa, y cambia los niveles de genes endoteliales corneales mediante QPCR. A-D. Fotografías de contraste de fase de células CEC de hESC que han sido tripsinizadas y después se han vuelto a cultivar en placa en presencia de un inhibidor de Rock. A. La morfología de las CEC de hESC es variable en presencia de inhibidor de Rock 1 μ M. B. Las CEC de hESC son algo más uniformes con inhibidor de Rock 5 μ M. C. Las CEC de hESC son uniformes y poligonales/hexagonales con inhibidor de Rock 10 μ M. D. Las CEC de hESC son uniformes y poligonales/hexagonales con inhibidor de Rock 20 μ M. E-F. Todas las muestras se normalizaron a las células madre (hESC). E. La expresión de COL8A1 permanece relativamente sin cambios en presencia del inhibidor de Rock, comparado con PD1T que no han sido recolectadas. SLC16A3 está sobrerregulado con inhibidor de Rock 1-10 μ M, pero permanece sin cambios con inhibidor de Rock 20 μ M, comparado con PD1T que no han sido recolectadas ("PD1T" indica las células producidas como en el ejemplo 2, es decir, con la etapa de volver a cultivar en placa durante la diferenciación).

Figura 18. Las CEC de hESC cultivadas en una placa de cultivo de tejidos tratada con UPCELL pueden retirarse en forma de lámina. Las CEC de hESC se cultivaron en placas de cultivo tratadas con UPCELL, se retiraron y se tiñeron para ZO-1. Las flechas indican células hexagonales. A. La expresión de ZO-1 (rojo) indica que se mantienen las zonas de unión estrecha después de la retirada de la lámina de células. B. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). C. Fusión de ZO-1 y DAPI.

Figura 19. COL8A1 y COL8A2 son segregados para formar una matriz similar a la matriz extracelular en CEC derivadas de hESC. Se recogió la matriz subcelular subyacente por debajo de las CEC de hESC y se analizó

mediante una transferencia Western. A. COL8A1 está presente, ya que se detecta en una banda de aproximadamente 50 kDa en la matriz subcelular. Se detectó una banda mayor que 250 kDa, que probablemente sea insoluble. B. COL8A2 está presente, ya que se detecta en una banda de aproximadamente 50 kDa en la matriz subcelular.

Figura 20. Comparación global de la expresión génica entre CEC de hESC y CEC derivadas de adultos. Los genes mostrados presentan una diferencia en al menos 3 veces en la expresión entre las CEC de hESC y las CEC de adulto, con un umbral de significancia de $p < 0,05$. Se listan los símbolos de los genes, la descripción de los genes, el número de registro y la diferencia en número de veces para cada gen. La micromatriz incluye además posiciones que no están anotadas, y los resultados de estas posiciones se incluyen en la tabla con la denominación "Tr." (por ejemplo, "Tr. 7904959") que indica el resultado de expresión para el número de identificación del agrupamiento de transcritos en la matriz. Un valor negativo indica que la expresión es menor en las CEC de adultos, comparado con las CEC de hESC.

Figura 21. Mejora en la pureza de las CEC derivadas de hESC usando extracción con esferas magnéticas. Las células positivas a CD271+ se retiraron de los cultivos endoteliales corneales. Vista por contraste de fase (20×) de células que han sido cultivadas durante un total de 2 semanas de diferenciación. A. Células control producidas según el ejemplo 2, pero que no fueron transferidas en el día 10. B. Control para la extracción de CD271. Las células se tripsinizaron en el día 10 e inmediatamente se volvieron a cultivar en placa. C. La mayoría de las células CD271+ fueron extraídas mediante la separación con esferas magnéticas. El procesamiento de las células ha alterado la morfología de las células endoteliales corneales. D. Análisis de citometría de flujo de células CD271+ con esferas magnéticas sin clasificar. Aproximadamente 23% de todas las células expresan CD271 a niveles relativamente bajos. E. Las células CD271+ fueron depuradas mediante la separación con esferas magnéticas. FLA4 es el canal de APC en donde se detecta CD271. CD271 también se denomina gen de la cresta neural NGFR.

Descripción detallada

La presente solicitud proporciona métodos para obtener células endoteliales corneales mediante la diferenciación dirigida de células madre pluripotenciales o multipotenciales, que incluyen células madre embrionarias humanas (hESC), células somáticas (que incluyen células transdiferenciadas y células madre, tales como células madre de la cresta neural), y células madre pluripotenciales humanas inducidas ("induced human pluripotent stem cells", hiPSC). Se espera que estas células puedan proporcionar una alternativa a la recolección trabajosa de córneas donadas para un uso terapéutico.

Tal como se detalla a continuación, se produjeron monocapas de endotelio corneal mediante la diferenciación dirigida de células madre embrionarias humanas (hESC). Las hESC se indujeron para que se diferenciases en progenitores de la cresta neural, y después los progenitores de la cresta neural se expusieron a factores de crecimiento que inducen la formación de células endoteliales corneales. Se confirmó la identidad de las células endoteliales corneales basándose en características morfológicas diferenciadas y la expresión de genes, que incluye la presencia de marcadores de células endoteliales corneal y la ausencia de ciertos marcadores de células endoteliales vasculares (cuya expresión de marcadores presenta cierto solapamiento con las células endoteliales corneales).

En ejemplos de realizaciones, las poblaciones de células endoteliales corneales pueden ensayarse para la presencia de otros tipos de células, por ejemplo, cualquier célula pluripotencial remanente y/o células madre de la cresta neural. Los ejemplos de métodos que pueden usarse para detectar otros tipos de células en una población de células endoteliales corneales incluyen métodos que pueden detectar la expresión de marcadores de células pluripotenciales, tales como transferencia Northern, transferencia Western, inmunotinción, PCR, y otros métodos conocidos en la técnica. Véase, en general, Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, 1988); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, 5ª edición, 2002); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición, 2001); Sambrook *et al.*, *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006).

En ejemplos de realizaciones, las células (por ejemplo, células hES, NCSC y/o CEC) pueden cultivarse sobre una matriz. La matriz puede comprender uno o más de: factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor 1 de crecimiento similar a insulina, factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF2, a veces denominado bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), laminina (por ejemplo, laminina-511, que puede ser recombinante), fibronectina, vitronectina (por ejemplo, vitronectina modificada con pez cebra recombinante), proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, sulfato de heparano, Matrigel (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), cuyos componentes principales incluyen laminina, colágeno IV, entactina, sulfato de heparano y proteoglicano, y que también incluye factores de crecimiento, collagenasas, activadores del plasminógeno y puede incluir otros componentes), un extracto de membrana basal humana, y cualquiera de sus combinaciones. En otra realización, la matriz procede de un ser humano o de un animal no humano (por ejemplo, de origen bovino, de ratón o de rata). En ejemplos de realizaciones, las células (por ejemplo, células hES, NCSC y/o CEC) pueden cultivarse sobre células de soporte (que incluyen, pero no se limitan a MEF, NHDF, otros fibroblastos, u otros tipos de células que no son fibroblastos), que puede estar mitóticamente inactivadas (por ejemplo, mediante irradiación gamma, tratamiento con

mitomicina C u otros métodos conocidos en la técnica). Las matrices y/o células de soporte adecuadas en general permiten el mantenimiento de las células hES, la diferenciación de células hES en NCSC, o la diferenciación de NCSC en CEC.

Otros ejemplos de realizaciones pueden incluir la detección sensible y específica de otros tipos de células (por ejemplo, células ES y/o células madre de la cresta neural) en una población de células CEC usando métodos descritos en la solicitud internacional de propiedad de los solicitantes con n.º de serie PCT/US11/45232 y las solicitudes provisionales de EE. UU. con n.ºs de serie Nos. 61/414.770 y 61/367.038. Por ejemplo, una población de células puede teñirse para dos marcadores indicativos de células ES (por ejemplo, teñirse para la expresión de fosfatasa alcalina ("alkaline phosphatase", AP) y teñirse para la expresión de un marcador específico de células ES, tal como Oct-4, Nanog, etc.), y las células pueden examinarse para detectar las células que expresan estos marcadores de células ES. De modo similar, la población puede teñirse para la presencia de dos o más marcadores indicativos de células madre de la cresta neural y examinarse para detectar las células que expresan estos marcadores de células madre de la cresta neural. Tal como se describe en las solicitudes mencionadas anteriormente, puede lograrse una detección muy sensible usando estos métodos por medio de examinar un número suficientemente elevado de células, por ejemplo, entre al menos un millón de células y al menos 10 millones de células. Preferiblemente, al menos un tinte es detectable bajo la luz visible, lo cual permite visualizar las células bajo luz visible para detectar al menos uno de los marcados, lo cual puede aumentar mucho la capacidad de procesamiento; el segundo marcador puede ser visible bajo luz UV, y cualquier célula positiva para dicho primer marcador puede visualizarse bajo luz UV para detectar la expresión de dicho segundo marcador, y cuando se detecta que una célula expresa ambos marcadores, esta se clasifica como una célula del tipo que se está detectando.

Alternativas y factores adicionales para la producción de células endoteliales corneales a partir de células madre embrionarias

Tal como se describe con más detalles en los siguientes ejemplos, los solicitantes han demostrado realizar métodos para la producción de células endoteliales corneales (CEC) mediante la diferenciación de células hES a través del contacto con ciertos factores. Además de los factores específicos usados en los ejemplos, se espera que otros factores, por ejemplo, equivalentes, agonistas, etc., puedan utilizarse en lugar de cualquiera de los factores identificados o además de estos. Las combinaciones adecuadas de factores pueden ser determinadas con facilidad por los expertos en la técnica, así como sus concentraciones. Por ejemplo, pueden ponerse en contacto con facilidad poblaciones de células hES con composiciones candidatas y controlarse para la adopción de un destino de célula madre de la cresta neural, tal como la expresión de marcadores genéticos de estas, que incluyen los identificados en la presente y en el documento WO/2010/096496. Además, pueden ponerse en contacto poblaciones de células madre de la cresta neural (que incluyen poblaciones de células ES que están sometidas al proceso de inducción de la cresta neural) con composiciones candidatas y controlarse para la adopción de un destino de célula endotelial corneal, tal como la morfología característica (véase, por ejemplo, la figura 2), así como la expresión de uno o más marcadores característicos de las células endoteliales corneales, que incluyen los identificados en la presente y otros conocidos en la técnica. Las células también pueden controlarse para determinar una expresión disminuida o ausente de uno o más marcadores indicativos de uno o más tipos de células distintos, y dicha expresión disminuida o ausente generalmente se evalúa con relación al nivel de expresión de las células de dicho otro tipo, por ejemplo, una expresión disminuida o ausente de uno o más marcadores de células endoteliales vascular (tales como VWF y/o CD31/PECAM-1) y/o una expresión disminuida o ausente de uno o más marcadores de células ES y/o una expresión disminuida o ausente de uno o más marcadores de células madre de la cresta neural en CEC. Las células, tales como células hES o células madre de la cresta neural, pueden exponerse a diferentes factores o combinaciones de factores y pueden controlarse para la adopción de fenotipos de CEC, opcionalmente junto con controles positivos y negativos adecuados, para identificar factores operativos y sus concentraciones, o para determinar concentraciones operativas u óptimas de factores.

Inhibidores de Smad duales

Los ejemplos de realizaciones del método descrito en la presente incluyen diferenciar hESC en presencia de nogina (por ejemplo, polipéptido de nogina humana, tal como NP_005441.1, o el polipéptido maduro contenido en su interior) y SB431542 (colectivamente, "inhibidores de SMAD duales"). Estos cultivos pueden producir células madre de la cresta neural, y un cultivo posterior (por ejemplo, en presencia de otros factores) puede producir CEC u otros tipos de células. Los solicitantes contemplan que puedan usarse factores alternativos (de modo individual y/o en combinación) en los métodos descritos, en lugar de cualquiera o ambos de los inhibidores de SMAD duales y/o que puedan usarse además de uno o ambos de estos factores. Aunque estos factores a veces se denominan inhibidores de SMAD "duales", pueden utilizarse más o menos de dos factores en el alcance de estos métodos.

La nogina es un inhibidor de BMP segregado, del cual se ha indicado que se une a BMP2, BMP4 y BMP7 con alta afinidad para bloquear la actividad de la familia del TGFβ. SB431542 es una molécula pequeña, de la cual se ha indicado que inhibe a TGFβ/activina/nodal mediante el bloqueo de la fosforilación de los receptores ACTRIB, TGFβR1, y ACTRIC. Se cree que SB431542 desestabiliza la red de pluripotencialidad mediada por activina y Nanog, así como suprime los destinos de trofoblastos, mesodermo y endodermo inducidos por BMP mediante el bloqueo de las señales endógenas de activina y BMP. Se espera que los agentes que tengan una o más de las actividades mencionadas anteriormente puedan reemplazar o aumentar las funciones de uno o ambos de nogina y SB431542, por ejemplo, tal como se emplean en el contexto de los métodos descritos. Por ejemplo, los solicitantes contemplan que la proteína nogina y/o la molécula pequeña SB4312542 puedan ser reemplazadas o magnificadas por uno o

más inhibidores que afecten a cualquiera o a todas las siguientes tres áreas diana: 1) evitar la unión del ligando al receptor; 2) bloquear la activación del receptor (por ejemplo, dorsomorfina), y 3) inhibir factores de transcripción/proteínas intracelulares SMAD. Los ejemplos de factores potencialmente adecuados incluyen los inhibidores de BMP segregados naturales cordina (que bloquea BMP4) y folistatina (que bloquea la activina), así como sus análogos o miméticos. Otros ejemplos de factores que pueden imitar el efecto de la nogina incluyen el uso de receptores negativos dominantes o anticuerpos de bloqueo que secuestran BMP2, BMP4 y/o BMP7. Además, con respecto al bloqueo de la fosforilación de receptores, se ha indicado que la dorsomorfina (o compuesto C) tiene efectos similares sobre las células madre. La inhibición de las proteínas SMAD también puede realizarse usando inhibidores solubles, tales como SIS3 (6,7-dimetoxi-2-((2E)-3-(1-metil-2-fenil-1H-pirrol-2-yl)prop-2-en-1-yl)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, inhibidor específico de Smad3, SIS3), la sobreexpresión de uno o más de los inhibidores de SMAD (por ejemplo, SMAD6, SMAD7, SMAD 10) o ARNi para uno de los receptores de SMAD (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8/9). Otra combinación de factores que se espera que sean adecuados para generar progenitores neurales comprende un cóctel del factor inhibidor de leucemia (LIF), el inhibidor de GSK3 (CHIR 99021), el compuesto E (inhibidor de XXI y secretasa), y el inhibidor de TGF β SB431542, que ha demostrado previamente que es eficaz para generar células madre de la cresta neural (Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 17 de mayo de 2011, 108(20):8299-304). Otros ejemplos de factores pueden incluir derivados de SB431542, por ejemplo, moléculas que incluyen uno o más sustituyentes añadidos o diferentes, grupos funcionales análogos, etc., y que tienen un efector inhibidor similar sobre una o más proteínas SMAD. Los factores o combinaciones de factores adecuados pueden identificarse, por ejemplo, poniendo en contacto hESC con dicho factor o factores y controlando la adopción de fenotipos de células madre de la cresta neural, tales como la expresión de genes característicos (que incluye la expresión de los marcadores descritos en la presente, la expresión de un gen indicador acoplado al promotor de células madre de la cresta neural o similares) o la capacidad de formar CEC u otro tipo de células capaz de diferenciarse a partir de células madre de la cresta neural.

En ejemplos de realizaciones, pueden cultivarse células hES, tales como células hES que están en proceso de inducción de la cresta neural, en presencia de SB431542, que puede estar presente en el medio de cultivo a una concentración tan baja como 10 nM, 20 nM, 50 nM, 0,1 μ M, o menor, o tan alta como 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, o mayor, tal como de 10 nM a 100 μ M, de 0,1 μ M a 50 μ M, 0,1-20 μ M, o 1-20 μ M, preferiblemente a aproximadamente 10 μ M. En ejemplos de realizaciones, pueden cultivarse células hES, tales como células hES que están en proceso de inducción de la cresta neural, en presencia de nogina, que puede estar presente en el medio de cultivo a una concentración tan baja como 10 ng, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, o menor, o tan alta como 700 ng/ml, 1000 ng/ml, 1500 ng/ml, 2000 ng/ml, 3000 ng/ml, 4000 ng/ml, 5000 ng/ml, o mayor, tal como de 10 ng/ml a 5.000 ng/ml, de 100 ng/ml a 700 ng/ml, o de 400 ng/ml a 600 ng/ml, preferiblemente a aproximadamente 500 ng/ml. Las células hES también pueden cultivarse con combinaciones de SB431542 y nogina, por ejemplo, combinaciones de las anteriores combinaciones.

PDGFB

Los ejemplos de realizaciones del método descrito en la presente incluyen cultivar células madre de la cresta neural en presencia de PDGFB (por ejemplo, polipéptido de PDGFB humano, tal como NP_002599.1, o el polipéptido maduro contenido en su interior) y un medio de cultivo que comprende PDGFB (a veces denominado en la bibliografía PDGFB debido a su existencia como dímero). Se contempla que puedan usarse uno o más factores adicionales además o en lugar del PDGFB. Por ejemplo, se ha descrito que PDGFB señala a través de PDGFR β , que entonces activa la vía de PKC. Ambos PDGFR α y PDGFR β se expresan en la córnea en desarrollo, y así PDGFAA o PDGFAB pueden ser adecuados para su uso además o en lugar del PDGFB. Como otro ejemplo, puede usarse 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (que se cree que activa PKC) en lugar o además del PDGFB. VEGF está relacionado desde el punto de vista estructural con PDGF y, por tanto, también puede usarse en lugar o además del PDGFB.

En ejemplos de realizaciones, se cultivan cultivos que comprenden células madre de la cresta neural, tal como en un cultivo que comprende células hES después de comenzar la inducción de la cresta neural o durante la inducción de la cresta neural, en presencia de PDGFB, que puede estar presente en el medio de cultivo a una concentración tan baja como 0,1 ng/ml, 0,2 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, o menor, o tan alta como 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, 125 ng/ml, 150 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, o mayor, tal como de 0,1 ng/ml a 250 ng/ml, de 0,5 ng/ml a 150 ng/ml, 1-50 ng/ml, 2-20 ng/ml, preferiblemente a aproximadamente 10 ng/ml.

DKK2

Los ejemplos de realizaciones del método descrito en la presente incluyen cultivar células en presencia de DKK2 (por ejemplo, polipéptido de DKK2 humano, tal como NP_055236.1, o el polipéptido maduro contenido en su interior) y un medio de cultivo que comprende DKK2. Por ejemplo, pueden cultivarse células madre de la cresta neural (obtenidas de células hES en diferenciación o de otras fuentes) y/o células hES en diferenciación cultivadas bajo condiciones que se espera que produzcan células madre de la cresta neural (por ejemplo, cultivar en presencia de inhibidores de SMAD duales) en presencia de DKK2. Se contempla que puedan usarse uno o más factores adicionales además o en lugar del DKK2, por ejemplo, un agonista de DKK2. Se ha demostrado que DKK2 es tanto un inhibidor como un activador de la vía de Wnt en diversos contextos dependientes de células. Los ejemplos de agonistas de DKK2 incluyen cualquier activador y/o inhibidor de la vía de Wnt que puede reemplazar funcionalmente al DKK2 en la diferenciación de CEC. Cuando DKK2 actúa como inhibidor, se ha descrito que se une al correceptor LRP5/6 y Kremen, que entonces provocan que el receptor se internalice y se degrade. Por ejemplo, puede usarse un ARNi que se dirija e inactive la expresión de LRP5/6 o Kremen, además o en lugar del DKK2. También pueden

usarse inhibidores de la vía de Wnt, tales como DKK 1, 3, 4 y Soggy, proteínas relacionadas con el encrespamiento segregadas ("secreted frizzled related proteins", Frzb), y el factor inhibidor de Wnt (WIF) además o en lugar del DKK2. Otro inhibidor de la vía de Wnt potencialmente adecuado es la caseína quinasa 1-7, que se espera que bloquee la transducción de señales. También pueden usarse factores (tales como moléculas pequeñas) que afectan a la β -catenina, por ejemplo, factores que estabilizan o desestabilizan a la β -catenina, además o en lugar del DKK2. Además puede usarse la modulación de miembros del factor de transcripción TCF/LEF además o en lugar del DKK2. Los ejemplos de activadores de la vía de Wnt incluyen proteínas de Wnt, ácidos nucleicos que codifican proteínas de Wnt, LiCl, inhibidores de reguladores negativos de la vía de Wnt (por ejemplo, ARNi u otros inhibidores que se dirigen a la axina y/o APC), norrina, R-espondina2. Los activadores de la vía de Wnt de molécula pequeña incluyen: (hetero)arilpirimidinas, IQ1, BIO(6-bromoindirubina-3'-oxima), 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, WAY-316606, QS11, SB-216763, SB-216763, y DCA. Los inhibidores de la vía de Wnt de molécula pequeña incluyen: IWR, pirvinio, ICG-001, PKF115-584 (y varios otros compuestos), IWP, Ant1.4Br/Ant 1.4Cl, niclosamida, apiculareno y bafilomicina, XAV939, NSC668036, 2,4-diaminoquinazolina, y quercetina. Otros ejemplos de inhibidores de la vía de WNT que pueden utilizarse incluyen ID8 (Hasagawa *et al.*, Stem Cells Transl Med., enero de 2012, 1(1):18-28), Wnt C59 (Proffitt Cancer Res., publicado por primera vez en la red el 27 de noviembre de 2012; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-2258), CGK062 (Gwak *et al.*, PLoS ONE, 2012; 7(10):e46697), IWP2 (Blauwkamp *et al.*, Nat Commun., 2012, 3:1070), FH535 (Iida *et al.*, PLoS One, 2012; 7(9):e44418); y Riluzole (Zhao *et al.*, J. Biomol. Screen, octubre de 2012, 17(9):1252-63). También pueden usarse combinaciones de los anteriores factores además o en lugar del DKK2, por ejemplo, combinaciones que comprenden más de un activador de la vía de Wnt, más de un inhibidor de la vía de Wnt, o al menos un activador de la vía de Wnt y al menos un inhibidor de la vía de Wnt.

En ejemplos de realizaciones, se cultivan cultivos que comprenden células madre de la cresta neural, tal como en un cultivo que comprende células hES después de comenzar la inducción de la cresta neural o durante la inducción de la cresta neural, en presencia de DKK2, que puede estar presente en el medio de cultivo a una concentración tan baja como 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, o menor, o tan alta como 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/ml, o mayor, tal como 1 ng/ml-15 μ g/ml, 10 ng/ml-15 μ g/ml, 1 ng/ml-1 μ g/ml, 1 ng/ml-100 ng/ml, 2 ng/ml-20 ng/ml, o 5 ng/ml-20 ng/ml, preferiblemente a aproximadamente 10 ng/ml.

Proteína 7 similar a angiopoietina (ANGPL7)

En otros experimentos, los resultados obtenidos por los presentes inventores cuando ANGPL7 se incluye en el medio de cultivo (en combinación con DKK2 y PDGFB) en los métodos descritos en el ejemplo 1, las CEC resultantes mostraron una mayor compactación y una morfología más hexagonal. Estos resultados indican que ANGPL7 puede ser un factor positivo para generar células endoteliales corneales, en particular para producir CEC en una lámina o capa de alta densidad que puede preferirse para el trasplante. Por consiguiente, puede utilizarse opcionalmente ANGPL7 en la diferenciación de células endoteliales corneales, por ejemplo, mediante su inclusión en el cultivo durante y/o después de la formación de las células endoteliales corneales. Puede usarse ANGPL1-8 en lugar o además de ANGPL7.

FGF2

En ejemplos de realizaciones, FGF2 puede estar presente en cultivos de células hES, por ejemplo, durante la inducción de la cresta neural, y puede estar presente en el medio de cultivo a una concentración tan baja como 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, o menor, o hasta 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, o 1 μ g/ml, tal como 1 ng/ml-1 μ g/ml, 1 ng/ml-100 ng/ml, 2 ng/ml-10 ng/ml, 6 ng/ml-100 ng/ml, preferiblemente a aproximadamente 6 ng/ml.

En ejemplos de realizaciones, FGF2 puede estar presente en cultivos de células madre de la cresta neural o CEC, por ejemplo, durante la diferenciación a partir de células madre de la cresta neural o en cultivos que comprenden CEC, y puede estar presente en el medio de cultivo a una concentración tan baja como 0,1 ng/ml, 0,2 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, o menor, o hasta 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, o 1 μ g/ml, tal como 0,1 ng/ml-1 μ g/ml, 0,1 ng/ml-400 ng/ml, 0,1 ng/ml-100 ng/ml, 0,1 ng/ml-10 ng/ml, 1 ng/ml-100 ng/ml, preferiblemente a aproximadamente 6 ng/ml.

B27

B27 (líquido de suplemento sin suero B-27 (50 $\times$), Invitrogen n.º de catálogo 17504-044) es un suplemento de medio de cultivo que contiene d-biotina, BSA, L-carnitina HC, corticosterona, etanolamina HCl, D-galactosa (anhid.), insulina (humana, Zn), ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, putrescina.2HCl, selenita de sodio (1000 $\times$), complejo de T-3/albumina, transferrina (humana, pobre en hierro), y acetato de vitamina A, que se prepara en agua destilada (Brewer *et al.*, J. Neurosci. Res., 35:567-576 (1993)). En ejemplos de realizaciones, las CEC pueden cultivarse en un medio que comprende B27 (tal como después de la diferenciación o durante la diferenciación) a una concentración tan baja como 0,01 $\times$, 0,02 $\times$, 0,05 $\times$, 0,1 $\times$, o menor, o tan alta como 0,5 $\times$, 1 $\times$, 2 $\times$, 3 $\times$, 5 $\times$, 10 $\times$, o mayor, tal como 0,01 $\times$ -10 $\times$, 0,02 $\times$ -5 $\times$, 0,05 $\times$ -1 $\times$, o 0,1 $\times$ -1 $\times$, preferiblemente a aproximadamente 0,1 $\times$.

TGF β 2

Los solicitantes contemplan que pueda usarse TGF β 2 para estimular la diferenciación de células madre de la cresta

neural para producir células endoteliales corneales. Por ejemplo, en ratones que carecen de ambas copias de TGFβ2, el endotelio corneal está ausente. Aunque la cresta neural migre en el momento y al lugar correctos, no se forma el endotelio corneal. Además, TGFβ2 se expresa en abundancia en el cristalino en el momento en que la cresta neural se encuentra adyacente al cristalino. Basándose en parte en lo anterior, los solicitantes contemplan que, en ejemplos de realizaciones, pueda usarse TGFβ2 para estimular la diferenciación de la cresta neural en células endoteliales corneales.

Factores que estimulan la proliferación de células endoteliales corneales

En la presente también se describe el uso de uno o más factores que estimulan la proliferación de células endoteliales corneales. Por ejemplo, estos factores pueden incluirse en un cultivo de células durante y/o después de la formación de las células endoteliales corneales. Los ejemplos concretos de factores incluyen el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y/o el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), que han demostrado que inducen la proliferación en células endoteliales corneales cultivadas (Wilson *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., julio de 1993, 34(8):2544-61).

IL1α

Se ha demostrado que IL1α sobreexpone HGF y KGF en fibroblastos estromáticos corneales. Los solicitantes contemplan que IL1α pueda contribuir también a la formación y/o el mantenimiento de células endoteliales corneales. Por consiguiente, en ejemplos de realizaciones, puede incluirse IL1α en un cultivo de células durante y/o después de la formación de las células endoteliales corneales.

Láminas, monocapas, cultivos y preparaciones farmacéuticas

En la presente se describe un cultivo de células endoteliales corneales, tal como una lámina o monocapa de CEC, en el que las CEC son producidas mediante la diferenciación de células madre embrionarias. La lámina o monocapa puede presentar una densidad de células de al menos 1.000 células/mm², al menos 1.500 células/mm², 2.000 células/mm², al menos 2.500 células/mm², al menos 3.000 células/mm², al menos 3.500 células/mm², al menos 4.000 células/mm², al menos 4.500 células/mm², al menos 5.000 células/mm², o más. Opcionalmente, la lámina o monocapa de células endoteliales corneales puede comprender también una membrana de Descemet u otra matriz producida por las células endoteliales corneales. Por ejemplo, puede prepararse una matriz a partir de un medio acondicionado por CEC (por ejemplo, CEC producidas a partir de células hES), por ejemplo, concentrando proteínas en dicho medio y añadiendo opcionalmente componentes de la matriz, factores de crecimiento o similares.

Se ha descrito que CEC derivadas de donante acumulan numerosos marcadores y cambios en la expresión génica que se cree que son el resultado de daños oxidativos acumulados y otros ataques. Véase Joyce *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 24 de marzo, 2011, vol. 52, n.º 3, 1641-1649. Se espera que las CEC producidas mediante los presentes métodos muestren uno o más atributos de CEC "juveniles". Por ejemplo, comparado con CEC derivadas de donante (en especial, CEC derivadas de adulto), se espera que las CEC puedan mostrar menores niveles de daños oxidativos; focos de daños en el ADN nuclear; menores niveles de expresión de p21Cip1; menores niveles de expresión de p16INK4a; menores niveles de expresión de la proteína citoglobina; menores niveles de expresión de la proteína GPX-1, y menores niveles de expresión de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG).

También se describen métodos para cultivar CEC, o sus precursores, de la presente descripción, comprendiendo dichos métodos cultivar dichas CEC, o sus precursores, sobre un soporte, en los que dichos métodos pueden incluir opcionalmente trasladar o liberar una lámina o monocapa de CEC, o sus precursores, sobre dicho soporte. También se describen métodos para preparar una composición que comprende CEC, o sus precursores, de la presente descripción, comprendiendo dichos métodos cultivar dichas CEC, o sus precursores, sobre un soporte, que puede incluir opcionalmente trasladar o liberar una lámina o monocapa de CEC, o sus precursores, sobre dicho soporte, en la que dicha composición puede ser adecuada para el trasplante. También se describen cultivos de CEC, o sus precursores, de la presente descripción, comprendiendo dichos cultivos CEC, o sus precursores, que están adheridas a un soporte. Ciertos ejemplos de soportes pueden resultar adecuados para el trasplante. Los ejemplos de soportes incluyen soportes que pueden disolverse o desaparecer de otro modo *in vivo* cuando la lámina o monocapa de células endoteliales corneales se trasplanta a un organismo hospedante, tal como gelatina (véase Hsiue *et al.*, supra). Otros ejemplos de soportes incluyen matrices basadas en fibrina, botones corneales desnudos de endotelio, membrana de Descemet desnuda, directamente sobre la capa estromática, por ejemplo, córnea estromática desvitalizada (por ejemplo, procedente de un cadáver humano o de animal no humano), discos estromáticos corneales frescos (procedentes de un ser humano o de un animal no humano) y/o una membrana amniótica (preferiblemente sin células amnióticas). Las dimensiones y/o el espesor del soporte son preferiblemente adecuados para la implantación en el ojo, por ejemplo, un espesor de aproximadamente 100 micrómetros o menos.

Por ejemplo, las CEC, o sus precursores, pueden cultivarse sobre un sustrato a partir del cual puede liberarse una lámina o monocapa intacta de células, por ejemplo, un sustrato tal como un polímero que responde al calor, tal como una superficie injertada con poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) que responde al calor, sobre la cual las células se adhieren y proliferan a la temperatura de cultivo, y después, tras un desplazamiento de temperatura, se alteran las características de superficie, lo cual provoca la liberación de las láminas de células cultivadas (por ejemplo, enfriando por debajo de la temperatura de disolución crítica más baja ("lower critical solution temperature", LCST) (véase da Silva *et al.*, Trends Biotechnol., diciembre de 2007, 25(12):577-83; Hsiue *et al.*, Transplantation, 2006, 15 de febrero, 81(3):473-6; Ide, T. *et al.* (2006), Biomaterials, 27, 607-614; Sumide, T. *et al.* (2005), FASEB J., 20, 392-

394; Nishida, K. *et al.* (2004), Transplantation, 77, 379-385; y Nishida, K. *et al.* (2004), N. Engl. J. Med., 351, 1187-1196). Por ejemplo, pueden liberarse CEC cultivadas sobre un soporte, tal como un soporte adecuado para el trasplante, por ejemplo, tal como se describe en el párrafo anterior.

