

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 174**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0793 (2010.01)

C12N 5/079 (2010.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/44 (2015.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2005** **E 11183613 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019** **EP 2438816**

54 Título: **Modalidades mejoradas para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina**

30 Prioridad:

23.01.2004 US 538964 P

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

29.07.2019

73 Titular/es:

**ASTELLAS INSTITUTE FOR REGENERATIVE
MEDICINE (100.0%)**

**33 Locke Drive
Marlborough, MA 01752, US**

72 Inventor/es:

KLIMANSKAYA, IRINA, V

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 721 174 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

Modalidades mejoradas para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un método para la diferenciación de citoblastos embrionarios en epitelio pigmentario de la retina humano. También se proporcionan métodos para mejorar las terapias basadas en células para la degeneración de la retina y otros trastornos visuales, así como para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y para la diferenciación de citoblastos embrionarios de mamífero y células derivadas de embriones de mamífero en células de epitelio pigmentario de la retina (RPE) y otros tejidos oculares que incluyen, pero no se limitan a bastones, conos, bipolares, corneales, neurales, del epitelio del iris y células progenitoras.

10 Antecedentes de la invención

Muchas partes del sistema nervioso central (SNC) presentan organización laminar, y los procesos neuropatológicos en general implican más de una de estas múltiples capas celulares. Las enfermedades del SNC con frecuencia incluyen pérdida de células neuronales, y debido a la ausencia de repoblación endógena, la recuperación efectiva de la función después de enfermedad relacionada con el SNC es extremadamente limitada o está ausente. En particular, la afección de la retina común conocida como degeneración macular asociada a la edad (AMD), es resultado de la pérdida de fotorreceptores junto con epitelio pigmentario de la retina (RPE), con implicación variable adicional de neuronas internunciales ("transmisión") de la capa nuclear interna (INL). El restablecimiento de la agudeza visual de moderado a alto, por lo tanto, requiere la sustitución funcional de algunas o todas las capas celulares dañadas.

20 Anatómicamente, la retinitis pigmentaria (RP), una familia de degeneraciones de la retina heredadas, es una disminución continua del número de núcleos de células fotorreceptoras que llevan a la pérdida de visión. Aunque el fenotipo es similar entre la mayoría de las formas de RP, los mecanismos celulares subyacentes son diversos y pueden ser resultado de diferentes mutaciones en muchos genes. La mayoría implican mutaciones que alteran la expresión de genes específicos de células fotorreceptoras, dando cuenta las mutaciones en el gen de la rodopsina de aproximadamente 10% de ellas. En otras formas de la enfermedad, están alterados los genes reguladores de la apoptosis (por ejemplo, *Bax* y *Pax2*). La AMD es un diagnóstico clínico que abarca una variedad de afecciones degenerativas que probablemente difieren en la etiología a nivel molecular. Todos los casos de AMD comparten la característica de la pérdida de células fotorreceptoras dentro de la retina central. Sin embargo, este punto final común parece que es una consecuencia secundaria de las anomalías más tempranas a nivel del RPE, neovascularización y membrana de Bruch subyacente. Esta última puede estar relacionada con dificultades con la recuperación de la membrana fotorreceptora, que todavía se entienden poco.

Además, el epitelio pigmentario de la retina es uno de los tipos de células más importantes en el ojo, ya que es crucial para el mantenimiento de la función fotorreceptora. Realiza varias tareas complejas, que incluyen la fagocitosis de segmentos exteriores desprendidos de bastones y conos, metabolismo de la vitamina A, síntesis de mucopolisacáridos implicados en el intercambio de metabolitos en el espacio subretiniano, transporte de metabolitos, regulación de la angiogénesis, absorción de luz, potenciación de resolución de imágenes, y la regulación de muchas otras funciones en la retina a través de proteínas secretadas tales como proteasas e inhibidores de proteasas..

Una característica adicional presente en algunos casos de AMD es la presencia de vasos sanguíneos aberrantes, que producen una afección conocida como neovascularización coroidea (CNV). La forma neovascular ("húmeda") de la AMD es particularmente destructiva y parece que es resultado de una pérdida de la regulación adecuada de la angiogénesis. La rotura en la membrana de Bruch como resultado de la disfunción del RPE permite que nuevos vasos de la circulación coroidea accedan al espacio subretiniano, donde pueden alterar físicamente la organización de segmentos exteriores y producir fuga vascular o hemorragia que conducen a la pérdida adicional de fotorreceptores.

La CNV se puede abordar por tratamiento con láser. Por lo tanto, el tratamiento con láser de la forma "húmeda" de la AMD se usa en general en los Estados Unidos. Sin embargo, a menudo hay efectos secundarios indeseables, y por lo tanto insatisfacción del paciente con el resultado del tratamiento. Esto se debe al hecho de que las quemaduras del láser, si se producen, están asociadas con la muerte de fotorreceptores y con la ceguera absoluta, irreparable dentro de la parte correspondiente del campo visual. Además, el tratamiento con láser no arregla la predisposición subyacente hacia el desarrollo de la CNV. De hecho, las quemaduras con láser se han usado como un método conveniente para la inducción de CNV en monos (Archer y Gardiner, 1981). Los tratamientos maculares con láser de la CNV se usan con mucha más moderación en otros países como el Reino Unido. No hay un tratamiento generalmente reconocido para la forma "seca" de la AMD más común, en la que hay pérdida de fotorreceptores que cubren parches irregulares de atrofia del RPE en la mácula y asociados con material extracelular llamado drusas.

Puesto que el RPE tiene una función importante en el mantenimiento de los fotorreceptores, y en la regulación de la angiogénesis, diferentes malfuncionamientos del RPE in vivo están asociados con dolencias que alteran la visión, tales como la retinitis pigmentaria, desprendimiento del ERP, displasia, atrofia, retinopatía, distrofia o degeneración

macular, incluyendo la degeneración macular asociada a la edad, que puede producir el daño de fotorreceptores y ceguera.

5 Específicamente y además de la AMD, la variedad de otras afecciones degenerativas que afectan a la mácula incluyen, pero no se limitan a distrofia de conos, distrofia de conos-bastones, malattia leventinese, distrofia en panel de Doyme, distrofia de Sorsby, enfermedad de Stargardt, distrofias en patrón/mariposa, distrofia viteliforme de Best, distrofia de Carolina del Norte, distrofia coroidea aerolar central, estrias angioideas y maculopatías tóxicas.

10 Las enfermedades de la retina generales que pueden afectar de forma secundaria a la mácula incluyen el desprendimiento de retina, miopía patológica, retinitis pigmentaria, retinopatía diabética, retinitis por CMV, enfermedad vascular oclusiva de la retina, retinopatía del prematuro (ROP), ruptura coroidea, síndrome de histoplasmosis ocular (POHS), toxoplasmosis y amaurosis congénita de Leber. Ninguna de las listas anteriores es exhaustiva.

Todas las afecciones anteriores implican la pérdida de fotorreceptores y, por lo tanto, las opciones de tratamiento son pocas e insuficientes.

15 Debido a su capacidad de cicatrización de heridas, el RPE se ha estudiado ampliamente en la aplicación de terapia de trasplante. En el 2002, un año en el ensayo, los pacientes mostraron una mejora de 30-50%. Se ha mostrado que en varios modelos animales y en seres humanos (Gouras et al., 2002, Stanga et al., 2002, Binder et al., 2002, Schraermeyer et al., 2001, revisado por Lund et al., 2001) el trasplante de RPE tiene un buen potencial para la recuperación de la visión. Sin embargo, incluso en un sitio inmunoprivilegiado tal como el ojo, hay un problema con el rechazo de injerto, ocultando el progreso de esta estrategia si se usa el trasplante alogénico. Aunque se han introducido nuevos fotorreceptores (PRC) experimentalmente por trasplante, los PRC injertados muestran una notable resistencia a conectar con neuronas que sobreviven de la retina hospedante. La resistencia de las células del RPE derivadas de tejido fetal es otro problema, ya que estas células han mostrado un potencial proliferativo muy bajo. Investigadores de la Universidad de Emory llevaron a cabo un ensayo donde cultivaban células del RPE de un donante de ojo humano in vitro y las trasplantaban a seis pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada. Aunque se encontró una disminución de 30-50% de los síntomas en un año después del trasplante, hay escasez de donantes de ojos, ya que todavía no está aprobado por la FDA, y todavía existiría una necesidad más allá de lo que podría encontrarse con el tejido ocular donado.

30 Hasta ahora, las terapias que usan células del RPE ectópicas han mostrado que se comportan como fibroblastos y se han asociado con una serie de complicaciones de la retina destructivas incluyendo la pérdida axonal (Villegas-Perez, et al., 1998) y vitreorretinopatía proliferativa (PVR) con desprendimiento de la retina (Cleary y Ryan, 1979). El RPE suministrado como una lámina suelta tiende a desplazarse hacia arriba. Esto da como resultado un cubrimiento efectivo malo de los fotorreceptores así como un RPE multilaminar con polaridad incorrecta, dando lugar posiblemente a la formación de quistes o edema macular.

35 El suministro de injertos de la retina neural al espacio subretiniano (submacular) del ojo humano enfermo se ha descrito en Kaplan et al. (1997), Humayun et al. (2000), y del Cerro et al. (2000). Existe un problema grave en cuanto que los injertos retinianos neurales típicamente no se integran funcionalmente con la retina hospedante. Además, la ausencia de una monocapa de RPE intacta significa que no se ha rectificado la disfunción del RPE o alteración de la membrana de Bruch. Ambos son antecedentes fundamentales de la pérdida de visión.

40 Por lo tanto, no existen medios eficaces para reconstituir el RPE en ninguna de las terapias actuales, y sigue habiendo deficiencias en cada una, en particular el problema esencial de una desconexión funcional entre el injerto y la retina hospedante. Por lo tanto, es necesaria una terapia de la retina mejorada.

Hirano et al., describen "Generation of Structures Formed by Lens and Retinal Cells Differentiating from Embryonic Stem Cells", *Developmental Dynamics*, (20031201), Vol. 228, No. 4, Páginas 664 - 671.

45 Kawasaki et al., describen "Generation of Dopaminergic Neurons and Pigmented Epithelia from Primate ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity", *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, (20020205), Vol. 99, No. 3, Páginas 1580-1585.

Oota et al., describen "Induction of the Differentiation of Lentoids from Primate Embryonic Stem Cells", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, (20030601), Vol. 44, No. 6, Páginas 2689 - 2693.

50 Zhao et al., describen "Differentiation of Embryonic Stem Cells into Retinal Neurons", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (20020920), Vol. 297, No. 2, Páginas 177 - 184.

Ying et al., describen "Conversion of Embryonic Stem Cells into Neuroectodermal Precursors in Adherent Monoculture", *Nature Biotechnology*, (20030201), Vol. 21, No. 2, Páginas 183 - 186.

Reubinoff et al., describen "Embryonic Stem Cell Lines from Human Blastocysts: Somatic Differentiation in Vitro", *Nature Biotechnology*, (20000401), Vol. 18, No. 4, Páginas 399 - 404.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para diferenciar citoblastos embrionarios humanos en células de RPE humano, comprendiendo dicho método: a) permitir el desarrollo de cultivos de citoblastos embrionarios humanos en MEF; b) permitir que los cultivos de citoblastos embrionarios humanos formen una multicapa espesa de células; c) cultivar los citoblastos embrionarios humanos para formar células de RPE pigmentadas; y d) aislar y cultivar las células de RPE pigmentadas del cultivo de la etapa (c) para formar células de RPE humano.

