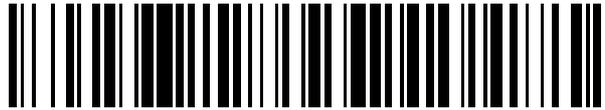


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 453**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 35/44 | (2015.01) |
| A61K 35/50 | (2015.01) |
| A61K 35/12 | (2015.01) |
| A61P 27/02 | (2006.01) |
| C12N 5/095 | (2010.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2012 PCT/US2012/065091**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13074681**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2012 E 12848968 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2780022**

54 Título: **Preparaciones farmacéuticas de células EPR humanas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

14.11.2011 US 201161559521 P
23.01.2012 US 201261589741 P
08.11.2012 US 201261724047 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GAY, ROGER;
 KLIMANSKAYA, IRINA y
 LANZA, ROBERT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 734 453 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

Preparaciones farmacéuticas de células EPR humanas y usos de las mismas

Antecedentes

5 Las células madre embrionarias humanas (hESCs) son consideradas una fuente prometedora de células de reemplazo para la medicina regenerativa (1). A pesar del enorme progreso científico, las hESCs están entre las entidades terapéuticas biológicas más complejas propuestas para uso clínico hasta la fecha (2). Además de la complejidad dinámica de su biología, numerosas preocupaciones reguladoras han dificultado su trasvase clínico, incluyendo el riesgo de formación de teratoma y los desafíos asociados a la histoincompatibilidad. Hasta que las tecnologías de reprogramación celular, tal como la transferencia nuclear celular somática (3) o las células madre pluripotentes inducidas (4, 5), se desarrollen más, es probable que las enfermedades que afectan al ojo y otras zonas inmunoprivilegiadas sean las primeras terapias basadas en células madre pluripotentes en pacientes. Está bien establecido que el espacio subretinal está protegido por una barrera hemato-ocular, y se caracteriza por la inhibición específica de antígeno de respuestas inmunes celulares y humorales (6).

15 En la retina, la degeneración de epitelio pigmentario de la retina (EPR) conduce a la pérdida de fotorreceptor en una variedad de enfermedades que amenazan la visión, que incluyen la degeneración macular seca relacionada con la edad (AMD) y la distrofia macular de Stargardt (SMD), dos de las causas principales de ceguera en adultos y juvenil en el mundo, respectivamente. Aunque actualmente ninguna de las dos es tratable, existe evidencia en modelos preclínicos de degeneración macular de que el trasplante de EPR derivado de hESC pueden rescatar fotorreceptores y prevenir la pérdida visual (7, 8). Entre sus funciones, el EPR mantiene la salud de los fotorreceptores reciclando fotopigmentos, administrando, metabolizando y almacenando vitamina A, fagocitando segmentos exteriores de fotorreceptor, transportando hierro y moléculas pequeñas entre la retina y el coroides, y absorbiendo luz extraviada para permitir una mejor resolución de imagen (9, 10). En la rata del "Royal College of Surgeons" (RCS), un modelo animal en el que la visión se deteriora debido a disfunción de EPR, el trasplante subretinal de EPR derivado hESC dio como resultado un rescate extensivo de fotorreceptores y una mejora de las prestaciones visuales (del 100% sobre los controles no tratados) sin evidencias de patologías indebidas (7).

30 El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es la capa celular pigmentada exterior de la retina neurosensora entre el coroides subyacente (la capa de vasos sanguíneos detrás de la retina) y las células visuales retinales superpuestas (p.ej., fotorreceptores – varillas y conos). El EPR es crítico para la función y la salud de los fotorreceptores y de la retina. El EPR mantiene la función fotorreceptora a través del reciclado de fotopigmentos, administrando, metabolizando y almacenando vitamina A, fagocitando segmentos externos de fotorreceptor de varilla, transportando hierro y moléculas pequeñas entre la retina y el coroides, manteniendo la membrana de Bruch y absorbiendo luz extraviada para permitir una mejor resolución de imagen. Engelmann y Valtink (2004) "RPE Cell Cultivation". *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 242(1): 65-67; véase también Irina Klimanskaya, *Retinal Pigment Epithelium Derived From Embryonic Stem Cells*, en STEM CELL ANTHOLOGY 335-346 (Bruce Carlson ed., 2009).
35 La degeneración de EPR puede producir desprendimiento de retina, displasia retinal o atrofia retinal asociada a una serie de dolencias de alteración de la visión que dan como resultado daños en los fotorreceptores y ceguera, tal como coroideremia, retinopatía diabética, degeneración macular (que incluye degeneración macular relacionada con la edad), retinitis pigmentosa, y Enfermedad de Stargardt (fundus flavimaculatus). Véase, p.ej., el documento WO 2009/051671.

40 Parte de la materia objeto, que incluye los métodos de preparación de células EPR, las composiciones de células EPR, y los usos de las mismas, se describe en solicitudes de patente de EE.UU. en co-titularidad y en patentes de EE.UU. que incluyen la solicitud de EE.UU. n° serie 11/186720, presentada el 20-jul-2005, ahora Patente de EE.UU. n° 7736896; la solicitud de EE.UU. n° serie 11/490953, presentada el 21-jul-2006, ahora Patente de EE.UU. n° 7795025; la solicitud de EE.UU. n° serie 11/041382, presentada el 24-ene-2005, ahora Patente de EE.UU. n° 7794704; la solicitud provisional de EE.UU. n° 60/538964, presentada el 23-ene-2004; la solicitud de EE.UU. n° serie 12/682.712, presentada el 10-oct-2010; la solicitud provisional de EE.UU. n° 60/998668, presentada el 12-oct-2007; la solicitud provisional de EE.UU. n° 60/998766, presentada el 12-oct-2007; la solicitud provisional de EE.UU. n° 61/009908, presentada el 02-ene-2008; la solicitud provisional de EE.UU. n° 61/009911, presentada el 02-ene-2008; la solicitud provisional de EE.UU. n° 61/367038, presentada el 23-jul-2010; la solicitud provisional de EE.UU. n° 61/414770, presentada el 17-nov-2010; la solicitud de patente internacional n° PCT/US11/45232, presentada el 25-jul-2011; la solicitud de EE.UU. n° serie 12/682712, presentada el 14-dic-2010; la solicitud de patente internacional n° PCT/US05/02273, presentada el 24-ene-2005; la solicitud de patente internacional n° PCT/US2010/57056 presentada el 17 de noviembre de 2010 (publicada como WO 2011/063005); y la solicitud de patente provisional de EE.UU. no 61/262.002, presentada el 17 de noviembre, 2009.

55 Aunque el trasplante de láminas y suspensiones intactas de células EPR primario se ha intentado previamente en sujetos humanos, los resultados han sido variados, tanto en términos de supervivencia del injerto y de mejora visual (11-19). Hasta la fecha, no se ha publicado una terapia humana consistentemente efectiva que emplee células EPR primarias.

Sumario

La presente invención queda definida por las reivindicaciones. Esta descripción presenta datos clínicos de fase 1/2 que ayudan a demostrar la seguridad de células de epitelio pigmentario de la retina (EPR) derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC) para el tratamiento de la distrofia macular de Stargardt (SMD) y la degeneración macular seca relacionada con la edad (AMD seca). Se presentan resultados correspondientes a dos pacientes, el primero en cada uno de los ensayos clínicos de fase 1/2. Además de no mostrar problemas de seguridad adversos, la evidencia estructural confirmó que las células derivadas de hESC sobrevivieron y continuaron persistiendo durante el periodo de estudio reportado. Ambos pacientes presentaron mejoría medible en su visión, que persistió durante al menos un año.

Un año después del tratamiento, no se observó hiperproliferación, tumorigenicidad, formación de tejido ectópico o rechazo aparente en ningún paciente en ningún momento. Se llevaron a cabo ensayos diagnósticos clínicos y de laboratorio detallados en múltiples evaluaciones post-trasplante. Un crecimiento anormal (o formación de tumor) sería considerado una preocupación de seguridad significativa para las terapias basadas en células madre, en particular aquellas derivadas de hESCs debido a su pluripotencia; por lo tanto es crítico controlar la diferenciación de hESCs. Los resultados publicados indican que la diferenciación de células madre estuvo bien controlada en dichos pacientes. No se detectaron señales de seguridad adversas.

Una evidencia anatómica de trasplante de EPR derivado de células madre con éxito fue observada clínicamente y con tecnología de imagen de alta resolución en el paciente con SMD. Dicha evidencia incluyó un aumento de la pigmentación a nivel de EPR, dentro del área del trasplante, comenzando una semana después del trasplante y durante el periodo de seguimiento. El EPR derivado de células madre trasplantado pareció injertarse en la localización apropiada y asumir la morfología de EPR normal. El injerto y el aumento de pigmentación no fueron detectados en el paciente de AMD seca. Sin embargo, ambos pacientes demostraron algún grado de mejoría visual al cuarto mes del periodo de seguimiento, que persistió al menos hasta el primer año de periodo de seguimiento.

Como se describe más detalladamente más adelante, la agudeza visual del paciente de Stargardt mejoró para movimientos de manos solo a visión 20/800. Antes del tratamiento, el paciente era incapaz de leer ninguna letra de la ficha de agudeza visual ETDRS. Sin embargo, a las dos semanas del trasplante, ella era capaz de comenzar a leer letras, lo cual mejoró hasta cinco letras entre uno y tres meses y a 15 letras al año en el ojo tratado (visión 20/500).

Aunque se dispone de varios fármacos nuevos para el tratamiento del tipo húmedo de AMD, actualmente no existen tratamientos probados para la AMD seca o para la enfermedad de Stargardt. A pesar de la naturaleza progresiva de estas afecciones, la visión de ambos pacientes parece haber mejorado tras el trasplante de las células, incluso a la dosis más baja. Los solicitantes esperan una mejoría incluso más significativa cuando se trate pacientes en un estadio más temprano de la enfermedad, en los que potencialmente se pueden esperar resultados más significativos. Un incremento de la dosis de células también puede conducir a una mejoría más significativa.

Las células madre embrionarias humanas pueden proporcionar una fuente superior de tejido de reemplazo produciendo un número ilimitado de células "jóvenes" sanas con inmunogenicidad potencialmente reducida. El ojo es una zona inmuno-privilegiada debido a la protección del espacio subretinal por una barrera hemato-ocular, y como resultado solo se usaron dosis bajas o transitorias de inmunosupresión. No se observaron signos de rechazo o de inflamación en ningún paciente, y los doctores continúan monitorizando a ambos pacientes.

Los resultados presentados en la presente memoria subestiman el potencial de las terapias con células madre y de la medicina regenerativa para llevar a cabo la posibilidad de reparar o reemplazar tejidos dañados por una enfermedad.

Las células EPR derivado de hESC se vieron sometidas a estudios extensivos de seguridad antes del trasplante. Se confirmó que las células no tenían patógenos animales y humanos, y se llevó a cabo un ensayo de alta sensibilidad para descartar la presencia de cualesquier hESCs no diferenciadas en el producto final, un factor de riesgo para la formación de tumores. La diferencia de hESC controlada dio lugar a casi un 100 por ciento de EPR puro. Una característica fundamental de las hESCs es que se puede controlar el estadio de la diferenciación *in vitro* para maximizar la supervivencia y la funcionalidad. Los datos de la presente memoria muestran que el grado de madurez y pigmentación del EPR pueden afectar drásticamente al injerto y crecimiento posteriores de las células tras el trasplante.

Ambos ensayos son estudios prospectivos de etiqueta abierta diseñados para determinar la seguridad y la tolerancia de células EPR derivadas de hESC tras un trasplante sub-retinal en pacientes con SMD y AMD seca a los 12 meses, el objetivo principal de los estudios. Cada ensayo reclutará 12 pacientes, con cohortes de tres pacientes cada una en un formato de dosis ascendente. Tanto el paciente de SMD como el de AMD seca recibieron el trasplante subretinal en la dosis más baja (50.000 células) de células EPR completamente diferenciadas derivadas de hESCs.

En un aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende: una pluralidad de células de epitelio pigmentario de la retina (EPR); y un vehículo farmacéuticamente aceptable; en donde el contenido medio de melanina de dicha pluralidad de células EPR es inferior a 8 pg/célula. Dichas células EPR pueden estar contenidas en una suspensión, gel, coloide, matriz, sustrato, estructura, o injerto.

5 Dicho vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender una disolución estéril que tenga una osmolaridad de entre aproximadamente 290 mOsm/kg y aproximadamente 320 mOsm/kg, o entre aproximadamente 300 mOsm/kg y 310 mOsm/kg o aproximadamente 305 mOsm/kg. Dicho vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender una disolución salina equilibrada. Dicha disolución salina equilibrada puede comprender, constar, o constar esencialmente de, en cada mL, 7,14 mg de cloruro sódico, 0,38 mg de cloruro potásico, 0,154 mg de dihidrato de cloruro cálcico, 0,2 mg de hexahidrato de cloruro magnésico, 0,42 mg de fosfato sódico dibásico, 2,1 mg de bicarbonato sódico, 0,92 mg de dextrosa, 0,184 mg de disulfuro de glutatona (glutatona oxidada), y ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico (para ajustar el pH a aproximadamente 7,4) en agua.

10 El volumen de dicha composición farmacéutica puede estar entre aproximadamente 100 μL y 1000 μL o puede ser al menos de 150 μL . Dicha composición farmacéutica puede comprender entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 1×10^9 células EPR viables. Dicha composición farmacéutica puede comprender entre aproximadamente 333 células EPR viables/ μL y aproximadamente 2.000 células de ERP viables/ μL , entre aproximadamente 444 células EPR viables/ μL y aproximadamente 1766 células de ERP viables/ μL , aproximadamente 333 células de ERP viables/ μL , aproximadamente 444 células de ERP viables/ μL , aproximadamente 666 células de ERP viables/ μL , aproximadamente 888 células de ERP viables/ μL , aproximadamente 999 células de ERP viables/ μL , o aproximadamente 1333 células de ERP viables/ μL .

20 La concentración de células de ERP en dicha composición farmacéutica puede ser suficientemente elevada para que no más de aproximadamente el 30% de dichas células EPR pierdan la viabilidad en 60 minutos, y opcionalmente para que no más de aproximadamente el 10% de dichas células EPR pierdan la viabilidad en 4 horas. Dicha concentración de células EPR puede ser al menos de aproximadamente 1.000 células/ μL , al menos de aproximadamente 2.000 células/ μL , entre aproximadamente 1.000-10.000 células/ μL , o entre aproximadamente 2.000-5.000 células/ μL .

La preparación farmacéutica puede comprender menos de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01%, 0,001% o 0,0001% de células que pueden no ser células EPR.

25 El contenido medio de melanina de dichas células EPR puede ser inferior a 8 pg/célula, inferior a 7 pg/célula, inferior a 6 pg/célula, inferior a 5 pg/célula, inferior a 4 pg/célula, inferior a 3 pg/célula, inferior a 2 pg/célula y al menos 0,1 pg/célula y opcionalmente al menos 0,5 pg/célula o 1 pg/célula; entre 0,1-8 pg/célula, entre 0,1-7 pg/célula, entre 0,1-6 pg/célula, entre 0,1-5 pg/célula, entre 0,1-4 pg/célula, entre 0,1-3 pg/célula, entre 0,1-2 pg/célula, entre 0,1-1 pg/célula, entre 1-7 pg/célula, entre 0,5-6 pg/célula, o entre 1-5 pg/célula.

30 Al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, o al menos el 80% de las células en dicha composición farmacéutica pueden ser bestrofina+. Al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% de las células en dicha composición farmacéutica pueden ser PAX6+ y/o MITF+. Al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% de las células de dicha composición farmacéutica pueden ser PAX6+ y/o bestrofina+. Al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% de las células en dicha composición farmacéutica pueden ser ZO-1+. Al menos el 50%, al menos el 60%, o al menos el 70% de las células de la composición farmacéutica pueden ser PAX6+ y bestrofina+. Al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% de las células en dicha composición farmacéutica pueden ser PAX6+.

En un ejemplo de realización, no más de aproximadamente una célula por millón de células y opcionalmente no más de dos células por millón de células en dicha composición farmacéutica pueden ser positivas para la expresión tanto de OCT-4 como de alcalina fosfatasa (AP).

40 Una aguja o una cánula de inyección pueden contener al menos una porción de dichas células EPR. La concentración de dichas células EPR tras cargarlas en dicha aguja o cánula de inyección puede estar entre aproximadamente 444 células viables/ μL y aproximadamente 1,766 células viables/ μL . La concentración de células viables de EPR a administrar desde dicha aguja o cánula de inyección puede estar entre aproximadamente 333 células viables/ μL y aproximadamente 1.333 células viables/ μL . El diámetro de dicha aguja o cánula de inyección puede estar entre aproximadamente 0,3 mm y aproximadamente 0,9. El diámetro de dicha aguja o cánula de inyección puede estar entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,6 mm. Dicha aguja o cánula de inyección puede comprender una punta que tenga un diámetro de entre aproximadamente 0,09 mm y aproximadamente 0,15 mm. Dicha cánula puede ser una cánula MEDONE POLYTIP® 25/38g (una cánula de 0,50 mm (25g) x 28 mm con punta de 0,12 mm (38g) x 5 mm) o una cánula de inyección Synergetics Angled 39g.

50 Dichas células EPR pueden comprender células EPR que han sido criopreservadas y descongeladas.

Dichas células EPR pueden ser humanas.