Como otro ejemplo, las CEC, o sus precursores, pueden estar contenidas en un material laminado, que puede comprender una lámina transparente de colágeno de tipo I que opcionalmente ha sido revestida con un factor adhesivo o un bioadhesivo y una capa cultivada de CEC, o sus precursores, proporcionadas sobre dicha lámina transparente de colágeno de tipo I, en la que dicha lámina transparente de colágeno de tipo I puede tener un espesor que varía de 5 a 50 micrómetros. El factor adhesivo o capa bioadhesiva puede encontrarse en el lado opuesto a la capa cultivada de células endoteliales corneales humanas y/o entre dicha lámina transparente de colágeno de tipo I y dichas CEC, o sus precursores. El factor adhesivo puede ser una fibronectina, por ejemplo, fibronectina plasmática humana. Por ejemplo, puede prepararse un material laminado colocando o liberando una capa o monocapa de CEC, o sus precursores, sobre una lámina transparente de colágeno de tipo I que opcionalmente ha sido revestida con un factor adhesivo o un bioadhesivo y/o cultivando una suspensión que comprende CEC, o sus precursores, en contacto con dicha lámina transparente de colágeno de tipo I, y dejando que dichas células formen un material laminado que comprende CEC, o sus precursores. Otros ejemplos de composiciones, sustratos, métodos y similares, en los que pueden usarse las células de la presente descripción, se describen en la patente de EE.UU. n.º 7.959.939 y el documento US 2010/0233240.

La presente descripción describe cultivos que comprenden células endoteliales corneales. Tal como se describe también en la presente, las CEC de la presente descripción pueden mantenerse en cultivo durante periodos prolongados de tiempo y pueden formar una población que no se está dividiendo.

Los ejemplos de composiciones pueden incluir un inhibidor de la quinasa asociada a Rho (ROCK), tal como Y-27632 (también denominado (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano o mediante su nombre IUPAC (1R,4r)-4-((R)-1-aminoetil)-N-(piridin-4-il)ciclohexancarboxamida; véase Watanabe *et al.*, Nat Biotechnol., junio de 2007, 25(6):681-6)), preferiblemente en una cantidad suficiente para estimular la supervivencia de las células. Véase, por ejemplo, Okumura *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2009, 50:3680-3687; Okumura *et al.*, Br. J. Ophthalmol., julio de 2011, 95(7):1006-9; las solicitudes de patente de EE. UU. publicadas 2010/0209402 y 2010/0233240.

Las CEC pueden cultivarse en presencia de Y-27632 y/u otro inhibidor de ROCK, por ejemplo, antes, durante y/o después de la transferencia, lo cual puede mejorar la viabilidad de las células. Otros ejemplos de inhibidores de ROCK incluyen moléculas pequeñas, ARNip, miARN, ARN antisentido o similares, que pueden dirigirse a una quinasa asociada a rho o a un miembro de la vía de señalización de ROCK. Los ejemplos de inhibidores de ROCK incluyen H-1152, Y-30141, Wf-536, HA-1077, hidroxil-HA-1077, GSK269962A y SB-772077-B, 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina (fasudilo), (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano (Y-27632), así como sus sales, preferiblemente las sales farmacéuticamente aceptables, tales como las sales clorhidrato. El inhibidor de ROCK puede tener una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 50 microM, por ejemplo, al menos o aproximadamente 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 microM, incluyendo cualquier intervalo derivado de estas, o cualquier concentración eficaz para estimular el crecimiento y/o la supervivencia de las células.

Las CEC de la presente descripción también pueden cultivarse bajo condiciones que estimulan la proliferación. Por ejemplo, las CEC pueden ponerse en contacto con una cantidad eficaz de al menos un factor de crecimiento que estimula la proliferación de células endoteliales corneales (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente con una proteína de la superficie celular sobre la célula endotelial corneal humana adulta que está implicada en la adhesión entre células, tal como un anticuerpo que se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste en una cadherina, proteína ZO-1, y conexina-43, que puede provocar la interrupción de los contactos entre células en al menos 15%, al menos 50%, o al menos 80% de las CEC, en la que la concentración de dicho factor de crecimiento puede ser de aproximadamente 0,02-3,0 mg/ml o de aproximadamente 0,2-2,0 mg/ml); y después exponerse a una cantidad eficaz de al menos un agente que estimula la interrupción de los contactos entre células de células endoteliales corneales adyacentes (tal como un quelante de calcio, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o etilenglicol-ácido bis[beta-aminoetil éter]-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA)), y, opcionalmente, poner en contacto después las CEC con una cantidad eficaz de al menos un factor de crecimiento que estimula la proliferación de células endoteliales corneales (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente con una proteína de la superficie celular sobre la célula endotelial corneal humana adulta que está implicada en la adhesión entre células, tal como un anticuerpo que se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste en una cadherina, proteína ZO-1, y conexina-43, que puede provocar la interrupción de los contactos entre células en al menos 15%, al menos 50%, o al menos 80% de las CEC, en la que la concentración de dicho factor de crecimiento puede ser de aproximadamente 0,02-3,0 mg/ml o de aproximadamente 0,2-2,0 mg/ml). Además, las CEC pueden cultivarse en un medio que comprende un medio de cultivo de células sin suero que comprende insulina, transferrina, y selenio; factor de crecimiento de fibroblastos (pituitaria); factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento nervioso; un quelante de calcio y, opcionalmente, una disolución de antibióticos antimicóticos. Véase la patente de EE. UU. n.º 6.548.059; y Senoo *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, septiembre de 2000, vol. 41, n.º 10, pp. 2930-2935.

Como otro ejemplo, las CEC pueden cultivarse en un medio que comprende insulina; transferrina; selenio; factor de crecimiento nervioso 1-100 ng/ml; factor de crecimiento de fibroblastos (pituitaria) 5-400 ng/ml; factor de crecimiento epidérmico 1-200 ng/ml; suero bovino fetal al 1-25%; ácido ascórbico 10-50 microgramos/ml; lípidos humanos al

0,001-0,01%; sulfato de condroitina al 0,01-0,12%; cloruro de calcio 100-300 microgramos/ml. Opcionalmente, el medio puede comprender además uno o más de gentamicina 10-100 microgramos/ml; disolución de múltiples vitaminas de RPMI-1640 (1/50-1/200); y disolución de un antibiótico antimicótico (1/50-1/200). Por ejemplo, las CEC pueden cultivarse en un medio de crecimiento que puede comprender factor de crecimiento nervioso 20 ng/ml; factor de crecimiento de fibroblastos (pituitaria) 40 ng/ml; factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml; suero bovino fetal al 8%; ácido ascórbico 20 microgramos/ml; lípidos humanos al 0,005%; sulfato de condroitina al 0,08%; cloruro de calcio 200 microgramos/ml. Opcionalmente, el medio puede comprender además uno o más de: gentamicina 50 microgramos/ml; disolución de múltiples vitaminas de RPMI-1640 (1/100); y disolución de un antibiótico antimicótico (1/100). Véase la patente de EE. UU. n.º 6.541.256.

Como otro ejemplo, las CEC pueden colocarse o cultivarse sobre una membrana amniótica, tal como el lado de la membrana basal de la membrana amniótica, por ejemplo, con o sin células amnióticas, en la que la membrana amniótica puede tener una matriz extracelular. Las CEC pueden colocarse sobre la membrana amniótica como una lámina o aplicarse como células individuales, tales como células en una suspensión y puede dejarse que se asienten mediante gravedad y/o centrifugación. Las CEC pueden cultivarse sobre la membrana amniótica y dejar que proliferen. Las CEC colocadas o cultivadas sobre una membrana amniótica también pueden utilizarse como injerto quirúrgico (o utilizarse para la fabricación de un medicamento), por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad de las células endoteliales corneales. Véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. n.º 2007/0254361.

Métodos terapéuticos

En la presente se describen métodos terapéuticos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades, preferiblemente enfermedades que afectan a las células endoteliales corneales o que pueden tratarse mediante su trasplante o administración, que incluyen, por ejemplo, enfermedades primarias, tales como distrofia de Fuch, síndrome endotelial iridocorneal, distrofia polimorfa posterior, y distrofia endotelial hereditaria congénita, y enfermedades secundarias para las cuales un tratamiento eficaz es el reemplazo del endotelio corneal, que incluyen las distrofias corneales, el uso de lentillas, la cirugía de cataratas y el fracaso endotelial tardío en el trasplante de córnea.

Los ejemplos de métodos terapéuticos pueden incluir además la administración de un agente inmunosupresor. Los inmunosupresores que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a un anticuerpo policlonal antiglobulina de linfocitos (ALG), un anticuerpo policlonal antiglobulina de timocitos (ATG), azatioprina, BASILIXIMAB® (anticuerpo antirreceptor de IL-2R α), ciclosporina (ciclosporina A), DACLIZUMAB® (anticuerpo antirreceptor de IL-2R α), everolimus, ácido micofenólico, RITUXIMAB® (anticuerpo anti-CD20), sirolimus, tacrolimus, micofenolato mofetilo, corticosteroides y células madre mesenquimáticas. Los inmunosupresores pueden dosificarse al menos a aproximadamente 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/kg. Cuando se emplean inmunosupresores, estos pueden administrarse de modo sistémico o local, y pueden administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración de las CEC. La terapia inmunosupresora puede continuar durante semanas, meses, años o de modo indefinido después de la administración de las células. Por ejemplo, al paciente se le puede administrar ciclosporina 5 mg/kg durante 6 semanas después de la administración de las CEC. Además, una composición de CEC puede comprender un agente inmunosupresor, por ejemplo, cualquiera de los anteriores.

En la presente se describen métodos terapéuticos que comprenden el trasplante de una lámina o monocapa cultivada de CEC, o sus precursores, al ojo de un sujeto que lo necesite, por ejemplo, un individuo que padece una enfermedad de las células endoteliales corneales. Por ejemplo, el ojo del sujeto puede prepararse mediante la retirada de la membrana de Descemet, y dicha lámina o monocapa cultivada de CEC puede colocarse en la cámara anterior de dicho ojo, por ejemplo, en contacto (y preferiblemente unida o fijada) al estroma corneal posterior. Opcionalmente, la lámina o monocapa de CEC, o sus precursores, pueden proporcionarse sobre un vehículo, por ejemplo, como se describió anteriormente, y administrarse al ojo de un paciente.

Un ejemplo de tratamiento que puede preferirse desde el punto de vista clínico cuando solo está comprometido el endotelio corneal, es el pelado de la membrana de Descemet con queratoplastia endotelial (DSEK), que incluye la retirada de la membrana de Descemet y el endotelio corneal enfermos, y el posterior trasplante de tejido de donante. Se han desarrollado procedimientos para reemplazar la córnea completa (queratoplastia penetrante o PK) o mantener la membrana de Descemet y el endotelio del paciente y reemplazar el resto de las capas por tejido de donante (queratoplastia laminar). Véase, en general, la patente de EE. UU. n.º 5.755.785, la patente de EE. UU. n.º 5.649.944, la patente de EE. UU. n.º 7.147.648, la patente de EE. UU. n.º 7.300.653, la patente de EE. UU. n.º 5.584.881, la patente de EE. UU. n.º 5.686.414, la patente de EE. UU. n.º 7.300.654, la solicitud de patente con n.º de serie 10/525.391. Están desarrollándose otros métodos de reemplazo quirúrgico de endotelio corneal, que incluyen la queratoplastia endotelial de la membrana de Descemet ("Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty", DMEK), en la que el tejido de donante consiste solo en membrana de Descemet y endotelio corneal. Otra vía terapéutica potencialmente prometedora es la reconstrucción endotelial corneal, en la que se cultivan células endoteliales corneales *in vitro* antes del trasplante. Por ejemplo, se cultivaron células corneales humanas donadas sobre un polímero, se liberaron sobre un disco de gelatina bioadhesivo, y después se integraron con éxito en córneas de conejo desnudas, disolviéndose el disco de gelatina después del trasplante (Hsiue *et al.*, Transplantation, 2006, 15 de febrero, 81(3):473-6). Sin embargo, los métodos que utilizan células de cultivo presuponen una fuente de dichas células y, por tanto, se ven afectados por la escasez de tejidos donados adecuados, tal como se describió anteriormente. Además, debido a las diferencias entre las células donadas, puede resultar difícil producir cultivos de células endoteliales corneales de calidad y eficacia constantes. Los obstáculos legales también pueden hacer que estos métodos sean difíciles de llevar a cabo, desde el punto de vista logístico,

debido a la posibilidad de que haya que realizar ensayos exhaustivos para determinar la seguridad y/o la eficacia de las células obtenidas de cada donante. Se describen más a fondo estos y otros métodos terapéuticos en Thomas John, Corneal Endothelial Transplant: DSAEK, DMEK & DLEK (JP Medical Ltd., 2010).

5 Los ejemplos de composiciones de la presente descripción pueden ser formulaciones adecuadas para su uso para tratar a un paciente humano, tal como formulaciones apirógenas o fundamentalmente apirógenas y sin patógenos. Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas para su uso en esta descripción pueden estar en una forma apirógena, sin patógenos y fisiológicamente aceptable.

La preparación puede ser adecuada para la administración a un paciente humano y, más preferiblemente, es apirógena y/o no contiene productos de animales no humanos.

10 La preparación puede ser adecuada para la administración a un mamífero veterinario no humano, tal como un perro, gato o caballo.

Definiciones

15 A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque pueden emplearse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la invención o en el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Para definir más concretamente la invención, en la presente se proporcionan los siguientes términos, expresiones y definiciones.

20 Tal como se emplea en la presente en la descripción y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "un/una" y "el/la" incluye la referencia en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se emplea en la presente en la descripción, el significado de "en" incluye "en" y "sobre", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 A lo largo de esta memoria descriptiva, el término "comprende" o variaciones tales como "que comprende" o "comprendiendo", implican que incluyen un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

30 Un "agonista" (tal como un "agonista de DKK2", "agonista de PDGFB", "agonista de SB431542", "agonista de nogina", etc.), tal como se emplea en la presente, se refiere al agente nombrado y a cualquier otro que puede actuar en su lugar. En el contexto de la diferenciación celular, un agonista de un factor concreto puede reconocerse porque se obtiene un resultado de diferenciación similar (tal como la formación de NCSC o CEC) en presencia del agonista y en ausencia (o menor concentración o duración de la exposición) de dicho agente. Un agonista también puede reconocerse, por ejemplo, porque tiene un efecto similar sobre un proceso afectado por el agente en cuestión (por ejemplo, un grado similar de activación o inhibición de la vía de Wnt).

35 Una "cantidad eficaz", tal como se emplea en la presente, se refiere de modo amplio a la cantidad de un compuesto o de células que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para realizar dicho tratamiento de la enfermedad. La cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para la profilaxis y/o una cantidad eficaz para la prevención. La cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para reducir, una cantidad eficaz para prevenir la aparición de señales/síntomas, para reducir la gravedad de la aparición de señales/síntomas, para eliminar la aparición de señales/síntomas, para frenar el desarrollo de la aparición de señales/síntomas, para prevenir el desarrollo de la aparición de señales/síntomas y/o para realizar una profilaxis sobre la aparición de señales/síntomas. La "cantidad eficaz" puede variar dependiendo de la enfermedad y su gravedad y de la edad, peso, historia médica, susceptibilidad y trastornos preexistentes del paciente que se va a tratar. La expresión "cantidad eficaz" es sinónima de "cantidad terapéuticamente" para los fines de esta invención.

45 Las "células pluripotenciales" y "células madre pluripotenciales", tal como se emplean en la presente, se refieren de modo amplio a una célula capaz de una proliferación prolongada o casi indefinida *in vitro* manteniendo, al mismo tiempo, su estado indiferenciado, que muestra un cariotipo estable (preferiblemente normal), y que tiene la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales (es decir, ectodermo, mesodermo y endodermo) bajo las condiciones apropiadas. Generalmente, las células pluripotenciales (a) son capaces de inducir teratomas cuando se trasplantan a ratones inmunodeficientes (SCID); (b) son capaces de diferenciarse en los tipos de células de las tres capas germinales (es decir, los tipos de células del ectodermo, mesodermo y endodermo); y (c) expresan al menos un marcador de células hES (tal como Oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno de la superficie SSEA 3, antígeno de la superficie SSEA 4, NANOG, TRA 1 60, TRA 1 81, SOX2, REX1). Los ejemplos de células pluripotenciales pueden expresar Oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno de la superficie SSEA 3, antígeno de la superficie SSEA 4, TRA 1 60 y/o TRA 1 81. Otros ejemplos de células pluripotenciales incluyen, pero no se limitan a células madre embrionarias, células pluripotenciales inducidas ("induced pluripotent cells", iPS), y células ES partenogénicas. Los ejemplos de células pluripotenciales pueden producirse sin destruir un embrión. Por ejemplo, pueden producirse células pluripotenciales inducidas a partir de células obtenidas sin destruir un embrión. Las células pluripotenciales (procedentes de cualquier fuente) pueden modificarse genéticamente o de otra manera para aumentar su longevidad, potencia, anidamiento o para introducir un factor deseado en las células que se diferencian de dichas células pluripotenciales (por ejemplo, MSC y hemangioblastos). Como ejemplos no limitantes, las células

pluripotenciales pueden modificarse genéticamente para que expresen Sirt1 (aumentando con ello la longevidad), para que expresen uno o más genes de la subunidad de telomerasa opcionalmente bajo el control de un promotor inducible o reprimible, para incorporar un marcador fluorescente, para incorporar partículas de óxido de hierro u otro reactivo de este tipo (que pueda utilizarse para rastrear las células a través de formación de imágenes *in vivo*, MRI, etc.; véase Thu *et al.*, Nat Med., febrero de 2012, 26, 18(3):463-7), para que expresen bFGF, lo cual puede mejorar la longevidad (véase Go *et al.*, J. Biochem., 142, 741-748 (2007)), para que expresen CXCR4 para el anidamiento (véase Shi *et al.*, Haematologica, julio de 2007, 92(7):897-904), para que expresen TRAIL recombinante para inducir la apoptosis mediada por caspasa en células de cáncer, tal como gliomas (véase Sasportas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, marzo de 2009, 24, 106(12):4822-7), etc.

“Embrión” o “embrionario”, tal como se emplea en la presente, se refiere de modo amplio a una masa de células en desarrollo que no se ha implantado en la membrana uterina de un hospedante materno. Una “célula embrionaria” es una célula que puede aislarse a partir de un embrión o que está contenida en un embrión. También incluyen blastómeros, obtenidos en una etapa tan temprana como la etapa de dos células, y blastómeros agregados.

Las “células madre embrionarias” (células ES o ESC) incluyen células pluripotenciales que pueden producirse a partir de células embrionarias, así como células pluripotenciales inducidas (descritas más a fondo a continuación). Las células ES generalmente incluyen al menos células ES de mamífero, tales como células ES humanas (“células hES” o “hESC”), así como murinas, de primate, de primate no humano, bovinas, porcinas, etc. Con frecuencia, dichas células son transferidas o han sido transferidas en serie como líneas celulares. Las células madre embrionarias pueden usarse como células madre pluripotenciales en los procesos de producción de hemangioblastos, tal como se describe en la presente. Por ejemplo, pueden producirse células ES mediante partenogénesis. Tal como se analizó más a fondo anteriormente (véase “células pluripotenciales”), las células ES pueden modificarse genéticamente o de otra manera para aumentar su longevidad, potencia, anidamiento o para introducir un factor deseado en las células que se diferencian de dichas células pluripotenciales (por ejemplo, MSC y hemangioblastos).

Las células ES pueden generarse con homocigosidad o hemicigosidad en uno o más genes HLA, por ejemplo, a través de manipulación genética, selección para la pérdida espontánea de heterocigosidad, etc. Las células ES pueden modificarse genéticamente o de otra manera para aumentar su longevidad, potencia, anidamiento o para introducir un factor deseado en las células que se diferencian de dichas células pluripotenciales (por ejemplo, MSC y hemangioblastos). Las células embrionarias, independientemente de su fuente o del método concreto utilizado para producirlas, generalmente poseen uno o más de los siguientes atributos: (i) la capacidad para diferenciarse en células de las tres capas germinales, (ii) la expresión de al menos Oct-4 y fosfatasa alcalina, y (iii) la capacidad para producir teratomas cuando se trasplantan a animales inmunocomprometidos. Las células madre embrionarias que pueden usarse en las realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a células ES humanas (“ESC” o “células hES”). Otros ejemplos de líneas celulares incluyen NED1, NED2, NED3, NED4, NED5 y NED7. Véase el Registro de células madre embrionarias humanas del NIH. Las células ES humanas usadas según los ejemplos de realizaciones de la presente invención pueden obtenerse y mantenerse según los estándares de GMP.

Los ejemplos de marcadores de células hES incluyen, pero no se limitan a: fosfatasa alcalina, Oct-4, Nanog, antígeno embrionario específico de estadio-3 (“Stage-specific embryonic antigen-3”, SSEA-3), antígeno embrionario específico de estadio-4 (SSEA-4), TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, Sox2, factor de crecimiento y diferenciación 3 (“growth and differentiation factor 3”, GDF3), expresión reducida 1 (“reduced expression 1”, REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (“fibroblast growth factor 4”, FGF4), gen específico de células embrionarias 1 (“embryonic cell-specific gene 1”, ESG1), asociado a la pluripotencialidad del desarrollo 2 (“developmental pluripotency-associated 2”, DPPA2), DPPA4, transcriptasa inversa de telomerasa (“telomerase reverse transcriptase”, hTERT), SALL4, E-CADHERINA, denominación de agrupamiento 30 (“Cluster designation 30”, CD30), Cripto (TDGF-1), GCTM-2, Génesis, factor nuclear de células germinales, y factor de células madre (“Stem cell factor”, SCF o ligando de c-Kit). Como otro ejemplo, las células madre embrionarias pueden expresar Oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno de la superficie SSEA 3, antígeno de la superficie SSEA 4, TRA 1 60 y/o TRA 1 81.

Las ESC pueden cocultivarse inicialmente con células de soporte embrionarias murinas (“murine embryonic feeder”, MEF). Las células MEF puede ser mitóticamente inactivadas mediante su exposición a mitomicina C antes de sembrar las ESC en un cocultivo y, así, las MEF no se propagan en cultivo. Además, los cultivos de células ESC pueden estudiarse al microscopio, y las colonias que no contienen morfologías de células ESC pueden escogerse y descartarse, por ejemplo, usando una herramienta de corte de células madre, mediante ablación con láser u otros medios. Generalmente, después del momento de recolección de las ESC para la siembra para la formación de cuerpos embrioides, no se emplean más células MEF.

Los ejemplos de marcadores de células ESC también pueden incluir, pero no se limitan a: fosfatasa alcalina, Oct-4, Nanog, antígeno embrionario específico de estadio-3 (SSEA-3), antígeno embrionario específico de estadio-4 (SSEA-4), TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, Sox2, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen específico de células embrionarias 1 (ESG1), asociado a la pluripotencialidad del desarrollo 2 (DPPA2), DPPA4, transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT), SALL4, E-CADHERINA, denominación de agrupamiento 30 (CD30), Cripto (TDGF-1), GCTM-2, Génesis, factor nuclear de células germinales, y factor de células madre (SCF o ligando de c-Kit).

Las “células madre pluripotenciales inducidas” o “células iPS” se refieren a otro ejemplo de tipo de células madre pluripotenciales generadas mediante la reprogramación de una célula somática expresando o induciendo la

expresión de una combinación de factores ("factores de reprogramación"). Las células iPS pueden generarse usando células procedentes de una diversidad de fuentes, tales como células somáticas fetales, postnatales, de recién nacido, juveniles o adultas. Las células iPS pueden obtenerse de un banco de células. Como alternativa, las células iPS pueden generarse *de novo* (por ejemplo, mediante procesos conocidos en la técnica) antes de comenzar la diferenciación para producir CEC, NCSC, o células de otro tipo. La fabricación de las células iPS puede ser una etapa inicial en la producción de células diferenciadas. Las células iPS pueden generarse específicamente usando material procedente de un paciente concreto o un donante compatible con el objetivo de generar células compatibles con tejidos. Las células iPS pueden producirse a partir de células que no son sustancialmente inmunogénicas en un receptor previsto, por ejemplo, pueden producirse a partir de células autólogas o a partir de células histocompatibles con un receptor previsto. Tal como se analizó más a fondo anteriormente (véase "células pluripotenciales"), las células pluripotenciales que incluyen células iPS pueden modificarse genéticamente o de otra manera para aumentar su longevidad, potencia, anidamiento o para introducir un factor deseado en las células que se diferencian de dichas células pluripotenciales (por ejemplo, MSC y hemangioblastos).

Como otro ejemplo, pueden generarse células madre pluripotenciales inducidas reprogramando una célula somática u otra célula poniendo en contacto la célula con uno o más factores de reprogramación. Por ejemplo, el factor o factores de reprogramación pueden ser expresados por la célula, por ejemplo, a partir de un ácido nucleico exógeno añadido a la célula, o a partir de un gen endógeno en respuesta a un factor, tal como una molécula pequeña, microARN o similares, que estimula o induce la expresión de ese gen (véase Suh y Blueloch, *Development*, 138, 1653-1661 (2011); Miyoshi *et al.*, *Cell Stem Cell* (2011), doi:10.1016/j.stem.2011.05.001; Sancho-Martínez *et al.*, *Journal of Molecular Cell Biology* (2011), 1-3; Anokye-Danso *et al.*, *Cell Stem Cell*, 8, 376-388, 8 de abril, 2011; Orkin y Hochedlinger, *Cell*, 145, 835-850, 10 de junio, 2011). Los factores de reprogramación pueden proceder de una fuente exógena, por ejemplo, se añaden al medio de cultivo, y pueden ser introducidos en las células por medio de métodos conocidos en la técnica, tales como por medio de acoplamiento a péptidos de entrada a células, agentes de transfección de proteínas o ácidos nucleicos, lipofección, electroporación, sistema de transporte de partículas biolístico (pistola de genes), microinyección y similares. Las células iPS pueden generarse usando células somáticas fetales, postnatales, de recién nacido, juveniles o adultas. En ciertas realizaciones, los factores que pueden usarse para reprogramar células somáticas para producir células madre pluripotenciales incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct-4 (a veces denominado Oct 3/4), Sox2, c-Myc, y Klf4. En otras realizaciones, los factores que pueden usarse para reprogramar células somáticas para producir células madre pluripotenciales incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct-4, Sox2, Nanog, y Lin28. En otras realizaciones, las células somáticas se reprograman expresando al menos 2 factores de reprogramación, al menos 3 factores de reprogramación o cuatro factores de reprogramación. En otras realizaciones, se identifican otros factores de reprogramación y se emplean solos o en combinación con uno o más factores de reprogramación conocidos para reprogramar una célula somática para que se convierta en una célula madre pluripotencial. Las células iPS generalmente pueden identificarse por la expresión de los mismos marcadores que las células madre embrionarias, aunque una línea de células iPS concreta puede variar en su perfil de expresión.

La célula madre pluripotencial inducida puede producirse expresando o induciendo la expresión de uno o más factores de reprogramación en una célula somática. La célula somática es un a fibroblasto, tal como un fibroblasto dérmico, un fibroblast sinovial o un fibroblasto de pulmón, o una célula somática que no es fibroblástica. La célula somática se reprograma expresando al menos 1, 2, 3, 4, 5 factores de reprogramación. Los factores de reprogramación pueden seleccionarse de Oct 3/4, Sox2, NANOG, Lin28, c Myc, y Klf4. La expresión de los factores de reprogramación puede inducirse mediante el contacto de las células somáticas con al menos un agente, tal como agentes de moléculas orgánicas pequeñas, que induce la expresión de los factores de reprogramación.

La célula somática también puede reprogramarse usando una estrategia combinatoria, en la que el factor de reprogramación se expresa (por ejemplo, usando un vector vírico, un plásmido y similares) y se induce la expresión del factor de reprogramación (por ejemplo, usando una molécula orgánica pequeña). Por ejemplo, los factores de reprogramación pueden ser expresados en la célula somática por medio de una infección usando un vector vírico, tal como un vector retrovírico o un vector lentivírico. Además, los factores de reprogramación pueden expresarse en la célula somática utilizando un vector no integrante, tal como un plásmido episómico. Véase, por ejemplo, Yu *et al.*, *Science*, 8 de mayo de 2009, 324(5928):797-801. Cuando los factores de reprogramación se expresan usando vectores no integrantes, los factores pueden expresarse en las células usando electroporación, transfección o transformación de las células somáticas con los vectores. Por ejemplo, en células de ratón, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, c myc, y Klf4) usando vectores víricos integradores es suficiente para reprogramar una célula somática. En células humanas, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, NANOG, y Lin28) usando vectores víricos integradores es suficiente para reprogramar una célula somática.

Una vez que los factores de reprogramación se expresan en las células, estas pueden cultivarse. Con el tiempo, aparecerán células con características de ES en la placa de cultivo. Las células pueden elegirse y subcultivarse basándose, por ejemplo, en la morfología de las ES, o basándose en la expresión de un marcador seleccionable o detectable. Las células pueden cultivarse para producir un cultivo de células que se parecen a células ES: son las células iPS putativas. Las células iPS generalmente pueden identificarse por la expresión de los mismos marcadores que otras células madre embrionarias, aunque una línea de células iPS concreta puede variar en su perfil de expresión. Los ejemplos de células iPS pueden expresar Oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno de la superficie SSEA 3, antígeno de la superficie SSEA 4, TRA 1 60 y/o TRA 1 81.

Para confirmar la pluripotencialidad de las células iPS, las células pueden ensayarse en uno o más ensayos de

pluripotencialidad. Por ejemplo, las células pueden ensayarse para la expresión de marcadores de células ES; las células pueden evaluarse para su capacidad para producir teratomas cuando se trasplantan a ratones SCID; y las células pueden evaluarse para la capacidad para diferenciarse para producir tipos de células de las tres capas germinales. Tras haber obtenido una célula iPS pluripotencial, esta puede usarse para producir hemangioblastos y células MSC.

Las “células derivadas de embriones” (“Embryo-derived cells”, EDC), tal como se describe en la presente, se refieren de modo amplio a células pluripotenciales u otras células madres pluripotenciales que incluyen endodermo, ectodermo y mesodermo primitivos y sus derivados. Las “EDC” excluyen a las células madre embrionarias humanas que han sido transferidas como líneas celulares.

Tal como se emplea en la presente, el término “marcador” o la expresión “marcador de células” se refiere a un gen (por ejemplo, en forma de ARN) o proteína cuya presencia identifica una célula o tipo de células concretos. Un marcador para una célula puede no limitarse a un solo marcador, y los marcadores pueden referirse a un “patrón” de marcadores, de modo que un grupo concreto de marcadores puede identificar una célula o tipo de célula de otra célula o tipo de célula, por ejemplo, un patrón que incluye la expresión de algunos marcadores y la ausencia o la baja expresión de otros marcadores indicativos de otros tipos de células. Por ejemplo, una población de CEC puede ser positiva para marcadores de CEC y negativa para marcadores indicativos de otros tipos de células, tales como la ausencia de marcadores que se expresan en otros tipos de células endoteliales, la ausencia de marcadores expresados por células hES y/o la ausencia de marcadores expresados por células madre de la cresta neural. Además, cuando la expresión de marcadores se detecta por medio de métodos de tinción de células (por ejemplo, inmunofluorescencia y similares), una célula puede identificarse como positiva para un marcador concreto por un patrón de tinción esperado, tal como la localización en las zonas de unión estrecha del marcador ZO-1. La expresión de los marcadores puede detectarse por medio de cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a: transferencia Western, métodos basados en la amplificación del ARNm (por ejemplo, PCR, amplificación isotérmica, etc., que pueden incluir una transcripción inversa y pueden aplicarse a la detección de la expresión a partir de células individuales o de múltiples células), transferencia Northern, inmunotinción, etc. Además, la expresión de dichos marcadores puede inferirse por la expresión de una construcción indicadora (tal como una proteína fluorescente cuya expresión puede detectarse de modo visual, un gen de resistencia a antibióticos cuya expresión puede detectarse por la supervivencia de células en presencia del antibiótico, etc.) bajo el control de un elemento genético que confiere la expresión específica del tipo de célula, tal como el promotor de uno de los anteriores marcadores o uno de sus fragmentos. Los ejemplos de construcciones indicadoras de la bibliografía son los genes pOCT4-GFP y pOCT4-LUC, que dirigen la expresión de GFP y luciferasa, respectivamente, en células ES, cuya expresión (de cualquiera de los dos) puede detectarse con facilidad usando metodologías convencionales. Otros métodos para detectar la expresión de marcadores que pueden usarse son conocidos en la técnica. Véase, en general, Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, 1988); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, 5ª edición, 2002); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición, 2001); Sambrook *et al.*, *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006).