El propósito de la presente invención es proporcionar métodos mejorados para la obtención de células de RPE humano. También se proporcionan mediante la descripción métodos para la obtención de células del ojo que incluyen, pero no se limitan, a células neurales, que incluyen células horizontales y células amacrinas, células de la retina tales como bastones y conos, células corneales, células vasculares, y células de RPE y similares a RPE a partir de citoblastos, y para proporcionar métodos y terapias mejoradas para el tratamiento de la degeneración de la retina. En particular, estos métodos implican el uso de células de RPE y similares a RPE obtenidas de citoblastos embrionarios humanos.

La descripción proporciona un método mejorado para generar células para terapia para la degeneración de la retina usando células de RPE, células similares a RPE, los progenitores de estas células o una combinación de dos o tres de cualquiera de las anteriores obtenidas de citoblastos embrionarios de mamífero, con el fin de tratar diferentes afecciones, que incluyen, pero no se limitan la retinitis pigmentaria y degeneración macular y afecciones asociadas. Los tipos de células que se pueden producir usando este método incluyen, pero no se limitan a células de RPE, similares a RPE y progenitores de RPE. Las células que también se pueden producir incluyen las células epiteliales pigmentadas del iris (IPE). Las células neurales asociadas con la visión que incluyen neuronas internunciales (p. ej., neuronas de "transmisión" de la capa nuclear interna (INL)) y células amacrinas (interneuronas que interactúan en el segundo nivel sináptico de las rutas verticalmente directas que consisten en la cadena de células fotorreceptoras-bipolares-ganglionares, son sinápticamente activas en la capa plexiforme interna (IPL) y sirven para integrar, modular e interponer un dominio temporal al mensaje visual presentado a la célula ganglionar) también se pueden producir usando este método. Además, se pueden producir células de la retina, bastones, conos y células corneales. Además, también se pueden producir células que proporcionan la vasculatura del ojo. Las células producidas de acuerdo con la presente invención se pueden trasplantar en el espacio subretiniano usando cirugía de vitrectomía.

Los ejemplos no limitantes incluyen el trasplante de estas células en una suspensión, matriz o sustrato. Los modelos animales de retinitis pigmentaria que se pueden tratar incluyen roedores (ratón rd, ratón con inactivación génica de RPE-65, ratón similar a tubby, rata RCS, gatos (gato abisinio), y perros (perro con degeneración de conos "cd", perro con degeneración de bastones-conos progresiva "prcd", perro con degeneración de la retina temprana "erd", perros con displasia de bastones-conos 1, 2 y 3 "rcd1, rcd2 y rcd3", perros con displasia de fotorreceptores "pd" y "RPE-65" en Briard (perro). La evaluación se lleva a cabo usando ensayos de comportamiento, angiografía fluorescente, histología o ensayo funcional tal como la medición de la capacidad de las células para llevar a cabo fagocitosis (fragmentos de fotorreceptores), metabolismo de vitamina A, conductividad de uniones estrechas, o evaluación usando microscopio electrónico. Una de las muchas ventajas de los métodos presentados aquí es la capacidad para producir y tratar muchos más pacientes de lo que sería posible tratar si uno se limitara a usar tejido de donantes de ojos.

También se proporcionan métodos para la diferenciación espontánea de células hES en células con numerosas características del RPE.

Estas preparaciones de RPE son capaces de cambios fenotípicos en cultivo y manteniendo las características del RPE a través de los múltiples pases. La presente descripción también proporciona métodos de diferenciación de líneas celulares de RPE establecidas en linajes neuronales alternativos, células corneales, células retinianas como un ejemplo no limitante, mediante el uso de bFGF o FGF.

Se proporciona además un método para la obtención de nuevas líneas de RPE y células progenitoras a partir de líneas de ES existentes o nuevas. Puede haber variaciones en las propiedades, tales como velocidad de crecimiento, expresión de pigmento o desdiferenciación y rediferenciación en cultivo, de células similares a RPE cuando se obtienen a partir de líneas de células ES diferentes. Puede haber ciertas variaciones en su funcionalidad y estabilidad de cariotipo, por lo que es deseable proporcionar métodos para la obtención de nuevas líneas de RPE y nuevas líneas de células ES que permitirían seleccionar las líneas con las propiedades deseadas que se puedan seleccionar clonalmente para producir una población pura de células similares a RPE de alta calidad.

Las células que también se pueden obtener a partir de líneas de células ES existentes y nuevas incluyen las células epiteliales pigmentadas del iris (IPE). En un ejemplo adicional, también se pueden producir células neurales asociadas con la visión que incluyen neuronas internunciales (p. ej., neuronas de "transmisión" de la capa nuclear interna (INL)) y células amacrinas.

Además, se pueden producir células de la retina, bastones, conos y células corneales. En un ejemplo adicional, también se pueden producir células que proporcionan la vasculatura del ojo.

Se proporciona además también, un método para la obtención de líneas de RPE o precursores de células de RPE que tienen una mayor capacidad para prevenir la neovascularización. Dichas células se pueden producir por envejecimiento de una célula somática de un paciente de modo que la telomerasa se acorta, donde ha pasado al menos 10% de la duración de vida replicativa normal de la célula, y después el uso de dicha célula somática como una célula donante de transferencia nuclear para crear células que sobreexpresan inhibidores de angiogénesis tales como el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF/EPC-1). Alternativamente dichas células se pueden modificar genéticamente con genes exógenos que inhiben la neovascularización.

Otro ejemplo de la presente descripción usaba un banco de células ES o derivadas de embriones con homocigosidad en la región HLA de modo que dichas células tienen complejidad reducida de sus antígenos de HLA.

Por lo tanto, un ejemplo adicional de la presente descripción incluye la caracterización de células similares a ERP derivadas de ES. Aunque las células epiteliales pigmentadas derivadas de ES se parecen mucho al RPE por su morfología, comportamiento y marcadores moleculares, su valor terapéutico dependerá de su capacidad para realizar funciones del RPE y permanecer no carcinógenas. Por lo tanto las células de RPE derivadas de ES se caracterizan usando una o más de las siguientes técnicas: (i) evaluación de su funcionalidad, es decir, fagocitosis de los fragmentos de fotorreceptores, metabolismo de vitamina A, potencial cicatrización de heridas; (ii) evaluación de la pluripotencia de los derivados de células ES similares a RPE mediante trasplantes en modelos animales (como un ejemplo no limitante estos pueden incluir ratones SCID); (iii) fenotipado y cariotipado de células similares a RPE; (iv) evaluación de células similares a RPE derivadas de células ES y tejido RPE por perfil de expresión génica, (v) evaluación de la expresión de marcadores moleculares de RPE a nivel de proteína, incluyendo bestrofina, CRALBP, RPE-65, PEDF. Las células también se pueden evaluar basándose en su expresión de activadores transcripcionales normalmente necesarios para el desarrollo del ojo, que incluyen *rx/rax*, *chx10/vsx-2/alx*, *ots-1*, *otx-2*, *six3/optx*, *six6/optx2*, *mitf*, *pax6/mitf*, y *pax6/pax2* (Fischer y Reh, 2001, Baumer et al., 2003).

Un aspecto adicional de la presente descripción es un método para la caracterización de células similares a RPE derivadas de células ES usando al menos una de las técnicas seleccionadas del grupo que consiste en (i) evaluación de la funcionalidad de las células similares a RPE derivadas de células ES; (ii) evaluación de la pluripotencia de los derivados de células ES similares a RPE mediante trasplante en modelos animales; (iii) fenotipado y cariotipado de células similares a RPE; (iv) evaluación del perfil de expresión de genes, (v) evaluación de la expresión de marcadores moleculares de RPE al nivel de proteína; y (vi) la expresión de activadores transcripcionales requeridos normalmente para el desarrollo del ojo. En un aspecto adicional estas técnicas se pueden usar para evaluar múltiples tipos de células derivadas de células hES.

Los citoblastos embrionarios (ES) se pueden mantener indefinidamente *in vitro* en un estado indiferenciado y todavía son capaces de diferenciarse en prácticamente cualquier tipo de célula. Por lo tanto, los citoblastos embrionarios humanos (hES) son útiles para estudios de la diferenciación de células humanas y se pueden considerar como una fuente potencial para terapias de trasplante. Hasta la fecha, se ha descrito la diferenciación de células ES humanas y de ratón en numerosos tipos de células (revisado por Smith, 2001) incluyendo cardiomiocitos [Kehat et al. 2001, Mummery et al., 2003 Carpenter et al., 2002], neuronas y precursores neurales (Reubinoff et al. 2000, Carpenter et al. 2001, Schuldiner et al., 2001), adipocitos (Bost et al., 2002, Aubert et al., 1999), células similares a hepatocitos (Rambhatla et al., 2003), células hematopoyéticas (Chadwick et al., 2003), ovocitos (Hubner et al., 2003), células similares a timocitos (Lin RY et al., 2003), células del islote pancreático (Kahan, 2003), y osteoblastos (Zur Nieden et al., 2003).

La presente descripción también proporciona un método de identificación de células tales como células RPE, células hematopoyéticas, células musculares, células hepáticas, células beta pancreáticas, neuronas, endoteliales, células progenitoras u otras células útiles en la terapia o investigación celular, derivadas de líneas de citoblastos embrionarios con capacidad para diferenciarse en tipos de células útiles, comparando los transcritos de ARN mensajero de dichas células con células derivadas *in vivo*. Este método facilita la identificación de células con un fenotipo normal y la obtención de células optimizadas para la terapia celular para investigación.

La presente invención proporciona la diferenciación de células ES humanas en una célula especializada en el linaje neuronal, el epitelio pigmentario de la retina (RPE). El RPE es una monocapa epitelial densamente pigmentada entre la coroides y la retina neural. Sirve como parte de una barrera entre el torrente sanguíneo y la retina, y su función incluyen la fagocitosis de segmentos exteriores de bastones y conos desprendidos, absorción de luz parásita, metabolismo de vitamina A, regeneración de retinoides y reparación de tejido. (Grierson et al., 1994, Fisher y Reh, 2001, Marmorstein et al., 1998). El RPE es fácilmente reconocido por su morfología celular de adoquines de células pigmentadas negras. Además, hay varios marcadores conocidos del RPE, que incluyen la proteína de unión al retinaldehído celular (CRALBP), una proteína citoplasmática que se encuentra también en microvellosidades apicales (Bunt-Milam y Saari, 1983); RPE65, una proteína citoplasmática implicada en el metabolismo retinoide (Ma et al., 2001, Redmond et al., 1998); bestrofina, el producto del gen de la distrofia macular viteliforme de Best (VMD2, Marmorstein et al., 2000), y factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF) una proteína secretada de 48kD con propiedades angiostáticas (Karakousis et al., 2001, Jablonski et al., 2000).

Una característica inusual del RPE es su aparente plasticidad. Las células de RPE normalmente son mitóticamente quiescentes, pero pueden empezar a dividirse en respuesta a lesión o fotocoagulación. Las células RPE adyacentes

a la lesión se aplanan y proliferan formando una nueva monocapa (Zhao et al., 1997). Varios estudios han indicado que la monocapa de RPE puede producir células de aspecto de fibroblastos que después pueden revertir a su morfología de RPE original (Grierson et al., 1994, Kirchhof et al., 1988, Lee et al., 2001). No está claro si las células que se dividen y la capa epitelial pigmentada son del mismo linaje ya que se han aislado dos poblaciones de células RPE: epiteliales y fusiformes. (McKay y Burke, 1994). In vitro, dependiendo de la combinación de factores de crecimiento y sustrato, el RPE se puede mantener como un epitelio o desdiferenciar rápidamente y hacerse proliferativo (Zhao 1997, Opas y Dziak, 1994). Es interesante que el fenotipo epitelial se puede restablecer en cultivos quiescentes de largo plazo (Grierson et al., 1994).