55 La composición farmacéutica puede comprender además al menos un inhibidor de angiogénesis que puede administrarse a un sujeto que lo necesite antes de, concurrentemente, posteriormente y/o con dichas células EPR. Los ejemplos de inhibidores de angiogénesis pueden seleccionarse del grupo que consiste en: pegaptanib sódico; aflibercept; bevasiranib; rapamicina; AGN-745; vitalanib; pazopanib; NT-502; NT-503; PLG101; CPD791; anticuerpos anti-VEGF o fragmentos funcionales de los mismos; bevacizumab; ranibizumad; anticuerpos anti-VEGFR1; anticuerpos anti-VEGFR2; anticuerpos anti-VEGFR3; IMC-1121(B); IMC-18F1; fragmentos o dominios de VEGF;

fragmentos o dominios de un receptor VEGFR; trampa de VEGF (Aflibercept); AZD-2171 (Cediranib); inhibidores de tirosina quinasa (TKIs); TKIs que inhiben VEGFR-1 y/o VEGFR-2; sorafenib (Nexavar); SU5416 (Semaxinib); SU11248/Sunitinib (Sutent); Vandetanib (ZD 6474); Ly317615 (Enzastaurina); anticuerpos anti-alfa5beta1 integrina o fragmentos funcionales de los mismos; volociximab; ácido 3-(2-{1-alkil-5-[(piridina-2-ilamino)-metil]-pirrolidin-3-iloxi}-acetilamino)-2-(alkil-amino)-propiónico; ácido (S)-2-[(2,4,6-trimetilfenil)sulfonyl]amino-3-[7-benciloxicarbonil-8-(2-piridinilaminometil)-1-oxa-2,7-diazaspiro-(4,4)-non-2-en-3-il]carbonilamino propiónico; EMD478761; o RC*D(TioP)C* (Arg-Cys-Asp-Tioprolina-Cys (los asteriscos denotan ciclación con un puente disulfuro a través de los residuos de cisteína); 2-metoxiestradiol; inhibidores de alfaVbeta3; angiopoyetina 2; esteroides angiostáticos y heparina; angiostatina; moléculas relacionadas con la angiostatina; anticuerpos anti-catepsina S; fragmento antitrombina III; calreticulina; canstatina; carboxiamidotriazol; Factor inhibidor de angiogénesis derivado de cartílago; CDAI; CM101; CXCL10; endostatina; IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ ; IL-12; IL-18; IL-4; linomida; maspina; inhibidores de matriz de metaloproteinasas; Meth-1; Meth-2; osteopontina; pegaptanib; factor plaquetario 4; prolactina; proteína relacionada con proliferina; protrombina (dominio kringle 2); restina; NRP-1 soluble; VEGFR-1 soluble; SPARC; SU5416; suramina; tecogalan; tetratiomolibdato; talidomida; lenalidomida; trombospondina; TIMP; TNP-470; TSP-1; TSP-2; vasostatina; antagonistas de VEGFR; VEGI; Volociximab (M200); un fragmento o dominio de fibronectina; anastelina; Lenvatinib (E7080); Motesanib (AMG 706); Pazopanib (Votrient); inhibidores de VEGF; inhibidores de VEGFR1; inhibidores de VEGFR2; inhibidores de VEGFR2; inhibidores de alfa5beta1 integrina; inhibidores de péptido; peptidomimético, molécula pequeña, químico, y/o ácido nucleico de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 y/o alfa5beta1 integrina; un antagonista de IL-6; un anticuerpo anti-IL-6; y cualquier combinación de los mismos; opcionalmente en una cantidad suficiente para prevenir o tratar enfermedades oculares proliferativas (neovasculares).

Dichas células EPR pueden ser modificadas genéticamente. Por ejemplo, dichas células EPR pueden ser producidas a partir de una célula pluripotente que está modificada genéticamente. Dicha modificación genética puede dar como resultado la producción por dichas células EPR de uno o más factores que inhiben la angiogénesis. Los ejemplos de factores que inhiben la angiogénesis incluyen al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento o dominio de fibronectina; anastelina; un anticuerpo específico anti-VEGF o un fragmento o dominio funcional del mismo; un anticuerpo de receptor específico anti-VEGF o un fragmento o dominio funcional del mismo; un anticuerpo específico anti-alfa5beta1 integrina o un fragmento o dominio funcional del mismo; fragmentos o dominios de VEGF; fragmentos o dominios de un receptor VEGFR; trampa de VEGF; y cualquier combinación de los mismos.

La producción de dicho factor que inhibe la angiogénesis puede ser regulada mediante un promotor específico de EPR. Dicho promotor específico de EPR puede ser seleccionado del grupo que consiste en: promotor de RPE65, promotor de catepsina D proximal; y el promotor de VMD2.

Dichas células EPR pueden producirse a partir de una célula pluripotente. Dicha célula madre pluripotente puede ser positiva para expresión de uno o más marcadores que pueden comprender OCT-4, fosfatasa alcalina, Sox2, TDGF-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y/o TRA-1-80. Dichas células pluripotentes pueden ser células pluripotentes humanas que pueden cultivarse en una población multicapa o cuerpo embrioide durante un tiempo suficiente para que aparezcan en dicho cultivo células epiteliales pigmentadas. Dicho tiempo suficiente para que aparezcan en dicho cultivo células epiteliales pigmentadas puede comprender al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 3 semanas, al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, o al menos aproximadamente 7 semanas, al menos aproximadamente 8 semanas. Dicha población multicapa de cuerpo embrioide puede cultivarse en un medio que puede comprender DMEM. Dicho medio puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en EB-DM. Dichas células epiteliales pigmentadas pueden aislarse y cultivarse, produciendo de este modo una población de células EPR. Dicho aislamiento puede comprender disociar células o grupos de células del cultivo enzimáticamente, químicamente o físicamente, y seleccionar las células epiteliales pigmentadas o los grupos de células que pueden comprender células epiteliales pigmentadas. Dicho cuerpo embrioide puede cultivarse en suspensión y/o como un cultivo adherente (p.ej., en suspensión seguido de cultivo adherente). Dicho cuerpo embrioide cultivado como un cultivo adherente puede producir uno o más sobre-crecimientos que comprenden células epiteliales pigmentadas. Dichas células madre pluripotentes presentan una complejidad de antígeno de HLA reducida. Antes de la formación de EPR, dichas células pluripotentes pueden cultivarse en una matriz que puede seleccionarse del grupo que consiste en laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, sulfato de heparan, Matrigel(TM) (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)), CellStart, un extracto de membrana de base humana, y cualquier combinación de los mismos. Dicha matriz puede comprender Matrigel(TM) (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)).

La composición farmacéutica que puede comprender células que carecen de expresión sustancial de uno o más marcadores de células madre embrionarias. Dicho uno o más marcadores de células madre embrionarias pueden comprender OCT-4, NANOG, Rex-1, fosfatasa alcalina, Sox2, TDGF-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y/o TRA-1-80.

Dichas células EPR pueden ser positivas para la expresión de uno o más marcadores de células EPR. Dicho uno o más marcadores de células EPR pueden comprender RPE65, CRALBP, PEDF, Bestrofina, MITF, Otx2, PAX2, PAX6, ZO-1, y/o tirosinasa.

Dichas células EPR pueden producirse mediante un método que comprende mantener las células EPR como células quiescentes durante un tiempo suficiente para alcanzar dicho contenido medio de melanina. Dichas células EPR pueden producirse mediante un método que comprende mantener las células EPR como células quiescentes durante un tiempo suficiente para establecer la expresión de bestrofina en al menos un 50% de dichas células EPR.

5 Dicha composición farmacéutica puede estar sustancialmente libre de células cebadoras embrionarias de ratón (MEF) y de células madre embrionarias humanas (hES).

10 Dicho EPR puede producirse mediante un método que comprende cultivar dichas células EPR en las condiciones que aumenten la expresión de una o más subunidades de integrina alfa, p.ej., subunidad 1 de integrina alfa, subunidad 2 de integrina alfa, subunidad 3 de integrina alfa, subunidad 4 de integrina alfa, subunidad 5 de integrina alfa, subunidad 6 de integrina alfa, o subunidad 9 de integrina alfa. Dichas condiciones pueden comprender la exposición a manganeso, la exposición a anticuerpo anti-CD29, la exposición a anticuerpo monoclonal HUTS-21, la exposición a anticuerpo monoclonal mAb TS2/16, y/o el pasaje de dichas células EPR durante al menos aproximadamente 4 pasajes.

15 Las células EPR cumplen al menos uno de los criterios incluidos en la Tabla 5 y/o se fabrican de acuerdo a la guía de "Buenas Prácticas de Fabricación" (GMP, del inglés "Good Manufacturing Practices").

20 La composición farmacéutica puede comprender además al menos un agente inmunosupresor o inmuno tolerizante que puede administrarse a un sujeto que lo necesite antes, concurrentemente, posteriormente y/o con dichas células EPR. Dicho agente inmunosupresor o inmuno tolerizante puede comprender uno o más de: células madre mesenquimales, anticuerpo policlonal anti-linfocito globulina (ALG), anticuerpo policlonal anti-timocito globulina (ATG), azatioprina, BASILIXIMAB® (anticuerpo anti-receptor de IL-2R α), ciclosporina (ciclosporina A), DACLIZUMAB® (anticuerpo anti-receptor de IL-2R α), everolimus, ácido micofenólico, RITUXIMAB® (anticuerpo anti-CD20), sirolimus, tacrolimus, y micofemolato mofetil.

25 En un aspecto, la presente descripción proporciona un kit que comprende una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente y un recipiente separado que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable en un volumen suficiente para diluir dicha pluralidad de células EPR hasta una concentración diana deseada. El volumen de dicho diluyente farmacéuticamente aceptable puede ser tal que combinando el volumen completo de dicho diluyente farmacéuticamente aceptable con la totalidad de dicha pluralidad de células EPR dé como resultado que dicha pluralidad de células EPR tenga dicha concentración diana deseada. La temperatura de dicho diluyente farmacéuticamente aceptable puede estar entre aproximadamente 0-10 grados C, opcionalmente entre aproximadamente 2-8 grados C. La temperatura de dicha pluralidad de células EPR o del vehículo farmacéuticamente aceptable que contiene dicha pluralidad de células EPR puede estar entre aproximadamente 0-10 grados C, opcionalmente entre aproximadamente 2-8 grados C.

30 El kit puede comprender además al menos un agente inmunosupresor o inmuno tolerizante que puede administrarse a un sujeto que lo necesite antes, concurrentemente, posteriormente y/o con dichas células EPR, agente inmunosupresor o inmuno tolerizante que puede incluir uno o más de los enumerados anteriormente.

35 El kit puede comprender además uno o más inhibidores de angiogénesis que pueden administrarse a un sujeto que lo necesite antes, concurrentemente, posteriormente y/o con dichas células EPR, tal como uno o más de los inhibidores de angiogénesis enumerados anteriormente.

40 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición criopreservada que comprende: una pluralidad de células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) criopreservadas que tienen un nivel medio de madurez en el momento de la congelación tal que las células EPR pueden ser recuperadas después de ser descongeladas y tienen una eficacia de siembra de al menos aproximadamente el 60%. Dicha eficacia de siembra puede ser de al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%. Dicho nivel medio de madurez puede determinarse midiendo el contenido medio de melanina de una población de células representativa de dicha pluralidad de células EPR criopreservadas. El contenido medio de melanina de dicha pluralidad de células EPR criopreservadas puede ser inferior a 8 pg/célula.

45 En un aspecto, la presente descripción proporciona una composición criopreservada que comprende: una pluralidad de células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR); en donde el contenido medio de melanina de dicha pluralidad de células EPR criopreservadas puede ser inferior a 8 pg/célula.

50 Dichas células pueden estar contenidas en un medio de criopreservación. Dicho medio de criopreservación puede comprender uno o más de DMSO (dimetil sulfóxido), etilen glicol, glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), propilen glicol, y sacarosa, p.ej., entre aproximadamente 5% y aproximadamente 50% de DMSO y entre aproximadamente 30% y aproximadamente 95% de suero, en donde dicho suero puede ser opcionalmente suero bovino fetal (FBS). Dicho medio de criopreservación puede comprender aproximadamente 90% de FBS y aproximadamente 10% de DMSO.

Las células EPR que pueden recuperarse después de descongelar tienen una eficacia de siembra de al menos aproximadamente 60%, tal como al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%.

5 Dicha composición criopreservada puede comprender entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 1×10^8 células EPR viables en el momento de la congelación, tal como entre aproximadamente 200.000 y aproximadamente 10.000.000, entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 50.000.000, entre aproximadamente 250.000 y aproximadamente 5.000.000, entre aproximadamente 500.000 y aproximadamente 4.000.000, o entre aproximadamente 1.000.000 y aproximadamente 4.000.000 células EPR viables en el momento de la congelación.

10 Las células EPR recuperadas después de la descongelación pueden tener una eficacia de siembra de al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, para un tiempo de al menos aproximadamente 3, 6, 9 o 12 meses después de la congelación.

15 Al menos el 85% de las células que son viables tras descongelación pueden permanecer viables almacenadas a entre 2-8 grados C durante hasta 1 hora, hasta 2 horas, hasta 3 horas, hasta 4 horas, hasta 5 horas, o hasta 6 horas después de descongelar.

La composición criopreservada puede comprender menos de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01%, 0,001% o 0,0001% de células que no son células EPR.

20 El contenido medio de melanina de dichas células EPR puede ser inferior a 8 pg/célula, inferior a 7 pg/célula, inferior a 6 pg/célula, inferior a 5 pg/célula, inferior a 4 pg/célula, inferior a 3 pg/célula, inferior a 2 pg/célula y al menos 0,1 pg/célula y opcionalmente al menos 0,5 pg/célula o 1 pg/célula; entre 0,1-8 pg/célula, entre 0,1-7 pg/célula, entre 0,1-6 pg/célula, entre 0,1-5 pg/célula, entre 0,1-4 pg/célula, entre 0,1-3 pg/célula, entre 0,1-2 pg/célula, entre 0,1-1 pg/célula, entre 1-7 pg/célula, entre 0,5-6 pg/célula, o entre 1-5 pg/célula.

25 En una realización, el contenido medio de melanina de dichas células EPR puede ser inferior a 10 pg/célula. En una realización, el contenido medio de melanina de dichas células EPR puede ser inferior a 9 pg/célula. En una realización, el contenido medio de melanina de dichas células EPR puede ser inferior a 8 pg/célula. En una realización, el contenido medio de melanina de dichas células EPR puede ser inferior a 7 pg/célula. En una realización, el contenido medio de melanina de dichas células EPR puede ser inferior a 6 pg/célula. En una realización, el contenido medio de melanina de dichas células EPR puede ser inferior a 5 pg/célula.

30 Al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, o al menos el 80% de las células en dicha composición criopreservada pueden ser bestrofina+. Al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% de las células en dicha composición criopreservada pueden ser PAX6+ y/o MITF+. Al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% de las células en dicha composición criopreservada pueden ser PAX6+ y/o bestrofina+. Al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% de las células en dicha composición criopreservada pueden ser ZO-1+. Al menos el 50%, al menos el 60% o al menos el 70% de las células en la composición criopreservada pueden ser PAX6+ y bestrofina+. Al menos el 95% o al menos el 99% de las células en dicha composición criopreservada pueden ser PAX6+.

En la composición criopreservada, opcionalmente no más de aproximadamente una célula por millón de células y opcionalmente no más de dos células por nueve millones de células en dicha composición criopreservada pueden ser positivas tanto para la expresión de OCT-4 como de fosfatasa alcalina (AP).

40 La composición criopreservada puede comprender además al menos un inhibidor de angiogénesis que puede administrarse a un sujeto que lo necesite antes, concurrentemente, posteriormente y/o con dichas células EPR, tal como uno o más de los inhibidores de angiogénesis enumerados anteriormente.

45 Dichas células EPR pueden estar modificadas genéticamente. Dichas células EPR pueden ser producidas a partir de una célula pluripotente. Dichas células EPR pueden ser producidas a partir de una célula pluripotente que puede estar diseñada genéticamente. Dicha ingeniería genética da como resultado la producción por parte de dichas células EPR de uno o más factores que inhiben la angiogénesis. Dicho uno o más factores que inhiben la angiogénesis incluyen al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento o dominio de fibronectina; anastelina; un anticuerpo específico anti-VEGF o un fragmento o dominio funcional del mismo; un anticuerpo específico anti-receptor de VEGF o un fragmento o dominio funcional del mismo; un anticuerpo específico anti-alfa5beta1 integrina o un fragmento o dominio funcional del mismo; fragmentos o dominios de VEGF; fragmentos o dominios de un receptor VEGFR; trampa de VEGF; y cualquier combinación de los mismos, p.ej., regulado por un promotor específico de EPR tal como el promotor RPE65, el promotor de catepsina D proximal, y el promotor de VMD2.

50 Dicha célula madre pluripotente puede ser positiva para la expresión de uno o más marcadores que comprenden OCT-4, fosfatasa alcalina, Sox2, TDGF-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y/o TRA-1-80.

Dichas células pluripotentes pueden ser células humanas pluripotentes que se pueden cultivar en una población multicapa o un cuerpo embriode durante un tiempo suficiente para que aparezcan en el cultivo las células epiteliales pigmentadas.

5 Dicho tiempo suficiente para que aparezcan en dicho cultivo las células epiteliales pigmentadas puede comprender al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 3 semanas, al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, o al menos aproximadamente 7 semanas, al menos aproximadamente 8 semanas.

10 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) para uso en una preparación farmacéutica, que comprende: (a) cultivar células EPR en condiciones adherentes para formar un cultivo sustancialmente monocapa de células EPR pigmentadas que tienen una morfología de adoquín; y (b) recolectar las células EPR del cultivo para criopreservación o formulación farmacéutica, en donde en el momento de la recolección la población recolectada de células EPR pigmentadas presenta un contenido medio de melanina inferior a 8 pg/célula.

15 Se pueden recolectar al menos 10^6 células EPR para criopreservación o formulación farmacéutica. Dichas células EPR pueden producirse a partir de células madre pluripotentes, en donde dichas células madre pluripotentes pueden ser opcionalmente células madre embrionarias humanas o células iPS humanas.

20 Se puede determinar el contenido medio de melanina de la población celular excluyendo el cinco por ciento de las células EPR recolectadas más pigmentadas y el cinco por ciento de las células EPR recolectadas menos pigmentadas. Dicho contenido medio de melanina puede ser inferior a 8 pg/célula, inferior a 7 pg/célula, inferior a 6 pg/célula, inferior a 5 pg/célula, inferior a 4 pg/célula, inferior a 3 pg/célula, inferior a 2 pg/célula y al menos 0,1 pg/célula y opcionalmente al menos 0,5 pg/célula o 1 pg/célula; entre 0,1-8 pg/célula, entre 0,1-7 pg/célula, entre 0,1-6 pg/célula, entre 0,1-5 pg/célula, entre 0,1-4 pg/célula, entre 0,1-3 pg/célula, entre 0,1-2 pg/célula, entre 0,1-1 pg/célula, entre 1-7 pg/célula, entre 0,5-6 pg/célula, o entre 1-5 pg/célula.

25 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) para uso en una preparación farmacéutica, que comprende: (a) cultivar las células EPR en condiciones adherentes para formar un cultivo sustancialmente monocapa de células EPR pigmentadas que tienen una morfología de adoquín; (b) someter las células EPR a pasaje al menos una vez en un momento previo a que las células EPR alcancen un contenido medio de melanina superior a 8 pg/célula; y (c) opcionalmente, después del uno o más pasajes, recolectar las células EPR para criopreservación o formulación farmacéutica, en donde, en el momento de la recolección, dichas células EPR presentan un contenido medio de melanina inferior a 8 pg/célula.

30 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método de producir células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR), que comprende: (a) cultivar células madre pluripotentes para formar cuerpos embrioides (EBs) o cultivar células madre pluripotentes para formar una población multicapa, en donde dichas células madre pluripotentes pueden ser opcionalmente células madre embrionarias humanas o células iPS humanas; (b) cultivar la población multicapa de células o los EBs durante un tiempo suficiente para que la aparición de células pigmentadas pueda comprender pigmento marrón dispersado en su citoplasma; y (c) aislar y cultivar las células pigmentadas de (b) para producir una población cultivada que contiene células EPR que tienen un nivel de pigmentación medio de. La etapa (b) puede comprender cultivar dichos cuerpos embrioides para formar un cultivo adherente. La etapa (a) puede comprender permitir que un cultivo de células pluripotentes tenga sobrecrecimiento, formando con ello una población multicapa.