Las “células endoteliales corneales” o “CEC” se refieren, en general, a células ricas en mitocondrias que tapizan (en un organismo vivo) la superficie posterior de la córnea y que están enfrentadas a la cámara anterior del ojo. Las CEC también pueden producirse a partir de otro tipo de célula, por ejemplo, mediante diferenciación de células madre de la cresta neural o células ES, usando los métodos descritos en la presente. Las CEC diferenciadas a partir de NCSC o células ES pueden identificarse o reconocerse porque muestran uno o más atributos de las CEC endógenas, tales como la expresión de marcadores de CEC, la capacidad para formar una monocapa de células con un tamaño uniforme con una forma predominantemente hexagonal, la capacidad para formar una “bomba con filtraciones” que permite la filtración de solutos y nutrientes desde el humor acuoso hacia las capas más superficiales de la córnea mientras que, al mismo tiempo, bombea activamente agua en la dirección opuesta, desde el estroma hacia el humor acuoso. Los ejemplos de marcadores de CEC incluyen, pero no se limitan a: Na⁺/K⁺-ATPasa, ZO-1, KLF13, AQP1, colágeno VIII, SLC16A3, CFTR, NBC1, CA2, AE2/SLC4A2, SCL16A1, CA12, CA4, FoxC1). Por ejemplo, las CEC generalmente expresan colágeno VIII, la bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa, y ZO-1, y no expresan vWF y CD31 (este último está presente en células endoteliales vasculares). Además, las CEC pueden expresar uno o más marcadores de la bomba endotelial corneal (que incluyen AQP1, CA2, CA4, CA12, SCL14A2, SLC16A1, SLC16A3, SLC16A7, CFTR, NHE1, ADCY10, canales aniónicos dependientes del voltaje VDAC2 y VDAC3, proteínas del canal de cloruro CLCN2 y CLC), marcadores de la cresta neural periocular (que incluyen PITX2 y FOXC1) y/o proteínas de adhesión celular y de matriz (que incluyen ocludina, conexina 43, antígeno 9.3E, colágeno III, colágeno IV, N cadherina, VE cadherina, E cadherina, beta-catenina, p120, p190 laminina alfa 4, nidógeno-2, y netrína 4). Por ejemplo, las CEC pueden expresar al menos un marcador de la bomba endotelial corneal, al menos un marcador de la cresta neural periocular, y al menos una proteína de adhesión celular y de matriz.

La “transferencia” se refiere en general a la retirada de células de un sustrato de cultivo, seguido por el cultivo en placa de las células para que crezcan sobre un sustrato de cultivo. Opcionalmente, la transferencia puede provocar un cambio en la densidad del cultivo, por ejemplo, un aumento o una disminución en el número de células por unidad de área. En ejemplos de realizaciones, las células pueden transferirse 1:1, es decir, pueden retirarse y volverse a cultivar en placa sobre sustratos de cultivo que tienen un área de cultivo por célula igual o aproximadamente igual. Las células también pueden transferirse a una proporción diferente, por ejemplo, 1:2 (es decir, tienen el doble de área de cultivo por célula), 1:3, 1:4, etc., o 2:1 (es decir, tienen la mitad del área de cultivo por célula), 3:1 (es decir, tienen tres veces el área de cultivo por célula), o proporciones mayores o menores o

proporciones no formadas por números enteros. La transferencia puede realizarse usando una diversidad de métodos diferentes para retirar las células del sustrato de cultivo. Los ejemplos de métodos incluyen el uso de agentes químicos, agentes enzimáticos y/o etapas mecánicas, por ejemplo, el uso de una disolución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tampón de disociación de células (Invitrogen, n.º de catálogo 13151-014) tampón de disociación de células suave (Stemcell Technologies, n.º de catálogo 07174), disolución de disociación de células sin enzimas basada en PBS (Millipore, n.º de catálogo S-014-C), disolución de disociación de células no enzimática (Sigma, n.º de catálogo C5789), Cellstripper (Cellgro, n.º de catálogo 25-056-CI), raspado mecánico, pinzas ópticas, catapultado con láser, tituración, circulación de un fluido (por ejemplo, mediante agitación orbital o balanceo), tripsina, acutasa, un colagenasa, tal como colagenasa B. Pueden usarse combinaciones, por ejemplo, uno o más agentes químicos o enzimáticos en combinación con tituración, balanceo, agitación u otro tipo de disociación mecánica. Un ejemplos de tampón de disociación de células preferido es EDTA al 0,02% en DPBS (0,5 mM) (Sigma, n.º de catálogo E8008-100ML), tampón de disociación de células (Invitrogen, n.º de catálogo 13151-014) y tampón de disociación de células suave (Stemcell Technologies, n.º de catálogo 07174). Otros ejemplos de tampones de disociación de células que pueden usarse incluyen disolución de disociación de células sin enzimas basada en PBS (Millipore, n.º de catálogo S-014-C), disolución de disociación de células no enzimática (Sigma, n.º de catálogo C5789), Cellstripper (Cellgro, n.º de catálogo 25-056-CI).

Tal como se emplea en la presente, la expresión “quinasa de linfoma anaplásico” se refiere a una familia de receptores asociados a membranas de tirosina quinasas asociadas a membranas que incluyen ALK4 (un receptor de activina), ALK5 (un receptor de TGF- β 1), ALK7 (un receptor de proteínas Nodal y relacionadas con Nodal).

Las “señales” de enfermedad, tal como se emplean en la presente, se refieren, de modo amplio, a cualquier anomalía indicativa de enfermedad, que puede descubrirse tras el examen del paciente; es una indicación objetiva de enfermedad, por contraste con un síntoma, que es una indicación subjetiva de enfermedad.

Los “síntomas” de enfermedad, tal como se emplean en la presente, se refieren, de modo amplio, a cualquier fenómeno mórbido o alejamiento de lo normal con respecto a la estructura, función o sensación experimentada por el paciente y que es indicativo de enfermedad.

“Terapia”, “terapéutico”, “tratar” o “tratamiento”, tal como se emplean en la presente, se refieren, de modo amplio, a tratar una enfermedad, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o trastorno o sus síntomas clínicos y/o aliviar la enfermedad o trastorno, provocando la regresión de la enfermedad o trastorno o sus síntomas clínicos. La terapia incluye la profilaxis, la prevención, el tratamiento, la cura, el remedio, la reducción, el alivio y/o proporcionar alivio de una enfermedad, las señales y/o los síntomas de una enfermedad. La terapia incluye el alivio de las señales y/o síntomas en pacientes con señales y/o síntomas de enfermedad en curso. La terapia también incluye la profilaxis y la prevención. La profilaxis incluye prevenir una enfermedad que aparece después del tratamiento de una enfermedad en un paciente o reducir la incidencia o la gravedad de la enfermedad en un paciente. El término “reducir”, con respecto a la terapia, se refiere de modo amplio a una reducción clínica significativa de las señales y/o síntomas. La terapia incluye tratar las recaídas o señales y/o síntomas recurrentes. La terapia incluye, pero no se limita a evitar la aparición de señales y/o síntomas en cualquier momento, así como reducir las señales y/o síntomas existentes y eliminar las señales y/o síntomas existentes. La terapia incluye tratar una enfermedad crónica (“de mantenimiento”) y una enfermedad aguda. Por ejemplo, el tratamiento incluye tratar o prevenir las recaídas o la recurrencia de señales y/o síntomas. Los ejemplos de tratamientos que pueden ser eficaces para enfermedades de las células endoteliales corneales se describen en la anterior sección “Métodos terapéuticos”.

Las “células madre de la cresta neural” o “NCSC” en general se refieren a una célula progenitora neural que tiene el potencial de desarrollar y producir células pigmentadas que coexpresan el marcador de melanosomas HMB45. Las células madre de la cresta neural pueden diferenciarse a partir de células hES, por ejemplo, usando inhibidores de SMAD duales, tal como se describe en la presente, o como se describe en el documento WO/2010/096496. Las células madre de la cresta neural pueden diferenciarse a partir de células hES usando una combinación de agonistas de Wnt (tales como, por ejemplo, Wnt3a y/o (2',3'E)-6-bromindirubina-3'-oxima (BIO)) e inhibidores de SMAD (tales como SB431542 y/o nogina); véase Menéndez *et al.*, PNAS, 29 de noviembre, 2011, vol. 108, n.º 48, 19240-19245. Por ejemplo, se ha indicado la inducción eficaz de NCSC después de poner en contacto hESC con SB431542, y BIO (con o sin nogina), o con Wnt3a y SB431542. Las NCSC también pueden obtenerse de cultivos de rosetas neurales, por ejemplo, cultivando células hES sobre células de soporte estromáticas MS5 (véase Lee, *et al.*, Stem Cells, 25(8), 1931-1393 (2007)). Las NCSC también pueden obtenerse a partir de numerosos tejidos, que incluyen el tubo neural, nervio ciático, intestino, y ganglios de la raíz dorsal de embriones en desarrollo; y ganglios de la raíz dorsal, médula ósea, piel, corazón, córnea, dientes y cuerpo caratoide de jóvenes y adultos. Véase Nagoshi *et al.*, Journal of Cellular Biochemistry, 107:1046-1052 (2009); Crane y Trainor, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2006, 22:267-86; y Blum, Brain Research Bulletin, 83 (2010), 189-193.

Las células madre de la cresta neural pueden identificarse por la expresión de marcadores identificados en la presente y conocidos en la técnica. Los ejemplos de marcadores de células madre de la cresta neural incluyen, pero no se limitan a: Sox10, AP2, HNK1, Pax3, PAX7, y p75 (NGFR), así como una expresión baja o ausente de Pax6.

Una “enfermedad de las células endoteliales corneales” o “enfermedades de las células endoteliales corneales” incluyen cualquier enfermedad o trastorno que puede tratarse mediante la administración de CEC, incluyendo enfermedades en las que las CEC del sujeto disminuyen de número o mueren, disminuyen en densidad o se convierten de otro modo en disfuncionales. Las principales enfermedades que afectan al endotelio corneal incluyen la distrofia de Fuch, el síndrome endotelial iridocorneal, la distrofia polimorfa posterior, y la distrofia endotelial

hereditaria congénita. Las enfermedades o trastornos secundarios para las cuales un tratamiento eficaz puede incluir el reemplazo del endotelio corneal incluyen distrofias corneales, el uso de lentillas, la cirugía de cataratas y el fracaso endotelial tardío en el trasplante de córnea. Las enfermedades de las células endoteliales corneales incluyen además cualquier lesión en la córnea, por ejemplo, provocada por irritación química, lesiones debidas al uso de lentillas, reacción o sensibilidad (por ejemplo, a las disoluciones para lentillas, cosméticos, colirios, medicaciones, humo, etc.), arañazos, raspaduras, abrasiones, formación de hematomas, un objeto extraño en el ojo (por ejemplo, arena o polvo), o exposición a la luz ultravioleta (procedente, por ejemplo, de la luz de sol, lámparas solares, reflejos de la nieve, reflejos del agua, o soldaduras por arco u otro tipo de exposición).

“Transdiferenciación”: En la presente descripción, la transdiferenciación se refiere a la conversión de un tipo de célula diferenciada en otro tipo de célula deseada. Un ejemplo de transdiferenciación son los cambios en una célula diferenciada (por ejemplo, una célula somática humana en un cultivo de tejido) que se producen tras la introducción de uno o más factores de transcripción, factores de crecimiento, microARN, moléculas pequeñas y/o un componente de una célula de un tipo de célula diferente que dicha célula diferenciada (por ejemplo, citoplasma, nucleoplasma, extracto de células enteras, o una de sus fracciones o componentes).

Los “inhibidores de ROCK” se refieren a cualquier sustancia que inhibe o reduce la función de quinasas asociadas a Rho o su vía de señalización en una célula, tal como una molécula pequeña, un ARNip, un miARN, un ARN antisentido o similares. La “vía de señalización de ROCK”, tal como se emplea en la presente, puede incluir cualquier procesador de señales implicado en la vía de señalización relacionada con ROCK, tal como la vía de señalización de Rho-ROCK-miosina II, su vía de señalización corriente arriba o su vía de señalización corriente abajo en una célula. Un ejemplo de inhibidor de ROCK que puede usarse es Stemolecule Y-27632 de Stemgent, un inhibidor de proteína quinasas asociadas a Rho (ROCK) (véase Watanabe *et al.*, Nat Biotechnol., junio de 2007, 25(6):681-6). Otros inhibidores de ROCK incluyen, por ejemplo, H-1152, Y-30141, Wf-536, HA-1077, hidroxil-HA-1077, GSK269962A y SB-772077-B (Doe *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 32:89-98, 2007; Ishizaki, *et al.*, Mol. Pharmacol., 57:976-983, 2000; Nakajima *et al.*, Cancer Chemother. Pharmacol., 52:319-324, 2003; y Sasaki *et al.*, Pharmacol. Ther., 93:225-232, 2002). Los inhibidores de ROCK pueden utilizarse a concentraciones y/o con condiciones de cultivo conocidas en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la publicación de EE. UU. n.º 2012/0276063. Otros ejemplos de inhibidores de quinasas asociadas a Rho incluyen compuestos descritos en las siguientes referencias: la patente de EE. UU. n.º 4.678.783, la patente de EE. UU. n.º 3.421.217, los documentos WO99/20620, WO99/61403, WO02/076976, WO02/076977, WO02/100833, WO03/059913, WO03/062227, WO2004/009555, WO2004/022541, WO2004/108724, WO2005/003101, WO2005/039564, WO2005/034866, WO2005/037197, WO2005/037198, WO2005/035501, WO2005/035503, WO2005/035506, WO2005/080394, WO2005/103050, WO2006/057270, WO2007/026664 y similares. Dichos compuestos pueden producirse según el método descrito en cada una de las respectivas referencias. Los ejemplos específicos incluyen 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina (fasudilo), (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano (Y-27632) y similares, así como sus sales, preferiblemente las sales farmacéuticamente aceptables, tales como las sales clorhidrato. En ejemplos de realizaciones, el inhibidor de ROCK puede tener una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 50 microM, por ejemplo, al menos o aproximadamente 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 microM, incluyendo cualquier intervalo derivado de estas, o cualquier concentración eficaz para estimular el crecimiento o la supervivencia de las células.

Ejemplos

Los ejemplos 1 y 2 ilustran la diferenciación dirigida de células endoteliales corneales a partir de células madre embrionarias. Se produjeron células endoteliales corneales a partir de cultivos sin células de soporte de células madre embrionarias, sin que fueran necesarios cuerpos embrioides, rosetas neurales, o células inductoras estromáticas. Se espera que las células endoteliales corneales resultantes sean particularmente adecuadas para un uso clínico, porque no se emplearon células xenogéneas en su obtención.

Desde el punto de vista morfológico, las células resultantes muestran la forma hexagonal o poligonal y la estrecha adherencia entre sí que son características de las células endoteliales corneales humanas naturales. Además, un análisis mediante qPCR e inmunotinción reveló que estas células expresan marcadores indicativos de células endoteliales corneales que incluyen la bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa, ZO-1 y KLF13. Además, estas células se distinguen de las células endoteliales vasculares (cuya expresión de marcadores presenta cierto solapamiento con las células endoteliales corneales) por la ausencia de expresión de los marcadores endoteliales vasculares vWF y CD31 (ensayado mediante qPCR e inmunotinción), que son proteínas del endotelio vascular típicas, pero que no se expresan en células endoteliales corneales humanas. Basándose en sus propias observaciones, los inventores han concluido que las células derivadas de hESC resultantes eran células endoteliales corneales.

Ejemplo 1: Obtención de células endoteliales corneales a partir de células madre embrionarias humanas (sin transferencia)

Etapas 1. Se cultivaron células madre embrionarias humanas (hESC) en ausencia de células de soporte (de modo específico, sobre Matrigel con medio mTESR1). Las hESC se transfirieron como masas (usando EDTA o dispasa). Las hESC transferidas con dispasa se fueron dividiendo a una proporción de 1:6 a 1:10 cada 5-7 días cuando las colonias grandes empezaban a tocarse o a una confluencia de aproximadamente 75%. El tamaño de colonia típico era significativamente mayor que con el método de EDTA, con un número de colonias de aproximadamente 150 por pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos. La transferencia se realizó fundamentalmente como indica el fabricante (Stem Cell Technologies). Las hESC transferidas con EDTA se fueron transfiriendo a una proporción de 1:8-1:12

cada 3-5 cuando las colonias empezaban a tocarse o a una confluencia de aproximadamente 75%. El tamaño de colonia era significativamente menor que con el método de dispasa, con un número de colonias de aproximadamente 300 por pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos.

El medio mTeSR1 se preparó como indica el fabricante, opcionalmente con la adición de antibióticos (por ejemplo, penicilina-estreptomicina a 1× concentración). Se espera que también puedan utilizarse otras condiciones de cultivo (que pueden incluir o no el uso de fibroblastos embrionarios murinos (MEF) u otras células de soporte), aunque puede preferirse evitar usar células de soporte (en particular, células de soporte xenogeneicas) cuando las células resultantes están previstas para un uso clínico. Se espera que puedan utilizarse otras metodologías de transferencia (por ejemplo, de modo manual o empleando otras enzimas, tales como tripsina, opcionalmente en combinación con un inhibidor de quinasas asociadas a Rho (ROCK), tales como Y-27632 (Watanabe *et al.*, Nat Biotechnol., junio de 2007, 25(6):681-6)).

Etapas 2. Las células se cultivaron hasta aproximadamente la densidad que tenían 1-2 días antes de que estuviesen listas para dividirse (el momento se determinó durante la transferencia descrita en la etapa 1).

Etapas 3. Día 0: El medio se cambió a medio de SMAD dual (véase la formulación a continuación) que contenía inhibidores de SMAD duales, nogina (nogina recombinante humana 500 ng/ml, obtenida en Peprotech (n.º de catálogo 120-10C)) y SB431542 (SB431542 10 micromolar, obtenido de Tocris (n.º de catálogo 1614) o Stemgent (n.º de catálogo 04-0010)). Tal como se analizó anteriormente, se cree que la nogina se une a BMP2, BMP4 y BMP7, y se cree que SB431542 bloquea la fosforilación de los receptores ACTRIB, TGFβR1 y ACTRIC, y se contempla que uno o más de los factores alternativos analizados anteriormente puedan utilizarse en lugar o además de la nogina, SB431542, o ambos. Opcionalmente, la formación de la cresta neural puede controlarse, por ejemplo, detectando el nivel de ARNm de marcadores de la cresta neural, tales como Sox10 y NGFR, a lo largo del tiempo. Se detectó una expresión elevada de estos marcadores aproximadamente un día después de comenzar la exposición a los inhibidores de SMAD duales. Además, se detectó que el marcador de endotelio corneal ColVIII se encontraba sobrerregulado, mientras que la expresión de Nanog (un marcador de pluripotencialidad) disminuyó (véase la figura 9).

Etapas 4. Día 2: El medio de cultivo se cambió a medio de córnea, que incluye PDGFB y DKK2 (véase la formulación a continuación). En este momento, las células gastaban el medio de cultivo con rapidez y se añadió medio de córnea fresco a diario. Aparentemente, esto fue debido a la alta actividad metabólica de las células, que es un fenotipo de CEC esperado y proporciona aún mayor confirmación de la identidad de las células. Se contempla que, después de una serie de días en cultivo (por ejemplo, después de 2, 3, 4, 5 o 6 días, o hasta una o dos semanas), las células pueden mantenerse en cultivo en ausencia de DKK2, que opcionalmente puede disminuir poco a poco su concentración y después omitirse del medio de cultivo.

Se contempla que puedan usarse alternativas al PDGF y/o DKK2, incluyendo las descritas más a fondo anteriormente, en lugar o además de estos respectivos factores. Otros componentes del medio también pueden incluir: proteína 7 similar a angiopoyetina, factor de crecimiento transformante β2, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de queratinocitos e interleuquina 1α (de nuevo, se contempla que puedan usarse alternativas potenciales, incluyendo las identificadas anteriormente, en lugar o además de estos factores). Aunque esta etapa se realizó en el día 2, un mayor tiempo de exposición de las células a los inhibidores de SMAD duales no cambia significativamente la expresión de los genes de la cresta neural, NGFR y Sox 10 (figura 8); por tanto, se espera que la exposición de las células a los inhibidores de SMAD duales durante un tiempo mayor o menor (por ejemplo, entre 1-4 días, hasta 6 días o más) sería aceptable.

Etapas 5. Los cultivos se hacen confluentes. En los bordes de las colonias la morfología se altera, las células se hacen más grandes, y la forma es más poligonal o hexagonal.

Etapas 6. En el día 7: Pueden observarse células hexagonales en los puntos de contacto de las colonias, así como colonias circulares de células hexagonales diseminadas por la placa.

Etapas 7. En el día 9, los cultivos expresan ARNm para el colágeno 8 (gen Col8a1), un componente principal de la membrana de Descemet (figura 7A), bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa (gen ATPa1), un componente principal de la función de bomba del endotelio (figura 4), así como los siguientes componentes potenciales de la función de bomba del endotelio: anhidrasa carbónica II (CA2), intercambiador aniónico 2 (AE2/SCL4A2), familia de transportadores de solutos 16 A1 (SCL16A1), SCL16A3, anhidrasa carbónica 12 (CA 12), anhidrasa carbónica 4 (CA4), regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Las células también expresan los factores de transcripción FoxC1 y Pitx2, que son expresados por la cresta neural ocular durante el desarrollo y mutaciones que pueden provocar anomalías corneales (figura 10). Mediante una inmunotinción se determinó que las células eran positivas a ZO-1 (figura 3) y Na⁺/K⁺-ATPasa (figura 4) y que se expresan en la zona de unión de las células. Las células fueron negativas para marcadores de células endoteliales vasculares, el factor de von Willebrand (VWF) y CD31/PECAM-1 (figura 6).

Etapas 8. En el día 11 y el día 17, las células que rodean a las colonias hexagonales son opcionalmente retiradas (por ejemplo, de modo manual o mediante ablación con láser) para dejar espacio para que las colonias hexagonales se expandan.

Etapas 9. En el día 19, las colonias de células hexagonales se diseccionaron en láminas sólidas y se trasladaron a

cubeobjetos de vidrio revestidos con Matrigel para la inmunotinción, y se cultivaron para expandir las colonias.

Etapas 10. En el día 25, las colonias de células hexagonales se recogieron para el análisis, por ejemplo, inmunotinción o detección de los ARNm expresados. Además de los marcadores descritos anteriormente, las células expresan proteínas y ARNm de KLF13 (un factor de transcripción expresado en células endoteliales corneales, figura 5).

Las formulaciones de los medios usados en este ejemplo fueron las siguientes.

Medio Wi modificado:

- DMEM-F12 al 80%, Invitrogen n.º de catálogo 11330-032
- Sustituto de suero de inactivación al 20%, Invitrogen n.º de catálogo 10828-028 (su composición se describe en el documento WO/1998/030679; véase Amit *et al.*, *Developmental Biology*, 227, 271-278 (2000))
- Aminoácidos no esenciales al 1%, Invitrogen n.º de catálogo 11140-050
- L-glutamina 1 mM, Invitrogen n.º de catálogo 250300-81
- b-mercaptoetanol 0,1 mM, Sigma n.º de catálogo M7522
- FGF2 recombinante humano 6 ng/ml, Invitrogen n.º de catálogo 13256-029
- 10.000 unidades de penicilina (base) y 10.000 µg de estreptomycin, Invitrogen n.º de catálogo 15140122

Medio de SMAD dual:

- DMEM-F12 al 80%, Invitrogen n.º de catálogo 11330-032
- Sustituto de suero de inactivación al 20%, Invitrogen n.º de catálogo 10828-028
- Aminoácidos no esenciales al 1%, Invitrogen n.º de catálogo 11140-050
- L-glutamina 1 mM, Invitrogen n.º de catálogo 250300-81
- b-mercaptoetanol 0,1 mM, Sigma n.º de catálogo M7522
- FGF2 recombinante humano 6 ng/ml, Invitrogen n.º de catálogo 13256-029
- 10.000 unidades de penicilina (base) y 10.000 µg de estreptomycin, Invitrogen n.º de catálogo 15140122
- Nogina recombinante humana 500 ng/ml, Peprotech n.º de catálogo 120-10C
- SB431542 10 micromolar, Tocris n.º de catálogo 1614 o Stemgent n.º de catálogo 04-0010

Medio de córnea (medio Wi modificado que contenía PDGFB, DKK2, B27):

- DMEM-F12 al 80%, Invitrogen n.º de catálogo 11330-032
- Sustituto de suero de inactivación al 20%, Invitrogen n.º de catálogo 10828-028
- Aminoácidos no esenciales al 1%
- L-glutamina 1 mM (véase la receta), Invitrogen n.º de catálogo 250300-81
- beta-mercaptoetanol 0,1 mM, Sigma n.º de catálogo M7522
- FGF2 recombinante humano 6 ng/ml, Invitrogen n.º de catálogo 13256-029
- 10.000 unidades de penicilina (base) y 10.000 µg de estreptomycin, Invitrogen n.º de catálogo 15140122
- PDGFB recombinante humano 10 ng/ml, Peprotech n.º de catálogo AF-100-14B
- DKK2 recombinante de ratón 10 ng/ml, R&D Systems n.º de catálogo 2435-DK-010 (o DKK2 recombinante humana)
- 0,1×B27, Invitrogen n.º de catálogo 17504-044

Ejemplo 2: Obtención de células endoteliales corneales a partir de células madre embrionarias humanas (método de volver a cultivar en placa)

Las etapas 1 a 4 se realizaron como en el anterior ejemplo 1; se espera que las metodologías, factores y programaciones alternativos analizados en el anterior ejemplo puedan usarse de modo similar y adecuado con este método.

Etapa 5. En el día 3, las células se transfirieron 1:1. Los tampones de disociación de células preferidos incluyen una disolución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,02% en DPBS (0,5 mM) (Sigma, n.º de catálogo E8008-100ML), tampón de disociación de células (Invitrogen, n.º de catálogo 13151-014) y tampón de disociación de células suave (Stemcell Technologies, n.º de catálogo 07174). Otros ejemplos de tampones de disociación de células que pueden usarse incluyen disolución de disociación de células sin enzimas basada en PBS (Millipore, n.º de catálogo S-014-C), disolución de disociación de células no enzimática (Sigma, n.º de catálogo C5789), Cellstripper (Cellgro, n.º de catálogo 25-056-CI).

La transferencia se realizó usando EDTA como sigue: se añadió 1 ml de tampón y la placa se dejó en reposo durante 9-12 minutos. Las células se observaron para señales de desprendimiento mediante microscopía óptica. Después se aspiró el tampón de disociación de células. Después se añadió medio de células de córnea gota a gota para levantar suavemente las células de la placa. No fue necesaria una agitación para retirar las células. Las células disociadas después se trasladaron a un tubo Falcon de 15 ml. Las células remanentes en la placa se enjuagaron con más medio de células corneales y se añadieron al tubo Falcon de 15 ml. Las células después se diluyeron de modo apropiado a un intervalo de 1:1-1:5 y se trasladaron a pocillos nuevos de placas revestidas con Matrigel.

Aunque esta etapa se realizó dos días después de la adición de los inhibidores de SMAD duales y un día después de la adición de PDGFB y DKK2, se espera que la programación de esta etapa pueda alterarse. Algunas células permanecieron adheridas y produjeron células endoteliales corneales con una eficacia comparable a la del ejemplo 1 (cuando siguieron siendo cultivadas como se indica en la etapa 5 y siguientes del ejemplo 1). Sin embargo, las células retiradas se cultivaron en placa (el mismo medio que en la etapa 4) y formaron células endoteliales corneales con más rapidez y de modo más uniforme que los cultivos del ejemplo 1; las propiedades y la caracterización de estas células se narran en el resto de etapas.

Etapa 6. En el día 8, los cultivos contenían un gran número de células hexagonales, con parches diseminados más pequeños de células progenitoras putativas (que se distinguen basándose en la morfología no poligonal).

Etapa 7. En el día 10, la placa contenía principalmente células hexagonales con colonias muy pequeñas con forma de bola de células progenitoras putativas. Las células expresaban los mismos marcadores que se describieron anteriormente en el ejemplo 1 (incluyendo CA2, SCL4A2, SLC16A1, SLC16A3, CA12, CA4, y CFTR). También se detectó la expresión de más ARNm de bombas: acuaporina 1 (AQP1), intercambiador de sodio-hidrógeno (NHE1) y transportador de bicarbonato de sodio (NBC-1) (tabla 1, figura 7B, C).

Las CEC derivadas de hESC resultantes después se evaluaron mediante qPCR para la expresión de genes de bombas que indican la identidad de las CEC. Los cultivos fueron positivos para la expresión de los 12 genes de bombas ensayados. En experimentos iniciales, se detectó la expresión de tan solo 10 de los 12 genes de bombas, aunque el uso de diferentes cebadores de PCR permitió la detección de la expresión de los otros dos genes de bombas.

Tabla 1 - Las células endoteliales corneales derivadas de hESC expresan 12 de los 12 marcadores de bombas corneales (detectado mediante qPCR). Los niveles de expresión se indican como "altos", "intermedios" o "bajos" basándose en el valor de Ct (el número de ciclo en que la abundancia del producto de RT-PCR supera un nivel de umbral que está dentro de la fase exponencial de la amplificación; unos valores más bajos indican una mayor abundancia).

Niveles de expresión relativos	Marcadores de bomba	Valor Ct
Altos	AQP1	26
	CA2	29
	SCL4A2	29
	SLC16A1	26
	SLC16A3	28
Intermedios	ADCY10	33
	CA12	33
	CA4	32
	CFTR	34
	NBC1	33
	NHE1	31
	SCL16A7	32

Ejemplo 3: Las CEC cultivadas producen una matriz similar a la membrana de Descemet

Este ejemplo describe la producción de una matriz similar a un gel a partir del medio acondicionado por un cultivo de CEC derivadas de hES. Estos resultados indican que las CEC segregan uno o más factores que pueden formar un gel, con lo cual los inventores establecen la hipótesis de que incluyen componentes de la membrana de Descemet (que es producida por las CEC *in vivo*). En particular, tal como se muestra anteriormente, las CEC sobreexpresan notablemente la expresión de ColVIII (un componente de la membrana de Descemet), lo cual sugiere que el ColVIII segregado es un componente de la matriz observada. Se realizó un análisis de la transferencia Western para confirmar que la matriz en efecto contenía proteínas COL8A1 y COL8A2. Además, puede usarse una matriz producida a partir de factores segregados por las CEC como sustrato de cultivo de CEC y/o como soporte para ser utilizado durante el trasplante de células.

Se produjeron células endoteliales corneales a partir de células hES tal como se describe en los anteriores ejemplos, y se cultivan. Se retiró el medio celular acondicionado de los cultivos endoteliales corneales después de al menos un día de cultivo desde dos pocillos en una placa de 6 pocillos. El volumen combinado fue de 8 ml. El medio celular acondicionado se centrifugó para eliminar los restos de células y otros fragmentos grandes. El medio se centrifugó durante 5 min a 1000×g y 10 °C para eliminar los restos de células. El sobrenadante se añadió a un Amicon Ultra 15 con un límite de exclusión de peso molecular ("molecular weight cut-off", MWCO) de 10.000 Da. El medio se concentró en este dispositivo mediante centrifugación en un Beckman Coulter Allegra X-15R con un motor de cubo oscilante (dos centrifugaciones a 4000×g durante 15 min a 4 °C), y el volumen se redujo de 8 ml a aproximadamente 500 µl. Para el análisis de SDS-PAGE, se retiraron 32 µl del medio concentrado y se añadieron a una disolución que contenía SDS a una concentración final de Tris-HCl 30 mM, SDS al 1% y glicerol al 10%. Tras calentar esta disolución hasta 95 °C durante 2 min, la disolución presentaba un color marrón y se había polimerizado para formar un semisólido similar a un gel.

Se cree que la disolución de SDS no es necesaria para la polimerización; por el contrario, un medio concentrado puede polimerizarse opcionalmente con o sin componentes adicionales, tales como medio de córnea, un medio de cultivo basal, otros factores de crecimiento u otras proteínas de matriz, etc. Además, se espera lograr resultados similares usando otros concentradores (por ejemplo., 10K Spin Column, BioVision; Vivaspinn, Sartorius Stedim; y 10K Spin Column, MBL International, etc.) u otro método de concentración (por ejemplo, ultrafiltración con presión, evaporación, diálisis frente a glicerol y otros). El tiempo de incubación y la temperatura pueden variar para permitir la formación del gel, por ejemplo, a unas temperaturas que varían de 37 °C a 95 °C y una duración de entre 0,5 minutos a durante toda la noche. Después de la polimerización, el líquido puede retirarse. Las CEC pueden cultivarse sobre la matriz resultante, por ejemplo, pueden sembrarse directamente sobre la matriz que puede suplementarse (antes, durante o después de la polimerización) con DKK2, PDGFB y/u otros factores que contribuyen al crecimiento.