En el desarrollo de los mamíferos, el RPE comparte el mismo progenitor con la regina neural, el neuroepitelio de la vesícula óptica. En determinadas condiciones, se ha sugerido que el RPE se puede transdiferenciar en progenitores neurales (Opas y Dziak, 1994), neuronas (Chen et al., 2003, Viores et al., 1995), y epitelio del cristalino (Eguchi, 1986). Uno de los factores que pueden estimular el cambio del RPE en neuronas es el bFGF (Opaz y Dziak, 1994, un procedimiento asociado con la expresión de activadores transcripcionales normalmente requeridos para el desarrollo del ojo, que incluyen rx/rax, chx10/vsx-2/axl, ots-1, otx-2, six3/optx, six6/optx2, mitf, y pax6/pax2 (Fischer y Reh, 2001, Baumer et al., 2003). Recientemente se ha mostrado que los bordes de la retina de pollo contienen citoblastos neurales (Fischer y Reh, 2000) y que las células pigmentadas en esta zona, que expresan pax6/mitf, pueden formar células neuronales en respuesta al FGF (Fisher y Reh, 2001).

La presente descripción proporciona la obtención de células de la red trabecular a partir de hES y también células de la red trabecular genéticamente modificadas para el tratamiento del glaucoma.

La presente descripción proporciona también la obtención de células de la red trabecular a partir de progenitores del RPE y células similares a RPE y también células de la red trabecular genéticamente modificadas para el tratamiento del glaucoma.

La presente descripción proporciona además métodos para la obtención de líneas de RPE o precursores de células de RPE que tienen una mayor capacidad para prevenir la neovascularización, comprendiendo dichos métodos: a) envejecimiento de una célula somática de un animal de modo que se acorta la telomerasa, en donde ha pasado al menos 10% del periodo de vida replicativo normal de la célula; y b) uso de dicha célula somática como una célula donante de transferencia nuclear para crear células que sobreexpresan inhibidores de angiogénesis, en donde los inhibidores de angiogénesis pueden ser el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF/EPC-1).

La presente descripción proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson con células de RPE derivadas de células hES, similares a RPE y/o progenitoras de RPE. Estas se pueden suministrar por implante intra-cuerpo estriado estereotáxico o con microsoportes. Alternativamente, se pueden suministrar sin el uso de microsoportes. Las células también se pueden expandir en cultivo y usar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson por cualquier método conocido para los expertos en la técnica.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

35 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A-F es una serie de fotografías que muestran el aspecto de las zonas pigmentadas (características de células de RPE) en células hES que se diferencian espontáneamente. La figura 1A es una fotografía de regiones pigmentadas en un cultivo adherente de 2,5 meses, un pocillo de una placa de 6 pocillos, barrido; la figura 1B es una fotografía de regiones pigmentadas en un cultivo de 2,5 meses desarrollado en EB, con 45x aumentos; la figura 1C es una fotografía de una zona pigmentada de un cultivo adherente; la figura 1D es una fotografía de una región pigmentada de un cultivo desarrollado en EB; la figura 1E es una fotografía del límite entre la región pigmentada y el resto del cultivo, x200; la figura F es igual que la figura E pero con x400 aumentos. Las flechas en A y B señalan regiones pigmentadas.

La figura 2A-F, es una serie de fotografías que muestran la pérdida y ganancia de nuevo de pigmentación y morfología epitelial en cultivo. La figura 2A es una fotografía que muestra sobrecrecimiento de EB primario, 1 semana; la figura 2B es una fotografía que muestra el cultivo primario de células, aisladas con tripsina, 1 semana; la figura 2C es una fotografía que muestra el islote epitelial rodeado de células proliferativas; la figura 2D es una fotografía que muestra la ganancia de nuevo de pigmentación y morfología epitelial en cultivo de 1 mes; la figura 2E es una fotografía que muestra el cultivo después de 3 pases, x200 aumentos; la figura 2F muestra el mismo cultivo que en E, x400 aumentos, microscopía de Hoffman. Las flechas negras señalan las células pigmentadas, las flechas blancas muestra las células con sobrecrecimiento sin pigmento.

La figura 3, panel izquierdo (A-D) y panel derecho, es una serie de fotografías y una gráfica, que muestran marcadores de RPE en células epiteliales pigmentadas derivadas de hES. Las figuras 3A y 3B son fotografías que muestran inmunolocalización del marcador de RPE bestrofina, y que corresponde a microscopía de campo de fases, x200 aumentos; las figuras 3C y 3D son fotografías que muestran CRALBP y la correspondiente microscopía de campo de contraste de fases, x400 aumentos. Las flechas muestran la colocalización de la bestrofina (A) y CRALBP (C) respecto a las células pigmentadas (C,D); las cabezas de flechas señalan la ausencia de tinción para estas proteínas (A,B) en regiones no pigmentadas (C,D).

La figura 3, panel derecho, muestra una fotografía y gráfica de transferencia western de lisados celulares (línea hES n° 36) con anticuerpos contra bestrofina (a) y CRALBP (b); c,d - células hES no diferenciadas, c -- control para anticuerpo anti-CRALBP, d-control para anticuerpo anti-bestrofina

5 La figura 4 muestra fotografías que demuestran la expresión de marcadores de Pax6 (figura 4A), Pax2 (figura 4E) y mitf (figura 4B, figura 4F) en células similares a RPE en cultivos quiescentes de largo plazo. La figura 4C, figura 4G, contraste de fase, figura 4D, figura 4H, imágenes fusionadas de Pax6/mitf/constate de fase (figura 4A, figura 4B, figura 4C) y Pax2/mitf/contraste de fase (figura 4E, figura 4F, figura 4G).

La figura 5A-B muestra fotografías de la diferenciación de RPE en cultivo de células derivadas embriones humanos: evitando la etapa de obtención de líneas de células ES.

10 La figura 6 muestra la comparación transcripcional de preparaciones de RPE. La figura 6A-F - basado en la anotación semántica, esta tabla representa los patrones de expresión de genes relacionados con RPE para epitelio pigmentario de la retina derivados de células hES (hES-RPE), RPE transdiferenciado derivado de células hES (hES-RPE-TD), ARPE-19 y D407, y humano recién aislado (fe-RPE). Figura 6G - La minería de datos adicional puso de manifiesto ontologías específicas de RPE conocidas, tales como biosíntesis de melanina, visión, unión a retinol, solo en RPE fetal y ES-RPE pero no ARPE-19.

Descripción detallada de la invención

20 Se describen diferentes realizaciones de la invención en detalle y se pueden ilustrar más mediante los ejemplos proporcionados. Como se usa en la descripción en la presente memoria y a lo largo de las siguientes reivindicaciones, el significado de "un", "una" y "el", "la" incluye la referencia plural salvo que el contexto dicte claramente otra cosa. También como se usa en la descripción en la presente memoria, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

25 Los términos usados en esta memoria descriptiva en general tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico donde se usa cada término. Algunos términos que se usan para describir la invención se describen a continuación, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar guía adicional al facultativo en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y cómo usarlos. Por conveniencia, algunos términos pueden estar destacados, por ejemplo usando cursiva y/o comillas. El uso del destacado no influye en el alcance y significado de un término; el alcance y el significado de un término es el mismo, en el mismo contexto, esté o no destacado. Se apreciará que se puede decir lo mismo en más de una forma. Por consiguiente, se puede usar lenguaje alternativo y sinónimos para todos y cada uno de los términos descritos en la presente memoria, y no debe ponerse ninguna importancia especial en si un término es desarrollado o descrito en la presente memoria o no. Se proporcionan sinónimos para algunos términos. Una cita de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos,

35 Los citoblastos embrionarios (ES) que tienen la capacidad de diferenciarse en prácticamente cualquier tejido de un cuerpo humano, pueden proporcionar un suministro ilimitado de células rejuvenecidas e histocompatibles para la terapia de trasplante, ya que el problema del inmunorechazo se puede superar con tecnología partenogenética. Los recientes descubrimientos de Hitano et al. (2003) han mostrado que las células ES de ratón producen estructuras de tipo ocular en experimentos de diferenciación in vitro. Entre estas, se describieron células epiteliales pigmentadas, que se parecían al epitelio pigmentario de la retina.

40 Experimentos preliminares llevados a cabo en Advanced Cell Technology con líneas de células ES de primate y humanas, muestran que en un sistema de cultivo especializado, estas células se diferencian en células similares a RPE que se pueden aislar y someter a pases. Los derivados de células ES partenoto Cyno, NT humanas y de ratón, tienen múltiples características del RPE: estas células epiteliales pigmentadas expresan cuatro marcadores moleculares del RPE, bestrofina, CRALBP, PEDF y RPE65; como el RPE, su proliferación en cultivo va acompañada de dediferenciación, pérdida de pigmento y morfología epitelial, los cuales se restablecen ambos después de que las células formen una monocapa y se vuelvan quiescentes. Dichas células similares a RPE se pueden someter a pases fácilmente, congelar y descongelar, permitiendo así su expansión.

45 Se ha mostrado además que las células ES humanas también producen múltiples estructuras de tipo ocular (cuerpo vítreo) en experimentos de diferenciación in vitro. Los análisis histológicos de estas estructuras muestran un patrón de células de acuerdo con el desarrollo temprano de la retina, incluyendo agregados de células similares a bastones y conos.

Trasplante de RPE

55 Actualmente, el rechazo lento, crónico de los aloinjertos de RPE impide a los científicos determinar la eficacia terapéutica de este trasplante de RPE. Se están considerando varios métodos para superar este obstáculo. La forma más fácil es usar inmunosupresión sistémica, que está asociada con efectos secundarios graves tales como el cáncer y la infección. Un segundo procedimiento es trasplantar el RPE del propio paciente, es decir, homoinjertos, pero esto tiene el inconveniente de usar RPE enfermo, viejo, para sustituir RPE incluso más enfermo. Un tercer planteamiento más es usar epitelio del iris (IPE) del mismo paciente, pero este tiene el inconveniente de que el IPE

no realiza todas las funciones relacionadas con la visión del RPE. Por último, será necesario encontrar un método para eliminar el rechazo y que entonces los científicos puedan determinar la eficacia real del trasplante de RPE en AMD y ARMD. La partenogénesis facilita la histocompatibilidad de células de RPE y progenitores migradas.

Defectos del RPE en la retinitis pigmentaria

5 La retinitis pigmentaria es una afección hereditaria en la que los receptores de la visión son destruidos gradualmente por programación genética anómala. Algunas formas producen ceguera total a edades relativamente jóvenes, y otras formas demuestran cambios de la retina de "espícula ósea" característicos, con poca destrucción de la visión. Esta enfermedad afecta a 1,5 millones de personas en el mundo. Se han encontrado dos defectos de genes que producen la RP recesiva autosómica en genes expresados exclusivamente en el RPE: uno se debe a una proteína del RPE implicada en el metabolismo de la vitamina A (proteína de unión al cis-retinaldehído) una segunda implica otra proteína única del RPE, RPE65. Una vez que se supere el rechazo, ambas formas de RP podrían ser tratables inmediatamente mediante trasplante de RPE. Este tratamiento era inconcebible hace unos años, cuando la RP era una forma de ceguera poco comprendida y con poca esperanza de ser tratable.