35 La etapa (a) puede comprender cultivar dichas células pluripotentes en un sustrato de baja adherencia o cultivar dichas células pluripotentes usando un método de gota colgante, formando de este modo cuerpos embrioides a partir de dichas células pluripotentes. Dichas células madre pluripotentes pueden ser células madre pluripotentes inducidas (iPS), células madre embrionarias (ES), células madre adultas, células madre hematopoyéticas, células madre fetales, células madre mesenquimales, células madre post-parto, células madre multipotentes, o células germinales embrionarias. Las células madre pluripotentes pueden ser células ES humanas o células iPS humanas. Las células madre pluripotentes pueden estar diseñadas genéticamente. Dicha ingeniería genética da como resultado la producción por parte de dichas células EPR de un factor que inhibe la angiogénesis, tal como los identificados anteriormente. El medio de cultivo en el que se pueden formar los cuerpos embrioides puede formarse en la etapa (a) y/o las células pigmentadas pueden cultivarse en la etapa (c) que puede comprender DMEM. Los cuerpos embrioides pueden formarse en la etapa (a) y/o las células pigmentadas pueden cultivarse en la (c) que pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en EB-DM. El medio en el que las células pigmentadas pueden cultivarse en la etapa (c) puede comprender EB-DM. Dichas células epiteliales pigmentadas pueden cultivarse en la etapa (c) y pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en EPR-GM/MM. La duración del cultivo de la etapa (b) puede ser al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. El medio de cultivo usado en la etapa (a), (b) o (c), puede ser EB-DM, EPR-GM/MM, MDBK-GM, OptiPro SFM, VP-SFM, EGM-2 o MDBK-MM. La etapa (c) puede comprender poner en contacto el cultivo con una enzima seleccionada del grupo que consiste en tripsina, colagenasa, dispasa, papaína, una mezcla de colagenasa y dispasa, y una mezcla de colagenasa y tripsina, o puede comprender la alteración mecánica o el aislamiento del cultivo, o puede comprender poner en contacto el cultivo con EDTA o EGTA, alterando con ello la adhesión de dichas células pigmentadas al sustrato del cultivo. Las células madre pluripotentes presentan una complejidad de antígeno HLA reducida. Las células EPR pueden carecer de una expresión sustancial de uno o más marcadores de células madre embrionarias. Dicho

uno o más marcadores de células madre embrionarias pueden ser Oct-4, NANOG, Rex-1, fosfatasa alcalina, Sox2, TDGF-1, DPPA-2 y/o DPPA-4.

5 Los cuerpos embrioides pueden cultivarse como cultivos adherentes con posterioridad a su formación, por ejemplo, para permitir que se produzcan sobrecrecimientos. Las células EPR pueden ser positivas para al menos un marcador de células EPR. Dicho al menos un marcador de células EPR incluye uno o más de RPE65, CRALBP, PEDF, Bestrofina, MITF, Otx2, PAX2, PAX6, o tirosina u opcionalmente PAX6 y bestrofina.

El método puede comprender además cultivar dichas células EPR en condiciones que aumenten la expresión de subunidad de alfa integrina, p.ej., como se ha descrito anteriormente.

10 Dichos EBs pueden formarse en presencia de un inhibidor de proteína quinasa asociado a rho (ROCK), tal como Y-27632. Antes de dicha formación de EPR dichas células pluripotentes pueden cultivarse en Matrigel(TM) (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)).

15 En un aspecto, la presente descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende células EPR adecuadas para el tratamiento de la degradación de retina, en donde dichas células EPR contienen un contenido medio de melanina inferior a 8 pg/célula, y en donde dichas células EPR pueden presentar al menos una de las siguientes propiedades: mantener su fenotipo después de trasplante durante al menos un mes, mantener su fenotipo en cultivo durante al menos aproximadamente un mes, integrarse en el hospedante tras el trasplante, no proliferar sustancialmente tras el trasplante, pueden ser fagocitóticas, administrar, metabolizar o almacenar vitamina A, transportar hierro entre la retina y el coroides después del trasplante, unirse a la membrana de Bruch después del trasplante, absorber luz extraviada tras el trasplante, presentar una expresión elevada de subunidades de alfa integrina, presentar una mayor longitud media de telómeros que las células EPR derivadas de tejido humano donado, presentar una mayor expresión de una o más subunidades de alfa integrina que las células EPR derivadas de tejido humano donado, presentar un menor contenido de A2E que células EPR derivadas de tejido humano donado, presentar un menor contenido de lipofuscina que células EPR derivadas de tejido humano donado, exhibir menos daño acumulado por ultravioleta que células EPR derivadas de tejido humano donado, o contener un mayor número de fagosomas que células EPR derivadas de tejido humano donado. En un aspecto, la presente descripción proporciona una preparación farmacéutica que puede comprender células EPR adecuadas para el tratamiento de la degradación de retina, en donde dichas células EPR contienen un contenido medio de melanina inferior a 8 pg/célula, y en donde dichas células EPR tienen al menos una de las siguientes propiedades: unirse a la membrana de Bruch tras el trasplante, absorber luz extraviada tras el trasplante, presentar una mayor longitud media de telómero que células EPR derivadas de tejido humano donado, presentar una mayor esperanza de vida replicativa en cultivo que células EPR derivadas de tejido humano donado, presentar un menor contenido de A2E que células EPR derivadas de tejido humano donado, presentar un menor contenido de lipofuscina que células EPR derivadas de tejido humano donado, exhibir menos daño acumulado por ultravioleta que células EPR derivadas de tejido humano donado, o contener un mayor número de fagosomas que células EPR derivadas de tejido humano donado.

25 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una afección degenerativa de la retina, que comprende administrar una preparación farmacéutica que comprende administrar las células EPR de una composición o kit, una preparación farmacéutica o fabricada según el método descrito anteriormente, al ojo de un sujeto que lo necesite, en una cantidad efectiva para tratar dicha afección degenerativa de la retina.

30 La afección degenerativa de la retina puede comprender coroideremia, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (seca o húmeda), desprendimiento de retina, retinitis pigmentosa, enfermedad de Stargardt, estrías angioides, o degeneración macular miópica. Dicha etapa de administración puede comprender la administración intraocular de dichas células EPR en un ojo que lo necesite. Dicha administración intraocular puede comprender la inyección de dichas células EPR en el espacio subretinal. Dicha administración intraocular puede comprender la inyección de una disolución acuosa, opcionalmente una disolución isotónica y/o una disolución salina, en el espacio subretinal, formando de este modo un pre-bleb, y la eliminación de dicha disolución acuosa, antes de la administración de dichas células EPR en el mismo espacio subretinal que dicha disolución acuosa. Dicha inyección puede ser a través de una aguja o cánula de inyección. El diámetro de dicha aguja o cánula de inyección puede ser de entre aproximadamente 0,3 mm y 0,9 mm o entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,6 mm. Dicha aguja o cánula de inyección puede comprender una punta que tiene un diámetro entre aproximadamente 0,09 mm y aproximadamente 0,15 mm. Dicha cánula puede ser una cánula MEDONE POLYTIP® 25/38g (una cánula de 0,50 mm (25g) x 28 mm con punta de 0,12 mm (38g) x 5 mm). La eficacia del tratamiento puede evaluarse determinando el resultado visual a través de uno o más de: fotografía biomicroscópica de lámpara de rendija, fotografía de fondo, IVFA y SD-OCT, y agudeza visual mejor corregida (BCVA). El método puede producir una mejoría en la agudeza visual corregida (BCVA) y/o un aumento en las letras legibles en la tabla de agudeza visual de estudio de retinopatía diabética de tratamiento temprano (ETDRS, del inglés "Early Treatment Diabetic Retinopathy Study"). La afección de degeneración de la retina puede ser AMD seca o enfermedad de Stargardt.

55 La cantidad efectiva para tratar dicha afección degenerativa de la retina puede estar entre aproximadamente 20.000-200.000 células EPR, entre aproximadamente 20.000-500.000 células EPR, entre aproximadamente 20.000-2.000.000 células EPR, o al menos aproximadamente 20.000 células EPR, o al menos aproximadamente 20.000, 50.000, 75.000, 100.000, 125.000, 150.000, 175.000, 180.000, 185.000, 190.000, 200.000 o 500.000 células EPR.

Puede no administrarse a dicho sujeto un corticosteroide antes o concurrentemente con dicha administración de dichas células EPR, tal como prednisolona o metilprednisolona. Puede no administrarse a dicho sujeto un corticosteroide en un plazo de al menos 3, 6, 12, 24, 48, 72 o 96 horas antes de dicha administración de dichas células EPR o concurrentemente con dicha administración de dichas células EPR. Puede no administrarse a dicho sujeto un corticosteroide en un plazo de al menos 1 hora antes de dicha administración de dichas células EPR o inmediatamente antes o concurrentemente con dicha administración de dichas células EPR. Puede no administrarse a dicho sujeto un corticosteroide en un plazo de al menos 12, 24, 48, 72 o 96 horas posterior a dicha administración de dichas células EPR. Puede no administrarse a dicho sujeto un corticosteroide en un plazo de al menos 48 horas posterior a dicha administración de dichas células EPR.

Dichas células EPR pueden administrarse a un paciente en combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en: inhibidores de angiogénesis, antioxidantes, cofactores de antioxidante, otros factores que contribuyen a una actividad antioxidante incrementada, xantófilos maculares, ácidos grasos omega-3 de cadena larga, inhibidores amiloides, agonistas de CNTF, inhibidores de RPE65, factores dirigidos a la acumulación de A2E y/o lipofuscina, reguladores a la baja o inhibidores de la función y/o el metabolismo fotorreceptor, agonistas de receptor α 2-adrenérgico, agonistas selectivos de serotonina 1A, factores dirigidos a C-5, complejo de ataque a membrana (C5b-9) y cualquier otro componente de Drusen, inmunosupresores, y agentes que previenen o tratan la acumulación de lipofuscina.

Dicho uno o más agentes pueden administrarse a dicho paciente concurrentemente, antes y/o posteriormente a dicha preparación de células EPR.

Dicha composición, kit o preparación farmacéutica pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección degenerativa de la retina, tal como coroideremia, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad seca, degeneración macular relacionada con la edad húmeda, desprendimiento de la retina, retinitis pigmentosa, enfermedad de Stargardt, estrías angioides o degeneración macular miópica.

Dichas células madre pluripotentes expresan uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: OCT-4, fosfatasa alcalina, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-80.

Dichas células EPR exhiben una o más de las siguientes características: una esperanza de vida replicativa que puede ser mayor que la esperanza de vida replicativa de células EPR obtenidas de otras fuentes; una longitud media de telómeros que puede ser al menos el 30 por ciento de la longitud de telómeros de una célula hESC y/o iPS humana (o de la media de una población de células hESC y/o iPS humanas), o al menos el 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de la longitud de telómero de una célula hESC y/o iPS humana; una longitud media de fragmento de restricción terminal (TRF) que puede ser mayor que 4 kb, o mayor que 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso 13 kb, o 10 kb o más; un contenido de lipofuscina medio que puede ser inferior al 50 por ciento del contenido de lipofuscina medio del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o inferior al 40, 30, 20 o 10 por ciento del contenido medio de lipofuscina del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos; un contenido medio de N-retinilideno-N-retiniletanolamina (A2E) que puede ser inferior al 50 por ciento del contenido medio de A2E del número equivalente de células EPR aisladas en ojos adultos, o inferior al 40, 30, 20 o 10 por ciento del contenido medio de A2E del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos; un contenido medio de N-retinilideno-N-retiniletanolamina (A2E) que puede ser inferior a 50 ng por 10^5 (100.000) células; una tasa de fagocitosis de segmentos exteriores de fotorreceptor (POS) que puede ser al menos un 50 por ciento mayor que la tasa de fagocitosis de POS para un número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o al menos un 75, 100, 150 o 200 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de POS para un número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos; una tasa de fagocitosis de segmentos exteriores de fotorreceptor (POS) que puede ser al menos un 20 por ciento de la concentración total de POS después de 24 horas, o al menos un 25, 30, 25, 40 o 50 por ciento de la concentración total de POS después de 24 horas; un nivel reducido de estrés oxidativo acumulado y/o daño en el ADN en comparación con células EPR aisladas de un hospedante adulto; una actividad media de proteosoma que puede ser al menos un 50 por ciento mayor que la actividad media de proteosoma del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o al menos un 60, 70, 80, 90 o 100 por ciento mayor que la actividad media de proteosoma del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos; una acumulación media de conjugados de ubiquitina que puede ser inferior al 50 por ciento de la acumulación media de conjugados de ubiquitina para un número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o inferior al 40, 30, 20 o incluso el 10 por ciento de la acumulación media de conjugados de ubiquitina del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización de EPR generados a partir de hESC MA09. A, una placa de seis pocillos que muestra parches pigmentados de EPR formado en cultivo de diferenciación de cuerpos embrioides, B-H, evaluación de marcadores moleculares en EPR descongelado y formulado. Se evaluó MITF y PAX6 (C-D) en cultivos de una noche de células recién formuladas y se llevó a cabo una inmunotinción con bestrofina/PAX6 y ZO-1 en cultivos de 3 semanas de edad. B- microfotografía de HMC de EPR de 3 semanas de edad post-formulación que muestra que se ha establecido la monocapa confluyente de adoquines con pigmentación media. C- MITF/PAX6 agrupados (MITF – rojo en los originales, PAX6 – verde en los originales), D- DAPI correspondiente a MITF/PAX6; E- bestrofina/PAX6 agrupados, F- DAPI correspondiente; G – ZO-1, H- DAPI correspondiente. Destacar que cerca de 100% de células en

C-H son positivas para el(los) marcador(es) evaluado(s). Aumentos, x400 (B-H). I- q-PCR que muestra la regulación al alza de marcadores de EPR y la regulación a la baja de marcadores de hESC en el EPR clínico descongelado (panel derecho de cada grupo, verde en el original) en comparación con un lote de EPR de referencia (panel izquierdo en cada grupo, azul en el original). Los genes mostrados (en orden de izquierda a derecha) son: Bestrofina, Pax-6, MITF, RPE-65, NANOG, OCT-4 y SOX-2. J, FACS que muestra la fagocitosis de biopartículas PhRodo por hES-EPR a 37°C y a 4°C (control). Se muestran células no tratadas (línea negra en el original; curva más a la izquierda) y células de control de 4°C (línea roja en el original; la parte izquierda de la curva se eleva ligeramente a la derecha de las células no tratadas y la parte derecha de la curva se solapa con la parte derecha de la curva de células no tratadas), y células tratadas a 37°C (línea azul en el original; curva más a la derecha). K- cariotipo femenino normal (46 XX) del lote de EPR clínico.

Figura 2: supervivencia e integración de EPR generado a partir de hESC-MA09 en ojo de ratón NIH III tras nueve meses. La sección teñida con mitocondrias anti-humanas (A, rojo en el original) y bestrofina anti-humana (B, verde en el original). Nótese la co-localización precisa de mitocondrias humanas y tinción de bestrofina en las mismas células (C: A y B agrupados) y ausencia de tinción en EPR de ratón (F: A, B, C, E agrupados). El cuadro de la imagen de campo brillante (E) está aumentado en "D" para mostrar la morfología de EPR humano. Aumento 200x (A-C, E, F), D está aumentado adicionalmente x4,5.

Figura 3: Diferencia en la unión y crecimiento de EPR con diferentes grados de pigmentación. Las micrografías muestran la unión y el comportamiento de lotes pigmentados más claros (A-C) y más oscuros (D-F). G ilustra la tasa de crecimiento de EPR para los lotes más oscuros (panel izquierdo de cada grupo) y lotes más claros (panel derecho de cada grupo) que muestra el número total de células por pocillo para tres días consecutivos tras llevar a placa. A y D muestran la población celular total a las 21 h de llevar a placa, B y E muestran los mismos cultivos que en A y D tras eliminación de las células flotantes, C y F muestran los mismos cultivos tres días después de llevar a placa. Nótese que la mayoría de las células se habían unido a las 21 h tras la descongelación en el lote pigmentado más claro (A, B, G) mientras que solo unas pocas células del lote pigmentado más oscuro se habían unido (flechas D, E, G), y la mayoría de las células estaban flotando. Después de tres días en cultivo, el lote pigmentado más ligero (C) presentó un mayor número de células, y se estableció una monocapa confluyente, mientras que el lote pigmentado más oscuro todavía era sub-confluyente. Aumento, x200.

Figura 4: imágenes de los sitios de trasplante de EPR derivado de hESC. Fotografías de fondo de color de la mácula izquierda de un paciente de SMD pre- y post-operativamente (A-C). El área dentro del rectángulo bisecciona el borde del sitio de trasplante quirúrgico y se corresponde con atrofia macular no incluida en la inyección quirúrgica. A- imagen a color macular de línea base con EPR extendido y atrofia macular neurosensora. B- imagen a color macular una semana después del trasplante de hESC-EPR. Nótese la pigmentación moderada más evidente en el área de atrofia de EPR de línea base. Dicha pigmentación aumentó en la semana 6 (C). Los paneles D y E muestran una tomografía de coherencia ocular de dominio espectral (SD-OCT) y fotografía de registro en blanco y negro (Hiedelberg Engineering). La vista transversal mostrada en el panel E corresponde a la línea horizontal (verde brillante en el original) indicada por una flecha en el panel D. Los círculos discontinuos del panel E (rojo en el original) destacan lo que parecen ser células hESC-EPR estableciéndose sobre o unidas a la capa de EPR nativa comprometida.

Figura 5: imágenes de angiografía de fluoresceína de un paciente de AMD. No se observa evidencia de fuga para los diferentes intervalos de tiempo. A: fase temprana de línea base, B: fase tardía de línea base, C: fase temprana de 4 semanas, D: fase tardía de 4 semanas, E: fase temprana de 8 semanas, F: fase tardía de 8 semanas. (Las imágenes seleccionadas están descentradas inferiormente para representar el área del trasplante).

Figura 6: imágenes de angiografía de fluoresceína de un paciente de Stargardt. No se observa evidencia de fuga para los diferentes intervalos de tiempo. A: fase temprana de línea base, B: fase tardía de línea base, C: fase temprana de 4 semanas, D: fase tardía de 4 semanas, E: fase temprana de 8 semanas, F: fase tardía de 8 semanas. (Las imágenes seleccionadas están descentradas inferiormente para representar el área del trasplante).

Figura 7: imágenes de OCT de un paciente de Stargardt a diferentes intervalos de tiempo. No se observa evidencia de edema o fluido subretinal en ninguna de las imágenes de los diferentes periodos de tiempo. (OCT seleccionado representa el área del trasplante). Panel A: línea base, B: 1 semana, C: 4 semanas, D: 8 semanas.

Figura 8: imágenes de lámpara de rendija de paciente de AMD. Paneles A y B: 1 semana post-op. No se observa evidencia de inflamación de segmento anterior o de edema de córnea.

Figura 9: imágenes de lámpara de rendija de paciente de Stargardt. Paneles A y B: 1 semana post-op. No se observa evidencia de inflamación de segmento anterior o de edema de córnea.