Los constituyentes de proteínas de la matriz se confirmaron también mediante análisis de la transferencia Western para detectar la presencia de las proteínas COL8A1 y COL8A2. Las células se retiraron y se lisaron del ECM subcelular usando hidróxido de amonio, tal como se ha descrito previamente (Sugino *et al.*, 2010). Esto permite la retirada de las CEC sin dañar la matriz extracelular que ha sido segregada por debajo de las células. Después de la exposición a hidróxido de amonio, la placa se lavó tres veces con PBS para desprender cualquier célula remanente. Después se añadió tampón de muestra reductor para recoger las proteínas de la matriz extracelular. Se realizaron una SDS PAGE y una transferencia Western convencionales usando anticuerpos contra COL8A1 (figura 19A) y COL8A2 (figura 19B) y se detectaron ambas proteínas, lo cual indica que estas proteínas fueron segregadas por las CEC derivadas de hESC para formar una matriz similar a la matriz extracelular.

Ejemplo 4: Influencia de los métodos de recolección sobre el rendimiento, la morfología y la expresión de marcadores de CEC

Este ejemplo ensaya el efecto de diversos métodos de recolección sobre la morfología, el rendimiento y la expresión de marcadores de CEC, que son potencialmente indicativos de la idoneidad de las células para el trasplante.

Las CEC fueron producidas como se describe en el ejemplo 2 y se recolectaron usando cada uno de los métodos enumerados en la tabla 2, es decir, de modo manual, usando tripsina (con diferentes tiempos y concentraciones), tripsina en combinación con tampón de disociación de células, acutasa, colagenasa B, colagenasa B en combinación con tampón de disociación de células, o solo con tampón de disociación de células. Las células se volvieron a cultivar en placa durante una semana y después se analizaron al microscopio para observar la morfología y el rendimiento (indicados por el hecho de que se obtuviesen posteriormente cultivos confluentes). Además, se determinó la expresión de los marcadores COL8A1 y AQP1 mediante qPCR. Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2 - Influencia de los métodos de disociación sobre el rendimiento, la morfología y la expresión de marcadores de CEC. Las CEC se produjeron como se describe en el ejemplo 2 y se recolectaron usando el método indicado en cada fila. En "Morfología", "+" indica una forma poligonal o hexagonal de las células, "-" indica una morfología fibroblástica, "+/-" indica una mezcla de morfología poligonal y fibroblástica. "Confluente" indica que el cultivo muestra una lámina sólida ininterrumpida de células "+" o no ("-") después de una semana en cultivo después de empezar el cultivo en placa. Las columnas COL8A1 y AQP1 indican el nivel de expresión de ARNm de estos genes respectivos, según se detectan mediante qPCR con relación a células PD1T; "+" indica niveles comparables y "+/-" indica unos niveles reducidos de ARNm.

Método de disociación	Morfología	Confluente	COL8A1	AQP1
Manual	–	–	+	+/-
Tripsina al 0,05%	+	+	+	+/-
Tripsina al 0,25% 5 min	+	+	+	+
Tripsina al 0,25% 10 min	+	+	+	+
Tripsina al 0,25%: tampón de dis. de cél. 1:1	+	+	+	+
Acutasa	–	–	+	+
Colagenasa B durante la noche	–	–	+	+/-
Colagenasa B 1 h + tampón de dis. de cél.	+/-	+	+	+
Tampón de dis. de cél.	+/-	–	+	+

Los niveles de ARNm de AQP1 y COL8A1 también se ensayaron mediante qPCR (figura 14A-C). Los niveles de AQP1 y COL8A1 fueron elevados en cada caso con relación a las hESC. Sin embargo, comparado con las células que no habían sido recolectadas (producidas como en el ejemplo 2), todos los métodos de recolección produjeron una disminución en los niveles de expresión de AQP1 y un aumento en los niveles de expresión de COL8A1.

Basándose en estos resultados, el uso de tripsina (por sí sola o en combinación con tampón de disociación de células) puede producir CEC de alta calidad potencialmente adecuadas para el trasplante. Otras metodologías pueden afectar potencialmente a la morfología celular después de una semana de cultivo, aunque esto puede afectar o no de modo adverso a la función de las células o a su idoneidad para el trasplante.

Métodos

Las CEC se obtuvieron como se describe en el ejemplo 2 y después se recolectaron bajo diferentes condiciones experimentales como se describe con más detalle a continuación. Todos los métodos de recolección enzimáticos incluyen un enjuagado con disolución salina tamponada con fosfato (Life Technologies n.º de catálogo 14190-250) antes de la digestión enzimática. Las células después se recolectaron por medio de los siguientes métodos y después se cultivaron en placa sobre una placa de Matrigel y se cultivaron durante una semana más. Las células se analizaron para su morfología: poligonal, una mezcla de poligonal y fibroblástica, y fibroblástica. Las células se analizaron para observar si eran capaces de volver a la confluencia del 100% después de la recolección y de volver a cultivar en placa. Después de la semana de cultivo, se recogió el ARN y se analizó para la expresión de COL8A1 y AQP1 mediante QPCR.

Para la disociación “manual”, se fabricó una herramienta de disección de vidrio fina a partir de una pipeta Pasteur bajo una llama. Bajo un microscopio de disección y una campana estéril se desprendieron con suavidad secciones de células endoteliales corneales de la placa. Las células después se trasladaron a una nueva placa para ensayar su viabilidad después de su retirada.

Para la disociación con “tripsina al 0,05%”, se empleó tripsina-EDTA al 0,05% (1×) y rojo de fenol de Life Technologies n.º de catálogo 25300-054. Las células se trataron con tripsina al 0,05% a 37 °C durante 10 minutos. Las células después se trituraron con la disolución de tripsina para retirar las células del pocillo. La digestión enzimática se detuvo con la adición de medio de córnea. Las células después se centrifugaron para sedimentar las células, se resuspendieron y se cultivaron en una placa con Matrigel fresca.

Para la disociación con “tripsina al 0,25%”, se empleó tripsina-EDTA al 0,25% (1×) y rojo de fenol de Life Technologies n.º de catálogo 25200056. Las células se trataron con tripsina al 0,25% a 37 °C durante 5 o 10 minutos, y se trataron como se describió anteriormente para la tripsina al 0,05%.

Para la disociación con “tripsina al 0,25%: tampón de disociación de células 1:1”, se empleó tripsina-EDTA al 0,25% (1×) y rojo de fenol de Life Technologies n.º de catálogo 25200056 y tampón de disociación de células sin enzimas y PBS, Life Technologies n.º de catálogo 13151-014. Las células se trataron con una dilución 1:1 de tripsina al 0,25% y tampón de disociación de células a 37 °C durante 15 minutos, y se trataron como se describió anteriormente para la tripsina al 0,05%.

Para el tratamiento con “acutasa”, se empleó una disolución de desprendimiento de células ACCUTASE™, Stem Cell Technologies n.º de catálogo 07920. Las células se trataron con acutasa a 37 °C durante 25 minutos, y se trataron como se describió anteriormente para la tripsina al 0,05%.

Para el tratamiento con “colagenasa B”, las células se trataron con colagenasa B (2 mg/ml) a 37 °C durante la noche, y se trataron como se describió anteriormente para la tripsina al 0,05%.

Para el tratamiento con “colagenasa B+tampón de disociación de células”, las células se trataron con colagenasa B (1 mg/ml) a 37 °C durante 1 h. La colagenasa B después fue reemplazada por tampón de disociación de células (véase anteriormente) a 37 °C durante 10 minutos y se trataron como se describió anteriormente para la tripsina al 0,05%

- 5 Para el tratamiento con “tampón de disociación de células”, se empleó tampón de disociación de células sin enzimas y PBS, Life Technologies n.º de catálogo 13151-014. Las células se trataron con tampón de disociación de células a 37 °C durante 1 h, y se trataron como se describió anteriormente para la tripsina al 0,05%.

Ejemplo 5: Densidad de células CEC

- 10 Este ejemplo cuantifica la densidad de los cultivos de CEC producidos a partir de hESC según se describe en el ejemplo 2. Las CEC se tiñeron con ZO-1 para confirmar su identidad y se contaron de modo manual en campos aleatorios. A partir de dos experimentos distintos se contaron tres campos 40× aleatorios. La densidad de las células endoteliales corneales cultivadas fue de 7605 ± 379 células/mm² (promedio $\pm$ PEE). Este es un número mayor que la densidad de células CEC indicada incluso para niños (concretamente, 5624 células/mm²) y es mucho más grande que los bajos niveles de densidad asociados con la disfunción (por ejemplo, menores que aproximadamente 500 a 1000 células/mm²). Véase Peh *et al.*, Transplantation, 2011, 27 de abril, 91(8):811-9. Estos métodos indican que los presentes métodos pueden usarse para producir láminas de células que tienen una densidad mucho mayor que el nivel asociado con la función corneal *in vivo*.

Métodos

- 20 Se cultivaron células endoteliales corneales de hESC sobre cubreobjetos revestidos con Matrigel durante 1 semana. Se realizó una inmunotinción tal como se ha descrito previamente con un anticuerpo contra ZO-1. Después de la inmunotinción se detectaron los núcleos mediante la exposición de los portaobjetos a DAPI. Se empleó la tinción de ZO-1 para identificar las células endoteliales corneales y se tomaron fotografías de la tinción con DAPI para el mismo campo y se contó. El número de células se contó de modo manual en el programa Image J 1.45 s (NIH). Se calculó el área del campo 40× midiendo el tamaño de una referencia de 0,1 mm y se calculó el área del campo de vista 40× obteniéndose 0,0767 mm². Los recuentos de células se dividieron entre 0,0767 mm² para obtener el número de células/mm².

Ejemplo 6: Expresión génica y morfología de CEC derivadas de hESC a lo largo de un cultivo prolongado

Este ejemplo caracteriza más a fondo la morfología y la expresión génica de cultivos de CEC producidas a partir de hESC según se describe en el ejemplo 2.

- 30 La morfología de las células se controló a lo largo de 4 semanas después de la diferenciación (figura 11). La forma hexagonal de las células continuó desarrollándose y mejorando a lo largo de las cuatro semanas, estando presente un alto grado de uniformidad en la forma de las células para la semana 4.

- Además, los cultivos de CEC se tiñeron para la expresión de los marcadores de proteínas de CEC ZO-1 y AQP1 cada semana entre las semanas 1 y 4. Tal como se esperaba, se detectó la expresión de ZO-1 en las zonas de unión estrecha entre las CEC (figura 12). En paralelo a la adopción de una morfología hexagonal muy uniforme que puede observarse en la figura 11, las zonas de unión estrecha adquirieron un aspecto más uniforme a lo largo de las cuatro semanas como se muestra. Se detectó la expresión de AQP1 en los límites de las células, tal como se esperaba (figura 13), en cada momento.

- 40 Los cultivos de CEC también se ensayaron para el nivel de expresión de ARNm de AQP1 y COL8A1 cada semana entre las semanas 1 y 4. Tanto COL8A1 (figura 15A) como AQP1 (figura 15B) fueron altamente expresados en todos los momentos (normalizados a hESC). La expresión de AQP1 aumentó monotónicamente a lo largo de las cuatro semanas del experimento y tiene una evolución paralela al desarrollo en el tiempo de la adopción de una morfología hexagonal, tal como se ilustra en la figura 11. COL8A1 se expresó en alto grado en todos los momentos ensayados. El aumento temporal en la expresión de COL8A1 detectado en la semana 2 coincide con la transferencia a un nuevo pocillo de cultivo de tejidos y se cree que refleja la producción de matriz extracelular. El ARNm de muchas bombas aumentó en su expresión con relación a las hESC. Sin embargo, la expresión de algunas bombas permaneció similar a las hESC, lo cual indica que estas bombas pueden expresarse en hESC y/o pueden estar sometidas a una regulación postranscripcional. La tabla 3 resume los resultados de la expresión de bombas en CEC.

- 50 Tabla 3 - Resumen de los niveles de expresión de genes de córnea detectados mediante qPCR. Los tres grupos de genes indican una mayor de expresión de bombas frente a las hESC (“Bombas sobrerreguladas”), bombas expresadas a niveles similares en hESC y CEC (“Bombas presentes”), y expresión de genes de colágeno 8. Alto (24-28), intermedio (29-33), y bajo (34-36) indican los valores de Ct brutos, y un valor bajo de Ct refleja una mayor cantidad de ARNm.

Bombas presentes en CEC y sobrerreguladas con respecto a hESC			
Gen	Alto	Intermedio	Bajo
AQP1	+	+	

CA2	+		
CA4	+		
SLC16A3	+		
CFTR		+	
SLC16A7		+	
SLC4A4		+	
Bombas presentes en CEC y hESC			
Gen	Alto	Intermedio	Bajo
AQP1	+	+	
CA2	+		
CA4	+		
SLC16A3	+		
CFTR		+	
SLC16A7		+	
SLC4A4		+	
Genes de colágeno 8			
Gen	Alto	Intermedio	Bajo
COL8A1	+		
COL8A2		+	

Ejemplo 7: Efecto del inhibidor de ROCK

Este ejemplo demuestra que la adición de un inhibidor de proteína quinasas asociadas a Rho ("ROCK") puede mejorar la calidad de los cultivos en placa tras la recolección de las células. Las CEC derivadas de hESC se recolectaron con o sin la adición de un inhibidor de ROCK y/o la isoforma de vitamina C ASC2P ("ASC") y se examinaron para la morfología y la expresión génica después del cultivo en placa. Se observó una mejora en respuesta a la dosis de la uniformidad celular y la morfología poligonal/hexagonal para concentraciones de inhibidor de ROCK de hasta 20 micromolar (figura 17A-D). La expresión de COL8A1 y SLC16A3 fue elevada con relación con hESC (figura 17E-F).

Las células recolectadas se estudiaron más a fondo para la morfología, la capacidad para restablecer un cultivo confluyente y el mantenimiento de la expresión de los marcadores de CEC COL8A1, AQP1 y SLC16A mediante qPCR. Los resultados demuestran que el tratamiento con el inhibidor de ROCK puede ayudar a mantener la morfología de las células, en particular cuando el inhibidor de ROCK está presente cuando las células se vuelven a cultivar en placa después de ser recolectadas. Además, el mantenimiento con medio que contiene inhibidor de ROCK puede ayudar a las células a mantener una morfología de CEC de alta calidad después de ser recolectadas y vueltas a cultivar en placa.

Tabla 4 - Un inhibidor de Rock puede mejorar la supervivencia de las células después de la recolección. Se añadió el inhibidor de ROCK Y-27632 y/o la isoforma de vitamina C ASC2P ("ASC") a CEC derivadas de hESC, tal como se indica en "Tratamiento", y las células recolectadas se evaluaron basándose en su morfología y expresión génica tras volverlas a cultivar en placa. "Confluentes durante la noche" indica la confluencia de las células cultivadas tras un cultivo en placa durante la noche, lo cual refleja el grado de supervivencia y/o unión de las células. "Morfología" indica el aspecto de las células cultivadas después de 1 semana en cultivo, que se registró como forma poligonal/hexagonal de las células de alta calidad ("++"), forma poligonal/hexagonal ("+"), o morfología fibroblástica ("–"). COL8A, AQP1, SLC16A3 indican la expresión ("+") o la no expresión ("–") de los respectivos ARN, según se detecta mediante QPCR. ND = no determinado. Abreviaturas: ASC = isoforma de vitamina C ASC2P añadida al cultivo a 0,3 mM; manten. = mantenimiento (es decir, los factores indicados se incluyeron en el medio de cultivo cada día después del cultivo en placa); D1 = indica que los factores se incluyeron en el medio de cultivo durante la primera semana después del cultivo en placa y después se omitieron.

Tratamiento	Confluentes durante la noche	Morfología	COL8A1	AQP1	SLC16A3
Pretrat. con Rock	-	-	+	+	+
Pretrat. con Rock + ASC	-	-	+	+	+
Rock durante la noche	+	+	+	+	+
Rock + ASC durante la noche	+	+	+	+	+
Rock 1 microM (manten.)	+	+	+	+	+
Rock 5 microM (manten.)	+	++	+	+	+
Rock 10 microM (manten.)	+	++	+	+	+
Rock 20 microM (manten.)	+	++	+	+	+
Rock 10 microM + ASC (manten.)	+	++	+	+	+
Rock 20 microM + ASC (manten.)	+	++	+	+	+
Rock, Rock + ASC (D1)	+	-	ND	ND	ND

Métodos

El inhibidor de Rock Y-27362 (Wako, n.º de catálogo 253-00513) se disolvió en H₂O destilada para preparar una disolución madre 10 mM, se esterilizó mediante filtración y se separó en partes alícuotas. A diario se descongeló una parte alícuota del inhibidor de Rock y se añadió fresca al medio.

Se cultivaron células de córnea según se describe en el ejemplo 2 y se recolectaron mediante un tratamiento con tripsina al 0,25%, según se describe en el ejemplo 4, y se volvieron a cultivar en placa con variaciones (concretamente, la inclusión del inhibidor de ROCK y/o ASC, tal como se describe a continuación).

Después del cultivo en placa, las células se visualizaron para identificar cualquier cambio morfológico y, específicamente, para observar si recuperaban su forma poligonal/hexagonal, si eran una población mixta de formas poligonales y fibroblásticas, o si se habían vuelto fibroblásticas.

El medio se cambió a diario por inhibidor de Rock fresco excepto para los paradigmas de “pretratamiento” y “D1”. Después de 1 semana de cultivo se recogió el ARN y se analizó mediante QPCR para observar cambios en los niveles de ARNm de COL8A1, AQP1 y SLC16A3. Se ensayó la eficacia del inhibidor de Rock para recolectar las células entre 1-20 microM.

Para el paradigma de “pretratamiento” se produjeron CEC según se describe en el ejemplo 2. Se retiró el medio de córnea y se sustituyó por Rock 10 microM o Rock 10 microM con ASC-P2 0,3 mM (n-hidrato de la sal de magnesio y fosfato del ácido L-ascórbico (Wako, n.º de catálogo 013-19641)) durante 1 hora antes de la recolección. Las células se recolectaron usando tripsina al 0,25% como se describió anteriormente, aunque no se añadió inhibidor de Rock durante la recolección.

Para el paradigma de “Rock durante la noche” se produjeron CEC como se describe en el ejemplo 2, se recolectaron con tripsina al 0,25% como se describió anteriormente, y después se cultivaron en placa durante la noche en presencia de inhibidor de Rock 10 microM. A la mañana siguiente se retiró el medio y no se añadió más inhibidor de Rock al medio.

Para el paradigma de “mantenimiento con Rock” se produjeron CEC como se describe en el ejemplo 2, se recolectaron con tripsina al 0,25% como se describió anteriormente, y mantuvieron en inhibidor de Rock añadido a diario a medio fresco.

Para el paradigma de “D1” se produjeron CEC como se describe en el ejemplo 2, se recolectaron con tripsina al 0,25% como se describió anteriormente, y se cultivaron en presencia de inhibidor de Rock durante una semana. Después las células de córnea se cultivaron durante una semana más en presencia o en ausencia de inhibidor de Rock para determinar si el inhibidor de ROCK contribuye al mantenimiento de su morfología.

Ejemplo 8: Las CEC derivadas de hESC mantienen la integridad estructural cuando se recolectan como láminas

Para obtener y ensayar láminas de CEC para potenciales trasplantes se produjeron CEC derivadas de hESC según se describe en el ejemplo 2 y se cultivaron en placas de cultivo de tejidos UPCELL. Estas placas de cultivo incluyen una superficie de cultivo celular sensible a la temperatura que puede liberar las células en forma de láminas de células en respuesta a un desplazamiento en la temperatura.

Después de la liberación de las placas UPCELL, las CEC se tiñeron para ZO-1 para ensayar la integridad física de la lámina de células, en particular para observar si se mantienen las zonas de unión estrecha. Tal como se muestra en la figura 18, la expresión de ZO-1 indica que las zonas de unión estrecha se mantuvieron después de la retirada de la lámina de células. Estos resultados indican que las CEC pueden mantener la integridad estructural cuando se retiran como láminas, lo cual sugiere que la función de las CEC puede mantenerse para el trasplante de láminas de células.

Métodos

Las placas de cultivo de tejidos UPCELL contienen una superficie de cultivo celular sensible a la temperatura que libera las células en forma de láminas de células sin necesidad de un tratamiento enzimático. El fabricante sugiere optimizar la cantidad de matriz para revestir las placas y realizar el revestimiento a 37 °C aunque normalmente se realiza a temperatura ambiente. Todas las disoluciones se equilibraron a 37 °C antes de ponerlas en contacto con las placas para evitar el desprendimiento prematuro de las células.

Las placas de cultivo de tejidos UPCELL (10 cm; Nunc n.º de catálogo 14902) se revistieron con 2,5×-5× la cantidad de Matrigel recomendada por el fabricante de Matrigel (BD, n.º de catálogo 354277) a 37 °C durante al menos una hora.

Las células de córnea se produjeron como se describe en el ejemplo 2 y se recolectaron usando tripsina al 0,25% durante 10 minutos. Las células después se trituraron con la disolución de tripsina para retirar las células del pocillo. La digestión enzimática se detuvo con la adición de medio de córnea. Las células después se centrifugaron para sedimentar las células y estas se resuspendieron.

El Matrigel se retiró rápidamente y las células se cultivaron en placa a la densidad normal en presencia del inhibidor de Rock Y-27362 10 microM (Wako, n.º de catálogo 253-00513). Para todos los cambios de medio, el medio se precalentó hasta 37 °C. Las células se cultivaron durante hasta dos semanas. Para desprender las células, una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos (según las instrucciones del fabricante) resultó insuficiente para lograr la liberación total. Sin embargo, una incubación durante 1 hora a 4 °C fue suficiente para desprender las células como una lámina. Después del desprendimiento, las células se tiñeron para ZO-1 y se estudiaron al microscopio.

Ejemplo 9: Caracterización de la expresión génica global de CEC y detección de un fenotipo celular "juvenil"

Este ejemplo describe la comparación de la expresión génica global de CEC derivadas de hESC con CEC donadas. El alto grado de expresión génica compartida confirma aún más la identidad de las células derivadas de hESC como CEC. Además, las diferencias en la expresión génica indican que las CEC derivadas de hESC muestran una expresión génica característica de células más "juveniles", lo cual sugiere que las células pueden ser aún más eficaces para el trasplante que los tejidos derivados de donante.

Cuando se comparan la CEC de hESC con células endoteliales corneales primarias adultas (células donadas), solo 792/28374 genes cambian en más de 3 veces, lo cual indica que los tipos de células expresan 97% de todos los genes a niveles similares. Esto indica que las células endoteliales corneales derivadas de hESC son muy similares a células endoteliales corneales adultas. Además, se descubrió que los siguientes genes endoteliales corneales eran expresados por ambas poblaciones, que incluyen, pero no se limitan a: ADCY10, ATP1A1, CA2, CFTR, COL8A2, FOXC1, KLF13, PITX2, SLC16A1, SLC16A3, SLC16A7, SLC4A2, SLC9A1, ZO-1.

Se predijo que las CEC de hESC serían más juveniles que las CEC adultas primarias, tal como se refleja por indicaciones de un nivel disminuido de estrés oxidativo acumulado y/o daños en el ADN, así como una mayor capacidad para recapturar el glutatión, comparado con CEC aisladas de endotelio corneal de donante. Los genes que muestran una diferencia de expresión en más de 3 veces entre las CEC derivadas de hESC y las CEC de donante se listan en la figura 20. Entre estos genes se encuentran genes indicativos de un fenotipo más juvenil de las CEC derivadas de hESC, tal como se describe más a fondo a continuación.

La capacidad para reparar los daños en el ADN disminuye con la edad en córneas más envejecidas. Pueden observarse indicaciones de esta capacidad reducida en los menores niveles de moléculas de la vía de reparación del ADN, tales como ATM y OGG1. Los niveles de proteínas ATM y OGG1 son 1,5 y 1,2 veces menores en córneas adultas más ancianas (Joyce *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1 de marzo de 2011, 52(3):1641-9). La micromatriz revela resultados similares a las córneas juveniles, con una disminución en aproximadamente 1,9 y 2,8 veces del ATM y OGG1 (para CEC adultas comparadas con CEC derivadas de hESC), respectivamente.

Otro gen, la enzima gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT), es una ectoenzima importante para mantener la deshidratación corneal, así como para recapturar el antioxidante glutatión. Redmond *et al.* (Cornea. 27 de septiembre de 2012 [Epub previo a su aplicación en papel], doi: 10.1097/ICO.0b013e3182656881) han indicado que las córneas envejecidas muestran una actividad de GGT 1,7 veces menor que las córneas más jóvenes. En coherencia con este informe de la bibliografía sobre CEC juveniles, la micromatriz reveló que GGT7 se encontraba infrarregulado en 1,8 veces comparado con las CEC de hESC.

La bibliografía indica otro gen que se encuentra en cantidad menor en córneas envejecidas, el oncogén de dedo anular de polipeptido BMI1 (BMI1), específicamente en 2,5 veces (Wang *et al.*, Mol. Vis., 2012, 18:803-15). En la micromatriz, las HCEC adultas presentaban 1,6 veces menos BMI1 comparadas con CEC de hESC.

Tabla 5 - Genes descubiertos por la micromatriz que indican que las CEC de hESC son más juveniles que CEC primarias adultas. Un valor negativo indica que la expresión es menor en las CEC adultas comparado con las CEC de hESC. Los cambios indicados en la bibliografía en la expresión génica para CEC “juveniles” comparadas con CEC “ancianas” se muestran como referencia (los valores negativos en esta columna indican que la expresión es menor en las CEC ancianas, comparado con las CEC jóvenes).

Símbolo del gen	Nombre del gen	n.º de registro	Cambio en n.º de veces [CEC primarias de adulto frente a CEC de hESC]	Cambio en n.º de veces indicado en la bibliografía
ATM	ataxia telangiectasia mutado	NM_000051	-1,87	-1,5 (Joyce <i>et al.</i> , 2011)
BMI1	oncogén de dedo anular de polipeine BMI1	NM_005180	-1,62	-2,5 (Wang <i>et al.</i> , 2012)
GGT5	gamma-glutamyltransferasa 5	NM_001099781	-1,86	-1,7 (Redmond <i>et al.</i> , 2012)
OGG1	8-oxoguanina ADN glicosilasa	NM_003656	-2,80	-1,2 (Joyce <i>et al.</i> , 2011)

Métodos

Se cultivó endotelio corneal de hESC en tres experimentos separados como se describe en el ejemplo 2, pero con una semana más de cultivo (PD1T 2 semanas). Se aisló endotelio corneal humano adulto y se expandió en cultivo tal como se ha descrito previamente (Joyce *et al.*, Molecular Vision, 2010, 16:897-906) y se recolectó en la transferencia 0. El ARN se aisló usando el kit de aislamiento de ARN RNAeasy (Qiagen, n.º de catálogo 74104) junto con un tratamiento con ADNasa (Qiagen, n.º de catálogo 79254) y se procesó según las indicaciones del fabricante. Las muestras de ARN después se procesaron para la hibridación con matrices Human Exome ST de Affymetrix en the University of Miami Genomics Core Facility. Los datos brutos se normalizaron y se analizaron usando las aplicaciones de software Genespring GX12 y GeneGo Metacore. Después de la normalización, las sondas se filtraron usando 2 criterios diferentes: unos valores de expresión entre 20 y 99º percentil y al menos 2 de las 3 muestras en al menos una condición cumplieron estos criterios. Se usaron 28374 de 28869 sondas totales (98%) para el posterior análisis. Los genes se compararon usando un ensayo de T desapareado con comparación de valor p asintótico. La corrección de múltiples ensayos se realizó mediante Benjamini-Hochberg.

Ejemplo 10: Pureza de CEC mejorada usando depuración con esferas magnéticas de otros tipos de células

Este ejemplo demuestra que la depuración de células usando microesferas puede aumentar la pureza de las CEC derivadas de hESC o NCSC. La depuración con esferas magnéticas se utilizó para retirar las células que no eran CEC del cultivo y con ello aumentar la pureza de los cultivos de CEC.

Se emplearon esferas magnéticas acopladas a anticuerpos para capturar preferentemente células que no son CEC del cultivo (véase, por ejemplo, Peh *et al.*, Int. J. Biomater., 2012:601302). De modo específico, se utilizaron microesferas acopladas a un anticuerpo anti-CD271. Se produjeron cultivos de CEC sin transferencia (figura 21A), con transferencia en el día 10 (figura 21B), o con transferencia y retirada de las células CD271+ mediante separación con esferas magnéticas, lo cual produjo cultivos que parecían ser algo menos uniformes en la forma hexagonal/poligonal (figura 21C). Una citometría de flujo confirmó que las células que expresan niveles más altos de CD271 fueron retiradas con éxito, siendo 23% de las células positivas a la expresión de CD271 antes de la depuración (figura 21D), pero solo 2% de las células fueron positivas a CD271 después de la depuración (figura 21E).

Los solicitantes también observaron que algunas CEC derivadas de hESC expresaban niveles menores de CD271 (detectados por citometría de flujo y a partir de los datos de la micromatriz) y, basándose en esto, se cree que otros marcadores pueden ser aún más eficaces para mejorar la pureza. No obstante, los anteriores resultados en general validan el uso de la depuración con esferas magnéticas con CEC derivada de hESC e indican que el método sería eficaz, de modo similar, para retirar células que expresan otros marcadores, tales como marcadores de células pluripotenciales (por ejemplo, SSEA-1, TRA-1-60 y/o SSEA-4, etc.), marcadores de células epiteliales (por ejemplo, CD326), o marcadores de NCSC, tanto individualmente como en combinación.

Métodos

Se depuraron las células CD271+ (receptor del factor de crecimiento nervioso) de cultivos de CEC de hESC usando microesferas CD271 (Miltenyi Biotec, n.º de catálogo 130-097-128) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las CEC de hESC se tripsinizaron para retirar las células de la placa. Después de una centrifugación

para eliminar la tripsina, las células se resuspendieron y se hicieron pasar a través de un filtro de preseparación (Militenyi Biotec, n.º de catálogo 130-041-407) para retirar cualquier agrupamiento de células. Una porción de las células no clasificadas se guardó para el análisis de citometría de flujo. Las células después se incubaron con las microesferas CD271 y después se depuraron usando las columnas LD (Militenyi Biotec, n.º de catálogo 130-042-901). Una porción de las células clasificadas se analizó mediante citometría de flujo, y el resto se cultivaron en placa inmediatamente. Existen dos controles para el crecimiento de las células, primero se usaron CEC de hESC intactas, así como CEC de hESC que habían sido tripsinizadas y vueltas a cultivar en placa (transferencia 1).

El análisis de citometría de flujo se realizó comparando las células clasificadas y no clasificadas. Se utilizó CD271-anticuerpo de APC (Militenyi Biotec, n.º de catálogo 130-091-884) a 1:11 para detectar la expresión de CD271 en clasificadas y no clasificadas. Se usaron los acontecimientos de células no marcadas para células clasificadas y no clasificadas para establecer una ventana de análisis a 99,5%.

Ejemplo 11: Ensayo clínico de CEC

El ejemplo describe experimentos para establecer la seguridad de células endoteliales corneales derivadas de hES trasplantadas. Se generaron células endoteliales corneales (CE) de calidad clínica en una instalación de producción clínica que se ajusta a GMP. Las células CE se sometieron a unos estrictos controles de validación y de calidad antes del lanzamiento final de la suspensión de células CE para el trasplante. Cada lote de células CE se somete a una batería de ensayos de seguridad y de control de calidad, que incluyen ensayos para la esterilidad, presencia de micoplasmas, presencia de endotoxinas, ausencia de células madre pluripotenciales y cariotipificación. La identidad se confirma mediante huella digital de ADN, morfología endotelial apropiada y expresión de marcadores coherentes con células CE. La pureza se determina mediante tinción inmunohistoquímica para los niveles aceptables y la distribución de proteínas específicas de CE, que incluyen la bomba de Na⁺/K⁺ATPasa, ZO-1 y KLF13. Además, cada lote se caracteriza mediante qRT-PCR para demostrar la infrarregulación de los marcadores de hESC (OCT-4, NANOG, y Sox-2) y la sobreexpresión de genes específicos de células CE según especificaciones validadas.