15 Nueva investigación en el trasplante de RPE sugiere que hay una promesa para el tratamiento de la degeneración de la retina, incluyendo la degeneración macular. Además, una serie de pacientes con RP avanzada han recuperado cierta visión útil después del trasplante de células de la retina fetales. Uno de los pacientes, por ejemplo, mejoró de apenas ver luz a ser capaz de contar dedos mantenidos a una distancia de aproximadamente 183 cm (seis pies) de la cara del paciente. En un segundo caso, la visión mejoró hasta poder ver letras a través de visión túnel. Los trasplantes en estos estudios se llevaron a cabo por inyección, introduciendo las nuevas células de la retina debajo de la retina neural existente. No todas las células sobrevivieron puesto que las células fetales trasplantadas eran alogénicas (es decir, no emparejadas genéticamente), aunque las que sobrevivieron formaron conexiones con otras neuronas y empezaron a funcionar como fotorreceptores alrededor de ellas. Aproximadamente un año después de que las primeras ocho personas recibieran los trasplantes, cuatro habían recuperado algo de función visual y una quinta mostraba síntomas de hacerlo.

25 Tres líneas de citoblastos embrionarios humanos recién obtenidas son similares en propiedades a las descritas anteriormente (Thomson et al. 1998, Reibunoff et al., 2000, Richards et al., 2000, Lanzendorf et al., 2001): mantienen fenotipo indiferenciado y expresan los marcadores conocidos de células hES indiferenciadas, Oct-4, fosfatasa alcalina, SSEA-3, SSEA-4, TRA-I-60, TRA-I-81 a lo largo de 45 pases en cultivo o en 130 duplicaciones de población. Todas las líneas de células hES se diferencian en derivados de las tres capas germinales en EB o cultivos adherentes a largo plazo y en teratomas. Uno de los derivados de diferenciación de las células hES es similar al epitelio pigmentario de la retina por los siguientes criterios: morfológicamente, tienen un aspecto típico de monocapa epitelial en adoquines y contienen pigmento marrón oscuro en su citoplasma, que se sabe que está presente en el cuerpo humano solo en melanocitos, queratinocitos, epitelio pigmentario de la retina y del iris (IPE). Sin embargo, los melanocitos son células no epiteliales, y los queratinocitos no secretan sino que solo acumulan melanina. El conjunto de proteínas específicas del RPE, bestrofina, CRALBP, PEDF, presente en estas células, indica que es probable que sean similares al RPE y no al IPE. Otra similitud es el comportamiento de las células pigmentadas aisladas en cultivo, cuando se veía poco o no se veía pigmento en células que proliferaban, pero era retenido en islas epiteliales estrechamente empaquetadas o reexpresado en monocapa de adoquines recién establecida después de que las células se convirtieran en quiescentes. Dicho comportamiento se describió para células RPE en cultivo (revisado por Zhao et al., 1997), y se describió previamente (Vinores et al., 1995) que un marcador neuronal de tubulina beta III se localizaba específicamente en células RPE que se desdiferenciaban in vitro y no en las células con la morfología de RPE típica, sugiriendo que refleja la plasticidad del RPE y su capacidad para diferenciarse en un linaje neural.

45 Se ha observado el mismo patrón de localización de la tubulina beta III en cultivos primarios y sometidos a pases de células de RPE y similares a RPE, lo cual puede reflejar una desdiferenciación de dichas células en cultivo o indicar una población separada de células comprometidas con un destino neuronal, que estaban originalmente situadas al lado de las células pigmentadas por diferenciación de células hES en cultivos a largo plazo y se podrían haber coaislado con las células similares a RPE.

50 En la vesícula óptica en crecimiento el RPE y la retina neural comparten el mismo progenitor neuroepitelial bipotencial, y se mostró que su destino estaba determinado por Pax2, Pax6 y Mitf (Baumer et al., 2003), siendo el último el objetivo de los dos primeros. Pax6 en etapas más tempranas actúa como un activador de genes proneuronales y es regulado por disminución en el RPE en el desarrollo posterior, permaneciendo en células amacrinas y ganglionares en la retina madura (revisado por Ashery-Padan y Gruss, 2001). En la carpa dorada, también se encuentra en progenitores mitóticamente activos de neuronas que se regeneran (Hitchcock et al., 1996). Se ha encontrado que muchas de las células similares a RPE expresaban mitf y Pax6 en un patrón similar a la tubulina beta III y se encontraron solo en células no pigmentadas de morfología no epitelial que rodean las islas epiteliales pigmentadas en cultivos a largo plazo o en células con un fenotipo de RPE "parcial" (ligeramente pigmentadas y empaquetadas de forma suelta). En células que proliferaban en cultivos con pases recientes, se encontraron todos estos marcadores en casi todas las células, sugiriendo una inversión de las células similares a RPE al estado progenitor al comienzo de la proliferación o proliferación masiva de progenitores de la retina. Es interesante que en teratomas donde también se encontraron islas de células pigmentadas de morfología epitelial,

Pax6 era expresado en células no pigmentadas adyacentes a las regiones pigmentadas (no se muestran los datos). Múltiples estudios han mostrado previamente la desdiferenciación de RPE en cultivo y su transdiferenciación en células de fenotipo neuronal (Reh y Gretton, 1987, Skaguchi et al., 1997, Vinores et al., 1995, Chen et al., 2003), células neuronales, amacrina y fotorreceptoras (Zhao et al., 1995), glía (Skaguchi et al., 1997), retina neural (Galy et al., 2002), y en progenitores neuronales (Opas y Dziak, 1993). Dichos progenitores a su vez pueden coexistir con células similares a RPE maduras o aparecer como un resultado de la desdiferenciación de células similares a RPE. Al mismo tiempo, las células de la retina neural se pueden transdiferenciar en RPE in vitro (Opas et al., 2001), por lo que alternativamente, células positivas para tubulina beta III y Pax6 podrían representar una etapa transitoria de dicha transdiferenciación de células neurales coaisladas o progenitores neurales en células similares a RPE.

La diferenciación de células hES en células similares a RPE ocurría espontáneamente cuando se usaban métodos descritos en el siguiente ejemplo, y los autores de la invención observaron que las células epiteliales pigmentadas aparecían con seguridad en cultivos de más tiempo que 6-8 semanas y su número progresaba a lo largo del tiempo, en cultivos de 3-5 meses casi cada EB tenía una región pigmentada grande. Además de las líneas de hES descritas, seis líneas más de hES recién obtenidas se convertían en células similares a RPE, lo que sugería que puesto que el destino neural es el normalmente elegido por las células ES espontáneamente, las células similares a RPE pueden surgir por defecto como una etapa avanzada de dicha ruta. También es posible que en estos cultivos a largo plazo, donde las células hES que se diferencian forman un entorno de múltiples capas, las señales de diferenciación permisivas y/o instructivas vengan de la matriz extracelular y factores de crecimiento producidos por derivados de células hES que se diferencian. El modelo de diferenciación de células hES en células similares a RPE podría ser una herramienta útil para estudiar como dicho microentorno orquesta la diferenciación y transdiferenciación de RPE.

El RPE tiene una función importante en el mantenimiento de fotorreceptores, y varios mal funcionamientos del RPE in vivo están asociados con una serie de dolencias que alteran la visión, tal como el desprendimiento de RPE, displasia, atrofia, retinopatía, retinitis pigmentaria, distrofia o degeneración macular, incluyendo la degeneración macular asociada a la edad, que puede producir daños de los fotorreceptores y ceguera. Debido a su capacidad de cicatrización de heridas, el RPE se ha estudiado ampliamente en la aplicación de terapia de trasplante. Se ha mostrado que en varios modelos animales y en seres humanos (Gouras et al., 2002, Stanga et al., 2002, Binder et al., 2002, Schraermeyer et al., 2001, revisado por Lund et al., 2001) el trasplante de RPE tiene un buen potencial para la recuperación de la visión. Recientemente se propuso otro nicho prospectivo para el trasplante de RPE y se llegó incluso a la fase de ensayos clínicos: puesto que estas células secretan dopamina, se podrían usar para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Subramanian, 2001). Sin embargo, incluso en un ojo inmunoprivilegiado, hay un problema de rechazo de injerto, ocultando el progreso de esta estrategia si se usa el trasplante alogénico. El otro problema es la dependencia del tejido fetal, ya que el RPE de adulto tiene un potencial proliferativo muy bajo.

Como fuente de tejidos inmunocompatibles, las células hES son prometedoras para la terapia de trasplante. El nuevo derivado de diferenciación de células ES humanas, las células similares al epitelio pigmentario de la retina y la fiabilidad y simplicidad de dicho sistema de diferenciación pueden ofrecer un potencial suministro atractivo de células de RPE para trasplante.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diferenciación espontánea en células epiteliales pigmentadas en cultivos a largo plazo

Cuando los cultivos de células hES se dejan crecer en exceso en MEF en ausencia de LIF, FGF y Plasmanate, forman una multicapa de células espesa. Aproximadamente 6 semanas después, aparecen islas oscuras de células con agrupaciones más grandes (Fig. 1). Estas células oscuras se pueden ver fácilmente a simple vista y parecen "pecas" en una placa de células como se muestra en la figura 1A. Con mayor aumento, estas islas aparecen como células poligonales estrechamente empaquetadas en una monocapa de adoquines, típico de las células epiteliales, con pigmento marrón en el citoplasma (Fig. 1C). Hay diferencias en la cantidad de pigmento en las células, siendo las células en la parte central de las islas las de más pigmento y las que están cerca de los bordes las de menos. (Fig. 1, E,F).

Cuando las células hES forman cuerpos embrionarios (EB), aparecen células epiteliales pigmentadas en aproximadamente 1-2% de los EB en las primeras 6-8 semanas (fig. 1B). Con el tiempo más y más EB desarrollan células pigmentadas, y a los 3 meses casi cada EB tiene una región epitelial pigmentada (fig. 1D). La morfología de las células en las regiones pigmentadas de los EB era muy similar a la de los cultivos adherentes (fig. 1D).

Ejemplo 2

Aislamiento y cultivo de células epiteliales pigmentadas

Los autores de la invención aislaron células epiteliales pigmentadas tanto a partir de cultivos de células hES adherentes como de EB. Las células poligonales pigmentadas se digirieron con enzimas (tripsina y/o colagenasa y/o dispasa), y las células de estas islas pigmentadas se seleccionaron selectivamente con un capilar de vidrio. Aunque

se tuvo cuidado de coger solo células pigmentadas, la población de células aisladas contenía invariablemente algunas células no pigmentadas. Después de cultivo en placa de las células en gelatina o laminina durante 1-2 días, se consideró que las células eran cultivos primarios (P0).

5 Los cultivos primarios contenían islas de células poligonales pigmentadas, así como algunas células pigmentadas individuales. Después de 3-4 días en cultivo, las células no pigmentadas que parecía que habían perdido la morfología epitelial (más planas y células con lamellipodia) aparecían en la periferia de algunas islas (fig. 2). El número de dichas células periféricas aumentaba con el tiempo, sugiriendo que esas células estaban proliferando, y después de 2 semanas la mayoría de las células en la monocapa recién formada contenían muy poco o no contenían pigmento. Después de cultivo continuado, durante otras 2-3 semanas, las células epiteliales pigmentadas empezaron a reaparecer, indistinguibles visiblemente de las de los cultivos originales (fig. 2).