Figura 10: campos visuales de Goldmann realizados sobre un paciente de AMD: panel A: línea base, panel B: 6 semanas. Se observa un escotoma central ligeramente más pequeño.

Figura 11: campos visuales de Goldmann realizados sobre un paciente de Stargardt: panel A: línea base, panel B: 6 semanas. Se observa una mínima disminución del escotoma.

Figura 12: resultados de ensayo de fagocitosis correspondientes a dos lotes de células EPR producidas usando diferentes medios. Las EPR fueron producidas usando medio MDBK (panel A) o EB-DM y EPR-GM/MM (panel B). Los resultados se presentan como histogramas de análisis FACS para células incubadas sin biopartículas fluorescentes (“no tratadas”), células de control negativo incubadas con biopartículas fluorescentes a 4 grados C (“4°C”), y células incubadas con biopartículas fluorescentes a 37 grados C (“37°C”).

Figura 13: Imágenes de la zona de trasplante de hESC-EPR en un paciente con distrofia macular de Stargardt. Fotografías de fondo a color de la mácula izquierda del paciente pre-operativamente y post-operativamente (A-C). La región dentro del rectángulo bisecciona el borde de la zona de trasplante quirúrgico y corresponde a atrofia macular no incluida en la inyección quirúrgica. (A) Imagen a color macular de línea base con EPR extendido y atrofia macular neurosensora. (B) Imagen a color macular 1 semana después de trasplante de hESC-EPR. Nótese la pigmentación moderada más evidente en la región de atrofia de EPR de línea base. Esta pigmentación aumentó en la semana 6 (C). (D-G) Fotografías a color de fondo e imágenes SD-OCT de línea base (D) y en el mes 3 después del trasplante (F). Las imágenes a color muestran una pigmentación creciente a nivel del EPR entre la línea base y el mes 3. Las imágenes SD-OCT registradas (E, G) muestran una pigmentación creciente a nivel del EPR, injerto de EPR monocapa normal y supervivencia en el mes 3 (flecha) adyacente a la región de la membrana de Bruch desnuda desprovista de EPR nativas. hESC = células madre embrionarias humanas. EPR = epitelio pigmentario de la retina. SD-OCT = tomografía de coherencia ocular de dominio espectral.

Figura 14. Resumen en tabla del cambio en la agudeza visual después de trasplante de hESC-EPR en paciente con distrofia macular de Stargardt en el ojo no tratado (“Ojo compañero”) y en el ojo en el que se inyectaron células EPR (“Ojo operado”) para un paciente de SMD. El ojo operado mostró una mejoría detectable mediante ETDRS y BCVA, mientras que no se detectó cambio en la agudeza visual del ojo no tratado. hESC = células madre embrionarias humanas. EPR = epitelio pigmentario de la retina. BCVA = agudeza visual mejor corregida. ETDRS = tabla de agudeza visual de estudio de retinopatía diabética de tratamiento temprano.

Figura 15: muestra dos fotografías de fondo que incluyen la retina, el disco óptico, la mácula, y el polo posterior para dos pacientes de Stargardt adicionales, tratado cada uno con 50.000 células EPR derivadas de una fuente de hESC. Cada foto indica la zona de inyección y el área del bleb creado tras inyección de la disolución que contiene las células EPR.

Figuras 16 y 17: (dos pacientes de SMD adicionales diferentes muestran tres fotografías de fondo cada uno, tomadas a los tiempos indicados para cada paciente (es decir, en la línea base, 1 mes, y dos o tres meses), que muestran el establecimiento de áreas dentro del bleb de inyección que presentan parches crecientes de células EPR pigmentadas, lo que sugiere el injerto y la regeneración de áreas de la retina con una nueva capa de EPR.

Figura 18: muestra la agudeza visual medida en el ojo tratado (“inyectado”) y en el no tratado (“no inyectado”) del paciente mostrado en el panel superior de la Fig. 16 y la Fig. 17. El eje vertical indica la puntuación del estudio de retinopatía diabética de tratamiento temprano (ETDRS) y el eje horizontal muestra el número de días tras la cirugía.

Figura 19: Micrografías de luz visible que ilustran la pigmentación y morfología esperadas de los cultivos de EPR producidos a partir de hESC que fueron generados sin destrucción de embriones. Los tres paneles superiores (A, B, C) muestran EPR producido a partir de tres líneas celulares iPS humanas (hiPS). Los tres paneles inferiores (D, E, F) muestran EPR producido a partir de células hES generadas a partir de blastómeros biopsiados (líneas celulares designadas D30469 y NED7), en donde el embrión restante permaneció viable y fue criopreservado.

Figura 20: Injerto de EPR a largo plazo en el mismo paciente de SMD mostrado para tiempos más cortos en la Fig. 4. Las fotografías de fondo tomadas (A) en la línea base y (B) un año después de la inyección de EPR muestran la presencia de células pigmentadas, lo que indica que el injerto a largo plazo de células EPR persiste durante al menos un año después de la inyección.

Figura 21: puntuación ETDRS/BCVA del paciente de AMD – periférico para tiempos hasta un año desde el tratamiento.

Figura 22: puntuación ETDRS/BCVA del paciente de SMD – central para tiempos hasta un año desde el tratamiento.

Descripción detallada

La presente memoria describe los resultados iniciales para dos pacientes en dos ensayos clínicos prospectivos que exploran la seguridad y la tolerancia de dicho EPR derivado de hESC en pacientes con AMD seca y enfermedad de Stargardt. Las células EPR derivadas de hESC no han mostrado signos de rechazo o tumorigenicidad en el momento de este informe. Las medidas visuales sugieren mejoría en ambos pacientes. Estos resultados indican que las hESCs podrían servir como fuente potencialmente segura e inagotable de EPR para el tratamiento eficaz de un rango de enfermedades degenerativas de la retina.

También se describen métodos para producir poblaciones de células EPR derivadas de hESC que presentan características ventajosas. El control del mecanismo de diferenciación, que incluye el grado de expresión génica y de pigmento, se demostró que potenciaba significativamente la supervivencia, la unión y el crecimiento de las células tras inyección. Específicamente, los datos presentados en la presente memoria muestran que el grado de madurez del

EPR y de pigmentación afecta drásticamente la posterior unión y crecimiento de las células *in vitro*. Estos resultados ilustran las ventajas que pueden obtenerse usando células diferenciadas de hESC para uso terapéutico, en comparación con el uso de células primarias. Estos resultados demuestran que además de producir un número ilimitado de células "jóvenes" saludables con inmunogenicidad potencialmente reducida (20, 21), el estadio de la diferenciación *in vitro* se puede controlar a nivel celular y molecular para asegurar la seguridad, la identidad, la pureza y la potencia antes del trasplante a pacientes.

Iniciamos dos estudios clínicos prospectivos para determinar la seguridad y la tolerancia del trasplante sub-retinal de epitelio pigmentario de la retina (EPR) derivado de hESC en pacientes con distrofia macular de Stargardt (SMD) y degeneración macular relacionada con la edad seca (AMD), la causa principal de la ceguera en el mundo desarrollado. En el primer paciente de cada ensayo se llevaron a cabo exámenes oftalmológicos pre- y post-operativos, que incluyen agudeza visual, angiografía de fluoresceína, tomografía de coherencia óptica (OCT), y evaluación del campo visual.

La diferenciación de hESC controlada dio como resultado poblaciones de EPR casi 100% puras. Inmediatamente después de la cirugía, la hiperpigmentación fue visible en la zona trasplantada en ambos pacientes, con evidencias posteriores de que las células se habían unido e integrado en la capa de EPR nativo. No se observaron signos de inflamación o hiperproliferación. Las medidas visuales mostraron signos de mejoría durante los primeros dos meses. A las 2 semanas, la agudeza visual mejor corregida (BCVA) había mejorado de 20/500 en el pre-tratamiento a 20/200 en el ojo de estudio del paciente de AMD, y continuó mostrando mejoría (20/200-20/320) y un aumento de las letras en la tabla de agudeza visual de estudio de retinopatía diabética de tratamiento temprano (ETDRS). El paciente de SMD mejoró desde movimiento de manos a recuento de dedos durante el mismo periodo; para el mes 1 y 2 la BCVA mejoró a 20/800. Antes del trasplante de EPR, el paciente fue incapaz de leer ninguna letra de la tabla ETDRS, pero comenzó a leer letras a las 2 semanas, lo que continuó mejorando durante el periodo de estudio (5 letras a 1 y 2 meses).

Las células de EPR derivadas de hESC no han mostrado signos de rechazo o tumorigenicidad en el momento de este informe. Las medidas visuales demuestran la mejoría en ambos pacientes.

Definiciones

A fin de que la invención descrita en la presente memoria puede ser comprendida completamente, se establece la siguiente descripción detallada. Se describen en detalle varias realizaciones de la invención, y puede ilustrarse adicionalmente a través de los ejemplos proporcionados.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el significado aplicado habitualmente por los especialistas en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la invención o para evaluar la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos, y no pretenden ser limitativos. En la presente memoria se proporcionan los siguientes términos y definiciones.

Tal como se usa en la descripción de la presente memoria y en las reivindicaciones que la siguen, el significado de "un", "una" y "el", "la" incluye la referencia al plural, a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Asimismo, tal como se usa en la descripción de la presente memoria, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

A lo largo de esta especificación, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" debe entenderse que implica la inclusión de un número entero dado o un grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

"Cantidad efectiva", tal como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a la cantidad de un compuesto o células que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de la enfermedad. La cantidad efectiva puede ser una cantidad efectiva para profilaxis, y/o una cantidad efectiva para prevención. La cantidad efectiva puede ser una cantidad efectiva para reducir, una cantidad efectiva para prevenir la incidencia de signos/síntomas, para reducir la gravedad de la incidencia de signos/síntomas, para eliminar la incidencia de signos/síntomas, para frenar el desarrollo de la incidencia de signos/síntomas, para prevenir el desarrollo de la incidencia de signos/síntomas, y/o efectuar la profilaxis de la incidencia de signos/síntomas. La "cantidad efectiva" puede variar dependiendo de la enfermedad y de su gravedad y la edad, peso, historial médico, susceptibilidades y afecciones preexistentes, del paciente a tratar. El término "cantidad efectiva" es sinónimo de "cantidad terapéuticamente efectiva" para los propósitos de esta descripción.

"Embrión" o "embrionario", tal como se usa en la presente memoria se refiere de forma amplia a una masa celular en desarrollo que no se ha implantado en la membrana uterina de un hospedante materno. Una "célula embrionaria" es una célula aislada de un embrión, o contenida en uno. Esto también incluye blastómeros, obtenidos tan temprano como en el estadio celular dos, y blastómeros agregados.

“Células madre embrionarias” (células ES), tal como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a células derivadas de una masa celular interna de blastocitos o mórulas que han sido sometidos a pasajes en serie como líneas celulares. Las células ES pueden derivar de la fertilización de un óvulo con esperma o ADN, transferencia nuclear, partenogénesis, o generando células ES con homociguidad en la región HLA. Las células ES también se pueden referir a células derivadas de un cigoto, blastómeros o embriones de mamífero en estadio de blastocisto producidos mediante la fusión de un esperma y un óvulo, transferencia nuclear, o la reprogramación de cromatina y posterior incorporación de la cromatina reprogramada en una membrana plasmática para producir una célula. Las células madre embrionarias, independientemente de su fuente o del método particular usado para producirlas, pueden ser identificadas en base a: (i) capacidad para diferenciarse en células de las tres capas germinales, (ii) expresión de al menos Oct-4 y fosfatasa alcalina, y (iii) capacidad para producir teratomas cuando son trasplantadas en animales inmunocomprometidos. El término también incluye células aisladas de uno o más blastómeros de un embrión, sin destruir el resto del embrión (véase, p.ej., Chung et al., Cell Stem Cell. 2008 Feb 7; 2(2): 113-7; U.S. PGPub No. 20060206953; U.S. PGPub No. 2008/0057041. El término también incluye células producidas mediante transferencia nuclear celular somática, incluso cuando se usan células no embrionarias en el proceso. Las células ES pueden derivar de fertilización de un óvulo con esperma o ADN, transferencia nuclear, partenogénesis, o generando células ES con homociguidad en la región HLA. Las células ES también son células derivadas de un cigoto, blastómeros o embrión de mamífero de estadio de blastocisto producido por la fusión de un esperma y un óvulo, transferencia nuclear, partenogénesis o la reprogramación de cromatina y posterior incorporación de la cromatina reprogramada en una membrana plasmática para producir una célula. Las células madre embrionarias humanas de la presente descripción pueden incluir, aunque sin limitación, células madre embrionarias MA01, MA09, ACT-4, No. 3, H1, H7, H9, H14 y ACT30. En determinadas realizaciones, las células ES humanas usadas para producir células EPR son derivadas y mantenidas según los estándares GMP.

“Células derivadas de embrión” (EDC), tal como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a células derivadas de mórula, células derivadas de blastocisto que incluyen las de la masa celular interior, escudo embrionario, o epiblasto, u otras células madre pluripotentes del embrión temprano, que incluye endoderma, ectoderma y mesoderma primitivo y sus derivados. “EDC” también incluye blastómeros y masas celulares procedentes de blastómeros individuales o embriones procedentes de estadios variables de desarrollo, pero excluye células madre embrionarias humanas que han sido sometidas a pasaje como líneas celulares.

“Degeneración macular”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a enfermedades que se caracterizan por una pérdida progresiva de visión central asociada a anomalías de la membrana de Bruch, la retina neural, y el epitelio pigmentario de la retina. Las enfermedades de degeneración macular incluyen, aunque sin limitación, la degeneración macular relacionada con la edad, la distrofia macular de Carolina del Norte, la distrofia de fondo de Sorsby, la enfermedad de Stargardt, la distrofia patrón, la enfermedad de Best, la malattia leventinese, la coroiditis de panal de abeja de Dooyne, la drusa dominante y la drusa radial.

“Célula madre pluripotente”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a una célula capaz de una proliferación prolongada o virtualmente indefinida *in vitro*, pero reteniendo su estado no diferenciado, que exhibe un cariotipo estable (preferiblemente normal), y que tiene la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales (es decir, ectoderma, mesoderma y endoderma) en las condiciones apropiadas.

“Células madre embrionarias pluripotentes”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a células que: (a) son capaces de inducir teratomas cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes (SCID); (b) son capaces de diferenciarse en tipos celulares de las tres capas germinales (p.ej., tipos celulares ectodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos); y (c) expresan al menos un marcador de célula madre embrionaria molecular (p.ej., expresan Oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno superficial de SSEA 3, antígeno superficial de SSEA 4, NANOG, TRA 1 60, TRA 1 81, SOX2, REX1). Como ejemplo adicional, las células pluripotentes pueden expresar OCT-4, fosfatasa alcalina, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y/o TRA-1-80. Se pueden generar células madre pluripotentes ejemplares usando, por ejemplo, métodos conocidos en la técnica. Las células madre pluripotentes ejemplares incluyen células madre embrionarias derivadas del ICM de embriones de estadio blastocisto, así como células madre embrionarias derivadas de uno o más blastómeros de un embrión de estadio de ruptura o estadio de mórula sin destruir el resto del embrión. Dichas células madre embrionarias pueden generarse a partir de material embrionario producido mediante fertilización o por medios asexuales, que incluyen transferencia nuclear de célula somática (SCNT), partenogénesis y androgénesis. Otros ejemplos de células madre pluripotentes incluyen células madre pluripotentes inducidas (células iPS) generadas mediante reprogramación de una célula somática expresando o induciendo la expresión de una combinación de factores (referidos en la presente memoria como factores de reprogramación). Se pueden generar células iPS usando células somáticas fetales, post-natales, de recién nacido, juveniles o adultas. En determinadas realizaciones, los factores que pueden usarse para reprogramar células somáticas en células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct4 (a veces referido como Oct 3/4), Sox2, c-Myc, y Klf4. En otras realizaciones, los factores que pueden usarse para reprogramar células somáticas en células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct-4, Sox2, Nanog y Lin28. En otras realizaciones, las células somáticas son reprogramadas expresando al menos 2 factores de reprogramación, al menos tres factores de reprogramación o cuatro factores de reprogramación. En otras realizaciones, se identifican factores de reprogramación adicionales y se usan solos o en combinación con uno o más factores de reprogramación conocidos para reprogramar una célula somática en una célula madre pluripotente. Las células iPS típicamente pueden ser identificadas mediante expresión

de los mismos marcadores que las células madre embrionarias, aunque una línea de células iPS particular puede variar en su perfil de expresión.

“Célula EPR”, “célula EPR diferenciada”, “célula EPR derivada de ES”, y tal como se usa en la presente memoria, puede usarse de forma intercambiable a lo largo del texto para referirse de forma amplia a una célula EPR diferenciada a partir de una célula madre pluripotente, p.ej., usando un método descrito en la presente memoria. El término se usa de forma genérica para referirse a células EPR diferenciadas, independientemente del nivel de madurez de las células, y por tanto puede abarcar células EPR de diversos niveles de madurez. Las células EPR se pueden reconocer visualmente por su morfología de adoquín y por la aparición inicial de pigmento. Las células EPR también pueden identificarse molecularmente en base a una falta sustancial de expresión de marcadores de célula madre embrionaria tales como Oct-4 y NANOG, así como en base a la expresión de marcadores de EPR tales como RPE65, PEDF, CRALBP y bestrofina. Por ejemplo, una célula puede contarse como positiva para un marcador dado si se observa el patrón de tinción esperado, p.ej., PAX6 localizado en el núcleo, bestrofina localizada en la membrana plasmática con una estructura poligonal (mostrando tinción de bestrofina localizada en líneas agudas en la periferia de la célula), tinción de ZO-1 presente en las uniones estrechas que rodean las células con un patrón poligonal, y tinción MITF detectada confinada en el núcleo. A menos que se especifique lo contrario, las células EPR, tal como se usan en la presente memoria, se refieren a células EPR diferenciadas in vitro de células madre pluripotentes.

“Células EPR madura” y “célula EPR diferenciada madura”, tal como se usa en la presente memoria, pueden usarse de forma intercambiable a lo largo del texto para referirse de forma amplia a cambios que se producen después de una diferenciación inicial de las células EPR. Específicamente, aunque se pueden reconocer las células EPR, en parte, en base a la aparición inicial de pigmento, tras la diferenciación las células EPR maduras se pueden reconocer en base a un aumento de la pigmentación.