Las células endoteliales corneales producidas según los métodos descritos en la presente pueden usarse en modelos de animales no humanos para establecer la seguridad y/o la eficacia potenciales para un uso humano. Se emplean composiciones farmacéuticas de células en modelos de animales no humanos que evalúan la función de CEC. Las células (por ejemplo, en forma de láminas o suspensiones) pueden administrarse de modo quirúrgico al ojo de un animal no humano. Por ejemplo, pueden usarse composiciones de CEC en modelos de conejo, como se describe en uno o más de Honda *et al.*, Arch Ophthalmol., octubre de 2009, 127(10):1321-6; Hitani *et al.*, Mol. Vis., 3 de enero de 2008, 14:1-9; Mimura *et al.*, (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2005, 46:3637-3644; Hsue *et al.*, Transplantation, 2006, 81:473-476; Lai *et al.*, Transplantation, 2007, 84:1222-1232; Shimmura *et al.*, Br. J. Ophthalmol., 2005, 89:134-137; Chen *et al.*, Molecular Vision, 2011, 17:2148-2156; y Gospodrowicz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 76, n.º 1, pp. 464-468, enero de 1979; y/o pueden usarse en modelos de roedores (por ejemplo, ratón/rata), como se describe en Hayashi *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, julio de 2009, vol. 50, n.º 7, pp. 3151-3158; Mimura *et al.*, Experimental Eye Research, 79 (2004), 231-237; Tchah, J. Korean Med. Sci., diciembre de 1992, 7(4):337-42; y/o pueden usarse en modelos de primates no humanos, tal como se describe en Koizumi *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2007, 48:4519-4526; Koizumi *et al.*, Cornea, 2008, 27 (supl. 1):S48-S55; y/o en un ser humano o no humano, tal como se describe en Peh *et al.*, Transplantation, 2011, 27 de abril, 91(8):811-9.

Las células endoteliales corneales producidas según los métodos descritos en la presente pueden usarse para la terapia de paciente como sigue: (i) los pacientes inicialmente reciben un tratamiento inmunosupresor (por ejemplo, esteroides); (ii) los pacientes se asignan opcionalmente a una cohorte de tratamiento (por ejemplo, cuatro cohortes de tres pacientes cada una); (iii) se administran dosis crecientes de células a las cohortes (preferiblemente de modo unilateral, es decir, a uno de los dos ojos del paciente). El desarrollo clínico de cada paciente se controla después del trasplante, por ejemplo, a lo largo de las primeras 6 semanas después del trasplante y, opcionalmente, en otros momentos (antes o después), preferiblemente durante al menos un año. La evaluación primaria de los pacientes incluye el control de acontecimiento adversos ("adverse events", AE) y las toxicidades limitantes de la dosis ("dose-limiting toxicities", DTL), que incluyen ensayos para la detección de patologías inmunológicamente mediadas, formación de teratomas y/o crecimiento anómalo de vasos sanguíneos. Los pacientes se evalúan también para criterios de valoración secundarios, que incluyen la eficacia con respecto a la presión intraocular ("intraocular pressure", IOP), agudeza visual y/o recuento de células endoteliales del injerto. Preferiblemente, se continúa con un seguimiento a largo plazo de hasta 15 años o más para evaluar los efectos a largo plazo. Cuando se obtienen unos datos de seguridad satisfactorios a partir de las cohortes iniciales de pacientes, se realiza un tratamiento unilateral o bilateral de más pacientes. Además, a los pacientes en las cohortes unilaterales iniciales se les puede ofrecer la oportunidad de recibir terapia en la córnea previamente no tratada.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para producir células endoteliales corneales (CEC), que comprende poner en contacto células madre de la cresta neural ("neural crest stem cells", NCSC) con al menos un agonista de la proteína 2 relacionada con dickkopf (DKK2) y/o al menos un agonista de la subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas ("platelet-derived growth factor subunit B", PDGFB) que induce la diferenciación de las NCSC en CEC,

en el que el agonista de DKK2 se selecciona del grupo que consiste en: DKK2; Dkk 1; Dkk 3; Dkk 4; Soggy; proteínas relacionadas con el encrespamiento segregadas ("secreted frizzled related proteins", Frzb); factor inhibidor de Wnt ("Wnt inhibitor factor", WIF); IWR; pirvinio; ICG-001; PKF115-584; IWP; Ant1.4Br/Ant 1.4Cl; niclosamida; apiculareno; bafilomicina; XAV939; NSC668036; 2,4-diaminoquinazolina; quercetina; proteínas de Wnt, ácidos nucleicos que codifican proteínas de Wnt, LiCl, norrina; R-espondina2; (hetero)arilpirimidinas; IQ1; BIO(6-bromoindirubina-3'-oxima); 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina; WAY-316606; QS11; SB-216763; SB-216763; DCA; y cualquiera de sus combinaciones; y/o

en el que el agonista de PDGFB se selecciona del grupo que consiste en: PDGFB; polipéptido de PDGFAA; un ácido nucleico que codifica PDGFAA; polipéptido de PDGFAB; un ácido nucleico que codifica PDGFAB; 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA); VEGF, y cualquiera de sus combinaciones.

2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un agonista de DKK2 es DKK2 y/o dicho al menos un agonista de PDGFB es PDGFB.

3.- El método de la reivindicación 2, en el que las NCSC se ponen en contacto con DKK2 y PDGFB.

4.- El método de la reivindicación 1, en el que las NCSC se producen a partir de células madre embrionarias ("embryonic stem", ES), y el método comprende poner en contacto las células ES con al menos un inhibidor de la señalización de proteínas Small/Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) seleccionado de nogina, 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida (SB431542), o una combinación de nogina y SB431542, para inducir la diferenciación de las células ES en células madre de la cresta neural (NCSC).

5.- El método de la reivindicación 1, en el que las CEC expresan uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: Na⁺/K⁺ATPasa, ZO-1, KLF13, AQP1, colágeno VIII, SLC16A3, CFTR, NBC1, CA2, AE2/SCL4A2, SCL16A1, CA12, CA4 y FoxC1.

6.- El método de la reivindicación 5, en el que las CEC expresan Na⁺/K⁺ATPasa, ZO-1, KLF13, AQP1, colágeno VIII, SLC16A3, CFTR, NBC1, CA2, AE2/SCL4A2, SCL16A1, CA12, CA4 y FoxC1.

7.- El método de la reivindicación 1, en el que las NCSC expresan uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: Sox10, AP2, HNK1, PAX7, p75 (NGFR), y cualquiera de sus combinaciones.

8.- El método de la reivindicación 1, en el que las CEC no expresan los marcadores vWF y CD31.

9.- El método de la reivindicación 1, en el que las CEC forman una monocapa de células con un tamaño uniforme, mostrando al menos 50% una forma hexagonal.

10.- El método de la reivindicación 1, en el que las CEC muestran un menor nivel de estrés oxidativo acumulado y/o daños en el ADN, comparado con CEC aisladas a partir de un hospedante vivo.

11.- El método de la reivindicación 1, en el que el tamaño promedio de las CEC en cultivo es menor que 1/9.000 mm².

12.- El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende poner en contacto las NCSC con DKK2 a una concentración entre 2 ng/ml y 20 ng/ml.

13.- El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende poner en contacto las NCSC con PDGFB a una concentración entre 2 ng/ml y 20 ng/ml.

14.- El método de la reivindicación 1, que comprende además cultivar las CEC sobre una matriz seleccionada de laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, sulfato de heparano, una preparación soluble de células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un extracto de membrana basal humana, y cualquiera de sus combinaciones.

15.- El método de la reivindicación 1, en el que las CEC son CEC humanas.

FIG. 1

A

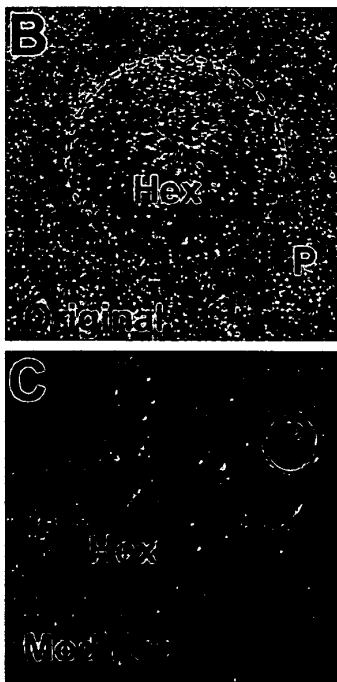
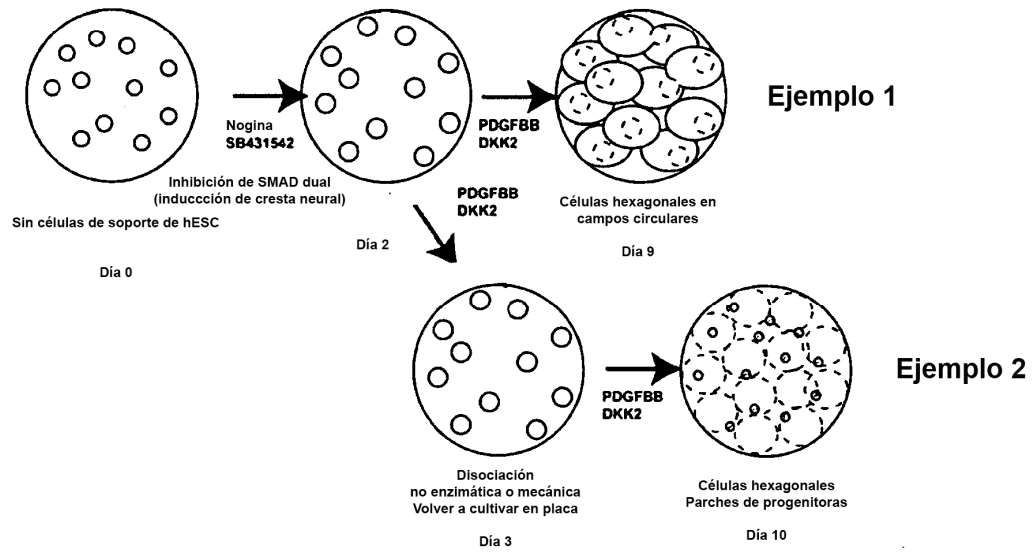


FIG. 2

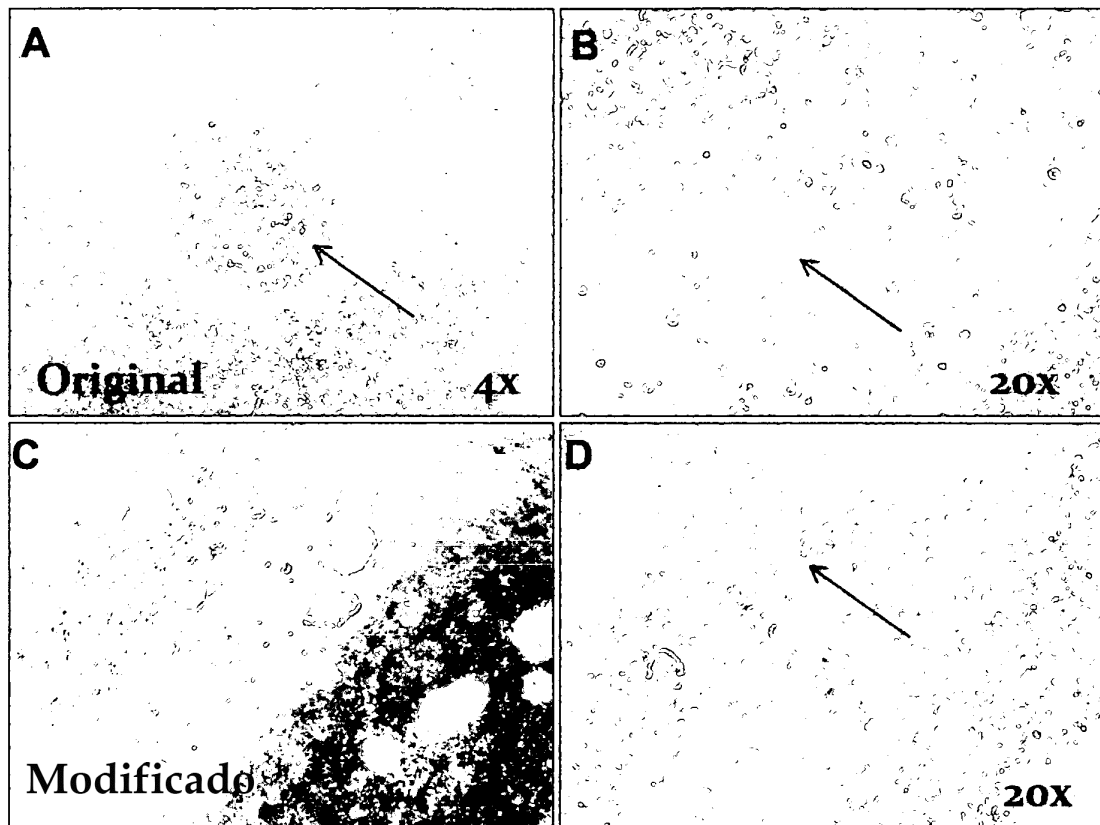


FIG. 3

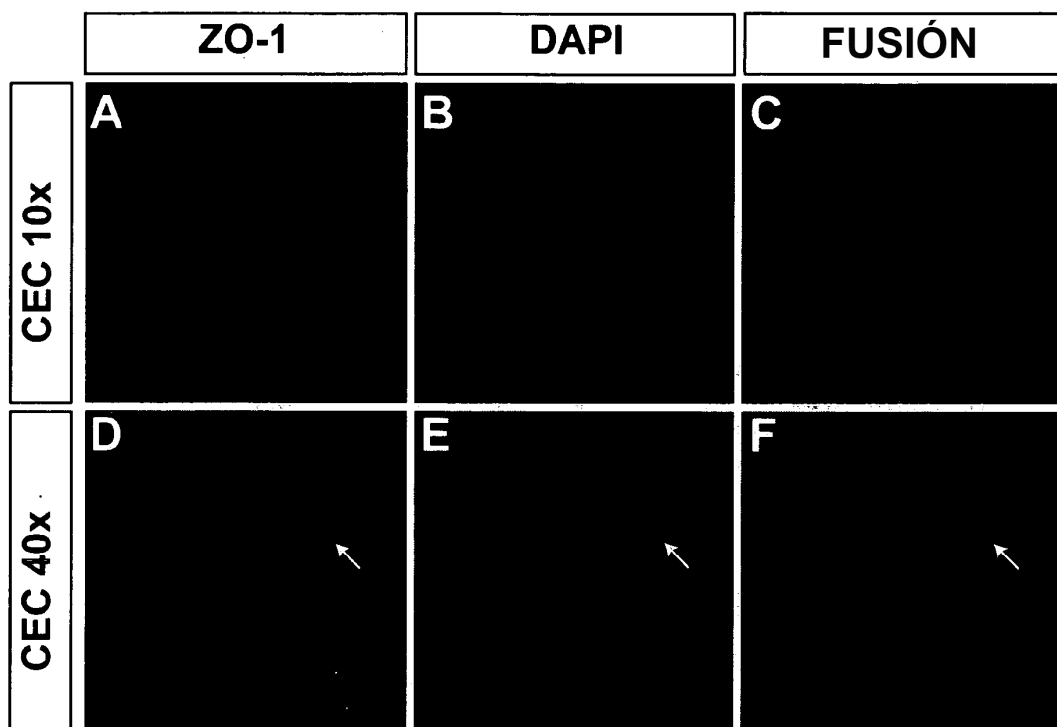


FIG. 4

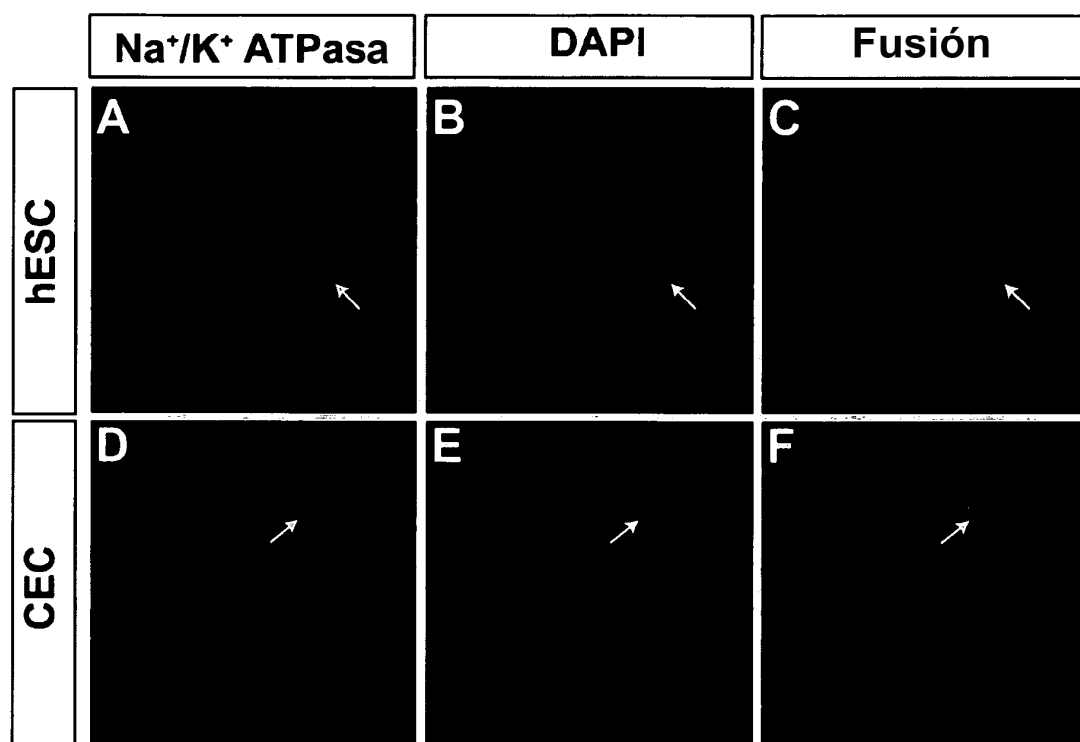


FIG. 5

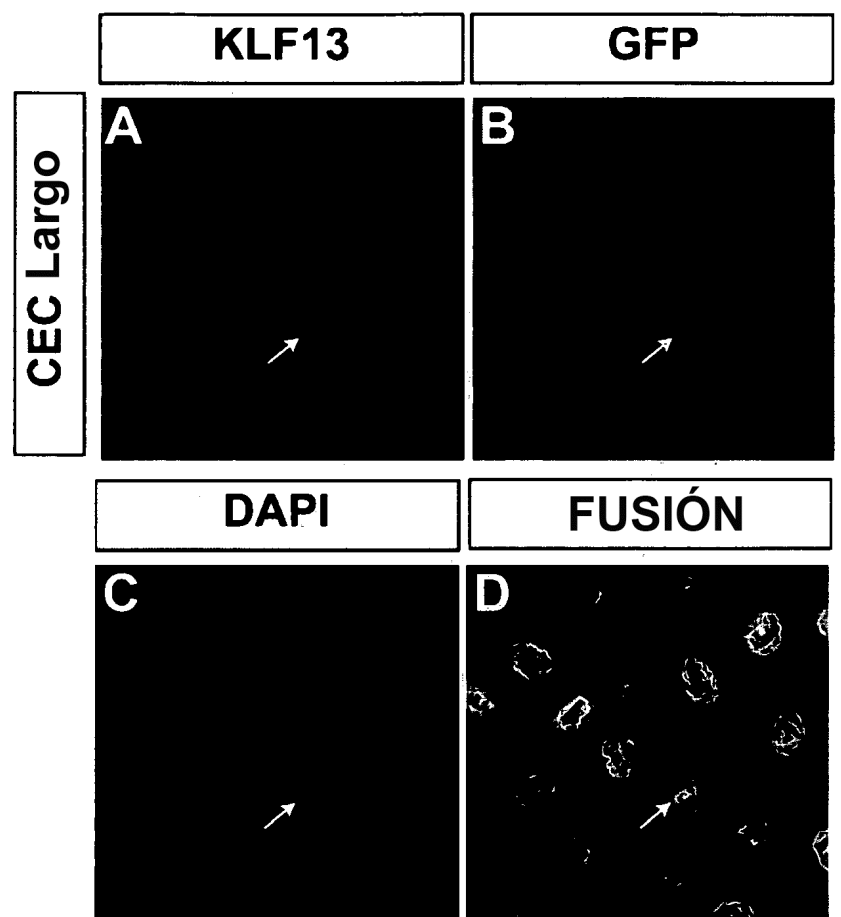


FIG. 6

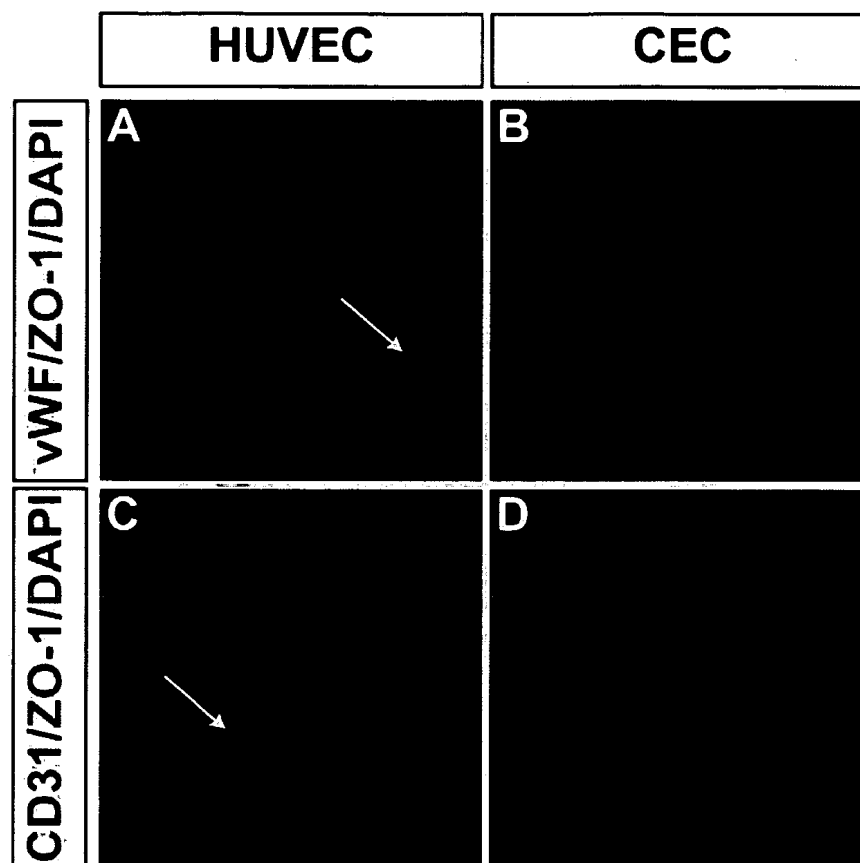


FIG. 7

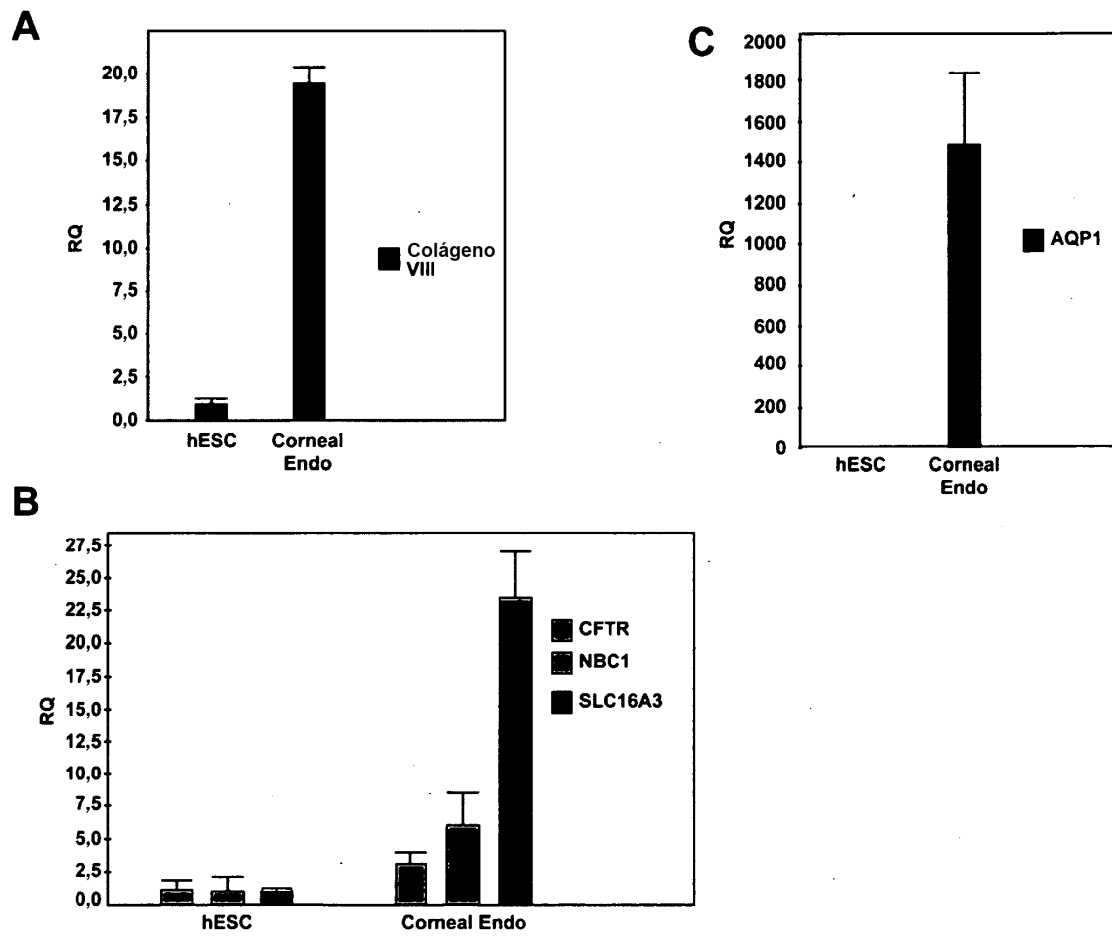


FIG. 8

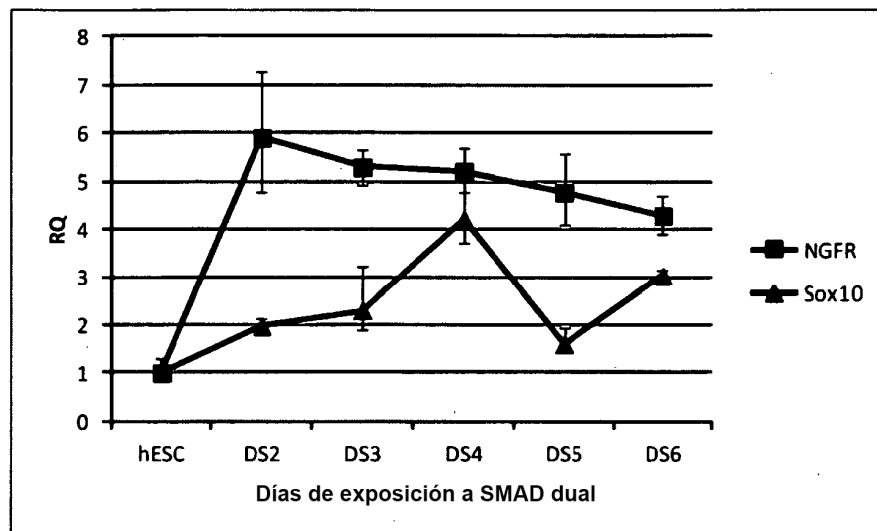


FIG. 9

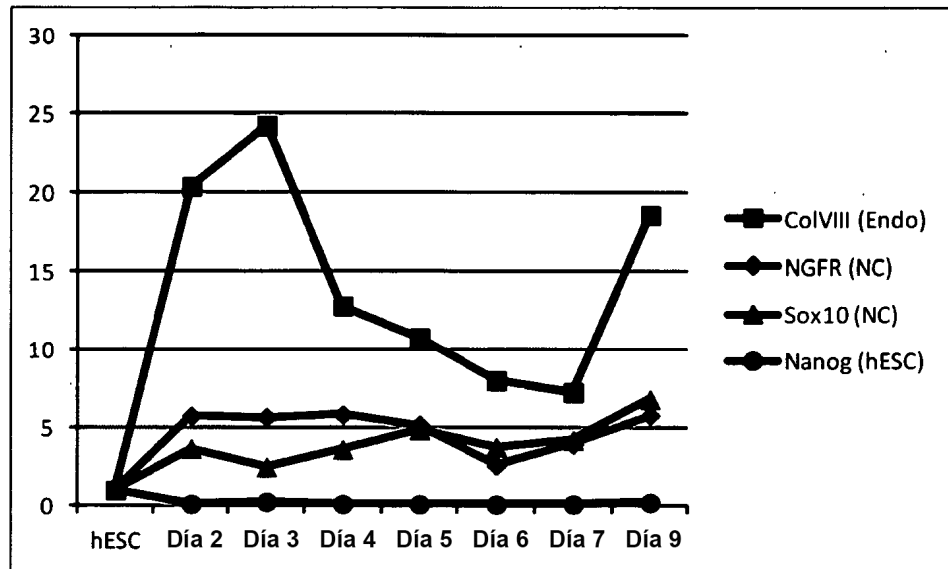


FIG. 10

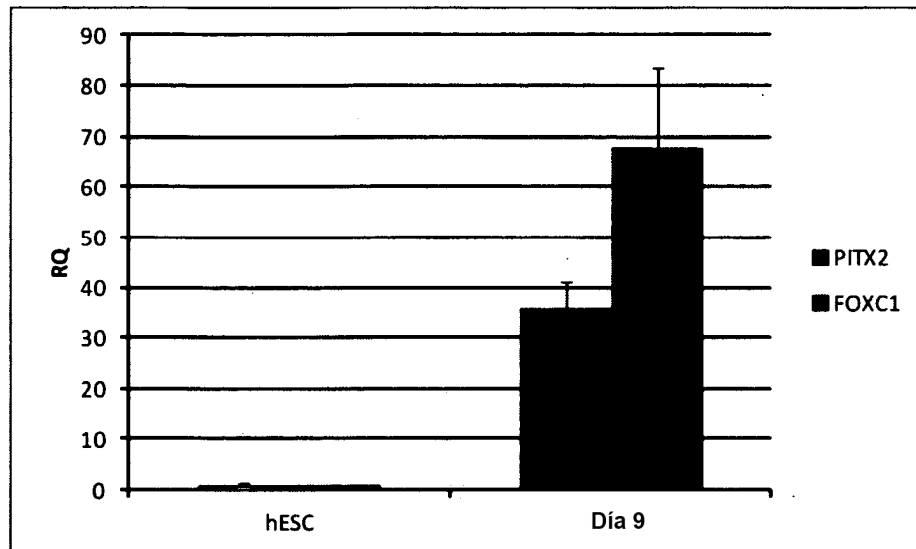


Figura 10. Las células endoteliales corneales expresan los factores de transcripción PITX2 y FOXC1, marcadores de la cresta neural ocular durante el desarrollo. RQ = cuantificación relativa mediante QPCR