Ejemplo 3

Detección de marcadores de RPE

15 La caracterización preliminar de estas células humanas diferenciadas como RPE se basa en su similitud con cultivos de RPE previamente descritos; principalmente, su morfología epitelial y posesión de pigmento. Hay tres tipos de células epiteliales pigmentadas en el cuerpo humano: epitelio pigmentado de la retina y el iris y queratinocitos, pero estos últimos no secretan pigmento. La estructura epitelial y la morfología en adoquines no son compartidas por otras células pigmentadas, p. ej., melanocitos. También merece la pena desatacar que se ha mostrado que las células de RPE pierden y vuelven a ganar pigmento y morfología epitelial cuando crecen en cultivo (Zhao 1997, Opas y Dziak, 1994), y las células pigmentadas se comportaban de una forma similar, de modo que para analizar la hipótesis de que las células derivadas de ES pueden ser RPE, se tiñeron con anticuerpos contra marcadores conocidos para el RPE: bestrofina y CRALBP. La figura 4 (panel izquierdo) muestra la localización en la membrana de la bestrofina (A) y CRALBP (C), ambos se encuentran en islas epiteliales pigmentadas. No todas las células se tiñen con estos anticuerpos y la intensidad de la tinción se correlaciona con la expresión de pigmento y la "estrechez" de las colonias, los bordes de cada isla pigmentada donde las células eran más grandes y estaban empaquetadas de forma más suelta mostraban menor expresión de ambas proteínas.

20 Para caracterizar mejor las supuestas células de RPE, se llevó a cabo el análisis de la expresión de bestrofina, CRALBP, por transferencia Western. La figura 4 (panel derecho) muestra las bandas que corresponden a la bestrofina, 68 kD (a), CRALBP, 36 kD (b) en lisados celulares. Todas estas proteínas se encontraron tanto en cultivos primarios como en los pases posteriores.

30 Otro marcador de PRE conocido, RPE65, se encontró en las células similares a RPE por RT-PCR en tiempo real (figura 4, panel derecho, superior), el ensayo ELISA de PEDF mostraba la presencia de PEDF en lisados de células de todos los supuestos cultivos de RPE, y la transferencia Western mostraba una banda de aproximadamente 48 kD (no se muestra).

Detección de marcadores de progenitores neuronales y de la retina en cultivos similares a RPE

35 La figura 4 muestra la localización de PAX-6, Pax2, mitf y tubulina beta III en cultivos recién sometidos a pases y antiguos de RPE derivados de células hES. En los cultivos que proliferaban (día 3 después de tripsinización, no se muestra) donde se pierde la morfología similar a RPE de las células que proliferan, casi cada célula mostraba la presencia de mitf, Pax6, tubulina beta III y nestina (no se muestra). Pax2 se encontró solo en un pequeño subconjunto de células que aparecían negativas para mitf, mientras que había un grado alto de colocalización de Pax6/mitf, mitf/tubulina beta III y Pax6/tubulina beta III. En cultivos quiescentes de 21 días después de restablecerse las islas epiteliales pigmentadas, se encontraron grupos de PAX-6 y mitf en la mayoría de las células no pigmentadas de morfología no epitelial entre las islas epiteliales pigmentadas (figura 4, A-C) y la tubulina beta III tenía un patrón de distribución similar (no se muestra). Sin embargo, había poblaciones de células positivas para mitf y negativas para Pax6, situadas cerca de la periferia de islas pigmentadas (figura 4, A-C). Pax2 se encontró solamente en un subconjunto muy pequeño de células negativas para mitf (figura 4 E-H). No se detectó nunca la presencia de ninguna de estas proteínas en las células de islas epiteliales pigmentadas "maduras". Sin embargo, los marcadores en células que tenían solo algunas de las características del RPE a menudo eran visibles, es decir, parecían epiteliales pero no tenían pigmento, o en algunas células pigmentadas individuales fuera de las islas epiteliales pigmentadas.

50 Ejemplo 4 - Ejemplo de referencia

Caracterización de células similares a RPE derivadas de líneas celulares de hES H9 y ACT J-1 y de células ES Cyno-1 y obtención de células similares a RPE a partir de líneas celulares de hES existentes H1 y H7.

55 Se expande una línea de células similares a RPE, se analiza la congelación y descongelación, y se caracteriza usando los siguientes métodos y marcadores moleculares de células de RPE: bestrofina y CRALBP por transferencia Western e inmunofluorescencia, PEDF por ELISA y transferencia Western, y RPE65 por RT-PCR. Las células se inyectan en ratones SCID con células hES indiferenciadas o Cyno-1 como control para evaluar la tumorigenicidad. El cariotipado de las células similares a RPE lo hará un laboratorio clínico comercialmente. La

caracterización de las propiedades funcionales de células similares a RPE y los estudios de su potencial de trasplante se llevan a cabo después como se ha descrito en otra parte en esta solicitud y usando las técnicas conocidas para el experto en la técnica.

- 5 Los experimentos de perfiles de expresión génica se hacen usando matrices de genoma humano de Affymetrix. La expresión de genes se compara en células similares a RPE derivadas de células ES y en muestras de retina de autopsias. Se pueden usar varios modelos animales para verificar la eficacia de las células similares a RPE trasplantadas, incluyendo, pero no limitado a monos rhesus, rata y conejo.

Ejemplo 5

Optimización del sistema de cultivo de diferenciación asegurando rendimientos altos de células similares a RPE.

- 10 Se cultivan células ES en células nutrientes o como cuerpos embrionarios (EB) en presencia de bFGF, insulina, TGF-beta, IBMX, bmp-2, bmp-4 o sus combinaciones, incluyendo la adición por etapas. Alternativamente, se cultivan células ES en diferentes placas recubiertas con matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno I, colágeno IV, Matrigel, etc.) para evaluar la función de la ECM en la formación de RPE. Se evalúa la expresión de marcadores moleculares de los progenitores de RPE tempranos (Pax6, Pax2, mitf) y de las células de RPE (CRALBP, bestrofina, PEDF, RPE65) en diferentes intervalos de tiempo por RT-PCR en tiempo real, para verificar y determinar las combinaciones satisfactorias de los agentes mencionados antes y el procedimiento por etapas que produce el enriquecimiento en células similares a RPE u otros progenitores. Este planteamiento se puede usar también para producir progenitores comunes de RPE y otros tejidos oculares, tales como fotorreceptores o retina neural, que se pueden aislar y caracterizar más por su diferenciación potencial y usar en estudios de trasplante.

- 20 Ejemplo 6 - Ejemplo de referencia

Obtención de RPE y otros progenitores del tejido ocular a partir de líneas celulares de ES existentes y nuevas

- 25 Usando los datos del perfil de expresión de genes, se correlacionará la expresión de los marcadores de progenitores de RPE con la expresión de las proteínas de superficie con el fin de encontrar una combinación única de marcadores de superficie para las células progenitoras del RPE. Si se encuentran dichos marcadores, se pueden usar anticuerpos contra proteínas de superficie para aislar una población pura de progenitores de RPE que después se pueden cultivar y diferenciar más en cultivo o usar en estudios de trasplante para permitir su diferenciación después de injerto.

- 30 Si los datos de los experimentos de perfiles de expresión de genes son insuficientes, se usará la siguiente estrategia para aislar los progenitores de RPE. Se transfectarán células ES y células similares a RPE con GFP bajo el control de un promotor de Pax6, y se seleccionarán los transfectantes estables. A partir de un cultivo de células ES transfectadas que se diferencian o células de RPE que proliferan (desdiferenciadas), se aislarán células positivas para GFP/Pax6 por FACS y se usarán como una fuente de antígeno para inyección en ratón para producir anticuerpos monoclonales contra las moléculas de superficie de las células positivas para Pax6. Debido a que Pax6 no solo está presente en progenitores de RPE, se hará un cribado (por FACS) usando varias estrategias: a) contra células similares a RPE que proliferan, b) contra células de RPE positivas para Pax2, c) contra células de RPE positivas para mitf. Para b) y c) se transfectarán células con GFP bajo el correspondiente promotor; como un control negativo estos antígenos usarán células de RPE o ES. Después de la expansión de clones positivos seleccionados por las tres estrategias, se ensayarán los anticuerpos contra todos los tipos de células usadas en el cribado y se analizarán más: puesto que esta estrategia puede producir anticuerpos que reconocen antígenos de superficie celular específicos y no específicos para progenitores de RPE, las células de la población total que se diferencia de células ES o de células de RPE seleccionadas con estos anticuerpos, se evaluarán en cuanto a los marcadores moleculares de progenitores de RPE y a su capacidad para producir RPE.

- 45 Usando los procedimientos por etapas definidos optimizados para producir RPE u otros progenitores tempranos de los tejidos oculares y los anticuerpos contra sus marcadores de superficie únicos, se aislarán dichos progenitores de células ES diferenciadas y se cultivarán in vitro. Se investigará su capacidad para diferenciarse en diferentes tejidos oculares usando la estrategia descrita en el objetivo 2.

- 50 Se usarán tres líneas de células ES que ya producían células similares a RPE (H9, ACT J-1, Cyno-1), células similares a RPE para continuar obteniendo células similares a RPE y sus progenitores como se describe en los objetivos 1 y 2, y se usarán líneas de células hES H1 y H7 para producir nuevas líneas de células similares a RPE. Después de expansión y caracterización de los marcadores moleculares de RPE, estas líneas se clonarán individualmente, y las líneas resultantes se caracterizarán como se describe en el objetivo 1. Las células que cumplan los criterios para células de RPE se usarán para estudios de trasplante. Se obtendrán nuevas líneas de células ES humanas de ovocitos donados, estimulados para desarrollarse sin fertilización (partenoto).

- 55 Las células similares a RPE y progenitores oculares comunes se obtendrán de estas líneas usando el planteamiento en el objetivo 2, y las líneas resultantes se caracterizarán como en el objetivo 1. [Opcional] se obtendrán nuevas líneas de células ES humanas en un sistema exento de virus, se caracterizarán y se someterán a ensayos clínicos.

Ejemplo 7

Potencial terapéutico de células similares a RPE y progenitores en diferentes modelos animales de retinitis pigmentaria y degeneración macular.

5 Las células ES de primate se ensayan en macacos cangrejeros (macacos). Inicialmente, se lleva a cabo la cirugía de vitrectomía y se trasplantan las células en el espacio subretiniano de los animales. La primera etapa es el trasplante de las células en el formato de suspensión, después de lo cual se usa un sustrato o matriz para producir un trasplante en monocapa. Esto también se puede llevar a cabo en conejos con inmunosupresión usando células derivadas de células ES humanas y también en varios otros modelos animales de retinitis pigmentaria, que incluyen roedores (ratón rd, ratón con inactivación génica de RPE-65, ratón similar a tubby, rata RCS, gatos (gato abisinio), y perros (perro con degeneración de conos "cd", perro con degeneración de bastones-conos progresiva "prcd", perro con degeneración de la retina temprana "erd", perros con displasia de bastones-conos 1, 2 y 3 "rcd1 rcd2 y rcd3", perros con displasia de fotorreceptores "pd" y "RPE-65" en Briard perro). La evaluación se lleva a cabo usando angiografía fluorescente, histología (haya o no restablecimiento de fotorreceptores y posiblemente ERG. También se llevará a cabo el ensayo funcional que incluye fagocitosis (fragmentos de fotorreceptores), metabolismo de vitamina A, conductividad de las uniones estrechas y microscopía electrónica.

Ejemplo 8 - Ejemplo de referencia Diferenciación directa de células de RPE a partir de células derivadas de embriones humanos.