La “eficacia de siembra” tal como se usa en la presente memoria se refiere a la fracción de células recuperadas que, tras descongelación, permanecen viables y se pueden unir a un sustrato de cultivo. Por ejemplo, la eficacia de siembra puede medirse descongelando, lavando y llevando a placa las células (preferiblemente sobre gelatina); determinando el recuento celular total antes de llevar a placa y determinando el recuento de células viables después de llevar a placa; la eficacia de siembra puede calcularse entonces como la fracción de células totales antes de llevar a placa que son viables y están unidas al sustrato después de llevar a placa. A modo de ejemplo más concreto, la eficacia de siembra se determina descongelando las células en un baño de agua a 37 grados C con agitación constante (tal como durante uno a dos minutos o un tiempo suficiente para que las células se descongelen), seguido del lavado de las células con salino tamponado con fosfato (u otra disolución de lavado adecuada) tres veces, determinando el recuento celular total (tal como usando un hemocitómetro) que incluye las células viables y no viables, y llevando a placa las células sobre gelatina con un medio de crecimiento (tal como RPE-GM), incubando las células (preferiblemente a 37 grados C) y permitiendo que las células se unan a la gelatina durante aproximadamente 24 horas, a continuación determinando el recuento de células viables (p.ej., usando un hemocitómetro y usando exclusión de azul de tripano para determinar la viabilidad); la eficacia de siembra se determina entonces dividiendo el recuento de células viables después de llevar a placa por el recuento de células totales antes de llevar a placa.

“Pigmentado”, tal como se usa en la presente memoria se refiere de forma amplia a cualquier nivel de pigmentación, por ejemplo, la pigmentación que se produce inicialmente cuando las células EPR se diferencian de células ES. La pigmentación puede variar con la densidad celular y con la madurez de las células EPR diferenciadas. La pigmentación de una célula EPR puede ser la misma que una célula EPR media tras la diferenciación terminal de la célula EPR. La pigmentación de una célula EPR puede ser más pigmentada que la célula EPR media tras la diferenciación terminal de la célula EPR. La pigmentación de una célula EPR puede ser pigmentada que la célula EPR media tras la diferenciación terminal.

“Signos” de enfermedad, tal como se usan en la presente memoria se refiere de forma amplia a cualquier anomalía indicativa de enfermedad, que puede descubrirse al examinar al paciente; una indicación objetiva de la enfermedad, en contraposición con un síntoma, que es una indicación subjetiva de la enfermedad.

“Síntomas” de la enfermedad tal como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a cualquier fenómeno mórbido o anomalía en la estructura, función o sensación, experimentado por el paciente e indicativo de la enfermedad.

“Terapia”, “terapéutico”, “tratar”, “tratado” o “tratamiento”, tal como se usan en la presente memoria, se refieren de forma amplia al tratamiento de una enfermedad, la detención o reducción del desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos, y/o al alivio de la enfermedad, produciendo la regresión de la enfermedad o de sus síntomas clínicos. La terapia abarca profilaxis, prevención, tratamiento, cura, remedio, reducción, paliación y/o proporcionar alivio de una enfermedad, signos y/o síntomas de una enfermedad. La terapia abarca la paliación de los signos y/o síntomas en pacientes con signos y/o síntomas activos de la enfermedad (p.ej., ceguera, deterioro de la retina). La terapia también abarca la “profilaxis” y la “prevención”. La profilaxis incluye prevenir que la suceda aparezca después del tratamiento de una enfermedad en un paciente, o reducir la incidencia o la gravedad de la enfermedad en un paciente. El término “reducida”, para el propósito de la terapia, se refiere de forma amplia a la reducción clínica significativa de los signos y/o síntomas. La terapia incluye tratar recaídas o signos y/o síntomas recurrentes (p.ej., degeneración de la retina, pérdida de visión). La terapia abarca, aunque sin limitación, impedir la aparición de signos y/o síntomas en cualquier momento, así como reducir los signos y/o síntomas existentes y eliminar los signos y/o síntomas existentes. La terapia

incluye tratar una enfermedad crónica (“mantenimiento”) y una enfermedad aguda. Por ejemplo, el tratamiento incluye tratar o prevenir recaídas o la recurrencia de signos y/o síntomas (p.ej., ceguera, degeneración de la retina).

5 El término “corticosteroide” se usa en la presente memoria para referirse a la clase de hormonas esteroideas que se unen al receptor glucocorticoide, que incluyen corticosteroides naturales y artificiales, análogos, etc. Los ejemplos de corticosteroides incluyen, aunque sin limitación, prednisolona, hidrocortisona, prednisona, metilprednisona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona, acetato de fludrocortisona, fluticasona (que incluye propionato de fluticasona (FP)), budesonida, ciclesonida, mometasona y flunisolida.

Preparaciones de células EPR y terapias de combinación

10 La presente descripción proporciona preparaciones de células EPR, que incluyen células EPR, poblaciones de células EPR sustancialmente purificadas, preparaciones farmacéuticas que comprenden células EPR y preparaciones criopreservadas de las células EPR. Las células EPR descritas en la presente memoria pueden estar sustancialmente libres de al menos una proteína, molécula, u otra impureza que se encuentra en su entorno natural (p.ej., “aislada”). Las células EPR pueden ser células EPR de mamífero, que incluye humano. La descripción también proporciona
15 células EPR humanas, una población sustancialmente purificada de células EPR, preparaciones farmacéuticas que comprenden células EPR humanas, y preparaciones criopreservadas de las células EPR humanas. La preparación puede ser una preparación que comprende células EPR derivadas de células madre embrionarias humanas, células EPR derivadas de células iPS humanas, y preparaciones sustancialmente purificadas (con respecto a las células que no son EPR) que comprenden células EPR derivadas de ES diferenciadas.

20 Las células EPR de la preparación pueden presentar una esperanza de vida replicativa que es mayor que la esperanza de vida replicativa de las células EPR obtenidas de otras fuentes (p.ej., cultivos derivados de tejido humano donado, tal como tejido fetal, infantil, de niño, adolescentes o adulto). La esperanza de vida replicativa se puede determinar a través del número de duplicaciones de población en el cultivo antes de la senescencia replicativa. Por ejemplo, las células EPR de la preparación pueden tener una esperanza de vida replicativa que es al menos un 10 por ciento mayor que la de una población de EPR derivada de tejido humano donado, y preferiblemente al menos un 20, 30, 40, 50, 60,
25 70, 80, 90, 100 por ciento, o incluso más, superior a la de una población de EPR derivada de tejido humano donado.

Las células EPR de la preparación pueden presentar una longitud media de telómero que es al menos el 30 por ciento de la longitud de telómero de una célula hESC y/o iPS humana (o de la media de una población de células hESC y/o iPS humanas), y preferiblemente al menos 40, 50, 60, 70, 80 o incluso 90 por ciento de la longitud de telómero de una célula hESC y/o iPS humana (o de la media de una población de células hESC y/o iPS humanas). Por ejemplo,
30 dicha célula hESC y/o iPS humana (o dicha población de células hESC y/o iPS humanas) puede ser una célula o una población celular a partir de la cual se diferencian dichas células EPR.

Las células EPR de la preparación pueden tener una longitud de fragmento de restricción terminal medio (TRF) que es superior a 4 kb, y preferiblemente superior a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso 13 kb. En un ejemplo de realización, las células EPR de la preparación pueden tener un TRF con una longitud de 10 kb o más.

35 Las células EPR de la preparación pueden presentar un contenido de lipofuscina medio que es inferior al 50 por ciento del contenido de lipofuscina medio del número equivalente de células EPR aisladas a partir de ojos adultos (es decir, de pacientes humanos adultos con edades de 25-80, más preferiblemente adultos con edades de 50-80), y más preferiblemente inferior a 40, 30, 20 o incluso 10 por ciento del contenido de lipofuscina medio del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos.

40 Las células EPR de la preparación pueden presentar un contenido medio de N-retiniliden-N-retiniletanolamina (A2E) que es inferior al 50 por ciento del contenido de A2E medio del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos (p.ej., pacientes adultos humanos con edades de 25-80, más preferiblemente adultos con edades de 50-80), y más preferiblemente inferior al 40, 30, 20 o incluso 10 por ciento del contenido de A2E medio del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos.

45 Las células EPR de la preparación pueden tener un contenido medio de N-retiniliden-N-retiniletanolamina (A2E) que es inferior a 50 ng por 10^5 (100.000) células, que se puede determinar a partir de las intensidades de pico integradas (tal como se describe en Sparrow et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Noviembre 1999, vol. 40 nº 12, pág. 2988-2995), y más preferiblemente inferior a 40 ng, 30 ng, 20 ng, 10 ng o incluso 5 ng por 10^5 células.

50 Las células EPR de la preparación pueden tener una tasa de fagocitosis de segmentos exteriores de fotorreceptor (POS) que es al menos un 50 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de POS de un número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos (es decir, pacientes adultos humanos con edades de 25-80, más preferiblemente adultos con edades de 50-80), y más preferiblemente al menos un 75, 100, 150 o incluso 200 por ciento mayor. La fagocitosis de POS se puede medir, a modo de ejemplo ilustrativo y no limitativo, usando los protocolos descritos en Bergmann et al. FASEB Journal, marzo 2004, vol. 18, páginas 562-564.

55 Las células EPR de la preparación pueden presentar una tasa de fagocitosis de segmentos exteriores de fotorreceptor (POS) que es al menos el 20 por ciento de la concentración total de POS después de 24 horas, y más preferiblemente

al menos el 25, 30, 25, 40 o incluso 50 por ciento de la concentración total de POS después de 24 horas. La fagocitosis de POS se puede medir, a modo de ejemplo ilustrativo y no limitativo, usando los protocolos descritos en Bergmann et al. FASEB Journal, marzo 2004, vol. 18, páginas 562-564.

5 Las células EPR pueden exhibir un nivel reducido de estrés oxidativo acumulado y/o de daño de ADN en comparación con células EPR aisladas de un hospedante adulto.

10 Las células EPR de la preparación pueden tener una actividad de proteosoma media que es al menos un 50 por ciento mayor que la actividad de proteosoma media del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos (es decir, pacientes adultos humanos con edades de 25-80, más preferiblemente adultos con edades de 50-80), y más preferiblemente al menos un 60, 70, 80, 90 o incluso 100 por ciento de la actividad de proteosoma media del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos. La actividad de proteosoma se puede medir usando, a modo de ejemplo ilustrativo y no limitativo, succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-amidometilcoumarina (LLVY-AMC) para la actividad de tipo quimotripsina, N-t-butiloxicarbonil-Leu-Ser-Thr-Arg-amidometilcoumarina (LSTR-AMC) para la actividad de tipo tripsina, y benciloxicarbonil-Leu-Leu-Glu-amidometilcoumarina (LLE-AMC) para la actividad de peptidilglutamil-péptido hidrolasa.

15 Las células EPR de la preparación pueden tener una acumulación media de conjugados de ubiquitina que es inferior al 50 por ciento de la acumulación media de conjugados de ubiquitina para un número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos (es decir, de pacientes humanos adultos con edades entre 25-80, más preferiblemente adultos con edades de 50-80), y más preferiblemente inferior al 40, 30, 20 o incluso 10 por ciento de la acumulación media de conjugados de ubiquitina del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos. La acumulación de conjugados de ubiquitina se puede medir, a modo de ejemplo ilustrativo y no limitativo, usando los protocolos descritos en Zhang et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Agosto 2008, vol. 49 n° 8 3622-3630.

25 Se puede administrar uno o más inhibidores de angiogénesis en combinación con la preparación de células EPR, preferiblemente en una cantidad terapéuticamente efectiva para la prevención o el tratamiento de la enfermedad ocular, tal como enfermedad ocular asociada a angiogénesis. Los ejemplos de enfermedades oculares incluyen la degeneración macular (p.ej., AMD húmeda o AMD seca), retinopatía diabética y neovascularización coroidal. Los ejemplos de inhibidores de angiogénesis incluyen antagonistas de VEGF, tal como inhibidores de VEGF y/o un receptor de VEGF (VEGFR, p.ej., VEGFR1 (FLT1, FLT), VEGFR2 (KDR, FLK1, VEGFR, CD309), VEGFR3 (FLT4, PCL)), tal como péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, químicos, o ácidos nucleicos, p.ej., pegaptanib sódico, aflibercept, bevasiranib, rapamicina, AGN-745, vitalanib, pazopanib, NT-502, NT-503 o PLG101, CPD791 (un conjugado di-Fab' polietileno glicol (PEG) que inhibe VEGFR-2), anticuerpos anti-VEGF o fragmentos funcionales de los mismos (tales como bevacizumab (AVASTIN®) o ranibizumab (LUCENTIS®)), o anticuerpo anti-receptor de VEGF (tal como IMC-1121(B) (un anticuerpo monoclonal de VEGFR-2), o IMC-18F1 (un anticuerpo del dominio de unión extracelular de VEGFR-1)). Otros ejemplos adicionales de inhibidores de actividad de VEGF incluyen fragmentos o dominios de receptor de VEGF, un ejemplo de los cuales es la trampa de VEGF (Aflibercept), una proteína de fusión de dominio 2 de receptor VEGFR-1 y el dominio 3 de VEGFR-2 con el fragmento Fc de IgG1. Otro ejemplo de inhibidores de VEGFR es AZD-2171 (Cediranib), que inhibe los receptores 1 y 2 de VEGF. Otros ejemplos adicionales de antagonistas de VEGF incluyen inhibidores de tirosina quinasa (TKIs), que incluyen TKIs que se ha reportado que inhiben VEGFR-1 y/o VEGFR-2, tal como sorafenib (Nexavar), SU5416 (Semaxinib), SU11248/Sunitinib (Sutent), y Vandetanib (ZD 6474). Otros ejemplos adicionales de antagonistas de VEGF incluyen Ly317615 (Enzastaurina), que se cree que está dirigida contra una quinasa aguas abajo implicada en la señalización de VEGFR (proteína quinasa C). Otros ejemplos adicionales de inhibidores de angiogénesis incluyen inhibidores de actividad de alfa5beta1 integrina, que incluyen anticuerpos anti-alfa5beta1 integrina o fragmentos funcionales de los mismos (tal como volociximab), un péptido, peptidomimético, molécula pequeña, químico o ácido nucleico tal como ácido 3-(2-((1-alquil-5-[[piridin-2-ilamino]-metil]-pirrolidin-3-iloxi)-acetilamino)-2-(alquil-amino)-propiónico, ácido (S)-2-[[2,4,6-trimetilfenil]sulfonil]amino-3-[7-benciloxicarbonil-8-(2-[[piridinilaminometil]-1-oxa-2,7-diazaspiro-(4,4)-non-2-en-3-il]carbonilamino propiónico, EMD478761 o RC*D(ThioP)C* (Arg-Cys-Asp-Tioproilina-Cys; los asteriscos denotan ciclación mediante un enlace disulfuro a través de los residuos de cisteína). Los ejemplos adicionales de inhibidores de angiogénesis incluyen 2-metoxiestradiol, inhibidores de alfaVbeta3, angiopoyetina 2, esteroides angiostáticos y heparina, angiostatina, moléculas relacionadas con angiostatina, anticuerpos anti-alfa5beta1 integrina, anticuerpos anti-catepsina S, fragmento III de antitrombina, bevacizumab, calreticulina, canstatina, carboxiamidotriazol, factor inhibidor de angiogénesis derivado de cartilago, CDAI, CM101, CXCL10, endostatina, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-12, IL-18, IL-4, linomida, maspina, inhibidores de matriz de metaloproteínasa, Meth-1, Meth-2, osteopontina, pegaptanib, factor plaquetario 4, prolactina, proteína relacionada con proliferina, protrombina (domino 2 de kringle), ranibizumab, restina, NRP-1 soluble, VEGFR-1 soluble, SPARC, SU5416, suramina, tecogalan, tetratiomolibdato, talidomida, lenalidomida, trombospondina, TIMP, TNP-470, TSP-1, TSP-2, vasostatina, antagonistas de VEGFR, VEGI, volociximab (también conocido como M200), un fragmento de fibronectina tal como anastelina (véase Yi y Ruoslahti, Proc Natl Acad Sci U S A 2001, enero 16; 98(2): 620-4) o cualquier combinación de los mismos. Dicho inhibidor de angiogénesis preferiblemente está en una cantidad suficiente para prevenir o tratar una enfermedad ocular proliferativa (neovascular), tal como membrana neovascular coroidal (CNV) asociada a AMD húmeda y otras enfermedades de la retina. Ejemplos adicionales de inhibidores de angiogénesis incluyen; lenvatinib (E7080), motesanib (AMG 706), pazopanib (Votrient), y un antagonista de IL-6 tal como anticuerpo anti-IL-6. Ejemplos adicionales de inhibidores de angiogénesis incluyen fragmentos, miméticos, quimeras, fusiones, análogos y/o dominios de cualquiera de los

- anteriores. Ejemplos adicionales de inhibidores de angiogénesis incluyen combinaciones de cualquiera de los anteriores. En un ejemplo de realización, la preparación de células EPR comprende un anticuerpo anti-VEGF, p.ej., bevacizumab, tal como entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 6,0 mg, p.ej., aproximadamente 1,25 mg y aproximadamente 2,5 mg de bevacizumab, por inyección en el ojo. En ejemplos adicionales de realizaciones, la preparación de células EPR comprende uno o más inhibidores de actividad de VEGF y uno o más inhibidores de la actividad de alfa5beta1 integrina.
- 5 Se puede administrar uno o más agentes anti-inflamatorios en combinación con la preparación de células EPR. Los ejemplos de agentes anti-inflamatorios incluyen: glucocorticoides, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, aspirina, ibuprofeno, naproxeno, inhibidores de la enzima ciclooxigenasa (COX), aldosterona, beclometasona, betametasona, corticosteroides, cortisol, acetato de cortisona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, acetato de fludrocortisona, acetona de fluocinolona (p.ej., ILUVIEN®), glucocorticoides, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, esteroides y triamcinolona. Opcionalmente, el agente anti-inflamatorio puede no ser un corticosteroide. Por ejemplo, el agente anti-inflamatorio puede ser un agente anti-inflamatorio no esteroideo.
- 10 Adicionalmente, el paciente puede no recibir un corticosteroide antes, concurrentemente y/o posteriormente a la administración de la preparación de células EPR. Sin pretender establecer una teoría, los solicitantes plantean la hipótesis de que la administración de un corticosteroide puede interferir con el asentamiento y/o injerto de las células EPR. En determinadas realizaciones preferidas el paciente no es tratado con prednisolona o metilprednisolona antes, concurrentemente y/o posteriormente a la administración de la preparación de células EPR. En una realización más preferida el paciente no es tratado con prednisolona antes, concurrentemente y/o posteriormente a la administración de la preparación de células EPR. Por ejemplo, el paciente no puede ser administrado con prednisolona o metilprednisolona u otro corticosteroide en un plazo de al menos 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 o 120 horas, o más, antes de la administración de la preparación de células EPR. Adicionalmente, el paciente no puede ser administrado con prednisolona o metilprednisolona u otro corticosteroide en un plazo de al menos 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 o 120 horas, o más, después de la administración de la preparación de células EPR.
- 15 El paciente puede ser administrado con un inmunosupresor no corticosteroide antes y/o después de la administración de la preparación de células EPR. Los ejemplos de inmunosupresores no corticosteroides incluyen tacrolimus (macrólido FK-506) y MMF (profármaco de ácido micofenólico).
- 20 Se puede administrar uno o más antioxidantes, cofactores de antioxidante y/u otros factores que contribuyen a un aumento de la actividad antioxidante en combinación con la preparación de células EPR, cuyos ejemplos pueden incluir OT-551 (Othera), vitamina C, vitamina E, beta caroteno, zinc (p.ej., óxido de zinc), y/o cobre (p.ej., óxido de cobre).
- 25 Se puede administrar uno o más xantófilos maculares (tal como luteína y/o zeaxantina) administrados en combinación con la preparación de células EPR.
- 30 Se puede administrar uno o más ácidos grasos omega-3 de cadena larga, tal como ácido docosahexaenoico (DHA) y/o ácido eicosapentaenoico (EPA)), en combinación con la preparación de células EPR.
- 35 Se puede administrar uno o más inhibidores amiloides, tal como fenretinida, Arc-1905, copaxona (acetato de glatiramer, Teva), RN6G (PF-4382923, Pfizer) (un anticuerpo monoclonal humanizado contra ABeta40 y ABeta42), GSK933776 (GlaxoSmithKline) (anticuerpo anti-amiloide), en combinación con la preparación de células EPR.
- 40 Se puede administrar uno o más agonistas de factor neurotrófico ciliar (CNTF) (p.ej., CNTF que ha sido administrado en un dispositivo intraocular tal como NT-501 (Neurotech)) en combinación con la preparación de células EPR.
- Se puede administrar uno o más inhibidores de RPE65, tal como ACU-4429 (Aculea, Inc.) en combinación con la preparación de células EPR.
- Se puede administrar uno o más factores dirigidos a la acumulación de A2E y/o lipofuscina, tal como fenretinida y ACU-4429, en combinación con la preparación de células EPR.
- 45 Se puede administrar uno o más reguladores a la baja o inhibidores de la función y/o el metabolismo fotorreceptor, tal como fenretinida y ACU-4429, en combinación con la preparación de células EPR.
- Se puede administrar uno o más agonistas de receptor α 2-adrenérgico, tal como tartrato de brimonidina, en combinación con la preparación de células EPR.
- 50 Se puede administrar uno o más agonistas de serotonina 1A selectivos, tal como tandospirona (AL-8309B), en combinación con la preparación de células EPR.
- En combinación con la preparación de células EPR se puede administrar uno o más factores dirigidos a C-5, complejo de ataque a membrana (C5b-9) y/o cualquier otro componente Drusen, cuyos ejemplos incluyen inhibidores de factores de complemento D, C-3, C-3a, C5 y C5a, y/o agonistas de factor H, tal como ARC1905 (Ophthotec) (un aptámero anti-C5 que inhibe C5 de forma selectiva), POT-4 (Potentia) (un derivado de compstatina que inhibe C3), factor de

complemento H, Eculizumab (Soliris, Alexion) (un anticuerpo de IgG humanizado que inhibe C5) y/o FCFD4514S (Genentech, San Francisco) (un anticuerpo monoclonal contra factor de complemento D).