FIG. 11

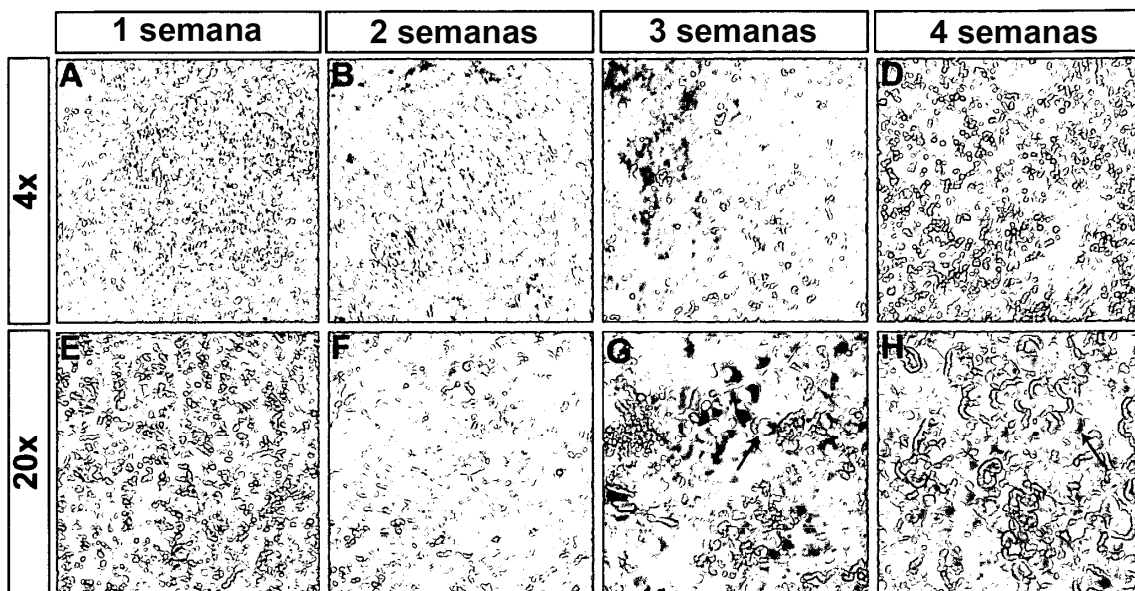


FIG. 12

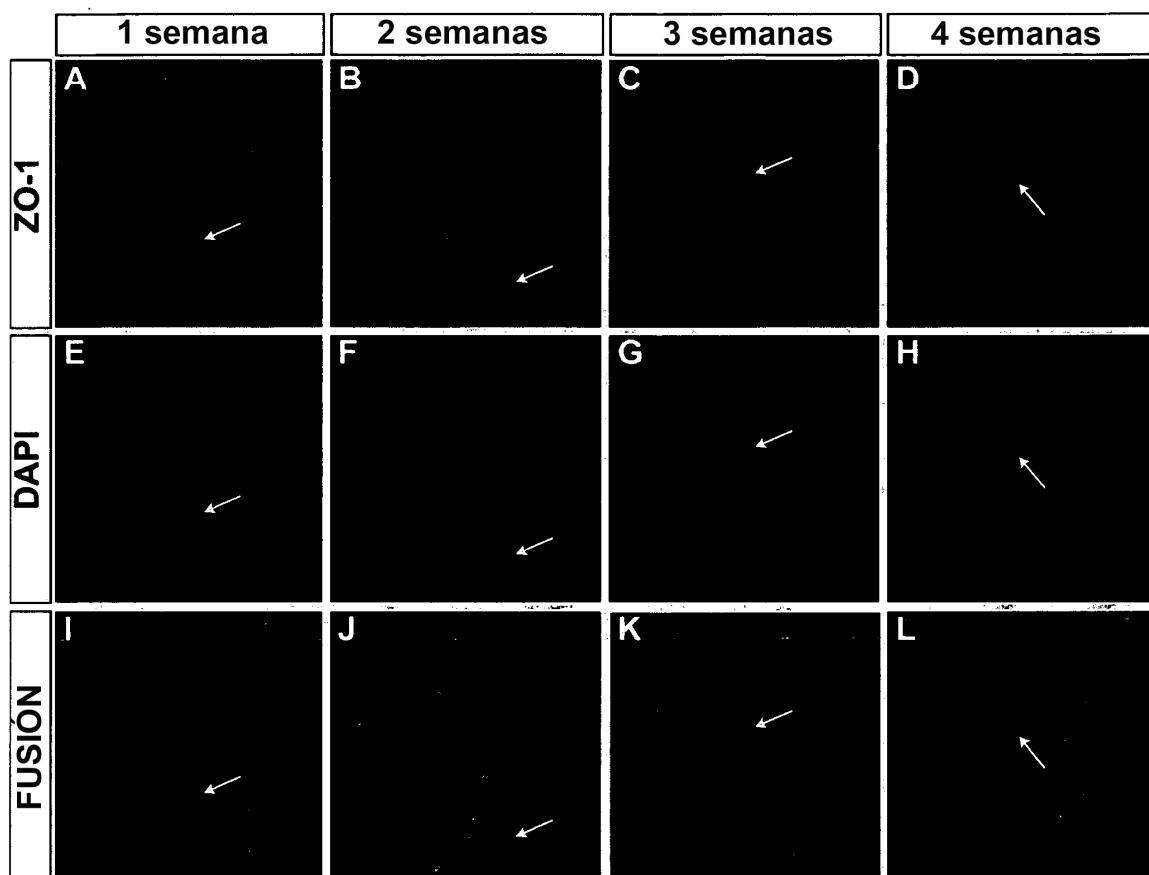


FIG. 13

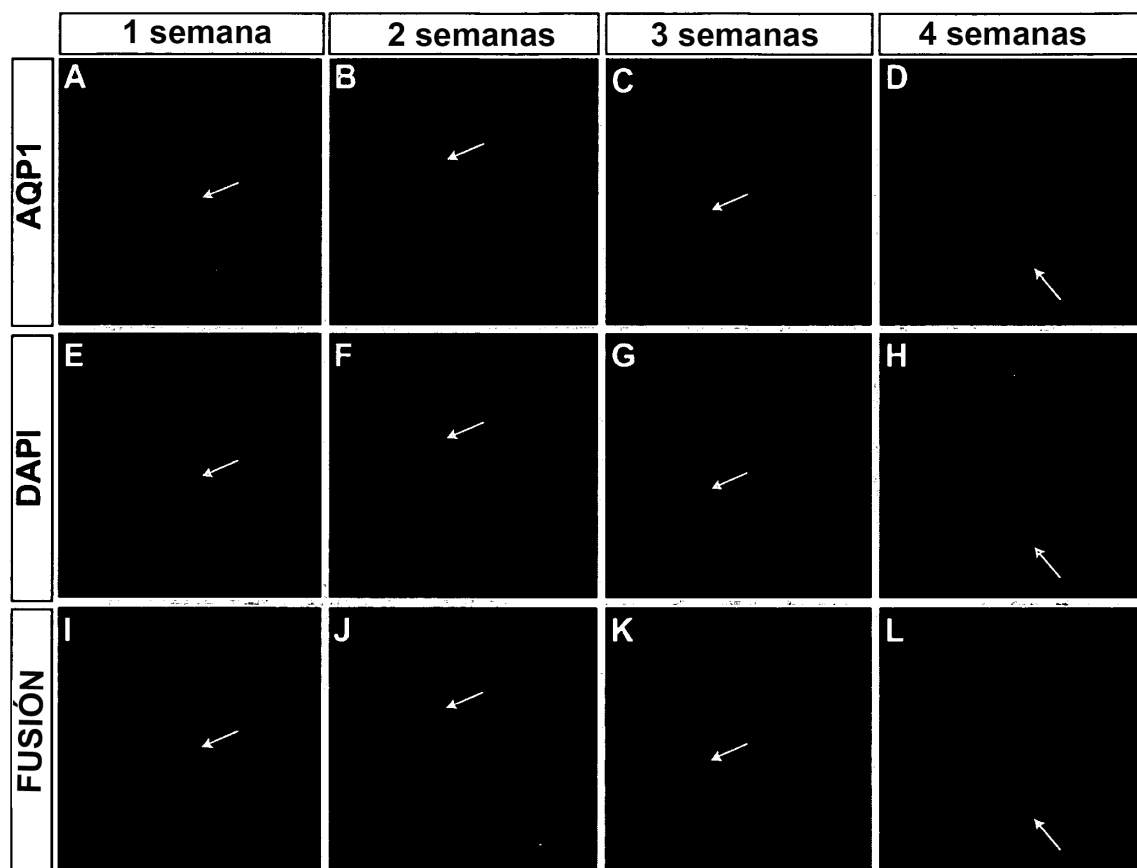


FIG. 14

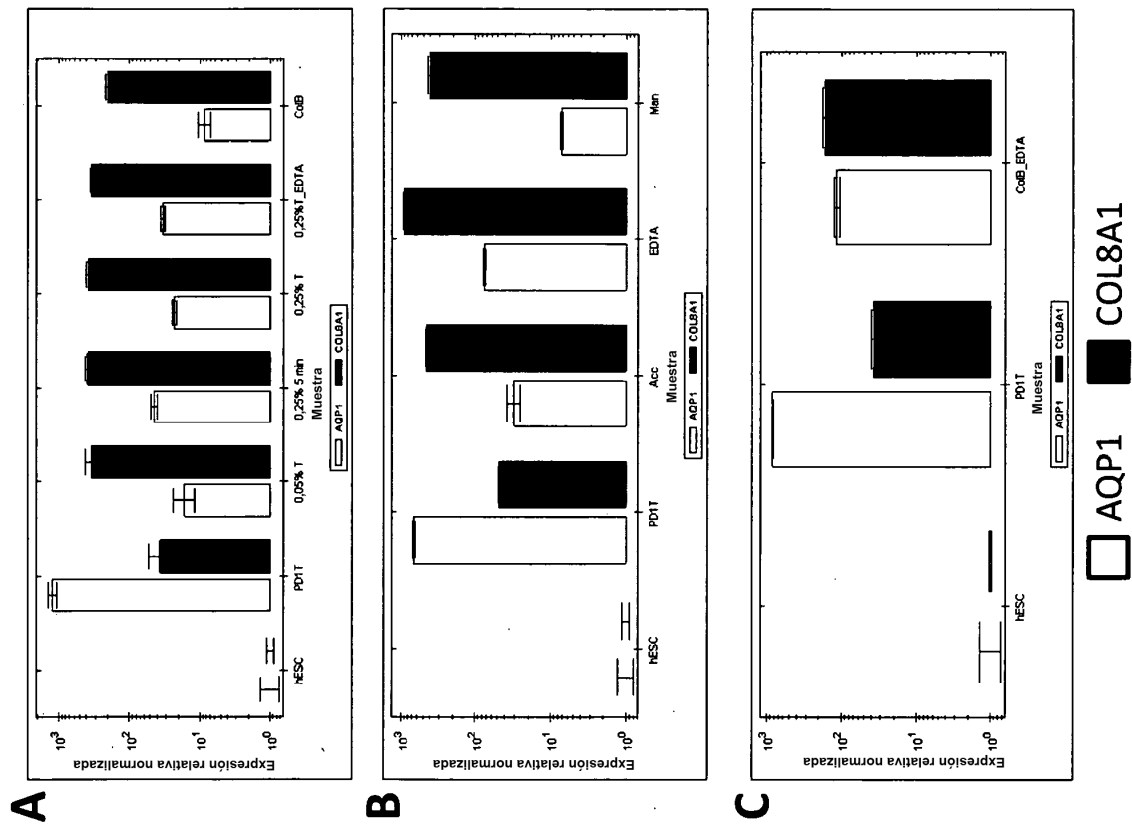


FIG. 15

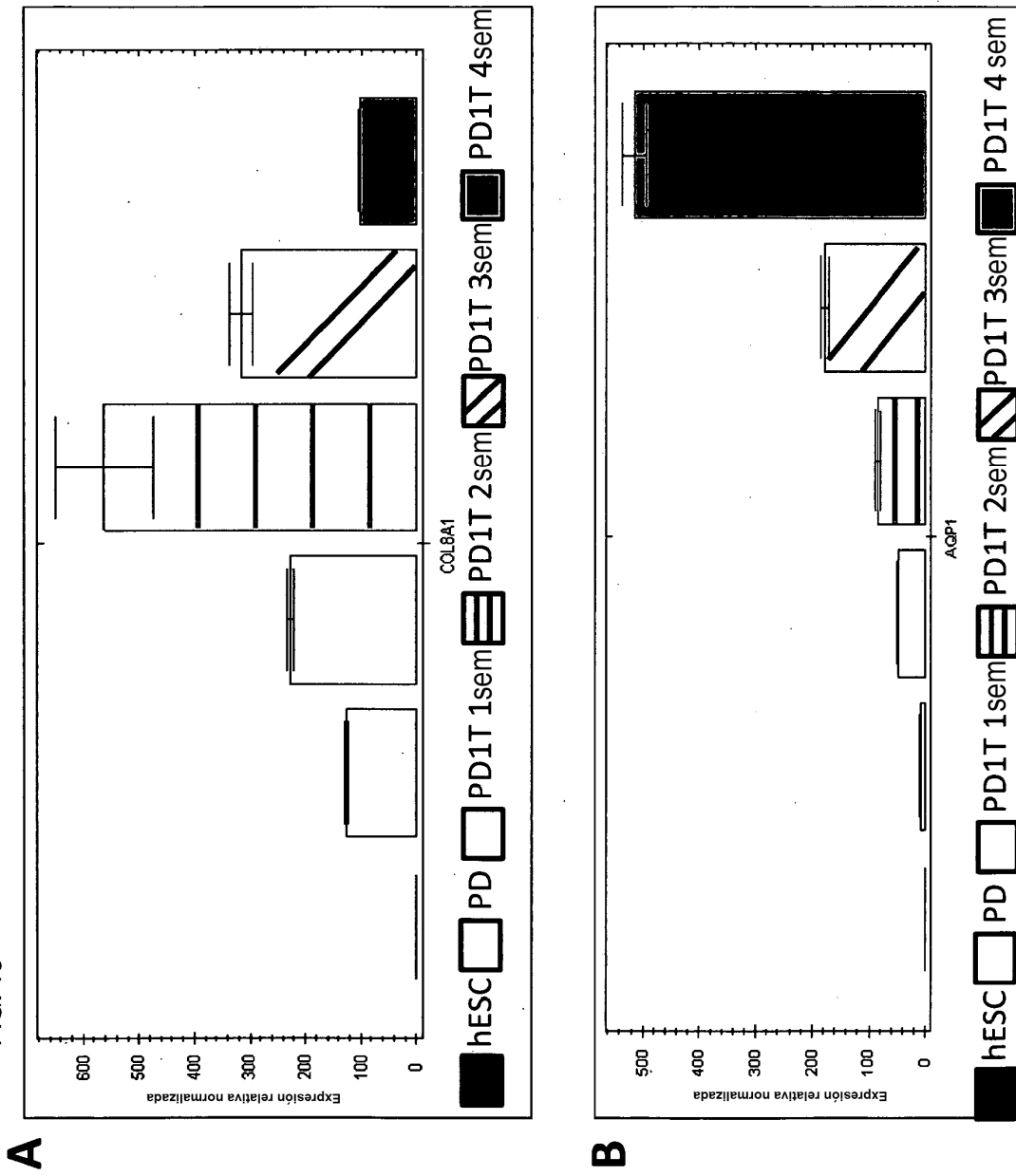
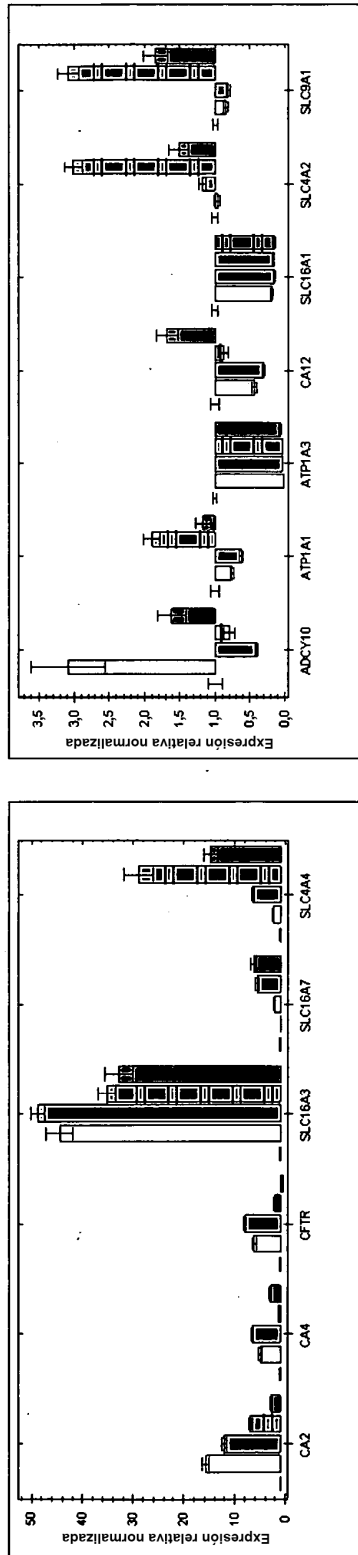


FIG. 16

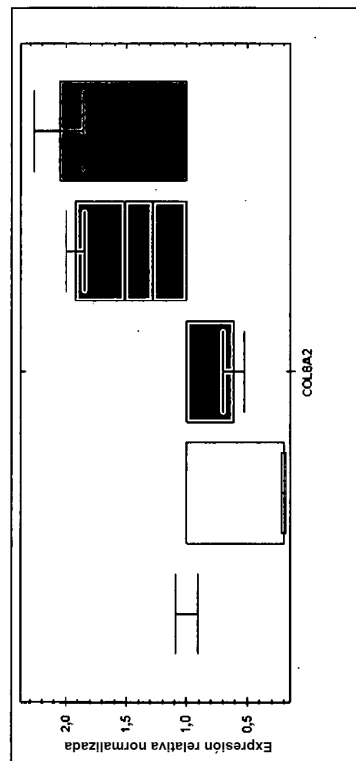
A Bombas sobreexpresadas

B Bombas presentes pero no enriquecidas

n.º de exp. de abogado 75820.200020



C COL8A2



hESC PD1T 1sem PD1T 2sem PD1T 3sem PD1T 4 sem

FIG. 17

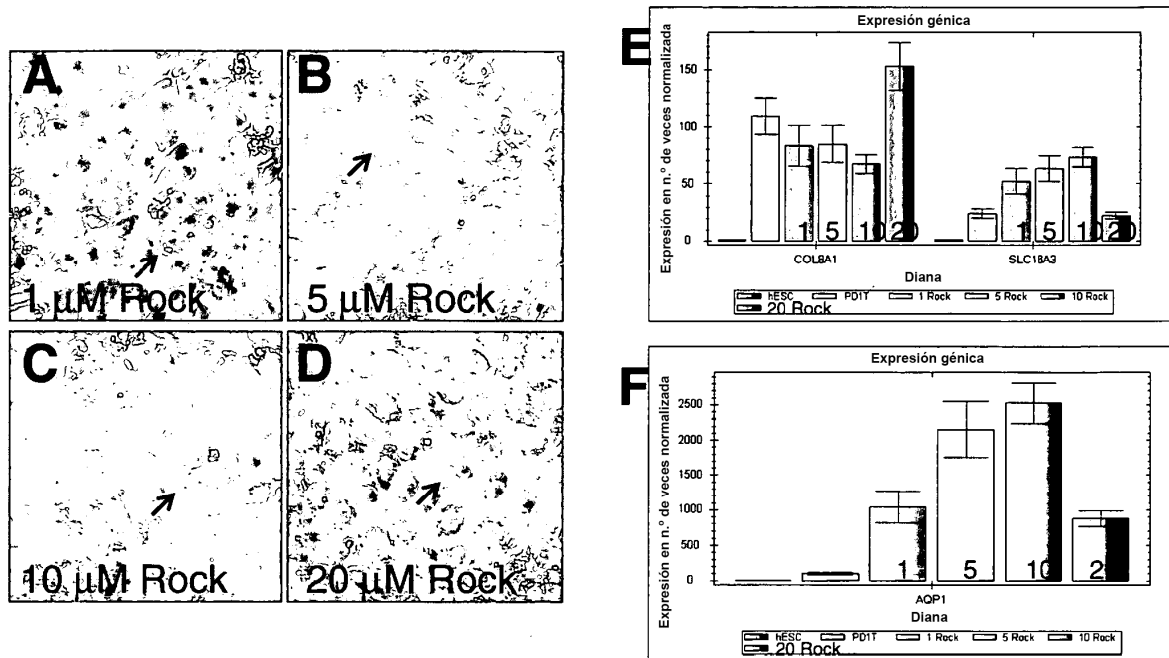


FIG. 18

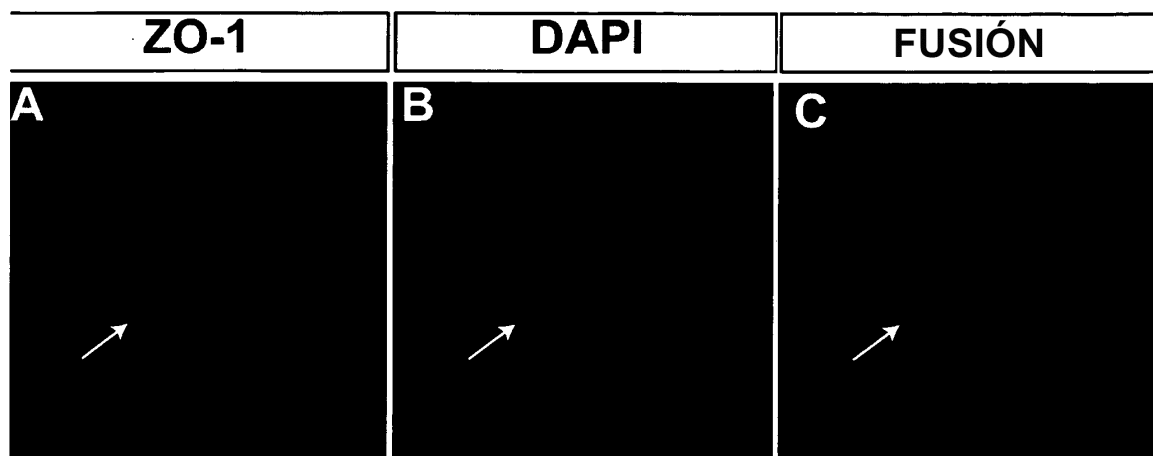


FIG. 19

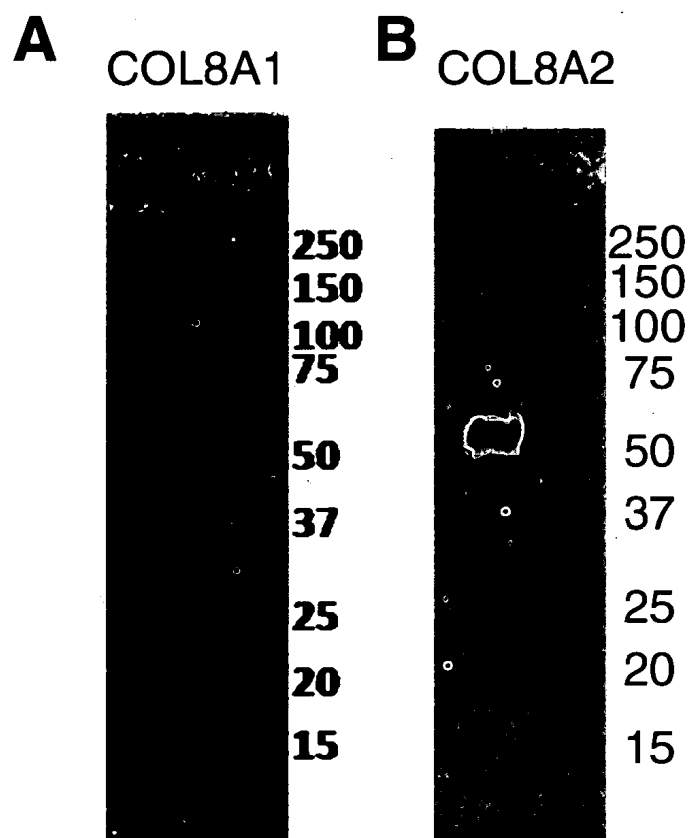


Fig. 20

Símbolo del gen	Descripción del gen	n.º de registro	Cambio en n.º de veces
PRKCZ	proteína quinasa C, zeta	NM_002744	16,45
GRHL3	similar a Grainyhead 3 (<i>Drosophila</i>)	NM_198173	12,71
CNKSR1	potenciador de conector del supresor de quinasa de Ras 1	NM_006314	11,10
SFN	estratífina	NM_006142	10,50
SCARNA1	ARN 1 específico de cuerpos de Cajal pequeños		10,02
TINAGL1	similar a antígeno de la nefritis tubulointestinal 1	NM_022164	9,97
PTPRF	proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, F	NM_002840	9,85
INADL	similar a InaD (<i>Drosophila</i>)	NM_176877	9,79
ARID3B	dominio interactivo rico en AT (similar a BRIGHT)	NM_006465	9,66
TMEM56	proteína transmembrana 56	NM_152487	9,54
LPPR4	proteína relacionada con fosfatasa de fosfato de lípidos de tipo 4	NM_014839	9,42
C1orf88	marco de lectura abierto 88 del cromosoma 1		9,41
PHGDH	fosfoglicerato deshidrogenasa	NM_006623	9,39
Tr. 7904959			9,35
BNIP1	BCL2/similar a la proteína de interacción E1B de 19 kD de adenovirus	NM_001159642	9,31
CGN	cingulina	NM_020770	9,27
RALGPS2	Ral GEF 2 con dominio PH y motivo de unión SH3	NM_152663	9,22
ELF3	factor 3 similar a E74 (factor de transcripción del dominio ets, específico de células epiteliales)	NM_001114309	9,17
FAM46B	miembro B de la familia con similitud de secuencia 46		8,78
NKAIN1	interacción con ATPasa de transporte de Na ⁺ /K ⁺ 1		8,76
RSPO1	homólogo de R-espondina (<i>Xenopus laevis</i>)	NM_001038633	8,52
C1orf210	marco de lectura 210 del cromosoma 1		8,10
KANK4	dominios 4 de repetición de anquirina y motivo KN		8,07
SYDE2	homólogo 2 de la Rho GTPasa defectuoso en sinapsis 1 (<i>C. elegans</i>)	NM_032184	8,03
ABCA4	miembro 4 de la subfamilia A de módulo de unión a ATP (ABC1)	NM_000350	8,03
F3	factor de coagulación III (tromboplastina, factor tisular)	NM_001993	8,02
FRRS1	quelado férrico reductasa 2	NM_001013660	7,98
TBX15	caja T 15	NM_152380	7,94
CRABP2	proteína 2 de unión al ácido retinoico celular	NM_001878	7,89
F11R/TSTD1	receptor de F11/contiene un dominio similar a tiosulfato sulfurotransferasa (rodanasa)	NM_016946	7,86
PVRL4	relacionado con el receptor de poliovirus 4	NM_030916	7,83
APOA2	apolipoproteína A-II	NM_001643	7,82
TNNT2	troponina T de tipo 2 (cardíaca)	NM_000364	7,80
LAD1	ladinina 1		7,65
LMOD1	leiomodina 1 (músculo liso)	NM_012134	7,59
IRF6	factor regulador de interferón 6	NM_006147	7,58
T. 7924069			7,49
LBR	receptor de lámina B		7,47
C1orf198	marco de lectura abierto 198 del cromosoma 1		7,44
FAM89A	miembro A de la familia con similitud de secuencia 89		7,38
GNG4	proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), gamma 4	NM_001098721	7,34
NET1	transformante de células neuroepiteliales 1	NM_001047160	7,17
BAMB1	homólogo inhibidor unido a membrana de BMP y activina (<i>Xenopus laevis</i>)	NM_012342	7,15

ES 2 716 200 T3

ANXA8L2/ANXA8L1	similar a anexina A8 2/anexina A8/similar a anexina A8 1		7,09
ANXA8L2/ANXA8L1/ANX8L2	anexina A8/similar a anexina A8 1/similar a anexina A8 2		7,07
TET1	oncogén tet 1	NM_030625	7,06
ENTPD1	ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1	NM_001776	7,06
ATRNL1	similar a atractina 1	NM_207303	7,04
ITIH5	inhibidor de inter-alfa (globulina) H5	NM_030569	6,98
ITGA8	integrina, alfa 8	NM_003638	6,97
MPP7	proteína de membrana palmitoilada 7 (miembro 7 de la subfamilia de MAGUK p55)		6,96
ANXA8L1/ANXA8L2	similar a anexina A8 1/anexina A8/similar a anexina A8 2		6,96
ACTA2	actina, alfa 2, músculo liso, aorta	NM_00141945	6,94
ANKRD1	dominio repetido de anquirina 1 (músculo cardíaco)	NM_014391	6,91
CYP2C8/CYP2C19	citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 8/citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 19	NM_000770	6,87
PDLIM1	dominio 1 PDZ y LIM	NM_020992	6,85
KIAA198		NM_001127211	6,85
C11orf35/LOC692247	marco de lectura abierto 35 del cromosoma 11/locus hipotético LOC692247		6,73
IGF2/INS-IGF2	factor 2 de crecimiento similar a insulina (somatomedina a)/transcrito de lectura total de INS-IGF2	NM_000612	6,69
SNORA3	ARN nucleolar pequeño, caja H/ACA 3		6,66
SNORA23	ARN nucleolar pequeño, caja H/ACA 23		6,61
PDE3B	fosfodiesterasa 3B, inhibida por cGMP	NM_000922	6,58
NAV2	navegador de neuronas 2	NM_182964	6,53
TSPAN18	tetraespanina 18		6,50
CREB3L1	proteína 3 de unión al elemento de respuesta a AMPc 1	NM_052854	6,49
PTPRJ	proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, J	NM_002843	6,48
STX3	sintaxina 3	NM_004177	6,46
C11orf9	marco de lectura abierto 9 del cromosoma 11	NM_001127392	6,45
CST6	cistatina E/M	NM_001323	6,45
P2RY2	receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 2	NM_176072	6,42
P2RY6	receptor pirimidinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 6	NM_176796	6,39
PIWIL4	similar a piwi 4 (<i>Drosophila</i>)	NM_152431	6,38
ST14	supresión de tumorigenicidad 14 (carcinoma de colon)	NM_021978	6,36
ANO9	anotamina 9	NM_001012302	6,36
SOX6	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 6	NM_017508	6,34
PLEKHA7	miembro 7 de la familia A que contiene dominio de homología de pleckstrina	NM_175058	6,30
SLC5A12	miembro 12 de la familia portadores de solutos 5 (cotransportador de sodio/glucosa)	NM_178498	6,26
RCOR2	correpresor REST 2	NM_173587	6,25
SHANK2	dominios 2 de repetición de múltiples anquirina y SH3	NM_012309	6,23
EXPH5	exofilina 5	NM_015065	6,20
DRD2	receptor de dopamina D2	NM_000795	6,14
FXYD6	regulador 6 del transporte iónico que contiene el dominio FXYD	NM_001164836	6,13
USP2	peptidasa 2 específica de ubiquitina	NM_004205	6,09

ES 2 716 200 T3

CACNA1C	subunidad alfa 1C de tipo L del canal de calcio dependiente de voltaje	NM_199460	6,03
CCND2	ciclina D2	NM_001759	6,03
SCARNA10	ARN específico de cuerpo de Cajal pequeño 10		6,02
PIK3C2G	gamma-polipéptido de clase 2 de fosfoinositida-3-quinasa	NM_004570	5,94
METTL7A	7A similar a metiltransferasa	NM_014033	5,93
ERBB3	homólogo 3 de oncogén vírico de leucemia eritroblástica (aviar) v-erb-b2	NM_001982	5,93
HMG2A	gancho-AT 2 de grupo de alta movilidad	NM_003483	5,93
RAB2IP	proteína de interacción con RAB3A (rabina3)	NM_175623	5,90
MIR492/KRT19P2	microARN 492/pseudogén 2 de queratina 19	NM_002276	5,87
SLC2A3	miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 2 (facilitada por el transportador de glucosa)	NM_006931	5,86
CLEC1B	miembro B de la familia 1 de dominio de lectina de tipo C	NM_016509	5,82
DUSP16	fosfatasa 16 de especificidad dual	NM_030640	5,80
SOX5	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 5	NM_152989	5,79
FAM60A	miembro A de la familia con similitud de secuencia 60		5,78
PRICKLE1	homólogo 1 de Prickle (<i>Drosophila</i>)	NM_153026	5,78
ADAMTS20	motivo de tipo 1 de metalopeptidasa ADAM con trombospondina, 20	NM_025003	5,73
GALNT6	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6 (GalNAc-T6)	NM_007210	5,71
KRT8	queratina 8	NM_002273	5,71
TAC3	taquiquinina 3	NM_033654	5,71
LUM	lumicano	NM_002345	5,66
NUAK1	quinasa 1 similar a SNF1 de la familia NUAK	NM_014840	5,65
RNU4-1	ARN, nuclear pequeño U4 1		5,65
SGCG	sarcoglicano, gamma (glicoproteína asociada a distrofina de 35 kDa)	NM_000231	5,64
C13orf15	marco de lectura abierto 15 del cromosoma 13	NM_014059	5,62
MIR622/KRT18	microARN 622/queratina 18	NM_000224	5,61
MIR17HG/MIR19A/ MIR19B1/MIR20A/ MIR92A1/MIR18A	gen de hospedante MIR17 (no codifica proteínas)/microARN 17/microARN 19a/microARN 19b-1/microARN 20a/microARN 92a-1/microARN 18a		5,59
GPC6	glipicano 6		5,56
FLT1	tirosina quinasa 1 relacionada con fms (factor de crecimiento endotelial vascular/receptor del factor de permeabilidad vascular)	NM_002019	5,55
SLC7A1	miembro 1 de la familia de transportadores de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+)	NM_003045	5,54
PCDH9	protocadherina 9	NM_203487	5,54
POTEM/POTEG/ POTEE/POTEF/POTEH	miembro M de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro G de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro E de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro F de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro H de la familia del dominio de anquirina POTE	NM_014579	5,52
SLC39A2	miembro 2 de la familia de transportadores de solutos 39 (transportador de cinc)	NM_014579	5,52
DACT1	homólogo 1 del antagonista de beta-catenina Dapper (<i>Xenopus laevis</i>)	NM_016651	5,52
AKAP5	proteína 5 de anclaje de quinasa A (PRKA)	NM_004857	5,50
DIO3	desyodinasas, yodotironina, tipo III	NM_001362	5,43