20 Se cultivan embriones en etapa de blastocito y presencia de fibroblastos de embrión murino o de pollo con o sin inmunocirugía para retirar el trofotodermo o directamente placas en material de cultivo tisular recubierto de proteína de matriz extracelular. En lugar de cultivar y someter a pases las células para producir una línea de células ES humanas, las células se diferencian directamente.

25 Cuando los cultivos de células hEDC se dejan crecer en exceso en MEF en ausencia de LIF, FGF y Plasmanate, formarán una multicapa de células espesa. (Se pueden usar factores de crecimiento, medio y FBS alternativos para variar la diferenciación directa, como conocen los expertos en la técnica). Aproximadamente 6 semanas después, aparecerán islas oscuras de células con agrupaciones más grandes. Estas células oscuras se pueden ver fácilmente a simple vista y parecen "pecas" en una placa de células como se muestra en la figura 5B. Con mayor aumento, estas islas aparecen como células poligonales estrechamente empaquetadas en una monocapa de adoquines, típico de las células epiteliales, con pigmento marrón en el citoplasma (Fig. 5A). Hay diferencias en la cantidad de pigmento en las células, siendo las células en la parte central de las islas las de más pigmento y las que están cerca de los bordes las de menos. (Fig. 5B).

35 Cuando las células hEDC se diferencian directamente pueden formar, aunque típicamente no lo hacen, cuerpos embrionarios (EB). Aparecen células epiteliales pigmentadas en aproximadamente 1-2% de estas células diferenciadas y/o EB en las primeras 6-8 semanas. Con el tiempo más y más EB desarrollan células pigmentadas, y a los 3 meses casi cada EB tiene una región epitelial pigmentada. La morfología de las células en las regiones pigmentadas de los EB era muy similar al de los cultivos adherentes.

Materiales y métodos

40 Medio MEF: DMEM con alto contenido en glucosa, complementado con GlutaMAX I 2 mM, y penicilina 500 ug/ml, estreptomycin 500 ug/ml (todos de Invitrogen) FCS al 16% (HyCLone). Medio de crecimiento de las células hES: DMEM con alto contenido en glucosa con inactivación complementado con penicilina 500 u/ml, estreptomycin 500 ug/ml, disolución de aminoácidos no esenciales al 1%, GlutaMAX I 2 mM,, beta-mercaptoetanol 0,1 mM, bFGF 4 ng/ml (Invitrogen), LIF humano 1 ng/ml (Chemicon, Temecula, CA), 8,4% de reemplazo de suero (SR, Invitrogen) y 8,4% de Plasmanate (Bayer). El medio de derivación contenía los mismos componentes que el medio de crecimiento excepto que tenía menos concentración de SR y Plamanate (4,2% de cada uno) y 8,4% de FCS y concentración 2x de LIF humano y bFGF, en comparación con el medio de crecimiento. Medio de EB: el mismo que el medio de crecimiento excepto bFGF, LIF y Plasmanate; la concentración de SR era 13%. Medio de RPE: 50% de medio de EB y 50% de medio de MEF.

Líneas de células hES

Las líneas celulares, hES 35, 36, 45, usadas para estos estudios se obtuvieron con modificaciones de procedimientos descritos previamente (Thomson et al., 1998, Reubinoff et al., 2000, Lanzendorf et al., 2001).

50 Los experimentos de diferenciación se llevaron a cabo con células hES adherentes o con cuerpos embrionarios (EB). Para la diferenciación adherente, las células hES se dejaron crecer en exceso en MEF hasta que las colonias de hES perdieron sus bordes apretados, momento en el que el medio de cultivo se sustituyó por medio EB (normalmente, 8-10 días después de pase). El medio se cambió cada 1-2 días. Para la formación de EB, se tripsinizaron las células hES y se cultivaron en medio de EB en placas de adherencia baja (Costar).

55 Inmunotinción

Las células se fijaron con paraformaldehído al 2%, se permeabilizaron con NP-40 al 0,1% para la localización de antígenos intracelulares, y se bloquearon con suero de cabra al 10%, suero de burro al 10% (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) en PBS (Invitrogen) durante al menos una hora. La incubación con anticuerpos primarios se llevó a cabo durante la noche a 4°C, se añadieron los anticuerpos secundarios (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante una hora. Entre todas las incubaciones, las muestras se lavaron con Tween-20 al 0,1% (Sigma) en PBS 3-5 veces, 10-15 minutos cada lavado. Las muestras se montaron usando Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se observaron con el microscopio de fluorescencia (Nikon). La localización de la fosfatasa alcalina se hizo bien por Vector Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para células vivas o después del segundo lavado durante la inmunotinción de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Anticuerpos usados, anticuerpo para bestrofina (Novus Biologicals, Littleton, CO), anti-CRALBP fue un regalo del Dr. Saari, University of Washington. Los anticuerpos secundarios eran de Jackson Immunoresearch Laboratories, y la estreptavidina-FITC se adquirió en Amersham.

Aislamiento y pases de células similares a RPE

Cultivos adherentes de células hES o EB se lavaron con PBS dos veces y se incubaron con tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM (Invitrogen) a 37°C hasta que la monocapa se vuelve suelta. Las células de las regiones pigmentadas se rasparon con un capilar de vidrio, se transfirieron a medio MEF, se centrifugaron a 200 x g, y se cultivaron en placas recubiertas con gelatina en medio RPE. El medio se cambió después de que se unieran las células (normalmente en 1-2 días) y cada 5-7 días después de esto; las células se sometieron a pases cada 2-4 semanas con tripsina al 0,05%/EDTA 0,53 mM (Invitrogen).

Transferencia Western y ELISA

Se prepararon muestra en tampón de Laemmli (Laemmli, 1970), complementado con mercaptoetanol al 5% y cóctel de inhibidor de proteasa (Roche), se hirvió durante 5 minutos y se cargaron en un gel de gradiente de 8-16% (Bio-Rad, Hercules, CA) usando un aparato Mini-Protean; los geles se usaron a 25-30 mA por gel; las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa 0,2 (Schleicher y Shull, Keene, NH) a 20 volt durante la noche. Se tiñeron brevemente transferencias con rojo Ponceau (Sigma) para visualizar las bandas, se lavaron con agua Milli-Q, y se bloquearon durante 1 hora con leche en polvo no grasa al 5% en TBST al 0,1% (Bio-Rad). Se añadieron anticuerpos primarios contra bestrofina, CRALBP o PEDF (Chemicon) durante 2 horas seguido de tres lavados de 15 minutos con TBST; se añadieron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa durante 1 hora, y se repitieron los lavados. Se detectaron las transferencias usando el sistema ECL con el reactivo Super-Signal (Pierce). Se llevó a cabo el análisis ELISA de PEDF en los lisados celulares usando el kit de ELISA de PEDF (Chemicon) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

RT-PCR en tiempo real

El ARN total se purificó de los cultivos de ES que se diferenciaban mediante un procedimiento en dos etapas Se aisló el ARN bruto usando el reactivo Trizol (Invitrogen) y se purificó más en minicolumnas RNeasy (Qiagen). Se siguieron los niveles de transcritos de RPE65 por PCR en tiempo real usando un conjunto de cebadores comerciales para la detección de RPE65 (Ensayo a pedido nº Hs00165642_m1, Applied Biosystems) y reactivos de RT-PCR de Quantitect Probe (Qiagen), de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen).

Obtención y caracterización de líneas de células hES indiferenciadas

En estos estudios se usaron líneas de células hES dos de hembra y una de macho. Los detalles de la obtención de estas líneas de hES se describen en otra parte. Todas las líneas se habían sometido a pases más de 50 veces y durante ese tiempo mantienen una morfología de colonia indiferenciada, alta actividad de fosfatasa alcalina y expresan Oct-4, SSEA-3, SSEA- 4, TRA I-60 y TRA I-81 (no se muestran los datos). Dos líneas tienen cariotipo normal (hES36, hES35), aunque había subpoblaciones tanto normales como con aneuploidía en hES45. Tras la diferenciación espontánea tanto in vitro como en teratomas, todas las líneas expresaban los marcadores de las tres capas germinales, actina muscular, alfa-fetoproteína y tubulina beta III.

Ejemplo 9 - Ejemplo de referencia

Uso de transcritos genómicos para identificar células diferenciadas normales diferenciadas ex vivo.

Transcriptómica - es probable que los derivados de células hES tengan una función importante en el futuro de la medicina regenerativa. La valoración cualitativa de estos y otros derivados de citoblastos siguen siendo un desafío que se podría abordar usando genómicas funcionales. Se comparó el perfil transcripcional de hES-RPE frente a su homólogo in vivo, células de RPE fetales, que se han investigado ampliamente por su valor en trasplante. Después ambos perfiles se compararon con los datos de transcriptómica previamente publicados (Rogojina et al., 2003) en líneas celulares de RPE.

El perfil de expresión de genes del conjunto de datos de los autores de la invención se comparó con dos líneas de células de RPE humanas (ARPE-19 no transformadas y D407 transformadas, Rogojina et al., 2003) para determinar si hES-RPE tiene perfiles transcripcionales globales similares. Para explicar los genes de mantenimiento comunes

expresados en todas las células, se usaron los conjuntos de datos de Affymetrix disponibles al público de células hES indiferenciadas (línea H1, h1-hES, --sato et al., 2003) y células epiteliales bronquiales (BE, Wright et al., 2004) como control basado en su origen epitelial común que permitiría excluir genes de mantenimiento y epiteliales comunes e identificar genes específicos de RPE.

- 5 Había similitudes y diferencias entre hES-RPE, hES-RPE-TD, ARPE-19, D407. Las similitudes se demostraron después analizando la intersección exclusiva ente los genes presentes en hES-RPE/ARPE-19 pero no en BE (1026 genes). Para explicar el contexto, se comparó esto con la intersección exclusiva de genes presentes en BE/hES-RPE, pero no en ARPE-19 (186 genes), que daba como resultado una similitud cinco o seis veces mayor en hES-RPE y ARPE-19 cuando se comparaba con BE. D407/ARPE19 parece que pierden genes específicos de RPE tales como RPE65, bestrofina, CRALBP, PEDF, que es típico de células de pases de largo plazo (figura 6). La minería de datos adicional puso de manifiesto ontologías específicas de RPE conocidas, tales como biosíntesis de melanina, visión, unión a retinol, solo en RPE fetal y ES-RPE pero no ARPE19.

- 15 La comparación de hES-RPE, ARPE-19 y D407 con su homólogo in vivo, RPE fetal humano recién aislado (feRPE), estaba de acuerdo con los datos previos, demostrando que la identidad transcripcional de hES-RPE con feRPE humano es significativamente mayor que D407 con feRPE (2,3 veces de diferencia - 849 genes/373 genes) y ARPE-19 con feRPE (1,6 veces de diferencia - 588 genes/364 genes (Figura 5c/5d). Los marcadores específicos de RPE identificados antes, que estaban presentes solo en hES-RPE y no en ARPE-19 o D407 también estaban presentes en feRPE, demostrando una mayor similitud de hES-RPE con su homólogo in vivo que con las líneas de RPE cultivadas.

- 20 Setecientos ochenta y cuatro genes presentes en hES-RPE estaban ausentes en los conjuntos de datos de feRPE y ARPE-19. Puesto que la retención de genes "*stemness*" podría causar potencialmente la transformación de derivados de hES en teratomas malignos si se trasplantaran a pacientes, se crearon datos de potenciales genes "*stemness*" conservativos usando los conjuntos de datos de micromatrices de Affymetrix actualmente disponibles, Abeyta et al. 2004 Sato 2003). Esto dio una lista de 3806 genes presentes en los 12 conjuntos de datos (incluyendo genes de mantenimiento comunes). j Solo 36 de los 784 genes presentes en el conjunto de datos de hES-RPE pero no de feRPE-ARPE-19 eran comunes a los 3806 genes *stemness* potenciales. Ninguno de ellos eran genes *stemness* conocidos tales como Oct4, Sox2, TDGF1.