Se puede administrar uno o más inmunosupresores, tal como sirolimus (rapamicina) en combinación con la preparación de células EPR.

5 Se puede administrar uno o más agentes que previenen o tratan la acumulación de lipofuscina, tal como piracetam, centrofenoxina, acetil-L-carnitina, Ginko Biloba o un extracto o preparación de los mismos, y/o DMAE (dimetiletanolamina), en combinación con la preparación de células EPR.

10 Cuando se administra uno o más agentes (tal como inhibidores de angiogénesis, antioxidantes, cofactores de antioxidante, otros factores que contribuyen al aumento de actividad antioxidante, xantófilos maculares, ácidos grasos omega-3 de cadena larga, inhibidores amiloides, agonistas de CNTF, inhibidores de RPE65, factores dirigidos a la acumulación de A2E y/o lipofuscina, reguladores a la baja o inhibidores de la función y/o el metabolismo fotorreceptor, agonistas de receptor α 2-adrenérgico, agonistas de serotonina 1A selectivos, factores dirigidos a C-5, complejo de ataque a membrana (C5b-9) y/o cualquier otro componente Drusen, inmunosupresores, agentes que previenen o tratan la acumulación de lipofuscina, etc.) en combinación con la preparación de células EPR, dicho agente puede administrarse concurrentemente, antes y/o posteriormente a dicha preparación de células EPR. Por ejemplo, dicho agente puede administrarse al ojo del paciente durante el procedimiento en el que dicha preparación de células EPR es introducida en el ojo de dicho paciente. La administración de dicho agente puede comenzar antes y/o continuar después de la administración de dichas células EPR en el ojo del paciente. Por ejemplo, dicho agente puede proporcionarse en disolución, suspensión, como una forma de liberación sostenida, y/o en un sistema de administración sostenida (p.ej., el sistema de administración Allergan Novadur™, el NT-501, u otro dispositivo intraocular o sistema de liberación sostenida).

25 Las poblaciones de células EPR pueden incluir células EPR diferenciadas de niveles variables de madurez, o pueden ser sustancialmente puras en relación a las células EPR diferenciadas de un nivel particular de madurez. Las células EPR pueden ser una preparación sustancialmente purificada que comprende células EPR de niveles variables de madurez/pigmentación. Por ejemplo, el cultivo sustancialmente purificado de células EPR puede contener tanto células EPR diferenciadas como células EPR diferenciadas maduras. Entre las células EPR maduras, el nivel de pigmento puede variar. Sin embargo, las células EPR maduras pueden distinguirse visualmente de las células EPR basadas por el aumento del nivel de pigmentación y por la forma más de columna. La preparación sustancialmente purificada de células EPR comprende células EPR de diferentes niveles de madurez (p.ej., células EPR diferenciadas y células EPR diferenciadas maduras). En tales casos, puede existir variabilidad a lo largo de la preparación con respecto a la expresión de marcadores indicativos de la pigmentación. La pigmentación de las células EPR del cultivo celular puede ser homogénea. Además, la pigmentación de las células EPR del cultivo celular puede ser heterogénea, y el cultivo de células EPR puede comprender tanto células EPR diferenciadas como células EPR maduras. Las preparaciones que comprenden células EPR incluyen preparaciones que son sustancialmente puras, con respecto a los tipos de células que no son EPR, pero que contienen una mezcla de células EPR diferenciadas y células EPR diferenciadas maduras. Las preparaciones que comprenden células EPR también incluyen preparaciones que son sustancialmente puras con respecto tanto a los tipos de células que no son EPR como con respecto a las células EPR de otros niveles de madurez.

40 El porcentaje de células EPR diferenciadas maduras en el cultivo puede reducirse disminuyendo la densidad del cultivo. De este modo, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender adicionalmente el subcultivo de una población de células EPR maduras para producir un cultivo que contiene un porcentaje más pequeño de células EPR maduras. El número de células EPR en la preparación incluye células EPR diferenciadas, independientemente del nivel de madurez e independientemente de los porcentajes relativos de células EPR diferenciadas y células EPR diferenciadas maduras. El número de células EPR en la preparación se refiere al número de células EPR diferenciadas o células EPR maduras. La preparación puede comprender al menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de células EPR diferenciadas. La preparación puede comprender al menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de células EPR maduras. La preparación de células EPR puede comprender una población mixta de células EPR diferenciadas y células EPR maduras.

50 La descripción proporciona un cultivo celular que comprende células EPR humanas que están pigmentadas y que expresan al menos un gen que no es expresado en una célula que no es una EPR humana. Por ejemplo, aunque dichas células EPR pueden tener sustancialmente la misma expresión de RPE65, PEDF, CRALBP y bestrofina que una célula EPR humana natural. Las células EPR pueden variar, dependiendo del nivel de madurez, con respecto a la expresión de uno o más de PAX2, Pax 6, MITF y/o tirosinasa. Nótese que los cambios en la pigmentación post-diferenciación también se correlacionan con los cambios en la expresión de PAX2. Las células EPR maduras pueden distinguirse de las células EPR en el nivel de pigmentación, el nivel de expresión de PAX2, Pax 6 y/o tirosinasa. Por ejemplo, las células EPR maduras pueden presentar un mayor nivel de pigmentación o un mayor nivel de expresión de PAX2, Pax 6 y/o tirosinasa en comparación con las células EPR.

60 Las preparaciones pueden estar sustancialmente purificadas, con respecto a células que no son EPR, que comprenden al menos aproximadamente un 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

o 100% de células EPR. La preparación de células EPR puede estar esencialmente libre de células que no son EPR o constar de células EPR. Por ejemplo, la preparación sustancialmente purificada de células EPR puede comprender menos de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de tipos celulares que no son EPR. Por ejemplo, la preparación de células EPR puede comprender menos de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% o 0,0001% de células que no son EPR.

Las preparaciones de células EPR pueden ser sustancialmente puras, tanto con respecto a células que no son EPR como con respecto a células EPR de otros niveles de madurez. Las preparaciones pueden estar sustancialmente purificadas, con respecto a células que no son EPR, y enriquecidas para células EPR maduras. Por ejemplo, en las preparaciones de células EPR enriquecidas para células EPR maduras, al menos aproximadamente el 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99% o 100% de las células EPR son células EPR maduras. Las preparaciones pueden estar sustancialmente purificadas, con respecto a células que no son EPR, y enriquecidas en células EPR diferenciadas más que en células EPR maduras. Por ejemplo, al menos aproximadamente el 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de las células EPR pueden ser células EPR diferenciadas más que células EPR maduras.

Las preparaciones de células EPR pueden comprender al menos aproximadamente 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} células EPR. Las preparaciones de células EPR pueden comprender al menos aproximadamente 5.000-10.000, 50.000-100.000, 100.000-200.000, 200.000-500.000, 300.000-500.000 o 400.000-500.000 células EPR. La preparación de células EPR puede comprender al menos aproximadamente 20.000-50.000 células EPR. Asimismo, la preparación de células EPR puede comprender al menos aproximadamente 5.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 75.000, 80.000, 100.000 o 500.000 células EPR.

Las preparaciones de células EPR pueden comprender al menos aproximadamente 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} células EPR/mL. Las preparaciones de células EPR pueden comprender al menos aproximadamente 5.000-10.000, 50.000-100.000, 100.000-200.000, 200.000-500.000, 300.000-500.000 o 400.000-500.000 células EPR/mL. La preparación de células EPR puede comprender al menos aproximadamente 20.000-50.000 células EPR/mL. Asimismo, la preparación de células EPR puede comprender al menos aproximadamente 5.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 75.000, 80.000, 100.000 o 500.000 células EPR/mL.

Las preparaciones descritas en la presente memoria pueden estar sustancialmente libres de contaminación o infección bacteriana, vírica o fúngica, que incluye, aunque sin limitación, la presencia de VIH 1, VIH 2, HBV, HCV, CMV, HTLV 1, HTLV 2, parvovirus B19, virus de Epstein-Barr, o herpesvirus 6. Las preparaciones descritas en la presente memoria pueden estar sustancialmente libres de contaminación o infección micoplasmática.

Las células EPR descritas en la presente memoria también pueden actuar como células EPR funcionales después del trasplante, en donde las células EPR forman una monocapa entre la retina neurosensora y el coroides en el paciente que recibe las células trasplantadas. Las células EPR también pueden suministrar nutrientes a fotorreceptores adyacentes y disponer de segmentos exteriores de fotorreceptor mudados por fagocitosis. Adicionalmente, las células EPR descritas en la presente memoria pueden tener un mayor potencial proliferativo que las células derivadas de donantes oculares (p.ej., las células EPR son "más jóvenes" que las de donantes oculares). Esto permite que la célula EPR descrita en la presente memoria tenga una mayor esperanza de vida útil que las células derivadas de donantes de ojos.

Las preparaciones que comprenden células EPR pueden prepararse siguiendo Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, del inglés "Good Manufacturing Practices") (p.ej., las preparaciones cumplen con GMP) y/o Buenas Prácticas de Tejido (GTP, del inglés "Good Tissue Practices") (p.ej., las preparaciones cumplen con GTP).

Cultivos de células EPR

La presente descripción también proporciona cultivos sustancialmente purificados de células EPR, que incluyen células EPR humanas. Los cultivos EPR descritos en la presente memoria pueden comprender al menos aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000 o 9.000 células ERP. El cultivo puede comprender al menos aproximadamente 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 ,

2x10⁷, 3x10⁷, 4x10⁷, 5x10⁷, 6x10⁷, 7x10⁷, 8x10⁷, 9x10⁷, 1x10⁸, 2x10⁸, 3x10⁸, 4x10⁸, 5x10⁸, 6x10⁸, 7x10⁸, 8x10⁸, 9x10⁸, 1x10⁹, 2x10⁹, 3x10⁹, 4x10⁹, 5x10⁹, 6x10⁹, 7x10⁹, 8x10⁹, 9x10⁹, 1x10¹⁰, 2x10¹⁰, 3x10¹⁰, 4x10¹⁰, 5x10¹⁰, 6x10¹⁰, 7x10¹⁰, 8x10¹⁰ o 9x10¹⁰ células EPR.

5 Las células EPR pueden cultivarse adicionalmente para producir un cultivo de células EPR maduras. Las células EPR pueden ser maduradas, y las células EPR pueden cultivarse adicionalmente, por ejemplo, en medio EPR-GM/MM o MDBK MM hasta obtener el nivel deseado de maduración. Éste puede determinarse monitorizando el aumento del nivel de pigmentación durante la maduración. Como alternativa al medio EPR-GM/MM o MDBK MM, se puede usar un medio funcionalmente equivalente o similar. Independientemente del medio particular usado para madurar las células EPR, el medio puede estar suplementado opcionalmente con un factor de crecimiento para madurar las células EPR. Tanto las células EPR como las células EPR maduras son células EPR diferenciadas. Sin embargo, las células EPR maduras se caracterizan por un aumento del nivel de pigmento en comparación con las células EPR diferenciadas. El nivel de madurez y de pigmentación se puede modular aumentando o disminuyendo la densidad del cultivo de células EPR diferenciadas. De esta manera, un cultivo de células EPR puede cultivarse adicionalmente para producir células EPR maduras. Alternativamente, la densidad de un cultivo que contiene células EPR maduras puede reducirse para reducir el porcentaje de células EPR diferenciadas maduras y aumentar el porcentaje de células EPR diferenciadas.

20 Las células EPR pueden identificarse comparando los transcritos de ARN mensajero de dichas células con células derivadas *in vivo*. Se toma una alícuota de células a diferentes intervalos durante la diferenciación de células madre embrionarias en células EPR y se evalúa la expresión de cualquiera de los marcadores descritos anteriormente. Estas características distinguen las células EPR diferenciadas.

25 El cultivo de células EPR puede ser un cultivo sustancialmente purificado que comprende al menos aproximadamente el 30%, 35%, 40% o 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de células EPR diferenciadas. El cultivo sustancialmente purificado puede comprender al menos aproximadamente el 30%, 35%, 40% o 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de células EPR diferenciadas maduras.

Los cultivos de células EPR pueden prepararse siguiendo Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) (p.ej., las preparaciones cumplen con GMP) y/o Buenas Prácticas de Tejido (GTP) (p.ej., las preparaciones cumplen con GTP).

Preparaciones criopreservadas de células EPR

30 Las células EPR pueden almacenarse mediante cualquier método apropiado conocido en la técnica (p.ej., congelarse criogénicamente) y pueden congelarse a cualquier temperatura apropiada para el almacenamiento de las células. Por ejemplo, las células pueden congelarse a aproximadamente -20°C, -80°C, -120°C, -130°C, -135°C, -140°C, -150°C, -160°C, -170°C, -180°C, -190°C, -196°C, a cualquier otra temperatura apropiada para el almacenamiento de células. Las células congeladas criogénicamente pueden almacenarse en recipientes apropiados y prepararse para almacenamiento para reducir el riesgo de daño celular y maximizar la probabilidad de que las células sobrevivan a la descongelación. Las células EPR pueden ser criopreservadas inmediatamente después de la diferenciación, tras una maduración *in vitro*, o después de un determinado periodo de tiempo en cultivo. Las células EPR también pueden mantenerse a temperatura ambiente, o refrigerarse, por ejemplo, a aproximadamente 4°C.

40 De forma similar se proporcionan métodos de criopreservación de células EPR. Las células EPR pueden recolectarse, lavarse en tampón o medio, contarse, concentrarse (vía centrifugación), formularse en medio de congelación (p.ej., 90% de FBS/10% de DMSO), o cualquier combinación de estas etapas. Por ejemplo, las células EPR pueden sembrarse en varios recipientes de cultivo y expandirse en serie. Según se van recolectando las células EPR y manteniéndose en FBS a aproximadamente 4°C, mientras varios matraces de células EPR son combinados en un único lote. Las células EPR también pueden lavarse con disolución salina (p.ej., DPBS) al menos 1, 2, 3, 4 o 5 veces. Adicionalmente, las células EPR pueden criopreservarse después de que la distrofina se haya organizado en la membrana celular y la expresión de PAX6 sea baja. Adicionalmente, los viales se pueden marcar, con una etiqueta primaria y/o secundaria. La información de la etiqueta puede incluir el tipo de célula (p.ej., células hEPR), el número de lote y la fecha, el número de células (p.ej., 1x10⁶ células/mL), la fecha de caducidad (p.ej., fecha recomendada para la cual el vial debería ser usado), información de fabricación (p.ej., nombre y dirección), avisos, y el medio de almacenamiento (p.ej., almacenamiento en nitrógeno líquido).

50 Las preparaciones de células EPR criopreservadas descritas en la presente memoria pueden comprender al menos aproximadamente 50.000-100.000 células EPR. Las preparaciones de células EPR criopreservadas también pueden comprender al menos aproximadamente 20.000-500.000 células EPR. Asimismo, las preparaciones de células EPR criopreservadas pueden comprender al menos aproximadamente 5.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 75.000, 80.000 o 100.000 células EPR. Las preparaciones de células EPR criopreservadas pueden comprender al menos aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 75.000, 80.000, 100.000 o 500.000 células EPR. Las preparaciones de células EPR criopreservadas pueden comprender al menos aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 1x10⁴, 2x10⁴, 3x10⁴, 4x10⁴, 5x10⁴, 6x10⁴, 7x10⁴, 8x10⁴, 9x10⁴, 1x10⁵, 2x10⁵, 3x10⁵, 4x10⁵, 5x10⁵, 6x10⁵, 7x10⁵, 8x10⁵, 9x10⁵, 1x10⁶, 2x10⁶, 3x10⁶, 4x10⁶, 5x10⁶, 6x10⁶, 7x10⁶, 8x10⁶, 9x10⁶, 1x10⁷, 2x10⁷, 3x10⁷, 4x10⁷, 5x10⁷, 6x10⁷, 7x10⁷, 8x10⁷, 9x10⁷,

1x10⁸, 2x10⁸, 3x10⁸, 4x10⁸, 5x10⁸, 6x10⁸, 7x10⁸, 8x10⁸, 9x10⁸, 1x10⁹, 2x10⁹, 3x10⁹, 4x10⁹, 5x10⁹, 6x10⁹, 7x10⁹, 8x10⁹, 9x10⁹, 1x10¹⁰, 2x10¹⁰, 3x10¹⁰, 4x10¹⁰, 5x10¹⁰, 6x10¹⁰, 7x10¹⁰, 8x10¹⁰ o 9x10¹⁰ células EPR. Las células EPR de las preparaciones de células EPR criopreservadas pueden ser células EPR de mamífero, que incluyen células EPR humanas.