ES 2 716 200 T3

POTEG/POTEM/POTEH	miembro G de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro M de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro H de la familia del dominio de anquirina POTE		5,39
RNASE1	ribonucleasa 1 de la familia A de ARNasas (pancreática)		5,39
NID2	nidógeno 2 (osteonidógeno)	NM_007361	5,38
RAB15		NM_198686	5,37
TC2N	dominios C2 en tándem, nuclear		5,36
CLMN	calmina (similar a calponina, transmembrana)		5,36
SNORD116-25	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 116-25		5,34
SNORD116-26	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 116-26		5,32
SNORD115-1/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-12/SNORD115-26/SNORD115-40/SNORD115-41/SNORD115-5/SNORD115-9/SNRPN	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/polipéptido N de ribonucleoproteína nuclear pequeña	AF400495	5,25
SNORD115-12/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-11/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-20/SNORD115-17/SNORD115-18/SNORD115-19/SNORD115-13/SNORD115-25/SNORD115-40/SNORD115-42/SNORD115-10/SNORD115-14/SNORD115-15/SNORD115-24	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-20/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-17/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-18/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-19/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-25/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-4/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-42/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-15/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24		5,25

SNORD115-12/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-11/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-22/SNORD115-20/SNORD115-39/SNORD115-17/SNORD115-18/SNORD115-19/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-25/SNORD115-40/SNORD115-44/SNORD115-34/SNORD115-42/SNORD115-6/SNORD115-10/SNORD115-14/SNORD115-15/SNORD115-21/SNORD115-24	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-20/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-17/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-18/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-19/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-3/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-25/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-44/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-4/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-42/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-15/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-21/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24		5,24
SNORD115-11/SNORD115-12/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-26/SNORD115-22/SNORD115-20/SNORD115-39/SNORD115-41/SNORD115-17/SNORD115-18/SNORD115-19/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-40/SNORD115-44/SNORD115-10/SNORD115-14/SNORD115-34/SNORD115-42/SNORD115-6/SNORD115-24	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-20/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-3/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-17/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-18/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-19/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-44/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-4/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-42/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24		5,23

SNORD115-12/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-11/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-22/SNORD115-20/SNORD115-39/SNORD115-17/SNORD115-18/SNORD115-19/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-25/SNORD115-40/SNORD115-44/SNORD115-34/SNORD115-42/SNORD115-6/SNORD115-10/SNORD115-14/SNORD115-15/SNORD115-21/SNORD115-24	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-20/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-17/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-18/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-19/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-3/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-25/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-44/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-4/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-42/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-15/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-21/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24		5,21
SNORD115-1/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-12/SNORD115-40/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-10/SNORD115-14/SNORD115-21/SNORD115-42/SNRPN	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-21/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-4/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-42/ polipéptido N de ribonucleoproteína nuclear pequeña	AF400495	5,20
SNORD115-1/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-11/SNORD115-26/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-39/SNORD115-40/SNORD115-41/SNORD115-43/SNORD115-34/SNORD115-6/SNRPN	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/polipéptido N de ribonucleoproteína nuclear pequeña	AF400496	5,15

SNORD115-11/SNORD115-22/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-26/SNORD115-39/SNORD115-41/SNORD115-16/SNORD115-44/SNORD115-34/SNORD115-/SNORD115-6/SNORD115-7	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-44/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-7		5,13
SNORD115-26/SNORD115-11/SNORD115-12/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-22/SNORD115-39/SNORD115-41/SNORD115-16/SNORD115-44/SNORD115-24/SNRPN	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-3/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-44/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24/polipéptido N de ribonucleoproteína nuclear pequeña	AF400501	5,12
SNORD115-11/SNORD115-12/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-26/SNORD115-22/SNORD115-20/SNORD115-39/SNORD115-41/SNORD115-17/SNORD115-18/SNORD115-19/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-40/SNORD115-44/SNORD115-10/SNORD115-14/SNORD115-34/SNORD115-42/SNORD115-/SNORD115-6/SNORD115-24	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-20/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-3/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-17/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-18/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-19/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-44/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-4/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-42/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24		5,12

SNORD115-11/SNORD115-12/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-26/SNORD115-22/SNORD115-20/SNORD115-39/SNORD115-41/SNORD115-17/SNORD115-18/SNORD115-19/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-40/SNORD115-44/SNORD115-10/SNORD115-14/SNORD115-34/SNORD115-42/SNORD115-6/SNORD115-24	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-20/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-3/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-17/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-18/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-19/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-44/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-4/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-42/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24		5,12
SNORD115-11/SNORD115-26/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-39/SNORD115-43/SNORD115-41/SNORD115-22/SNORD115-16/SNORD115-14/SNORD115-38/SNORD115-44	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-38/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-44/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-3		5,08
SNORD115-42/SNORD115-6/SNORD115-30/SNORD115-34/SNORD115-15/SNORD115-21/SNORD115-12/SNORD115-13/SNORD115-40/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-10/SNORD115-14/SNORD115-24	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-42/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-4/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-30/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-15/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-21/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-14/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24		5,06

ES 2 716 200 T3

SNORD115-11/SNORD115-12/SNORD115-29/SNORD115-36/SNORD115-43/SNORD115-5/SNORD115-9/SNORD115-26/SNORD115-22/SNORD115-20/SNORD115-39/SNORD115-41/SNORD115-17/SNORD115-18/SNORD115-19/SNORD115-13/SNORD115-16/SNORD115-40/SNORD115-44/SNORD115-34/SNORD115-6/SNORD115-10/SNORD115-24	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-11/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-12/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-29/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-36/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-43/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-5/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-9/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-26/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-22/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-20/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-39/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-3/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-41/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-17/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-18/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-19/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-1/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-13/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-16/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-40/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-34/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-6/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-10/ARN nucleolar pequeño, caja C/D 115-24		5,05
C15orf41	marco de lectura abierto 41 del cromosoma 15		5,03
PAK6	quinasa 6 activada por proteína p21 (Cdc42/Rac)	NM_020168	5,03
SPINT1	inhibidor de serina peptidasa de Kunitz de tipo 1	NM_181642	5,01
CKMT1A/CKMT1B	creatina quinasa mitocondrial 1A/creatina quinasa mitocondrial 1B	NM_001015001	5,00
CKMT1A/CKMT1B	creatina quinasa mitocondrial 1A/creatina quinasa mitocondrial 1B	NM_001015001	5,00
SLC27A2	miembro 2 de la familia de transportadores de solutos 27 (transportador de ácidos grasos)	NM_003645	4,99
TLN2	talina 2	NM_015059	4,98
TPM1	tropomiosina 1 (alfa)	NM_000366	4,97
NR2F2	miembro 2 del grupo F de la subfamilia 2 de receptores nucleares	NM_021005	4,96
Tr. 7987403			4,95
RASGRP1	proteína 1 de liberación de RAS guanilo (regulada por calcio y DAG)	NM_005739	4,94
GATM	glicina amidinotransferasa (L-arginina:glicina amidinotransferasa)	NM_001482	4,93
CYP19A1	polipéptido 1 de la subfamilia A de la familia 19 del citocromo P450	NM_031226	4,93
MYO5C	miosina VC		4,93
RBPMS2	proteína de unión a ARN con múltiples cortes y empalmes 2		4,92
GRAMD2	contiene dominio GRAM 2		4,92
ATF7IP2	proteína de interacción 2 del factor 7 activador de la transcripción	NM_024997	4,91
ACSM3/ER12	miembro 3 de la familia de acil-CoA sintetasa de tamaño de cadena intermedio/miembro 2 de la familia de ERI1 exorribonucleasa	NM_005622	4,90
QPRT	quinolinato fosforribosiltransferasa	NM_014298	4,88
LPCAT2	lisofosfatidilcolina aciltransferasa 2	NM_017839	4,86
GPR56	receptor 56 acoplado a proteína G	NM_201524	4,86
MMP15	metaloproteinasas de matriz 15 (insertada en la membrana)	NM_002428	4,83
MARVELD3	contiene dominio MARVEL 3		4,82
PPL	periplaquina	NM_002705	4,82

ES 2 716 200 T3

GFPRC5B	miembro B del grupo 5 de la familia C de receptores acoplados a proteína G		4,79
Tr. 8000480			4,78
CDH8	cadherina 8 de tipo 2	NM_001796	4,77
ESRP2	proteína 2 reguladora del corte y empalme endotelial	NM_024939	4,75
SALC7A5	miembro 5 de la familia de transportadores de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+)	NM_003486	4,75
TMEM88	proteína transmembrana 88		4,71
RAB11FIP4	proteína 4 de interacción con la familia RAB11 (clase II)	NM_032932	4,70
MYL4	miosina, cadena ligera 4, alcalina; atrial, embrionaria	NM_001002841	4,70
TBX4	caja T 4	NM_018488	4,69
TANC2	contiene helicoidal, repeticiones de anquirina y repeticiones de tetratricopéptidos 2		4,69
LLGL2	homólogo 2 de larvas gigantes letal (<i>Drosophila</i>)	NM_001031803	4,68
ITGB4	beta-integrina 4	NM_000213	4,68
NXN	nucleorreoxina	NM_022463	4,67
LOC100130876			4,67
SLC6A4	miembro 4 de la familia de transportadores de solutos 6 (transportador de neurotransmisores, serotonina)	NM_001045	4,66
SLFN13	miembro 13 de la familia de Schlafen		4,66
KRT23	queratina 23 (inducible por histona desacetilasa)		4,66
KRT19	queratina 19	NM_002276	4,66
WNT3	miembro 3 de la familia de sitio de integración de MMTV de tipo áptero	NM_030753	4,62
HOXB2	homeocaja B2	NM_002145	4,62
HOXB3	homeocaja B3	NM_002146	4,58
RNF43	proteína de dedo anular 43		4,57
SLC16A6	miembro 6 de la familia de portadores de solutos 16 (transportador 7 de ácidos monocarboxílicos)	NM_001174166	4,57
C17orf28	marco de lectura abierto 28 del cromosoma 17		4,57
ZNF750	proteína de dedos de cinc 750		4,56
ARHGAP28	proteína 28 activadora Rho GTPasa	NM_001010000	4,55
DSG2	desmogleína 2	NM_001943	4,55
TTR	transtiretina	NM_000371	4,54
ASXL3	similar a peines sexuales adicionales 3 (<i>Drosophila</i>)	NM_030632	4,54
EPB41L3	similar a banda de proteína de membrana 4.1 de eritrocitos 3	NM_012307	4,53
LAMA1	alfa-laminina 2	NM_005559	4,53
PSTPIP2	proteína 2 de interacción con prolina-serina-treonina fosfatasa		4,52
MYO5B	miosina VB	NM_001080467	4,52
ATP8B1	miembro 1 de tipo 8B de clase I de transportadores de aminofosfolípidos de ATPasa	NM_005603	4,52
ALPK2	alfa-quinasa 2	NM_052947	4,52
CCBE1	dominios 1 de EGF de unión a colágeno y calcio	NM_133459	4,51
CYB5A	citocromo b5 de tipo A (microsómico)	NM_148923	4,51
ARID3A	dominio interactivo 3A rico en AT (similar a BRIGHT)	NM_005224	4,50
KIAA1543		NM_001080429	4,50
ZNF93	proteína de dedos de cinc 93	NM_031218	4,48
ZNF90/ZNF93	proteína de dedos de cinc 90/proteína de dedos de cinc 93	NM_007138	4,48
ZNF714	proteína de dedos de cinc 714	NM_182515	4,47

ES 2 716 200 T3

ZNF738	proteína de dedos de cinc 738	NM_027130	4,47
RPSAP58	pseudogén 58 de proteína SA ribosómica		4,47
LSR	receptor de lipoproteínas estimulado por lipolisis	NM_205834	4,45
SPINT2	inhibidor de serina peptidasa de tipo Kunitz 2	NM_021102	4,44
CGB5/CGB8/ CGB7/CGB1	beta polipéptido 5 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 8 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 7 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 1 de gonadotropina coriónica	NM_000737	4,42
FLJ45949			4,40
FBN3	fibrilina 3		4,40
RGL3	similar a estimulante de la disociación de nucleótidos de guanino ral 3	NM_001161616	4,38
NOTCH3	mella 3	NM_000435	4,35
EPHX3	epóxido hidrolasa 3	NM_024794	4,35
ISYNA1	inositol-3-fosfato sintasa 1	NM_016368	4,34
RHPN2	rofilina, proteína 2 de unión a Rho GTPasa	NM_033103	4,33
DMKN	dermoquina		4,31
CGB/CGB5/CGB8 /CGB7/CGB2	beta polipéptido de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 5 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 8 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 7 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 2 de gonadotropina coriónica	NM_000737	4,29
CGB1/CGB5/ CGB8/CGB2	beta polipéptido 1 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 5 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 8 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 2 de gonadotropina coriónica	BC106059	4,28
CGB5/CGB8/CGB7	beta polipéptido 5 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 8 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 7 de gonadotropina coriónica	NM_000737	4,28
CGB7/CGB5/ CGB2/CGB8/NTF4	beta polipéptido 7 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 5 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 2 de gonadotropina coriónica/beta polipéptido 8 de gonadotropina coriónica/neurotrofina 4	NM_000737	4,27
ZNF702P	pseudogén de la proteína de dedos de cinc 702	NM_003578	4,26
MYCN	oncogén relacionado con el virus de la mielocitomatosis m-myc derivado de neuroblastoma (aviar)	NM_005378	4,26
PKDCC	homólogo citoplásmico que contiene un dominio de proteína quinasa (ratón)	NM_138370	4,26
C2orf15/MRPL30	marco de lectura abierto 15 del cromosoma 2/proteína ribosómica mitocondrial L30	AK126402	4,25
ILIR1	receptor de interleuquina 1 de tipo I	NM_000877	4,25
EPB41L5	similar a banda de proteína de membrana 4.1 de eritrocitos 5	NM_020909	4,24
C2orf14/LOC440905/ LOC100128270	marco de lectura abierto 14 del cromosoma 2/LOC440905 hipotético/similar a proteína C2orf14 no caracterizada 2		4,24
ACVR2A	receptor de activina A, tipo IIA	NM_001616	4,24
LYPD6	contiene dominio LY6/PLAUR 6		4,23
GCA	granalcina, proteína de unión a calcio de mano EF	NM_012198	4,22
CDCA7	asociado al ciclo de división celular 7	NM_031942	4,21
FSIP2	proteína de interacción con la envuelta fibrosa 2		4,21
FSIP2	proteína de interacción con la envuelta fibrosa 2		4,21
COL3A1	colágeno alfa 1, tipo III	NM_000090	4,21
SLC39A10	miembro 10 de la familia de transportadores de solutos 39 (transportador de cinc)	NM_001127257	4,21
CPS1	carbamoilo-fosfato sintasa 1, mitocondrial	NM_001875	4,20

ES 2 716 200 T3

CXCR7	receptor 7 de quimioquina (motivo C-X-C)	NM_020311	4,19
FAM49A	miembro A de familia de similitud de secuencia 49		4,17
SLC8A1	miembro 1 de familia de transportadores de solutos 8 (intercambiador de sodio/calcio)	NM_021097	4,16
FSHR	receptor de la hormona estimulante del folículo	NM_000145	4,15
BCL11A	CLL de células B/linfoma 11A (proteína de dedos de cinc)	NM_022893	4,15
PAIP2B	proteína 2B de interacción con proteína de unión de poli(A)	NM_020459	4,13
AFF3	miembro 3 de la familia AF4/FMR2	NM_002285	4,12
LOC440905			4,11
C2orf14/LOC440905/ LOC100128270	marco de lectura abierto 14 del cromosoma 2/LOC440905 hipotético/similar a proteína C2orf14 no caracterizada 2		4,10
POTEE/POTEF/POTEH POTEM/POTEG/POTEB	miembro E de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro F de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro H de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro M de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro G de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro B de la familia del dominio de anquirina POTE		4,10
FIGN	fidgetina		4,09
COBLL1	similar a COBL 1		4,09
GALNT3	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)	NM_004482	4,09
CHN1	quimerina 1	NM_001822	4,09
SLC19A3	miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 19	NM_025243	4,07
KCNJ13	miembro 13 de la subfamilia J de canal de rectificación hacia el interior de potasio	NM_002242	4,06
ARL4C	similar al factor de ribosilación-ADP 2	NM_005737	4,06
TGIF2	homeocaja 2 del factor inducido por TGFB	NM_021809	4,04
WFDC2	dominio central 2 de cuatro disulfuros WAP	NM_006103	4,03
TSHZ2	homeocaja 2 de dedos de cinc de camiseta	NM_173485	4,03
TSHZ2	homeocaja 2 de dedos de cinc de camiseta	NM_173485	4,03
TFAP2C	factor de transcripción AP-2 gamma (proteína gamma 2 de unión a potenciador de la activación)	NM_003222	4,01
FLRT3	proteína transmembrana rica en leucina 3 de fibronectina	NM_198391	4,01
TGM2	transglutaminasa 2 (polipéptido C, proteína-glutamina-gamma-glutamyltransferasa)	NM_004613	4,00
BMP7	proteína morfogenética ósea 7	NM_001719	3,99
HUNK	quinasa asociada a Neu sobrerregulada hormonalmente	NM_014586	3,99
TIAM1	metástasis e invasión de linfoma de células T 1	NM_003253	3,99
CBS	cistationina-beta-sintasa	NM_001178008	3,98
CECR2	candidato 2 de región cromosómica del síndrome de los ojos de gato	NM_031413	3,97
ADRBK2	receptor de quinasa 2 beta-adrenérgico	NM_005160	3,97
Tr. 8073680			3,95
POTEM/POTEH/POTEG POTEE/POTEF	miembro M de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro H de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro G de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro E de la familia del dominio de anquirina POTE/miembro F de la familia del dominio de anquirina POTE		3,94
Tr. 8075657			3,93
C1QTNF6	proteína 6 relacionada con el factor de necrosis tumoral y C1q		3,93
LMCD1	dominios 1 ricos en cisteína y LIM	NM_014583	3,92
TRIM71	contiene motivo tripartito 71	NM_001039111	3,91
ACVR2B	receptor de activina A de tipo IIB	NM_001106	3,91

ES 2 716 200 T3

NBEAL2	similar a neurobeaquina 2		3,90
DOCK3	dedicador de citoquinesis 3		3,88
ST3GAL6	ST3 beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 6	NM_006100	3,87
UPK1B	uroplaquina 1B	NM_006952	3,86
SLC15A2	miembro 2 de la familia de transportadores de solutos 15 (transportador de péptidos/H ⁺)	NM_021082	3,86
MED12L	similar a la subunidad 12 del complejo de mediador	NM_053002	3,85
ARHGEG26	factor 26 de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho (GEF)		3,84
NLGN1	neuroigina 1	NM_014932	3,84
EPHB3	receptor B3 de EPH	NM_004443	3,83
SATB1	homeocaja 1 SATB	NM_002971	3,83
THRB	beta receptor de la hormona tiroidea (homólogo 2 de oncogén del virus de la leucemia eritroblástica (v-erb-a), aviar)	NM_001128176	3,83
ADAMTS9	motivo 9 de tipo 1 de trombospondina con metalopeptidasa ADAM	NM_182920	3,82
VGLL3	similar a vestigial 3 (<i>Drosophila</i>)		3,82
FILIP1L	similar a proteína 1 de interacción con filamina A	NM_182909	3,82
IGSF10/MED12L	miembro 10 de la superfamilia de las inmunoglobulinas/similar a subunidad 12 del complejo del mediador	NM_178822	3,81
SST	somatostatina	NM_001048	3,79
D4S234E	secuencia expresada 234 de segmento de ADN sobre el cromosoma 4 (exclusiva)	NM_014392	3,79
CPZ/GPR78	carboxipeptidasa Z/receptor 78 acoplado a proteína G	NM_001014448	3,79
SLIT2	homólogo de ranura 2 (<i>Drosophila</i>)	NM_004787	3,77
C4orf19/RELL1	marco de lectura abierto 19 del cromosoma 4/similar a RELT1		3,76
NSUN7	miembro 7 de la familia del dominio Sun/NOP2		3,76
SHROOM3	miembro 3 de la familia de Shroom	NM_020859	3,75
FRAS1	síndrome de Fraser 1	NM_025074	3,74
CDS1	CDP-diacilglicerol sintasa (fosfatidato citidililtransferasa) 1	NM_001263	3,74
FAM190A	miembro A de la familia con similitud de secuencia 190		3,72
DAPP1	adaptador dual de fosfotirosina y 3-fosfoinositidas	NM_014395	3,71
MAB21L2	similar a mab-21 (<i>C. elegans</i>)	NM_006439	3,71
FHDC1	contiene dominio FH2 1	NM_033393	3,71
GUCY1B3	guanilato ciclasa 1, soluble, beta 3	NM_000857	3,71
CPE	carboxipeptidasa E	NM_001873	3,70
NBLA00301	Nbla100301		3,70
LDB2	dominio de unión a LIM 2	NM_001130834	3,69
ARAP2	ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 2 de PH	NM_015230	3,69
RBM47	proteína de motivo de unión a ARN 47		3,69
RASGEF1B	miembro 1B de la familia del dominio RasGEF	NM_152545	3,68
MOP-1			3,68
ABCG2	miembro 2 de la subfamilia G (WHITE) del módulo de unión a ATP	NM_004827	3,67
PRSS12	proteasa serina 12 (neurotripsina, motopsina)	NM_003619	3,66
TMEM154	proteína transmembrana 154		3,66
FGA	cadena alfa de fibrinógeno	NM_000508	3,66
AADAT	aminoadipato aminotransferasa	NM_016228	3,64
HAND2	derivados expresados de cresta neural y neural 2	NM_021973	3,64

ES 2 716 200 T3

MGC45800	LOC90768 hipotético		3,64
TRIML2	similar a la familia de motivo tripartito 2		3,63
FAM105A	miembro A de la familia con similitud de secuencia 105		3,62
SKP2	proteína 2 asociada a quinasa de fase S (p45)	NM_005983	3,62
EGFLAM	dominios de laminina G, fibronectina de tipo III y similar a EGF	NM_152403	3,62
MAP3K1	proteína quinasa 1 activada por mitógenos	NM_005921	3,61
MARVELD2	contiene dominio MARVEL 2	NM_001038603	3,61
IQGAP2	proteína 2 activadora de GTPasa que contiene el motivo IQ	NM_006633	3,61
CRHBP	proteína de unión a la hormona liberadora de corticotropina	NM_001882	3,59
C5orf30	marco de lectura abierto 30 del cromosoma 5	NM_000679	3,58
ADRA1B	receptor alfa-1B-adrenérgico	NM_001161661	3,57
WWC1			3,56
Tr. 8110668	contiene dominio C2 y WW 1	NM_024930	3,56
ELOVL7	miembro 7 de la familia ELOVL, alargamiento de ácidos grasos de cadena larga (levadura)	NM_003633	3,55
ENC1	córtex neural-ectodérmico 1 (con dominio similar a BTB)		3,55
FAM169A	miembro A de la familia de similitud de secuencia 169		3,54
GCNT4	glucosaminil (N-acetil) transferasa 4, central 2	NM_016591	3,54
MEF2C	factor potenciador de miocitos 2C	NM_002397	3,53
EPB4IL4A	similar a banda de proteína de membrana 4.1 de eritrocitos 4A	NM_022140	3,52
PPP2R2B	proteína fosfatasa 2, subunidad reguladora B, beta	NM_004576	3,52
SLIT3	homólogo de ranura 3 (<i>Drosophila</i>)	NM_003062	3,51
SYCP2L/TMEM14B	similar a proteína del complejo sinaptonemal 2/proteína transmembrana 14B		3,49
HIS1H3E	agrupamiento de histonas 1, H3e		3,47
HIST1H2BH	agrupamiento de histonas 1, H2bh	NM_003524	3,47
ANKS1A	contiene dominio de motivo alfa estéril y repetición de anquirina 1A		3,46
SCUBE3	péptido señal, dominio CUB, similar a EGF 3	NM_152753	3,46
SH3BGR2	similar a proteína rica en ácido glutámico de unión al dominio SH3 2		3,45
PRSS35	proteasa, serina, 35	NM_001170423	3,45
PK1B	beta inhibidor de proteína quinasa (dependiente de AMPc, catalítico)	NM_181794	3,44
RSPO3	homólogo de R-espondina 3 (<i>Xenopus laevis</i>)	NM_032784	3,44
TCF21	factor de transcripción 21	NM_003206	3,44
TIAM2	metástasis e invasión de linfoma de células T 2	NM_012454	3,44
SMOC2	unión a calcio modular relacionado con SPARC 2		3,43
SERPINB9	miembro 9 del clado B (ovoalbúmina) del inhibidor de serpina peptidasa	NM_004155	3,42
TUBB2B	beta tubulina 2B	NM_178012	3,40
HIST1H3F	agrupamiento de histonas 1, H3f	NM_021018	3,40
ZNF204P	pseudogén de la proteína de dedos de cinc 204		3,39
Tr. 8124604			3,39
C6orf132	marco de lectura abierto 132 del cromosoma 6		3,38
KHDRBS2	asociado a transducción de señales de unión a ARN que contiene un dominio KH 2	NM_152688	3,37
SRSF12	factor de corte y empalme 12 rico en arginina/seria	NM_080743	3,37
BACH2	factor de transcripción 2 de cremallera de leucina básico de homología con BTB y CNC 1	NM_021813	3,36
FYN		NM_002037	3,36

ES 2 716 200 T3

MAP7	proteína 7 asociada a microtúbulos	NM_003980	3,35
EZR	ezrina	NM_003379	3,35
SNORA20	caja H/ACA 20 de ARN nucleolar pequeño		3,33
SDK1	molécula de adhesión celular (pollo), homólogo de patada lateral 1	NM_152744	3,32
GLCCI1	transcrito inducido por glucocorticoides 1		3,31
TSPAN13	tetraespanina 13		3,31
SNX10	selección de nexina 10	NM_013322	3,31
PRR15	rico en prolina 15	NM_175887	3,31
AQP1	acuaporina 1 (grupo sanguíneo de Colton)	NM_198098	3,31
WBSCR17	región 17 del cromosoma del síndrome de Williams-Beuren		3,30
GNAI1	polipéptido alfa 1 de inhibición de la actividad de la proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G)	NM_002069	3,29
FLNC	gamma filamina C		3,29
MEST	homólogo de transcrito específico de mesodermo (ratón)	NM_002402	3,27
TRIM24	contiene motivo tripartito 24	NM_015905	3,27
ARHGEF5/LOC728377	factor 5 de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho (GEF)/pseudogén del factor 5 de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho (GEF)	NM_005435	3,27
ICA1	autoantígeno 1 de células de islotes, 69 dDa	NM_004968	3,27
SKAP2	fosfoproteína 2 asociada a src quinasa	NM_003930	3,26
HOXA1	homeocaja A1	NM_005522	3,26
TRIL	interactor TLR4 con repeticiones ricas en leucina	NM_014817	3,26
ELMO1	motilidad celular y atrapamiento 1	NM_014800	3,26
TNS3	tensina 3	NM_022478	3,26
COBL	homólogo de cordon-bleu (ratón)		3,26
DLX5	homeocaja menos distal 5	NM_005221	3,25
BA1AP2L1	similar a proteína 2 asociada a BA11 1	NM_018842	3,25
WNT2	miembro 2 de la familia de sitio de integración de MMTV de tipo áptero	NM_003391	3,25
TSPAN12	tetraespanina 12	NM_012338	3,25
ARHGEF5/ARHGEF35/ LOC728377/OR2A7	factor 5 de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho (GEF)/factor 35 de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho (GEF)/pseudogén del factor 5 de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho (GEF)/miembro 7 de la subfamilia A de la familia 2 del receptor olfativo	NM_005435	3,24
OR2A7/OR2A4/ LOC728377	miembro 7 de la subfamilia A de la familia 2 del receptor olfativo/miembro 4 de la subfamilia A de la familia 2 del receptor olfativo/pseudogén del factor 5 de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho (GEF)	NM_001005328	3,24
XKR4	miembro 4 de la familia relacionada con la subunidad compleja del grupo sanguíneo Kell, XK		3,24
ADHFE1	alcohol deshidrogenasa 1 que contiene hierro	NM_144650	3,23
CRISPLD1	contiene dominio LCCL de proteína secretora rica en cisteína 1		3,23
MATN2	matrilina 2	NM_002380	3,23
C8orf42	marco de lectura abierto 42 del cromosoma 8	NM_175075	3,23
SGK223	homólogo de pragma de rata de Rnd2	NM_001080826	3,23
PPP1R3B	subunidad reguladora (inhibidora) 3B de la proteína fosfatasa 1	NM_024607	3,22
MTMR7	proteína 7 relacionada con miotubularina	NM_004686	3,20
SFRP1	proteína 1 relacionada con el encrespamiento segregada	NM_003012	3,20
TOX	caja de grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos		3,19
PDE7A	fosfodiesterasa 7A	NM_002603	3,19
JPH1	junctofilina 1	NM_020647	3,18

ES 2 716 200 T3

ZNF704	proteína de dedos de cinc 704		3,18
PAG1	fosfoproteína 1 asociada a microdominios de glicosfingolípidos	NM_018440	3,18
RUNX1T1	factor de transcripción 1 relacionado con enanismo; translocado, 1 (relacionado con ciclina D)	NM_001198625	3,18
RSOP2	homólogo 2 de R-espondina (<i>Xenopus laevis</i>)	NM_178565	3,17
KCNV1	miembro 1 de la subfamilia V del canal de potasio	NM_014379	3,16
KANK1	dominios 1 de repetición de anquirina y motivo KN	NM_153186	3,16
TEK		NM_000459	3,16
KRT18	queratina 18	NM_000224	3,16
TJP2	proteína 2 de zona de unión estrecha (zona occludens 2)	NM_004817	3,16
PCSK5	proteína convertasa de subtilisina/quexina de tipo 5	NM_001190482	3,16
PSAT1	fosfoserina aminotransferasa 1	NM_058179	3,15
TMEFF1	proteína transmembrana 1 con un dominio similar a EGF y dos dominios similares a folistatina	NM_003692	3,14
RALGPS1	Ral GEF con dominio PH y motivo de unión 1 a SH3	NM_014636	3,13
GARNL3	similar a dominio Rap/RanGAP activador de GTPasa 3	NM_032293	3,13
AIF1L	similar a factor inflamatorio de aloinjerto 1		3,12
FAM69B	miembro B de la familia con similitud de secuencia 69		3,12
MOBKL2B	MOB1, similar a activador de quinasa de un ligante Mps 2B (levadura)		3,11
KIAA1161		NM_020702	3,11
RASEF	contiene dominio de mano de EF y RAS	NM_152573	3,11
ROR2	receptor huérfano 2 similar a receptor de tirosina quinasa	NM_004560	3,11
CORO2A	coronina, proteína de unión a actina, 2A	NM_003389	3,10
NOTCH1	mella 1	NM_017617	3,10
CSF2RA	alfa receptor 2 del factor estimulante de colonias, baja afinidad (granulocitos-macrófagos)		3,09
TBL1X	unido a IX similar a transducina (beta)	NM_005647	3,09
SHROOM2	miembro 2 de la familia Shroom	NM_001649	3,09
SYTL5	similar a sinaptotagmina 5	NM_138780	3,09
CLCN5	canal de cloruro 5	NM_001127899	3,08
XAGE2/XAGE2B	miembro 2 de la familia del antígeno X/miembro 2B de la familia del antígeno X		3,07
LPAR4	receptor 4 de ácido lisofosfatídico	NM_005296	3,07
PCDH11X/PCDH11Y	protocadherina 11 unida a X/protocadherina 11 unida a Y	NM_032967	3,06
Tr. 8168674			3,06
PLP1	proteína de proteolípido 1	NM_000533	3,05
NRK	quinasa relacionada con Nik	NM_198465	3,05
MST4		NM_016542	3,05
CSG2/CSAG3	miembro 2 de la familia de CSAG/miembro 3 de la familia de CSAG	NM_001080848	3,04
MID1	línea media 1 (síndrome de BBB/Opitz)	NM_000381	3,04
TMEM27	proteína transmembrana 27	NM_020665	3,04
AKAP4	proteína 4 de anclaje a quinasa A (PRKA)	NM_003886	3,04
XAGE2/XAGE2B	miembro 2 de la familia del antígeno X/miembro 2B de la familia del antígeno X		3,04
ITM2A	proteína de membrana integral 2A		3,04
BEX1	unido a X expresado en el cerebro 1	NM_018476	3,03
HS6ST2	sulfato de heparano 6-O-sulfotransferasa 2	NM_001077188	3,01
MIR503	microARN 503		3,01