Ejemplo 10 - Ejemplo de referencia

Uso de células de RPE para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

- 30 El hRPE se puede usar como una fuente alternativa de células para terapia celular de la enfermedad de Parkinson debido a que secretan L-DOPA. Los estudios han mostrado que dichas células unidas a microsoportes recubiertos con gelatina se pueden trasplantar con éxito en monos hemiparkinsonianos y producir mejoras notables (10-50 mil células por objetivo), y en el ensayo aprobado por la FDA iniciado en el 2000, los pacientes recibieron trasplantes intra-cuerpo estriado de hRPE sin efectos adversos. Una de las muchas ventajas del uso de RPE derivado de
- 35 células hES es que evita la escasez de tejido ocular de donante. También facilita el uso de terapia génica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diferenciar citoblastos embrionarios humanos en células de RPE humano, comprendiendo dicho método:
 - a) permitir el sobrecrecimiento de cultivos de citoblastos embrionarios humanos en MEF;
 - 5 b) permitir que los cultivos de citoblastos embrionarios humanos formen una multicapa de células espesa;
 - c) cultivar los citoblastos embrionarios humanos para formar células de RPE pigmentadas; y
 - d) aislar y cultivar las células de RPE pigmentadas del cultivo de la etapa (c) para formar las células de RPE humano.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células de RPE humano comprenden células que son bestrofina+, CRALBP+ y PEDF+.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células de RPE humano son adecuadas para terapia de trasplante.
4. El método de la reivindicación 3, en donde las células de RPE humano adecuadas para terapia de trasplante están en una suspensión.
- 15 5. El método de la reivindicación 3, en donde las células de RPE humano adecuadas para terapia de trasplante están en una matriz.

Figura 1

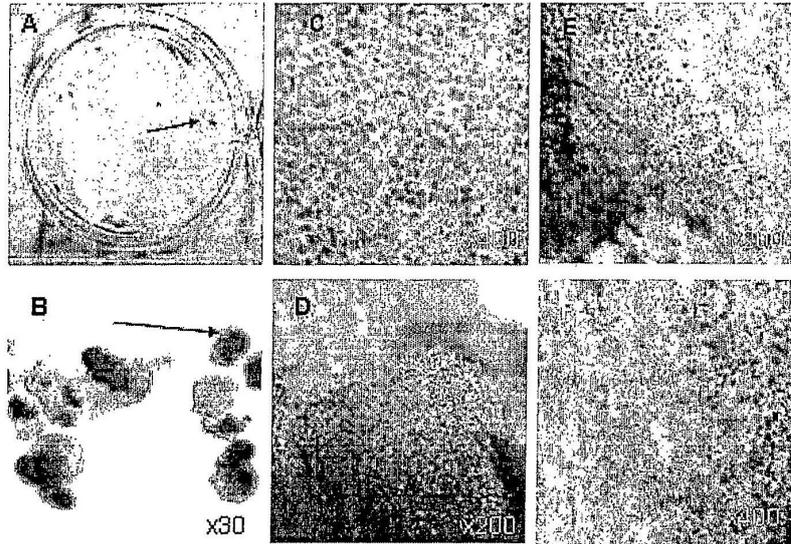


Figura 2

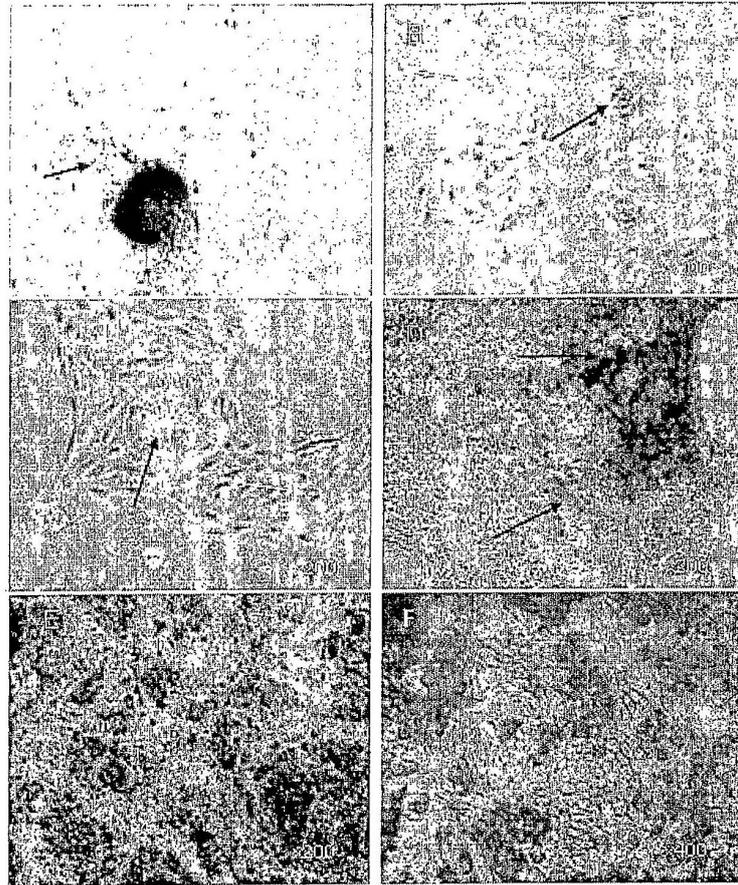


Figura 3

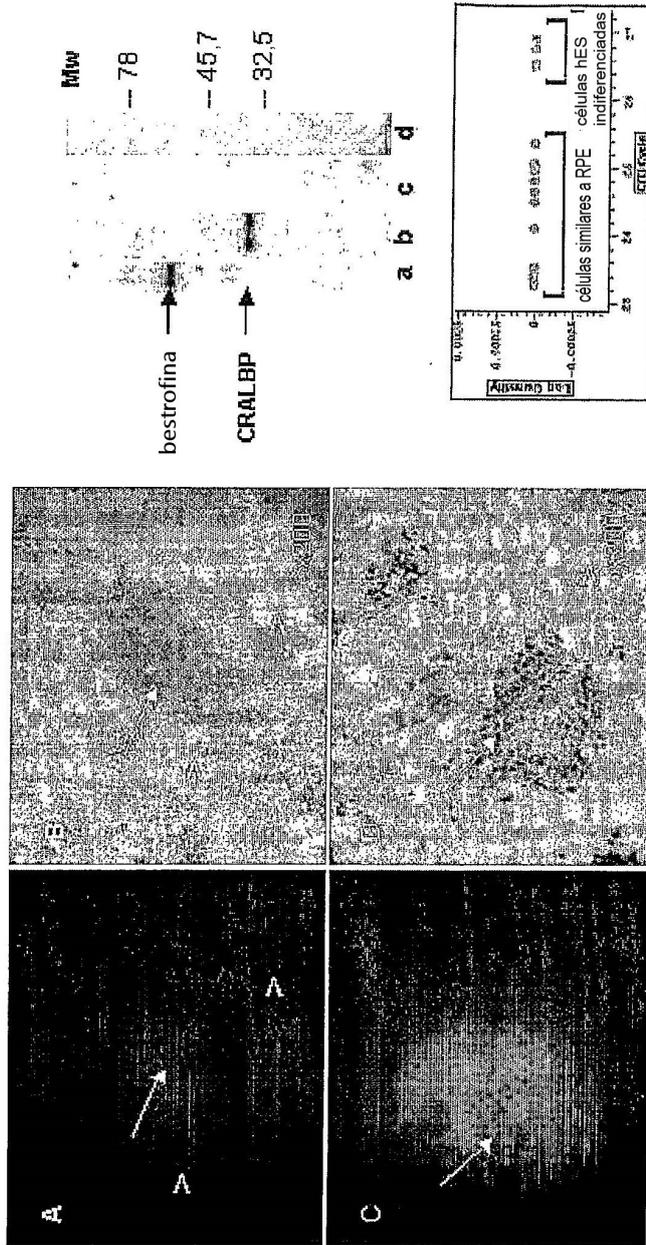


Figura 4

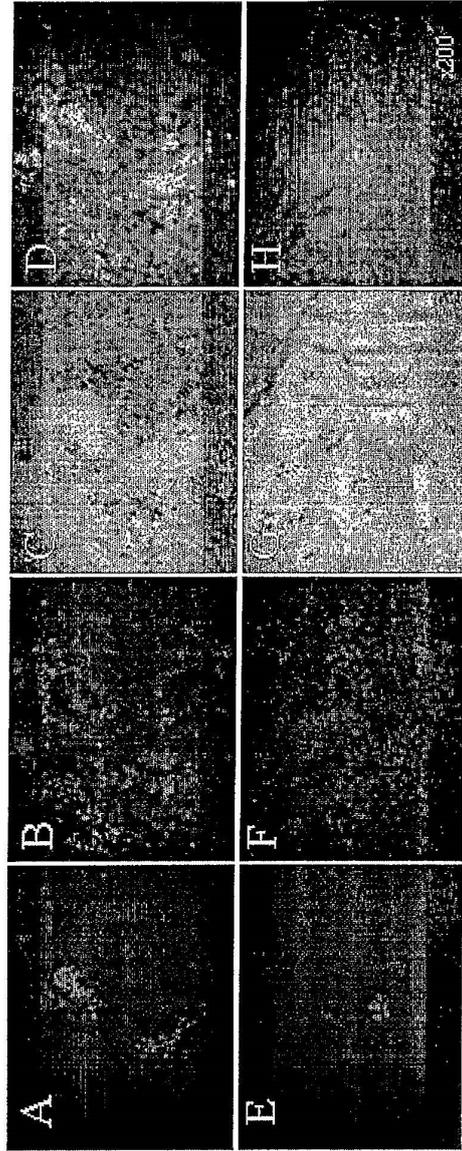


Figura 5

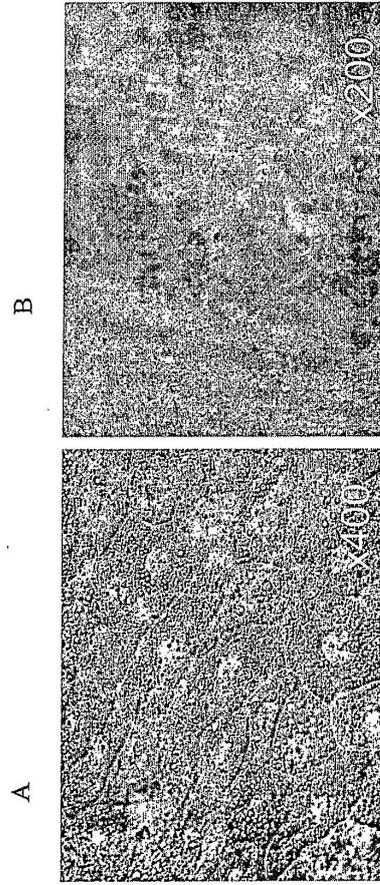


Figura 6A

RPE-embriionario	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
Bestrofina	Bestrofina	-	-	Bestrofina
Catepsina D	Catepsina D	Catepsina D	Catepsina D	Catepsina D
Similar a clusterina 1 (retinal)	Similar a clusterina 1 (retinal)	-	-	-
-	Proteína de unión a ácido retinoico celular 1	-	--	-
Cistatina C	Cistatina C	Cistatina C	Cistatina C	Cistatina C
Proteína de membrana intrínseca de cristalino 2, 19 kDA	Proteína de membrana intrínseca de cristalino 2, 19 kDA	-	-	-
Lectina retinal aciltransferasa (fosfatidilcolina- retinal O-aciltransferasa)	Lectina retinal aciltransferasa (fosfatidilcolina- retinal O-aciltransferasa)	-	-	-
Factor de transcripción asociado a microftalmia	Factor de transcripción asociado a microftalmia	Factor de transcripción asociado a microftalmia	Factor de transcripción asociado a microftalmia	Factor de transcripción asociado a microftalmia
-	NCAM1	-	-	NCAM1
NCAM2	NCAM2	NCAM2	-	-
Gen asociado al desarrollo ocular	Gen asociado al desarrollo ocular	Gen asociado al desarrollo ocular	Gen asociado al desarrollo ocular	Gen asociado al desarrollo ocular
Albinismo oculocutáneo II (homólogo de dilución de ojo rosa, ratón)	Albinismo oculocutáneo II (homólogo de dilución de ojo rosa, ratón)	-	-	-
Opsina 3	Opsina 3	Opsina 3	Opsina 3	Opsina 3
-	-	PAX4	-	-