5 Adicionalmente, las preparaciones de células EPR criopreservadas descritas en la presente memoria pueden comprender al menos aproximadamente 50.000-100.000 células EPR/mL. Las preparaciones de células EPR criopreservadas también pueden comprender al menos aproximadamente 20.000-500.000 células EPR/mL. También, las preparaciones de células EPR criopreservadas pueden comprender al menos aproximadamente 5.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 75.000, 80.000 y 100.000 células EPR/mL. Las preparaciones de células EPR
10 criopreservadas pueden comprender al menos aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 75.000, 80.000, 100.000 o 500.000 células EPR/mL. Las preparaciones de células EPR criopreservadas pueden comprender al menos aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 1x10⁴, 2x10⁴, 3x10⁴, 4x10⁴, 5x10⁴, 6x10⁴, 7x10⁴, 8x10⁴, 9x10⁴, 1x10⁵, 2x10⁵, 3x10⁵, 4x10⁵, 5x10⁵, 6x10⁵, 7x10⁵, 8x10⁵, 9x10⁵, 1x10⁶, 2x10⁶, 3x10⁶, 4x10⁶, 5x10⁶, 6x10⁶, 7x10⁶, 8x10⁶, 9x10⁶, 1x10⁷, 2x10⁷, 3x10⁷, 4x10⁷, 5x10⁷,
15 6x10⁷, 7x10⁷, 8x10⁷, 9x10⁷, 1x10⁸, 2x10⁸, 3x10⁸, 4x10⁸, 5x10⁸, 6x10⁸, 7x10⁸, 8x10⁸, 9x10⁸, 1x10⁹, 2x10⁹, 3x10⁹, 4x10⁹, 5x10⁹, 6x10⁹, 7x10⁹, 8x10⁹, 9x10⁹, 1x10¹⁰, 2x10¹⁰, 3x10¹⁰, 4x10¹⁰, 5x10¹⁰, 6x10¹⁰, 7x10¹⁰, 8x10¹⁰ o 9x10¹⁰ células EPR/mL. Las células EPR de las preparaciones de células EPR criopreservadas pueden ser células EPR de mamífero, que incluyen células EPR humanas.

20 Las células EPR de la descripción pueden recuperarse del almacenamiento tras criopreservación. Las células EPR recuperadas de criopreservación también mantienen su estatus de viabilidad y diferenciación. Por ejemplo, al menos aproximadamente el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de las células EPR pueden retener la viabilidad y la diferenciación después de la criopreservación. Adicionalmente, las células EPR de la descripción pueden ser criopreservadas y mantener su viabilidad tras ser almacenadas durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o
25 7 días. Las células EPR de la descripción también pueden ser criopreservadas y mantener su viabilidad tras ser almacenadas durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Las células EPR de la descripción pueden ser criopreservadas y mantener su viabilidad tras ser almacenadas durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 años. Por ejemplo, las células EPR de la descripción pueden ser criopreservadas durante al menos 4 años y mostrar al menos aproximadamente un 80% de viabilidad. La preparación de
30 criopreservación que comprende células EPR puede estar sustancialmente libre de DMSO.

Métodos para producir células EPR

Las poblaciones celulares analizadas por los métodos objeto pueden producirse a partir de células madre pluripotentes. Los tipos celulares que pueden producirse incluyen, aunque sin limitación, células EPR, células progenitoras de EPR, células epiteliales pigmentadas del iris (EPI), y otras células neurales asociadas a la visión, tal como neuronas internunciales (p.ej., neuronas de "relevo" de la capa nuclear interna (INL)) y células de amacrina. Adicionalmente, se pueden producir células retinales, bastones, conos y células de córnea. Las células que proporcionan la vasculatura del ojo también se pueden producir mediante los métodos descritos en la presente memoria.

40 Sin pretender establecer ninguna teoría particular, los inventores observaron que los métodos descrito en la presente memoria pueden actuar de FGF, EGF, WNT4, TGF-beta y/o estrés oxidativo para señalizar rutas de MAP-quinasa y quinasa terminal potencial C Jun para inducir la expresión del factor de transcripción de caja-emparejada 6 (PAX6). PAX6 actúa sinérgicamente con PAX2 para diferenciar terminalmente EPR madura a través de la coordinación de MITF y Otx2 para transcribir genes específicos de EPR tales como tirosinasa (Tyr), y dianas aguas abajo tales como RPE 65, bestrofina, CRALBP y PEDF. Véase el documento WO 2009/051671, Figura 1.

45 Las células EPR descritas en la presente memoria se pueden diferenciar de células madre pluripotentes, tal como células madre embrionarias humanas, y pueden ser distintas molecularmente de las células madre embrionarias, las células EPR derivadas de adulto y las células EPR derivadas de feto. Por ejemplo, las etapas del proceso de fabricación descritas en la presente memoria pueden conferir características estructurales y funcionales distintivas al producto de células EPR final, de tal modo que dichas células se asemejan estrechamente a células EPR nativas y
50 son distintas de células EPR derivadas de feto o líneas de células EPR (p.ej., ARPE19).

Los solicitantes han descrito previamente métodos para producir EPR a partir de células pluripotentes. Véanse las Patentes de EE.UU. nº 7736896, 7795025 y 7794704, y las solicitudes internacionales publicadas WO/2012/012803 y WO 2011/063005, cada una de las cuales se incorporan a la presente memoria a modo de referencia en su totalidad. El EPR puede producirse a partir de células pluripotentes cultivadas como poblaciones multicapa o cuerpos embrioides. Por ejemplo, los cuerpos embrioides pueden formarse cultivando células pluripotentes en condiciones no unidas, p.ej., un sustrato de baja adherencia o en una "gota colgante". En estos cultivos, las células ES pueden formar cúmulos o agrupaciones de células denominados cuerpos embrioides. Véase Itskovitz-Eldor et al., Mol Med. 2000 Feb; 6(2): 88-95, que se incorpora a la presente memoria en su totalidad a modo de referencia. Típicamente, los cuerpos embrioides se forman inicialmente como cúmulos o agrupaciones sólidas de células pluripotentes, y con el tiempo algunos de los cuerpos embrioides llegan a incluir cavidades rellenas de fluido, siendo los primeros referidos en la
60

bibliografía como EBs “simples” y los últimos como cuerpos embrioides “císticos”. Id. Como han publicado previamente los solicitantes, las células de estos EBs (las formas tanto sólidas como císticas) pueden diferenciarse y con el tiempo producir números crecientes de células EPR. Opcionalmente los EBs pueden ser cultivados a continuación como cultivos adherentes y se deja que se formen sobrecrecimientos. Del mismo modo, los solicitantes han publicado previamente que las células pluripotentes que se dejan sobrecrecer y formar una población celular multicapa pueden diferenciarse y formar células EPR con el tiempo. Una vez que se ha formado EPR, se identifica fácilmente en base sus características morfológicas, que incluye la pigmentación y la apariencia de adoquín, y puede aislarse para un uso posterior.

Las células pluripotentes pueden propagarse y mantenerse antes de la formación de células EPR usando cualesquier métodos de cultivo conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pluripotentes pueden cultivarse en presencia de células cebadoras, tales como células de ratón (p.ej., fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)), células cebadoras humanas (p.ej., células cutáneas adultas humanas, fibroblastos dérmicos neonatales (HDFs), etc.). Las células pluripotentes pueden cultivarse en cultivo xeno-libre, y/o en condiciones libres de cebador. Véase Klimanskaya et al., *Lancet*. 2005 May 7-13; 365 (9471): 1636-41; Richards et al., *Stem Cells*. 2003; 21(5): 546-56; Patente de EE.UU. nº 7.410.798; Ilic et al., *Stem Cells Dev*. 2009 Nov; 18(9): 1343-5; Xu et al. *Nat Biotechnol*. 2001 Oct; 19(10): 971-4. Por ejemplo, las células pluripotentes pueden cultivarse en una matriz. La matriz se puede seleccionar del grupo que consiste en: laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, colágeno VIII, sulfato de heparan, Matrigel(TM) (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)), CellStart, un extracto de membrana de base humano, y cualquier combinación de los mismos. La matriz puede ser de origen humano o animal no humano, tal como de origen bovino, de ratón o de rata. Las células pluripotentes pueden cultivarse en un medio acondicionado. Por ejemplo, el medio acondicionado puede acondicionarse mediante células pluripotentes, tal como células ES, células iPS, células cebadoras, células fetales, etc., cualquiera de las cuales pueden ser o no humanas.

Durante la formación de EPR, las células pluripotentes pueden cultivarse en presencia de un inhibidor de proteína quinasa asociada a rho (ROCK). Los inhibidores de ROCK se refieren a cualquier sustancia que inhibe o reduce la función de la quinasa asociada a Rho o su ruta de señalización en una célula, tal como una molécula pequeña, un siARN, un miARN, un ARN antisentido, o similar. “Ruta de señalización ROCK”, tal como se usa en la presente memoria, puede incluir cualquier procesador de señal implicado en la ruta de señalización relacionada con ROCK, tal como la ruta de señalización Rho-ROCK-miosina II, su ruta de señalización aguas arriba, o su ruta de señalización aguas abajo en una célula. Un ejemplo de inhibidor de ROCK que puede usarse es la StemoLécula de Stemgent Y-27632, un inhibidor de proteína quinasa asociada a rho (ROCK) (véase Watanabe et al., *Nat Biotechnol*. 2007 Jun; 25(6): 681-6). Otros inhibidores de ROCK incluyen, p.ej., H-1152, Y-30141, Wf-536, HA-1077, hidroxilo-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 con concentraciones y/o condiciones de cultivo conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento US PGPub No. 2012/0276063. Por ejemplo, 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, que incluye cualquier rango derivable de los mismos, o cualquier concentración para promover el crecimiento celular o la supervivencia celular.

Por ejemplo, se puede mejorar la viabilidad de células pluripotentes mediante la inclusión de un inhibidor de ROCK. En un ejemplo de realización, las células pluripotentes pueden mantenerse en condiciones libres de cebador, tales como en Matrigel(TM) u otra matriz. Después de eso, se pueden formar cuerpos embrioides a partir de células pluripotentes que se disocian sin el uso de tripsina, tal como usando EDTA, colagenasa, o mecánicamente. Los cuerpos embrioides pueden formarse en un medio de cultivo que comprende Y-27632 u otro inhibidor de ROCK. Por ejemplo, el inhibidor de ROCK puede promover la viabilidad celular en cuerpos embrioides formados a partir de células pluripotentes cultivadas en Matrigel(TM) u otra matriz. De este modo se puede mejorar el rendimiento de células EPR.

Un ejemplo de método para producir una célula EPR comprende: (a) proporcionar células madre pluripotentes; (b) cultivar las células madre pluripotentes como cuerpos embrioides en medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, en donde el medio comprende opcionalmente suplemento B 27 libre de suero; (c) cultivar los cuerpos embrioides como un cultivo adherente en medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, en donde el medio comprende opcionalmente suplemento B 27 libre de suero; (d) cultivar el cultivo adherente de células de (c) en medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, en donde el medio comprende opcionalmente suplemento B 27 libre de suero; (e) cultivar las células de (d) en medio capaz de soportar el crecimiento de un cultivo de células somáticas de alta densidad, en donde las células EPR aparecen en el cultivo de células; (f) disociar las células o cúmulos de células del cultivo de (e), preferiblemente de forma mecánica o química (p.ej., usando una proteasa u otra enzima, u otro medio de disociación); (g) seleccionar las células EPR del cultivo y transferir las células EPR a un cultivo separado que contiene medio suplementado con un factor de crecimiento para producir un cultivo enriquecido de células EPR; y (g) propagar el cultivo enriquecido de células EPR para producir una célula EPR. Estas etapas del método pueden llevarse a cabo al menos una vez para producir un cultivo sustancialmente purificado de células EPR. Adicionalmente, estas etapas del método pueden repetirse al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces para producir más células EPR.

Adicionalmente, la descripción también proporciona un método para producir una célula epitelial pigmentaria de la retina (EPR) madura que comprende: (a) proporcionar células madre pluripotentes; (b) cultivar las células madre pluripotentes; (b) cultivar las células madre pluripotentes como cuerpos embrioides en medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, en donde el medio comprende opcionalmente suplemento B 27 libre de suero; (c) cultivar los cuerpos embrioides como un cultivo adherente en medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, en donde el medio comprende opcionalmente suplemento B 27 libre de suero; (d) cultivar el cultivo adherente de células de la etapa (c) en medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, en donde el medio no comprende suplemento B 27 libre de suero; (e) cultivar las células de (d) en medio capaz de soportar el crecimiento de cultivo de células somáticas de alta densidad, mediante lo cual aparecen las células EPR en el cultivo de células; (f) disociar las células o cúmulos de células del cultivo de (e), preferiblemente de forma mecánica o química (p.ej., usando una proteasa u otra enzima, u otro medio de disociación); (g) seleccionar las células EPR del cultivo y transferir las células EPR a un cultivo separado que contiene medio suplementado con un factor de crecimiento para producir un cultivo enriquecido de células EPR; (h) propagar el cultivo enriquecido de células EPR; e (i) cultivar el cultivo enriquecido de células EPR para producir una célula EPR madura. Estas etapas del método se pueden llevar a cabo al menos una vez para producir un cultivo sustancialmente purificado de células EPR maduras. Adicionalmente, estas etapas del método se pueden repetir al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces para producir más células EPR maduras.

Para cualquiera de las etapas articuladas, las células pueden cultivarse durante al menos aproximadamente 1-10 semanas. Por ejemplo, las células pueden cultivarse durante al menos aproximadamente 3-6 semanas. Para cualquiera de las etapas articuladas, las células pueden cultivarse durante entre aproximadamente 1 día y 50 días, por ejemplo, durante al menos aproximadamente 1-3, 3-4, 7, 4-9, 7-10, 7-12, 8-11, 9-12, 7-14, 14-21 y 3-45 días. Las células pueden cultivarse durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 días. Las células se pueden cultivar durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas. Por ejemplo, las células pueden cultivarse durante 2-4 y 3-6 horas. Para cada una de las etapas del método articuladas anteriormente, las células se pueden cultivar durante el mismo periodo de tiempo en cada etapa o durante periodos de tiempo diferentes en una o más de las etapas. Adicionalmente, cualquiera de las etapas del método articuladas anteriormente se puede repetir para producir más células EPR (p.ej., escalarse para producir grandes cantidades de células EPR).

En los métodos descritos en la presente memoria, las células EPR pueden comenzar a diferenciarse de las células del cultivo adherente de EBs. Las células EPR pueden reconocerse visualmente en base a su morfología de adoquín y a la apariencia inicial de la pigmentación. Según continúan diferenciándose las células EPR, pueden observarse agrupaciones de células EPR.

Se pueden usar métodos mecánicos o enzimáticos para seleccionar células EPR de entre las agrupaciones de células que no son EPR en un cultivo de cuerpo embriode, o para facilitar el sub cultivo de células adherentes. Los ejemplos de métodos mecánicos incluyen, aunque sin limitación, trituración con una pipeta o corte con una aguja de extracción. Los ejemplos de métodos enzimáticos incluyen, aunque sin limitación, cualesquier enzimas apropiadas para disociar células (p.ej., tripsina (p.ej., tripsina/EDTA), colagenasa (p.ej., colagenasa B, colagenasa IV), dispasa, papaína, mezcla de colagenasa y dispasa, una mezcla de colagenasa y tripsina). Se puede usar una disolución no enzimática para disociar las células, tal como una disolución con alto contenido en EDTA, p.ej., tampón de disociación celular basado en Hanks.

Las células EPR pueden diferenciarse a partir de los cuerpos embrioides. El aislamiento de células EPR a partir de EBs permite la expansión de las células EPR en un cultivo enriquecido *in vitro*. Para células humanas, las células EPR pueden obtenerse de EBs crecidos durante menos de 90 días. Adicionalmente, las células EPR pueden surgir en EBs humanos cultivados durante al menos aproximadamente 7-14 días, 14-28 días, 28-45 días, o 45-90 días. El medio usado para cultivar células madre pluripotentes, cuerpos embrioides, y células EPR puede retirarse y/o reemplazarse por el mismo o diferente medio en cualquier intervalo. Por ejemplo, el medio puede retirarse y/o reemplazarse después de al menos aproximadamente 0-7 días, 7-10 días, 10-14 días, 14-28 días o 28-90 días. Adicionalmente, el medio puede reemplazarse al menos diariamente, cada dos días, o al menos cada 3 días.

Para enriquecer en células EPR y para establecer cultivos sustancialmente purificados de células EPR, las células EPR se pueden disociar unas de otras y de células que no son EPR usando métodos mecánicos y/o químicos (que incluyen métodos enzimáticos). A continuación, se puede transferir una suspensión de células EPR a medio fresco y a un recipiente de cultivo fresco para proporcionar una población enriquecida de células EPR.

Las células EPR se pueden seleccionar a partir de las células disociadas y ser cultivadas por separado para producir un cultivo de células EPR sustancialmente purificado. Las células EPR se seleccionan en base a las características asociadas a las células EPR. Por ejemplo, las células EPR se pueden reconocer por la morfología celular de adoquín y por la pigmentación. Adicionalmente, existen varios marcadores conocidos del EPR, que incluyen la proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), una proteína citoplasmática que también se encuentra en apical microvilli; RPE65, una proteína citoplasmática implicada en el metabolismo retinoide; la bestrofina, el producto del gen de distrofia macular viteliforme de Best (VMD2), y un factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF), una proteína secretada de 48 kD con propiedades angiostáticas. Los transcritos de ARN mensajero de estos marcadores pueden

ser evaluados usando PCR (p.ej., RT-PCR) o ensayos de transferencia Northern. Asimismo, se pueden evaluar los niveles de proteína de dichos marcadores usando tecnología de inmunotinción o ensayos de transferencia Western.

- 5 Las células EPR también pueden seleccionarse en base a la función celular, tal como mediante fagocitosis de segmentos exteriores de bastones y conos (o fagocitosis de otro sustrato, tal como partículas de poliestireno), absorción de luz extraviada, metabolismo de vitamina A, regeneración de retinoides y reparación de tejido. La evaluación también se puede llevar a cabo ensayando la función *in vivo* tras el implante de células EPR en un animal hospedante adecuado (tal como un animal humano o no humano que padece una afección natural o inducida de degeneración de la retina), p.ej., usando ensayos conductuales, angiografía fluorescente, histología, conductividad de uniones apretadas, o evaluación usando microscopía electrónica.
- 10 Los cultivos enriquecidos en células EPR pueden cultivarse en medio apropiado, por ejemplo, medio EGM 2. Éste, o un medio funcionalmente equivalente o similar, puede suplementarse con un factor de crecimiento o agente (p.ej., bFGF, heparina, hidrocortisona, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de tipo insulina recombinante, ácido ascórbico, o factor de crecimiento epidérmico humano). Las células EPR pueden ser estables fenotípicamente a lo largo de un periodo de tiempo largo en cultivo (p.ej., > 6 semanas).
- 15 Opcionalmente, el EPR puede cultivarse en presencia de un inhibidor de proteína quinasa asociada a rho (ROCK), tal como la Stemolécula de Stemgent Y-27632. Por ejemplo, el EPR puede cultivarse en presencia de un inhibidor de ROCK antes de la criopreservación.