ES 2 716 200 T3

GABRA3	receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA), alfa 3	NM_000808	3,01
CSAG2/CSAG3	miembro 2 de la familia CSAG/miembro 3 de la familia CSAG	NM_001080848	3,01
CSF2RA	receptor 2 del factor estimulante de colonias, alfa, baja afinidad (granulocitos-macrófagos)		3,01
PCDH11Y/PCDH11X	protocadherina 11 unida a Y/protocadherina 11 unida a X	NM_032971	3,01
CD24		NM_013230	3,00
MARVELD2	contiene dominio MARVEL 2	NM_001038603	3,00
ZNF471	proteína de dedos de cinc 471	NM_020813	-3,01
PRAF2/WDR45	miembro 2 de la familia del dominio PRA1/dominio de repetición WD 45	NM_007213	-3,01
PFKFB3	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3	NM_004566	-3,02
HERC6	dominio hect y RLD 6	NM_017912	-3,04
SAMD15	contiene dominio de motivo alfa estéril 15		-3,04
HRH1	receptor de histamina H1	NM_001098213	-3,04
SPOCK1	sparc/osteonectina, dominios de proteoglicano (testicano) similares a cwcv y kazal 1	NM_004598	-3,04
COPZ2	subunidad zeta 2 del complejo de proteínas de coatómero	NM_016429	-3,05
NR4A1	miembro 1 del grupo A de la subfamilia 4 de receptores nucleares	NM_002135	-3,05
LOC645166/LOC654342	pseudogén de la proteína 1 específica de linfocitos		-3,05
CLIP4	miembro 4 de la familia de proteínas de conector que contienen el dominio CAP-GLY		-3,06
LRRK2	quinasa 2 con repeticiones ricas en leucina	NM_198578	-3,06
GXYLT2	glucósido xilosiltransferasa 2	NM_001080393	-3,07
DHRS3	miembro 3 de reductasa/deshidrogenasa (familia SDR)	NM_004753	-3,07
C1orf54	marco de lectura abierto 54 del cromosoma 1		-3,07
ABCC4	miembro 4 de la subfamilia C (CFTR/MRP) del módulo de unión a ATP	NM_005845	-3,08
PSMB8	subunidad de proteasoma (prosoma, macropaina), tipo beta, 8 (peptidasa 7 multifuncional grande)	NM_004159	-3,09
PSMB8	subunidad de proteasoma (prosoma, macropaina), tipo beta, 8 (peptidasa 7 multifuncional grande)	NM_004159	-3,09
PSMB8	subunidad de proteasoma (prosoma, macropaina), tipo beta, 8 (peptidasa 7 multifuncional grande)	NM_004159	-3,09
MDGA1	anclaje 1 de glicosilfosfatidilinositol que contiene el dominio MAM	NM_153487	-3,09
ZNF562	proteína de dedos de cinc 562	NM_001130031	-3,09
NDP	enfermedad de Norrie (pseudoglioma)	NM_000266	-3,10
TSPO	proteínas de translocador (18 kDa)	NM_000714	-3,10
Tr. 8163253			-3,10
ITPRIP	proteína de interacción con receptor de inositol 1,4,5-trifosfato		-3,11
PAK3	quinasa 3 activada por proteína p21 (Cdc42/Rac)	NM_002578	-3,11
CD97		NM_078481	-3,11
GLS	glutaminasa	NM_014905	-3,12
Tr. 8037387			-3,12
ZNFX1	contiene tipo NFX1, dedos de cinc, 1		-3,12
TAP2	subfamilia B (MDR/TAP) del módulo de unión a ATP, transportador 2	NM_018833	-3,13
MORC4	dedos de cinc 4 de tipo CW de familia MORC		-3,13
NRP1	neuropilina 1	NM_003873	-3,14

ES 2 716 200 T3

STAT1	transductor de señales y activador de la transcripción 1, 91 kDa	NM_007315	-3,15
PCDHB13	protocadherina beta 13	NM_018933	-3,15
PC	piruvato carboxilasa	NM_001040716	-3,16
FKBP5/LOC285847	proteína 5 de unión a FK506/LOC285847 hipotético	NM_001145775	-3,16
MPHOSPH6	fosfoproteína 6 de fase M	NM_005792	-3,16
NIPAL2	contiene dominio similar a NIPA 2		-3,17
SLC9A7	miembro 7 de la familia de transportadores de solutos 9 (intercambiador de sodio/hidrógeno)	NM_03291	-3,17
ANO5	anotamina 5	NM_213599	-3,17
SLCO3A1	miembro 3A1 de la familia de transportadores de aniones orgánicos transportadores de solutos	NM_013272	-3,17
C16orf45	marco de lectura abierto 45 del cromosoma 16		-3,17
DNAJB4	miembro 4 de la subfamilia B de homólogos de DnaJ (Hsp40)	NM_007034	-3,17
SNX25	clasificador de nexina 25	NM_031953	-3,17
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro	NM_170732	-3,19
TBC1D8B	miembro 8B de la familia del dominio TBC1 (con dominio GRAM)	NM_017752	-3,19
C1GALT1C1	chaperona 1 específica de C1GALT1		-3,20
WDR52	dominio de repetición de WD 52		-3,21
Tr. 8043500			-3,21
NR3C1	miembro 1 del grupo C de la subfamilia 3 de receptores nucleares (receptor de glucocorticoides)	NM_000176	-3,21
PDE8A	fosfodiesterasa 8A	NM_002605	-3,21
CMPK2	citidina monofosfato (UMP-CMP) quinasa 2, mitocondrial	NM_207315	-3,22
ANKRD42	dominio de repetición de anquirina 42		-3,22
TBX2	caja T 2	NM_005994	-3,24
SMAP2	ArfGAP2 pequeño	NM_022733	-3,24
AEBP1	proteína de unión a AE 1	NM_001129	-3,25
PRKCA	proteína quinasa C, alfa	NM_002737	-3,25
WDR35	dominio de repetición de WD 35		-3,25
ADAM15	dominio de metalopeptidasa ADAM 15	NM_207196	-3,26
SNORD56B	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 56B		-3,28
ARSB	arilsulfatasa B	NM_000046	-3,28
DYRK3	quinasa 3 regulada por fosforilación de tirosina (Y) de especificidad dual	NM_001004023	-3,28
PDLIM5	dominio 5 de PDZ y LIM	NM_006457	-3,29
QSOX/FLJ23867	quiescina Q6 sulfhidrido oxidasa 1/proteína hipotética FLJ23867	NM_002826	-3,29
ZNF585B	proteína de dedos de cinc 585B	NM_152279	-3,30
CNTNAP1	proteína 1 asociada a contactina	NM_003632	-3,31
NAV1	navegador de neuronas 1	NM_020443	-3,32
PODNL1	similar a podocano 1		-3,32
NF1B	factor nuclear 1/B	NM_001190737	-3,32
G6PD	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	NM_000402	-3,33
SYNC	sincoilina, proteína del filamento intermedio	NM_030786	-3,33
ICAM1	molécula de adhesión intercelular 1	NM_000201	-3,34
PITX2	homeodominio 2 similar a apareado	NM_153426	-3,34
NTN4	netrina 4	NM_021229	-3,37

ES 2 716 200 T3

TAPBPL/VAMP1	similar a proteína de unión a TAP/proteína de membrana 1 asociada a vesículas (sinaptobrevina 1)	NM_018009	-3,38
GNG12	proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), gamma 12	NM_018841	-3,40
NHSL1	similar NHS 1		-3,40
FLJ38109	LOC386627 hipotética		-3,40
AVP1	inducida por vasopresina arginina 1	NM_021732	-3,41
PLCD3	fosfolipasa C, delta 3	NM_133373	-3,42
SG1P1	proteína 1 de interacción similar a GRB2 (endofilina) con dominio SH3	NM_032291	-3,42
SIAE	ácido siálico acetilesterasa		-3,44
ABCA10	miembro 10 de la subfamilia A (ABC1) del módulo de unión a ATP	NM_080282	-3,44
FAM46C	miembro C de la familia con similitud de secuencia 46		-3,44
NRG1/LOC100507358	neuregulina 1/proteína hipotética LOC100507358	AF176921	-3,44
RNF112	proteína de dedos de cinc 112		-3,45
ELL2	factor de alargamiento, ARN polimerasa II, 2	NM_012081	-3,45
CDH2	cadherina 2, tipo 1, N-cadherina (neuronal)	NM_001792	-3,46
STEAP4	miembro 4 de la familia STEAP	NM_024636	-3,46
Tr. 8079163			-3,46
ID3	inhibidor 3 de unión al ADN, proteína de hélice-bucle-hélice negativa dominante	NM_002167	-3,47
EFR3B	homólogo B de EFR3 (<i>S. cerevisiae</i>)		-3,48
GLB1L	similar a beta galactosidasa 1	NM_024506	-3,48
PODN	podocano	NM_153703	-3,49
C19orf66/ANGPTL6	marco de lectura abierto 66 del cromosoma 19/similar a angiopoyetina 6	NM_031917	-3,49
ZNF596	proteína de dedos de cinc 596	NM_001042416	-3,49
PLCB4	fosfolipasa C, beta 4	NM_001172646	-3,50
SP110		NM_080424	-3,51
PAPPA/PAPPAS	proteína plasmática A asociada al embarazo, papalisina 1/ARN antisentido de PAPPA (no codifica proteínas)	NM_002581	-3,52
EML6	similar a proteína asociada con microtúbulos de equinodermo 6		-3,52
ADAM12	dominio de metalopeptidasa ADAM 12	NM_003474	-3,53
Tr. 7919749			-3,53
KCNAB2	miembro beta 2 de la subfamilia relacionada con agitador del canal con apertura por voltaje de potasio	NM_003636	-3,54
MICB	secuencia B relacionada con el polipéptido de MHC de clase I	NM_005931	-3,54
ABCA8	miembro 8 de la subfamilia A (ABC1) del módulo de unión a ATP	NM_007168	-3,54
SLC12A2	miembro 2 de la familia de transportadores de solutos 12 (transportadores de sodio/potasio/cloruro)	NM_001046	-3,55
ULBP2	proteína 2 de unión a UL16	NM_025217	-3,55
DNAJC12	miembro 12 de la subfamilia C del homólogo de DnaJ (Hsp40)		-3,56
TAP2	transportador 2 de la subfamilia B (MDR/TAP) del módulo de unión a ATP	NM_000544	-3,56
CASP4	caspasa 4, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis	NM_033306	-3,58
SPON1	espondina 1, proteína de la matriz extracelular	NM_006108	-3,58
GLIS1	dedos de cinc 1 de la familia GLIS	NM_147193	-3,59
APOBEC3G	enzima de edición de ARNm de apolipoproteína B, similar a polipéptido catalítico 3G	NM_021822	-3,59
PSD3	contiene dominio de Sec7 y pleckstrina 3	NM_015310	-3,60

ES 2 716 200 T3

IFIT5	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos 5	NM_012420	-3,60
ARHGAP26	proteína activadora de Rho GTPasa 26	NM_015071	-3,61
C3orf55	marco de lectura abierto 55 del cromosoma 3		-3,61
BLID	inductor de la muerte celular que contiene motivo similar a BH3	NM_001001786	-3,62
GAP43	proteína asociada al crecimiento 43	NM_001130064	-3,62
Tr. 7977951			-3,62
USP18	peptidasa específica de ubiquitina 18	NM_017414	-3,63
TAP2	transportador 2, módulo de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	NM_000544	-3,63
APBA1	miembro 1 de la familia A de unión a la proteína precursora de beta amiloides (A4)	NM_001163	-3,63
SUSD2	contiene dominio sushi 2	NM_019601	-3,63
ANKRD44	dominio de repetición de anquirina 44		-3,64
ACVR1	receptor de tipo 1 de activina A	NM_001105	-3,64
ME1	enzima málica 1 dependiente de NADP(+) citosólica	NM_002395	-3,64
PARP3	miembro 3 de la familia de poli(ADP-ribosa)polimerasa	NM_001003931	-3,64
DYNC111	cadena intermedia 1 de dineína citoplásmica 1	NM_004411	-3,64
TIPARP	poli(ADP-ribosa)polimerasa inducible por TCDD	NM_015508	-3,65
FLI1/EWSR1	integración 1 del virus de la leucemia de Friend/región 1 de punto de ruptura del sarcoma de Ewing	NM_002017	-3,66
RGS4	regulador 4 de la señalización de la proteína G	NM_001102445	-3,66
C4orf26	marco de lectura abierto 26 del cromosoma 4		-3,66
UBA7	enzima 7 activadora del modificador similar a ubiquitina	NM_003335	-3,67
NTM	neurotrimina	NM_016522	-3,68
AMIGO2	molécula de adhesión con dominio 2 similar a Ig	NM_001143668	-3,70
TBC1D19	miembro 19 de la familia del dominio TBC1	NM_018317	-3,71
MRC2	receptor de manosa C de tipo 2	NM_006039	-3,73
CCPG1	progresión del ciclo celular 1	NM_004748	-3,74
CPEB4	proteína 4 de unión al elemento de poliadenilación citoplásmico		-3,74
DCC	delecionado en el carcinoma colorrectal	NM_005215	-3,76
CTSF	catepsina F	NM_003793	-3,76
FAM101B	miembro B de la familia con similitud de secuencia 101		-3,77
PSD3	contiene dominio Sec7 y pleckstrina 3	NM_015310	-3,77
NME5	proteína expresada en células no metastásicas 5 (nucleósido-difosfato quinasa)	NM_003551	-3,78
CPEB2	proteína 2 de unión al elemento de poliadenilación citoplásmico	NM_182485	-3,78
APOL2	apolipoproteína L, 2	NM_030882	-3,79
TRIM14	contiene motivo tripartito 14	NM_014788	-3,80
RBFOX1	proteína de unión a ARN, homólogo 1 de fox-1 (<i>C. elegans</i>)	NM_018723	-3,80
WNT5A	miembro 5A de la familia de sitio de integración de MMTV de tipo áptero	NM_003392	-3,81
ZNF248	proteína de dedos de cinc 248	NM_021045	-3,81
DUSP4	fosfatasa de especificidad dual 4	NM_001394	-3,81
FGF2/NUDT6	factor 2 de crecimiento de fibroblastos (básico)/motivo 6 de tipo nudix (resto X unido a nucleósido difosfato)	NM_002006	-3,84
KLF9	factor 9 similar a Kruppel	NM_001206	-3,85
SRPY4	homólogo brotador 4 (<i>Drosophila</i>)	NM_030964	-3,85
INSIG1	gen 1 inducido por insulina	NM_005542	-3,86

ES 2 716 200 T3

ZEB1	homeocaja 1 de unión a la caja E de dedos de cinc	NM_030751	-3,87
ACAD11/NPHP3	miembro 11 de la familia de acil-CoA deshidrogenasa/nefronofitosis 3 (adolescentes)	NM_032169	-3,87
MICB	secuencia B relacionada con polipéptido de MHC de clase I	NM_005931	-3,88
APIS3	subunidad sigma 3 del complejo 1 de proteínas relacionadas con adaptador	NM_001039569	-3,88
LPXN	leupaxina	NM_004811	-3,90
CXCL11	ligando 11 de quimioquina (motivo C-X-C)	NM_005409	-3,91
SMAD9	miembro 9 de la familia SMAD	NM_001127147	-3,94
SLC9A3R2	regulador 2 del miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 9 (intercambiador de sodio/hidrógeno)	NM_001130012	-3,95
PDGFRA	alfa polipéptido del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas	NM_006206	-3,96
AOX1	aldehído oxidasa 1	NM_001159	-3,96
Tr. 8045347			-3,96
CNTN6	contactina 6	NM_014461	-3,96
LMO7	dominio LIM 7	NM_005358	-3,98
ADAMTSL1	similar a ADAMTS 1		-3,98
TMEM22	proteína transmembrana 22		-4,00
C18orf1	marco de lectura abierto 1 del cromosoma 18	NM_181481	-4,02
TMEM100	proteína transmembrana 100	NM_001099640	-4,03
BMP2	proteína 2 morfogenética ósea	NM_001200	-4,04
Tr. 7969091			-4,05
CHRNA5	receptor colinérgico, nicotínico, alfa 5	NM_000745	-4,05
PID1	contiene dominio de interacción con fosfotirosina 1		-4,05
SNED1	dominios 1 similares a EGF, nidógeno y sushi	NM_001080437	-4,09
TRIM22	contiene motivo tripartito 22	NM_006074	-4,10
KCNJ15	miembro 15 de la subfamilia J del canal de rectificación hacia el interior de potasio	NM_002243	-4,10
DDX58	polipéptido 58 de la caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	NM_014314	-4,11
Tr. 8058201			-4,12
FBN1	fibrilina 1	NM_000138	-4,13
CNRIP1	proteína 1 de interacción con el receptor de cannabinoides		-4,13
NR1D1/THRA	miembro 1 del grupo D de la subfamilia 1 de receptor nuclear/receptor de la hormona tiroidea, alfa (homólogo del oncogén del virus de la leucemia eritroblástica (v-erb-a), aviar)	NM_021724	-4,13
TGFB3	beta receptor III del factor de crecimiento transformante	NM_003243	-4,15
IL1RAP	proteína accesoria del receptor de interleuquina 1	NM_002182	-4,17
HIST1H1A	agrupamiento de histonas 1, H1a	NM_005325	-4,19
C9orf150	marco de lectura abierto 150 del cromosoma 9		-4,20
NFASC	neurofascina	NM_001005388	-4,21
MEGF9	dominios 9 similares a EGF múltiple	NM_001080497	-4,21
IFIH1	inducido por interferón con dominio 1 de helicasa C	NM_022168	-4,22
MIR155/MIR155HG	microARN 155/gen MIR155 del hospedante (no codifica proteínas)		-4,22
ASMA	molécula de adhesión específica de adipocitos		-4,22
ABCA6	miembro 6 de la subfamilia A (ABC1) del módulo de unión a ATP	NM_080284	-4,24
ZSWIM5	contiene tipo SWIM de dedos de cinc 5		-4,24
NOG	nogina	NM_005450	-4,25
FLRT2	proteína 2 transmembrana rica en leucina de fibronectina	NM_013231	-4,26

ES 2 716 200 T3

SRXN1	sulfirredoxina 1	NM_080725	-4,27
FAIM2	molécula 2 inhibidora apoptótica de Fas	NM_012306	-4,29
DUSP1	fosfatasa de especificidad dual 1	NM_004417	-4,29
MIR29A	microARN 29a		-4,29
RORA	receptor huérfano A relacionado con RAR	NM_134260	-4,30
KGFLP2/KGFLP1/ FGF7/FLJ20444	proteína 2 similar al factor de crecimiento de queratinocitos/proteína 1 similar al factor de crecimiento de queratinocitos/factor 7 de crecimiento de fibroblastos/proteína hipotética FLJ20444	NM_003670	-4,31
KAT2B	K(lisina) acetiltransferasa 2B	NM_003884	-4,31
Tr. 8099393			-4,31
ACOX2	cadena ramificada de la acil-CoA oxidasa 2	NM_003500	-4,32
STIM2	molécula de interacción estromática 2	NM_0011691118	-4,33
CD248		NM_020404	-4,35
MGAT5	manosil (alfa-1,6)-glicoproteína beta-1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa	NM_002410	-4,35
Tr. 8002301			-4,36
PLOD2	2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2 de procolágeno-lisina	NM_182943	-4,37
HIST2H2BF/HIST2H2BA/ HIST2H2BE	agrupamiento de histonas 2, H2bf/agrupamiento de histonas 2, H2ba/agrupamiento de histonas 2, H2be	NM_001024599	-4,38
PTPRG	proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, G	NM_002841	-4,38
GK	glicerol quinasa	NM_001128127	-4,39
Tr. 8121884			-4,39
SAT1	espermidina/espermina N1-acetiltransferasa 1	NM_027783	-4,40
COMT	catecol-O-metiltransferasa	NM_000754	-4,41
ELTD1	contiene dominio siete transmembrana, latrofilina y EGF 1	NM_022159	-4,45
MCAM	molécula de adhesión de células de melanoma	NM_006500	-4,45
SLC20A1	miembro 1 de la familia de transportadores de solutos 20 (transportador de fosfato)	NM_005415	-4,46
Tr. 8163255			-4,47
LTBP3	proteína 3 de unión al factor beta del crecimiento transformante latente	NM_001130144	-4,48
SNORD116- 21/SNORD116@	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 116-21/agrupamiento de ARN nucleolar pequeño, caja C/D 116		-4,48
Tr. 8165692			-4,49
TGFB1	factor beta del crecimiento transformante 1	NM_000660	-4,49
SLC7A8	miembro 8 de la familia de transportadores de solutos 7 (transportador de aminoácidos, tipo L)	NM_012244	-4,51
VDR	receptor de vitamina D (1,25-dihidroxitamina D3)	NM_001017535	-4,51
GK/GK3P	glicerol quinasa/pseudogén 3 de glicerol quinasa	NM_001128127	-4,52
SLC6A6	miembro 6 de la familia de transportadores de solutos 6 (transportador de neurotransmisores, taurina)	NM_003043	-4,52
CPEB1	proteína 1 de unión al elemento de poliadenilación citoplásmico	NM_030594	-4,54
PCBP3	proteína 3 de unión a poli(rC)	NM_020528	-4,54
PRNP	proteína priónica	NM_000311	-4,55
IGFBP4	proteína 4 de unión al factor de crecimiento similar a insulina	NM_001552	-4,55
ZNF454	proteína de dedos de cinc 454	NM_001178089	-4,57
LGALS1	lectina, de unión a galactósido, soluble, 1	NM_002305	-4,59
CSGALNACT2	condroitina sulfato N-acetilgalactosaminil-transferasa 2	NM_018590	-4,60
HBEGF	factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina	NM_001945	-4,60

ES 2 716 200 T3

GEM	proteína de unión a GTP sobreexpresada en músculo esquelético	NM_005261	-4,65
ZNF676	proteína de dedos de cinc 676	NM_001001411	-4,65
LOC100128252/ LOC100288114	LOC100128252 hipotético/LOC100288114 hipotético		-4,68
C13orf31	marco de lectura abierto 31 del cromosoma 13		-4,70
VEPH1	homólogo 1 del dominio PH expresado en la zona ventricular (pez cebra)		-4,72
DDX60L	similar al polipéptido 60 de la caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)		-4,74
PLAT	activador de plasminógeno, de tejidos	NM_000930	-4,77
NHEDC2	contiene dominio de intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ 2	NM_178833	-4,79
Tr. 8009073			-4,79
CORO2B	coronina, proteína de unión a actina, 2B	NM_006091	-4,80
BHMT2	betaína-homocisteína S-metiltransferasa 2	NM_017614	-4,81
GMDS	GDP-manosa 4,6-deshidratasa	NM_001500	-4,81
TMEM173	proteína transmembrana 173	NM_198282	-4,82
TFP12	inhibidor 2 de la vía del factor tisular	NM_006528	-4,83
IGFBP6	proteína 6 de unión al factor de crecimiento similar a insulina	NM_002178	-4,85
AHR	receptor de hidrocarburos de arilo	NM_001621	-4,87
MAP1A	proteína 1A asociada a microtúbulos		-4,90
PROCR	receptor de proteína C endotelial	NM_006404	-4,90
ETV5	variante de ets 5	NM_004454	-4,95
ABCA5	miembro 5 de la subfamilia A (ABC1) del módulo de unión a ATP	NM_018672	-4,95
Tr. 8043502			-4,97
ATOH8	homólogo atonal 8 (<i>Drosophila</i>)	NM_032827	-5,02
CTSK	cathepsina K	NM_000396	-5,02
LGALS3BP	proteína de unión 3 soluble de unión a galactósido de lectina	NM_005567	-5,02
C10orf116/AGAP11	marco de lectura abierto 116 del cromosoma 10/proteína 11 activadora de Arf GTPasa de dominio de GTPasa y repetición de anquirina	NM_006829	-5,05
ENG	endoglina	NM_000118	-5,11
PGCP	glutamato carboxipeptidasa de plasma	NM_016134	-5,13
CDYL2	proteína de cromodominio 2 similar a Y	NM_152342	-5,17
PARP12	miembro 12 de la familia de poli(ADP-ribosa) polimerasa		-5,19
MGP	proteína de matriz G1a	NM_001190839	-5,21
SULF1	sulfatasa 1	NM_001128205	-5,24
CDH13	cadherina 13, H-cadherina (corazón)	NM_001257	-5,25
Tr. 8079742			-5,27
PLAUR	activador de plasminógeno, receptor de uroquinasa	NM_002659	-5,28
LY96	antígeno 96 de linfocitos	NM_015364	-5,30
EMX2	homeocaja 2 de espiráculos vacíos	NM_004098	-5,34
BICC1	homólogo 1 de bicaudal C (<i>Drosophila</i>)	NM_001080512	-5,36
DDX60	polipéptido 60 de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)		-5,37
TMTC1	contiene repetición de tetratricopéptido y transmembrana 1		-5,37
PARP9	miembro 9 de la familia de poli(ADP-ribosa) polimerasa	NM_031458	-5,40
SERPINB8	miembro 8 del clado B (ovoalbúmina) del inhibidor de serpina peptidasa	NM_002640	-5,42
SRPX2	proteína 2 que contiene repetición de suchi, unida a X	NM_014467	-5,43
CD44		NM_000610	-5,44
NNMT	nicotinamida N-metiltransferasa		-5,44

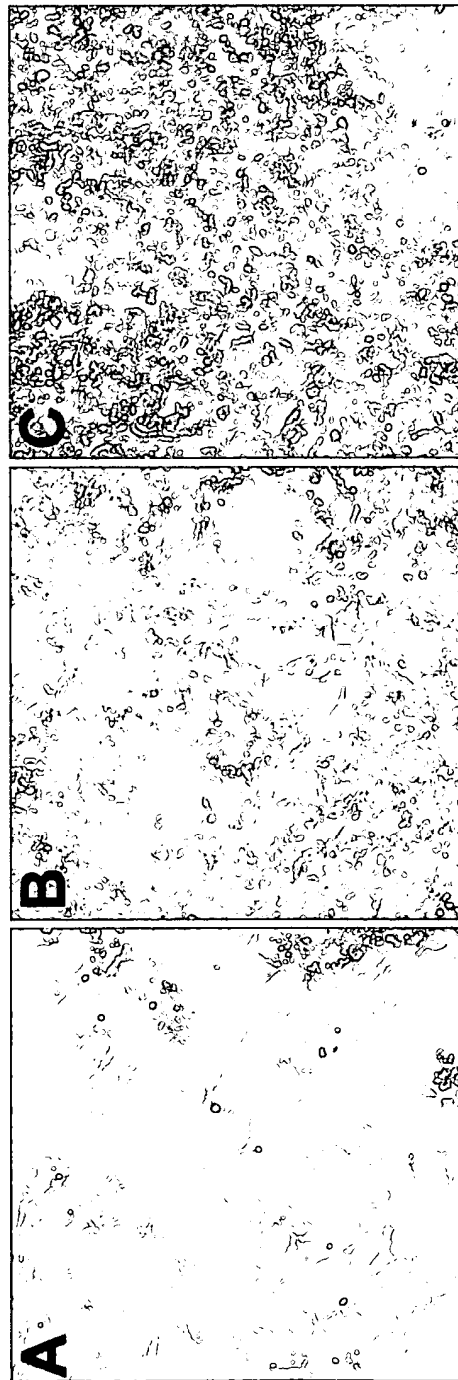
ES 2 716 200 T3

NCAM1	molécula 1 de adhesión de células neurales	NM_181351	-5,47
GLIS3	dedos de cinc de la familia GLIS 3	NM_152629	-5,52
CPB2	carboxipeptidasa B2 (plasma)	NM_001872	-5,53
CLCA2	accesoria del canal de cloruro 2	NM_006536	-5,56
GPR1	receptor 1 acoplado a proteína G	NM_005279	-5,60
MAMLD1	contiene dominio similar a Mastermind 1	NM_005491	-5,63
QPCT	glutaminil-péptido ciclotransferasa	NM_012413	-5,64
AHI1	sitio de integración del auxiliar Abelson 1		-5,65
SAMD5	contiene dominio de motivo alfa estéril 5		-5,67
PAPSS2	3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato sintasa 2	NM_004670	-5,68
IFI35	proteína 35 inducida por interferón	NM_005533	-5,68
DKK1	homólogo 1 de dickkopf 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	NM_012242	-5,70
RANBP3L	similar a proteína 3 de unión a RAN	NM_001161429	-5,73
LRP8	proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, receptor de apolipoproteína e	NM_004631	-5,80
PTPRM	proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, M	NM_001105244	-5,82
EPHX4	epóxido hidrolasa 4		-5,82
MALL	similar a la proteína de diferenciación de células T mal	NM_005434	-5,86
ARHGAP20	proteína 20 activadora de Rho GTPasa	NM_020809	-5,90
MFSD2A	contiene el dominio de la superfamilia del facilitador mayor 2A	NM_001136493	-5,96
CYP1B1	polipéptido 1 de la subfamilia B de la familia 1 del citocromo P450	NM_000104	-5,98
MX2	resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 2 (ratón)	NM_002463	-6,03
FGF10	factor de crecimiento de fibroblastos 10	NM_004465	-6,08
NFIC	factor nuclear I/C (factor de transcripción de unión a CCAAT)	NM_205843	-6,09
PGM2L1	similar a fosfoglucomutasa 2 1	NM_173582	-6,10
SYT11	sinaptotagmina XI		-6,14
TEX15	expresado en testículo 15	NM_031271	-6,16
USP18/USP41	peptidasa 18 específica de ubiquitina/peptidasa 41 específica de ubiquitina	NM_017414	-6,35
CD302/LY75	molécula CD302/antígeno de linfocitos 75	ENST00000409803	-6,37
CD68			-6,39
PDCD1LG2	ligando 2 de la muerte celular programada 1	NM_025239	-6,41
MICA	secuencia A relacionada con el polipéptido de MHC de clase I	NM_001177519	-6,42
FHL1	cuatro y medio dominios LIM 1	NM_001159702	-6,51
MR1	complejo de histocompatibilidad mayor, relacionado con clase I	NM_001531	-6,63
LMF1	factor de maduración de lipasa 1	NM_0022773	-6,70
B2M	beta-2-microglobulina	NM_004048	-6,72
DUSP6	fosfatasa de especificidad dual 6	NM_001946	-6,73
IFIT2	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 2	NM_001547	-6,77
TM4SF18	miembro 18 de la familia seis 4 L transmembrana		-7,11
NR4A2	miembro 2 del grupo A de la subfamilia 4 de receptor nuclear	NM_006186	-7,14
C5orf62	marco de lectura abierto 62 del cromosoma 5		-7,16
XYLT1	xilosiltransferasa 1	NM_022166	-7,16
Tr. 8048976			-7,27
MICA	secuencia A relacionada con el polipéptido de MHC de clase II	NM_000247	-7,35
NQO1	NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1	NM_000903	-8,06

ES 2 716 200 T3

AB13BP	proteína de unión al miembro 3 (NESH) de la familia ABI		-8,14
SNCA	sinucleína, alfa (no componente A4 del precursor amiloide)	NM_000345	-8,21
CA2	anhidrasa carbónica II	NM_000067	-8,30
TLR4	receptor similar a toll 4	NM_024168	-8,50
PLCD4	fosfolipasa C, delta 4	NM_032726	-8,60
C1R	subcomponente r del componente del complemento 1	NM_001733	-9,89

FIG. 21



D. Control CEC

E. CD271+extraídas