Figura 6B

RPE-embriionario	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
PAX6	PAX6	PAX6	-	PAX6
PAX8	PAX8	PAX8	PAX8	PAX8
PEDF	PEDF	-	-	PEDF
Similar a fosducina	Fosducina	-	-	-
-	Prominina 1	-	-	-
Receptor acoplado a proteína G de la retina	Receptor acoplado a proteína G de la retina	-	-	-
Proteína de membrana de segmento externo de la retina 1	Proteína de membrana de segmento externo de la retina 1	-	Proteína de membrana de segmento externo de la retina 1	-
-	Homólogo de rodopsina derivado de epitelio pigmentario de la retina	-	-	-
-	-	-	-	Rodopsina
Proteína específica de epitelio pigmentario de la retina 65 kDa	Proteína específica de epitelio pigmentario de la retina 65 kDa	-	-	-
Proteína de unión a retinaldehído 1	Proteína de unión a retinaldehído 1	-	-	-
Retinol deshidrogenasa 5 (11-cis y 9-cis)	Retinol deshidrogenasa 5 (11-cis y 9-cis)	-	-	-
SOX10	SOX10	-	-	-
SOX11	SOX11	-	-	SOX11
SOX12	SOX12	SOX12	SOX12	SOX12
-	-	SOX13	SOX13	-
SOX15	-	-	SOX15	-

Figura 6C

RPE-embriionario	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
SOX17	SOX17	-	SOX17	-
SOX4	SOX4	SOX4	SOX4	SOX4
SOX9	SOX9	SOX9	-	SOX9
Transtiretina	Transtiretina	-	-	-
-	Homólogo de homosecuencia de sistema visual 1, similar a CHX10 (pez cebra)	-	-	Homólogo de homosecuencia de sistema visual 1, similar a CHX10 (pez cebra)
Retriocalbina 1, dominio de unión al calcio mano EF	Retriocalbina 1, dominio de unión al calcio mano EF	Retriocalbina 1, dominio de unión al calcio mano EF	Retriocalbina 1, dominio de unión al calcio mano EF	Retriocalbina 1, dominio de unión al calcio mano EF
Retriocalbina 2, dominio de unión al calcio mano EF	Retriocalbina 2, dominio de unión al calcio mano EF	Retriocalbina 2, dominio de unión al calcio mano EF	Retriocalbina 2, dominio de unión al calcio mano EF	Retriocalbina 2, dominio de unión al calcio mano EF
-	-	Reticulón 1	-	-
Reticulón 2	Reticulón 2	Reticulón 2	Reticulón 2	Reticulón 2
Reticulón 3	Reticulón 3	Reticulón 3	Reticulón 3	Reticulón 3
Reticulón 4	Reticulón 4	Reticulón 4	Reticulón 4	Reticulón 4
Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 2	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 2	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 2	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 2	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 2
Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 3	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 3	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 3	-	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 3

Figura 6D

RPE-embriionario	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 4	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 4	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 4	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 4	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la retina 4
Retinitis pigmentaria 2 (recesiva asociada a X)	Retinitis pigmentaria 2 (recesiva asociada a X)	Retinitis pigmentaria 2 (recesiva asociada a X)	Retinitis pigmentaria 2 (recesiva asociada a X)	Retinitis pigmentaria 2 (recesiva asociada a X)
Regulador de GTPasa Retinitis pigmentaria	Regulador de GTPasa Retinitis pigmentaria	Regulador de GTPasa Retinitis pigmentaria	-	-
-	-	Proteína 1 de interacción regulador de GTPasa Retinitis pigmentaria	GTPasa Retinitis pigmentaria	-
Retinoblastoma 1 (incluyendo osteosarcoma)	Retinoblastoma 1 (incluyendo osteosarcoma)	Retinoblastoma 1 (incluyendo osteosarcoma)	Proteína de interacción con regulador 1	-
-	-	Similar a retinoblastoma 1 (p107)	Retinoblastoma 1 (incluyendo osteosarcoma)	Retinoblastoma 1 (incluyendo osteosarcoma)
Proteína de unión a retinoblastoma 1	Proteína de unión a retinoblastoma 1	Proteína de unión a retinol 1, celular	Similar a retinoblastoma 1 (p107)	-
Proteína de unión a retinoblastoma 1 - similar a 1	Proteína de unión a retinoblastoma 1 - similar a 1	Proteína de unión a retinoblastoma 1 - similar a 1	Proteína de unión a retinoblastoma 1	Proteína de unión a retinol 1, celular
Proteína de unión a retinoblastoma 2	Proteína de unión a retinoblastoma 2	Proteína de unión a retinoblastoma 2	Proteína de unión a retinoblastoma 1 - similar a 1	Proteína de unión a retinoblastoma 1 - similar a 1
Proteína de unión a retinoblastoma 4	Proteína de unión a retinoblastoma 4	Proteína de unión a retinoblastoma 4	Proteína de unión a retinoblastoma 2	Proteína de unión a retinoblastoma 2
Proteína de unión a retinoblastoma 5	-	Proteína de unión a retinoblastoma 5	Proteína de unión a retinoblastoma 4	Proteína de unión a retinoblastoma 4

Figura 6E

RPE-embriionario	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
Proteína de unión a retinoblastoma 6	Proteína de unión a retinoblastoma 6	Proteína de unión a retinoblastoma 6	Proteína de unión a retinoblastoma 5	-
Proteína de unión a retinoblastoma 7	Proteína de unión a retinoblastoma 7	Proteína de unión a retinoblastoma 7	Proteína de unión a retinoblastoma 6	Proteína de unión a retinoblastoma 6
Proteína de unión a retinoblastoma 8	Proteína de unión a retinoblastoma 8	Proteína de unión a retinoblastoma 8	Proteína de unión a retinoblastoma 7	Proteína de unión a retinoblastoma 7
-	Proteína de unión a retinoblastoma 9	-	Proteína de unión a retinoblastoma 8	Proteína de unión a retinoblastoma 8
Factor asociado a retinoblastoma 600	Factor asociado a retinoblastoma 600	Factor asociado a retinoblastoma 600	-	Proteína de unión a retinoblastoma 9
Proteína asociada a retinoblastoma 140	Proteína asociada a retinoblastoma 140	Proteína asociada a retinoblastoma 140	Factor asociado a retinoblastoma 600	Factor asociado a retinoblastoma 600
Similar a retinoblastoma 2 (p130)	Similar a retinoblastoma 2 (p130)	Similar a retinoblastoma 2 (p130)	Proteína asociada a retinoblastoma 140	Proteína asociada a retinoblastoma 140
-	-	Proteína inducible por ácido retinoico e interferón (58 kd)	Similar a retinoblastoma 2 (p130)	Similar a retinoblastoma 2 (p130)
-	Ácido retinoico inducido por 1	-	Proteína inducible por ácido retinoico e interferón (58 kd)	-
-	-	Ácido retinoico inducido por 3	-	Ácido retinoico inducido por 1
Ácido retinoico inducido por 14	Ácido retinoico inducido por 14	Ácido retinoico inducido por 14	Ácido retinoico inducido por 3	Ácido retinoico inducido por 3
Ácido retinoico inducido por 16	Ácido retinoico inducido por 16	Ácido retinoico inducido por 16	Ácido retinoico inducido por 14	Ácido retinoico inducido por 14
Ácido retinoico inducido por 17	Ácido retinoico inducido por 17	Ácido retinoico inducido por 17	Ácido retinoico inducido por 16	Ácido retinoico inducido por 16

Figura 6F

RPE-embrionario	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
-	Ácido retinoico inducido por 2	-	Ácido retinoico inducido por 17	Ácido retinoico inducido por 17
Respondedor de receptor de ácido retinoico (inducido por tazaroteno) 2				
-	Respondedor de receptor de ácido retinoico (inducido por tazaroteno) 3	Respondedor de receptor de ácido retinoico (inducido por tazaroteno) 3	Respondedor de receptor de ácido retinoico (inducido por tazaroteno) 3	-
Receptor de ácido retinoico, beta	Receptor de ácido retinoico, beta	-	Receptor de ácido retinoico, alfa	Receptor de ácido retinoico, alfa
-	Receptor de ácido retinoico, alfa	-	Receptor de ácido retinoico, beta	Receptor de ácido retinoico, beta
Proteína reprimible por ácido retinoico	Proteína reprimible por ácido retinoico			
Receptor X retinoide, alfa	Receptor X retinoide, alfa			
Receptor X retinoide, beta	Receptor X retinoide, beta			
Proteína de unión a retinol 1, celular	Proteína de unión a retinol 1, celular	-	-	Proteína de unión a retinol 1, celular
Retinol deshidrogenasa 11 (todo trans y 9-cis)	Retinol deshidrogenasa 11 (todo trans y 9-cis)			
Retinol deshidrogenasa 14 (todo trans y 9-cis)	Retinol deshidrogenasa 14 (todo trans y 9-cis)			
				Retinosquisis (juvenil ligada a X) 1

Figura 6G

Biosíntesis de melanina	Retinitis pigmentaria	Visión	Unión a retinol
Dopacromo tautomerasa (dopacromo delta-isomerasa, proteína relacionada con tirosina 2)	Proteína de membrana de segmento exterior de la retina 1	Proteína de membrana de segmento exterior de la retina 1	Proteína de membrana de segmento exterior de la retina 1
Dopacromo tautomerasa (dopacromo delta-isomerasa, proteína relacionada con tirosina 2)	Tirosina quinasa c-mer protooncogénica	Tirosina quinasa c-mer protooncogénica	Transtiretina (prealbúmina, amiloidosis tipo I)
Tirosinasa (albinismo oculocutáneo IA)	Proteína de unión a retinaldehído 1	Proteína de unión a retinaldehído 1	
Homólogo de plata (ratón)	Receptor acoplado a proteína G de la retina	Receptor acoplado a proteína G de la retina	
Transportador asociado a membrana	Proteína específica de epitelio pigmentario de la retina 65k Da	Proteína específica de epitelio pigmentario de la retina 65k Da	
Transportador asociado a membrana		Distrofia macular viteliforme (enfermedad de Best, bestrofina)	
		Retinol deshidrogenasa 5 (11-cis y 9-cis)	
		Transportador asociado a membrana	