Células madre pluripotentes

- 20 Los métodos descritos en la presente memoria pueden usar células diferenciadas (tal como células EPR) producidas a partir de células madre pluripotentes. Las células madre pluripotentes adecuadas incluyen, aunque sin limitación, células madre embrionarias, células madre derivadas de embrión y células madre pluripotentes inducidas, independientemente del método mediante el cual se deriva las células madre pluripotentes. Las células madre pluripotentes se pueden generar usando, por ejemplo, métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de células madre pluripotentes incluyen células madre embrionarias derivadas de la masa celular interior (ICM) de embriones en estadio de blastocisto, así como células madre embrionarias derivadas de uno o más blastómeros de un embrión de estadio de ruptura o de estadio de mórula sin destruir el resto del embrión. Dichas células madre embrionarias pueden generarse a partir de material embrionario producido mediante fertilización o por medios asexuales, que incluyen transferencia nuclear de célula somática (SCNT), partenogénesis, reprogramación celular y androgénesis.
- 25 Adicionalmente, las células madre pluripotentes adecuadas incluyen, aunque sin limitación, células madre embrionarias humanas, células madre derivadas de embrión humano, y células madre pluripotentes inducidas, independientemente del método mediante el cual se derivan las células madre pluripotentes.
- 30

- Las células madre pluripotentes (p.ej., células hES) pueden cultivarse como un cultivo de suspensión para producir cuerpos embrioides (EBs). Los cuerpos embrioides pueden cultivarse en suspensión durante aproximadamente 7-14 días. Sin embargo, en determinadas realizaciones, los EBs pueden cultivarse en suspensión menos de 7 días (menos de 7, 6, 5, 4, 3, 2 o menos de 1 día) o más de 14 días. Los EBs pueden cultivarse en medio suplementado con suplemento B 27.
- 35

- Tras cultivar los EBs en cultivo de suspensión, los EBs pueden ser transferidos para producir un cultivo adherente. Por ejemplo, los EBs pueden llevarse a placa sobre placas recubiertas de gelatina en medio. Cuando se cultivan como un cultivo adherente, los EBs pueden cultivarse en el mismo tipo de medios que cuando se cultivan en suspensión.
- 40 Los medios no pueden estar suplementados con suplemento B 27 cuando las células son cultivadas como un cultivo adherente. Asimismo, el medio se suplementa con B 27 inicialmente (p.ej., durante menos o igual a aproximadamente 7 días), pero después es cultivado en ausencia de B 27 durante el resto del periodo como cultivo adherente. Los EBs se pueden cultivar como cultivo adherente durante al menos aproximadamente 14-28. Sin embargo, en determinadas realizaciones, los EBs pueden cultivarse como un cultivo adherente durante menos de aproximadamente 14 días (menos de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o menos de 1 día) o más de aproximadamente 28 días.
- 45

Células madre embrionarias humanas

- Las células madre embrionarias humanas (hES) pueden usarse como célula madre pluripotente en los métodos descritos en la presente memoria. Las células madre embrionarias humanas (hES) incluyen la progenie de la masa celular interior (ICM) de un blastocisto o células derivadas de otra fuente, y pueden permanecer pluripotentes de manera virtualmente indefinida. Las células hES pueden derivar de uno o más blastómeros de un embrión de estadio de ruptura temprana, sin destruir o sin dañar el embrión. Las células hES se pueden producir usando transferencia nuclear. Las células hES también pueden ser células pluripotentes inducidas (células iPS) que se describen con más detalle más adelante. Asimismo, se pueden usar células hES criopreservadas. Las células hES pueden cultivarse de cualquier modo conocido en la técnica, tal como en presencia o ausencia de células cebadoras. Por ejemplo, las células hES pueden cultivarse en EB-DM, MDBK GM, medio hESC, medio de células madre de INVITROGEN®, OptiPro SFM, VP SFM, EGM 2 o MDBK MM. Véase la información de células madre (Cultivo de células madre embrionarias humanas (hESC)) [página web de NIH, 2010]. Las células hES se pueden usar y mantener de acuerdo a los estándares GMP.
- 50
- 55

5 Cuando se crecen en cultivo sobre una capa cebadora en condiciones definidas, las células hES mantienen una morfología específica, formando colonias planas consistentes en células pequeñas altamente empaquetadas con una ratio de núcleo a citoplasma elevada, límites claros entre las células, y límites de colonia refráctiles y definidos. Las células hES expresan un conjunto de marcadores moleculares, tal como proteína de unión a Octámero 4 (Oct-4, también conocida como Pou5f1), antígenos embrionarios específicos de estadio (SSEA) 3 y SSEA 4, antígeno de rechazo tumoral (TRA) 1 60, TRA 1 80, fosfatasa alcalina, NANOG y Rex 1. De forma similar a las células que se diferencian en linajes predeterminados, las células hES en cultivo pueden ser inducidas para diferenciarse. Por ejemplo, las células hES pueden diferenciarse en EPR humano en las condiciones definidas descritas en la presente memoria.

10 Las células madre embrionarias que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, MA01, MA04, MA09, ACT4, MA03, H1, H7, H9 y H14. Ejemplos adicionales de líneas celulares incluyen NED1, NED2, NED3, NED4 y NED5. Véase también el registro de células madre embrionarias humanas NIH. Un ejemplo de línea de células madre embrionarias humanas que puede usarse son las células MA09. El aislamiento y preparación de células MA09 se describió previamente en Klimanskaya, et al. (2006) "Human Embryonic Stem Cell lines Derived from Single Blastomeres". Nature 444: 481-485.

15 Las células hES pueden co-cultivarse inicialmente con células cebadoras embrionarias de ratón (MEF). Las células MEF pueden inactivarse mitóticamente mediante exposición a mitomicina C antes de sembrar las células hES en co-cultivo, y de esta manera las MEFs no se propagan en el cultivo. Adicionalmente, los cultivos de células hES se pueden examinar con microscopio y se pueden seleccionar y desechar las colonias que no tengan morfología de célula hES, p.ej., usando una herramienta de corte de células madre, con ablación por láser, u otros medios. Típicamente, tras el punto de recolección de las células hES para siembra de formación de cuerpo embriode, no se usan células MEF adicionales en el proceso. El tiempo entre la eliminación de MEF y la cosecha de las células EPR descritas en la presente memoria puede ser un mínimo de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco pasajes y al menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 días en cultivo celular libre de MEF. El tiempo entre la eliminación de MEF y la recolección de las células EPR también puede ser un mínimo de al menos aproximadamente 3 pasajes y al menos aproximadamente 80-90 días en cultivo celular libre de MEF. Debido a los métodos de producción descritos en la presente memoria, los cultivos de células EPR y las preparaciones descritas en la presente memoria pueden estar sustancialmente libres de fibroblastos de embrión de ratón (MEF) y de células madre embrionarias humanas (hES).

Células madre pluripotentes inducidas (células iPS)

30 Otros ejemplos de células madre pluripotentes incluyen células madre pluripotentes (células iPS) generadas mediante 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 somáticas fetales, post-natales, de recién nacido, juveniles o adultas. Las células iPS pueden obtenerse de un banco celular. Alternativamente, las células iPS pueden generarse desde cero (mediante métodos conocidos en la técnica) antes de comenzar la diferenciación a células EPR u otro tipo de célula. La fabricación de 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 particular o de un donante emparejado con el objetivo de generar células EPR emparejadas respecto al tejido. Las células iPS pueden producirse a partir de células que no son sustancialmente inmunogénicas en un receptor pretendido, p.ej., pueden producirse a partir de células autólogas o a partir de células histocompatibles con un receptor pretendido.

45 La célula madre pluripotente inducida puede producirse expresando o induciendo la expresión de uno o más factores de reprogramación en una célula somática. La célula somática es un fibroblasto, tal como un fibroblasto dérmico, fibroblasto sinovial, o fibroblasto pulmonar, o una célula somática no fibroblástica. La célula somática está programada para expresar al menos 1, 2, 3, 4, 5. Los factores de reprogramación pueden seleccionarse entre Oct 3/4, Sox2, NANOG, Lin28, c Myc, y Klf4. La expresión de los factores de reprogramación puede inducirse poniendo en contacto las células somáticas con al menos un agente, tal como un agente de molécula orgánica pequeña, que induce la expresión de factores de reprogramación.

50 La célula somática también puede ser reprogramada usando una estrategia combinatoria en donde el factor de reprogramación se expresa (p.ej., usando un vector vírico, plásmido, y similar) y se induce la expresión del factor de reprogramación (p.ej., usando una molécula orgánica pequeña). Por ejemplo, los factores de reprogramación se pueden expresar en la célula somática mediante infección usando un vector vírico, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral. Asimismo, los factores de reprogramación se pueden expresar en la célula somática usando un vector no integrativo, tal como un plásmido episomal. Véase, p.ej., Yu et al., Science. 8 Mayo 2009; 324 (5928): 797-801. Cuando se expresan los factores de reprogramación usando vectores no integrativos, los factores se pueden expresar 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 integrativos es suficiente para reprogramar una célula somática. En células humanas, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, NANOG y Lin28) usando vectores víricos integrativos es suficiente para reprogramar una célula somática.

Una vez que los factores de reprogramación son expresados en las células, las células pueden cultivarse. Con el tiempo, aparecen en el disco de cultivo células con características ES. Las células pueden seleccionarse y subcultivarse en base a, por ejemplo, la morfología ES, o en base a la expresión de un marcador seleccionable o detectable. Las células se pueden cultivar para producir un cultivo de células que se asemeje a células ES – estas son células iPS putativas.

Para confirmar la pluripotencia de las células iPS, las células se pueden evaluar en uno o más ensayos de pluripotencia. Por ejemplo, las células se pueden evaluar para la expresión de marcadores de células ES; las células se pueden evaluar para determinar la capacidad de producir teratomas cuando se trasplantan en ratones SCID; las células se pueden evaluar para determinar la capacidad de producir tipos celulares de las tres capas germinales. Una vez obtenida una célula iPS pluripotente se puede usar para producir células EPR.

Células de Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR)

La presente descripción proporciona células EPR que pueden diferenciarse de células madre pluripotentes, tal como células madre embrionarias humanas, y pueden ser molecularmente distintas de las células madre embrionarias, las células EPR derivadas de adulto y las células EPR derivadas de feto. El EPR producido según los ejemplos de realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria y en las aplicaciones relacionadas identificadas anteriormente puede ser diferente de los que se obtienen mediante los métodos previos y de otras fuentes de células EPR. Por ejemplo, las etapas del proceso de fabricación descritas en la presente memoria pueden conferir características estructurales y funcionales distintivas al producto de célula EPR final, tal como dichas células procedentes de células EPR aisladas obtenidas de otras fuentes tal como células EPR derivadas de feto o líneas de células EPR derivadas de feto (p.ej., ARPE19).

Adicionalmente, los ejemplos de realizaciones de los métodos de producción de células EPR descritos en la presente memoria no son permisivos para células ES, de tal modo que las células ES no pueden persistir y no suponen un riesgo inaceptable de contaminación en los cultivos y preparaciones de células EPR.

Los tipos celulares proporcionados por esta descripción incluyen, aunque sin limitación, células EPR, células EPR progenitoras, células epiteliales pigmentadas del iris (IPE), y otras células neurales asociadas a la visión, tal como neuronas internunciales (p.ej., neuronas de “relevó” de la capa nuclear interior (INL)) y células amacrin. Las realizaciones de la descripción también pueden proporcionar células retinales, bastones, conos y células de la córnea, así como células que proporcionan la vasculatura al ojo.

Las células EPR pueden usarse para tratar enfermedades de degeneración de la retina debidas a desprendimiento de retina, displasia retinal, estrías angioides, degeneración macular miópica o atrofia retinal o asociada a un número de dolencias de alteración de la visión que dan como resultado daño de fotorreceptores o ceguera, tal como, coroideremia, retinopatía diabética, degeneración macular (p.ej., degeneración macular relacionada con la edad), retinitis pigmentosa y enfermedad de Stargardt (fundus flavimaculatus).

Las células EPR pueden ser células EPR estables, terminalmente diferenciadas, que no se des-diferencian a un tipo de célula que no sea EPR. Las células EPR descritas en la presente memoria pueden ser células EPR funcionales, que se caracterizan por la capacidad para integrarse en la retina tras administración corneal, sub-retina o de otro tipo en un humano o un animal no humano.

Las células EPR pueden expresar marcadores de células EPR. Por ejemplo, el nivel de expresión de marcadores tales como RPE65, PAX2, PAX6, tirosinasa, bestrofina, PEDF, CRALBP, Otx2 y MITF puede ser equivalente a de las células EPR naturales. El nivel de madurez de las células EPR se puede evaluar midiendo la expresión de al menos uno de PAX2, PAX6 y tirosinasa, o sus niveles de expresión respectivos.

Por el contrario, las células EPR no pueden expresar marcadores de células ES. Por ejemplo, los niveles de expresión de los genes de célula ES Oct-4, NANOG y/o Rex-1 puede ser aproximadamente 100-1000 veces menores en células EPR que en células ES. Por ejemplo, las células EPR pueden carecer sustancialmente de expresión de marcadores de células ES que incluyen, aunque sin limitación, la proteína 4 de unión a octámero (Oct-4, también conocida como Pou5f1), antígenos embrionarios específicos de estadio (SSEA)-3 y SSEA-4, antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60, TRA-1-80, fosfatasa alcalina, NANOG, Rex-1, Sox2, TDGF-1, DPPA2, DPPA3 (STELLA), DPPA4 y/o DPPA5. De este modo, en comparación con las células ES, las células EPR preferiblemente carecen sustancialmente de expresión de Oct-4, NANOG y/o Rex-1.

Las células EPR descritas en la presente memoria también pueden mostrar niveles elevados de expresión de las subunidades 1-6 o 9 de alfa integrina, en comparación con células EPR no cultivadas u otras preparaciones de células EPR. Las células EPR descritas en la presente memoria también pueden mostrar niveles de expresión elevados de las subunidades 1, 2, 3, 4, 5 o 9 de alfa integrina. Las células EPR descritas en la presente memoria pueden cultivarse en condiciones que promuevan la expresión de las subunidades 1-6 de alfa integrina. Por ejemplo, las células EPR pueden cultivarse con agentes activantes de integrina que incluyen, aunque sin limitación manganeso y el anticuerpo monoclonal activante (mAb) TS2/16. Véase Afshari, et al., Brain (2010) 133(2): 448-464. Las células EPR se pueden llevar a placa en laminina (1 µg/mL) y exponerse a Mn²⁺ (500 µM) durante al menos aproximadamente 8, 12, 24, 36 o

48 horas. Asimismo, las células EPR pueden cultivarse durante varios pasajes (p.ej., al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7 u 8 pasajes) que pueden aumentar la expresión de subunidad de alfa integrina.

Las células EPR pueden exhibir un cariotipo normal, expresar marcadores de EPR, y no expresar marcadores de hES.

5 Las células EPR descritas en la presente memoria también pueden identificarse y caracterizarse en base al grado de pigmentación de la célula. Los cambios en el pigmento pueden controlarse por la densidad a la cual se cultivan y se mantienen las células EPR y por la duración en la que el EPR se mantiene en cultivo. Las células EPR diferenciadas que se dividen rápidamente están pigmentadas de forma más ligera. Por el contrario, las células EPR de división más lenta o que no se dividen adoptan su forma poligonal o hexagonal característica y aumentan el nivel de pigmentación acumulando melanina y lipofuscina. Por ejemplo, los cultivos de EPR quiescentes (p.ej., debido a confluencia) típicamente aumentan su nivel de pigmentación con el tiempo. Como tal, la acumulación de pigmentación sirve como indicador de la diferenciación de EPR, y el aumento de pigmentación asociado a la densidad celular sirve como indicador de la madurez de EPR. Por ejemplo, las células EPR maduras pueden ser subcultivadas a una menor densidad, de tal modo que la pigmentación se reduce. En este contexto, las células EPR maduras pueden cultivarse para producir menos células EPR maduras. Dichas células EPR siguen siendo células EPR diferenciadas que expresan marcadores de diferenciación de EPR.

20 Las células EPR descritas en la presente memoria pueden mantener su fenotipo durante un periodo de tiempo largo *in vitro*. Por ejemplo, las células EPR pueden mantener su fenotipo durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pasajes. Las células EPR pueden mantener su fenotipo durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días. Las células EPR pueden mantener su fenotipo durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas.

25 Además, las células EPR descritas en la presente memoria pueden mantener su fenotipo tras el trasplante. Las células EPR pueden mantener su fenotipo durante toda la vida del receptor tras el trasplante. Por ejemplo, las células EPR pueden mantener su fenotipo tras el trasplante durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días. Además, las células EPR pueden mantener su fenotipo tras el trasplante durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas. Las células EPR pueden mantener su fenotipo tras el trasplante durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Las células EPR pueden mantener su fenotipo tras el trasplante durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años.

Contenido de melanina de las poblaciones de células EPR

30 Los ejemplos de realizaciones de la descripción proporcionan una población de células EPR que tienen un nivel promedio bajo o medio de pigmentación y una preparación farmacéutica que comprende células EPR que tienen un nivel promedio bajo o medio de pigmentación. Como se describe en más detalle en los ejemplos incluidos a continuación, los solicitantes han demostrado que las células EPR que tienen un nivel de pigmentación relativamente menor se comportan mejor en un ensayo que medía la capacidad de las células para unirse y sobrevivir. Sin pretender establecer ninguna teoría, se cree que según las células EPR maduran se hacen menos capaces de formar uniones celulares, sobrevivir y proliferar tras la criopreservación, lo cual puede ser debido al aumento de nivel de la pigmentación (melanina) contenida en las células EPR más maduras y/u otros fenotipos de EPR maduro que tienen a correlacionarse de forma genérica con el aumento de pigmentación (que pueden incluir, por ejemplo, cambios en el citoesqueleto, la composición de membrana, la expresión de receptor superficial celular, la fuerza de unión, la arquitectura nuclear, la expresión génica, u otros fenotipos, o combinaciones de fenotipos). También sin pretender establecer ninguna teoría, se cree que según maduran las células EPR se hacen menos capaces de formar uniones celulares, de sobrevivir y proliferar cuando son sometidas a pasajes y/o mantenidas incluso sin criopreservación; nuevamente, esto puede deberse al aumento del nivel de pigmentación (melanina) contenida en las células EPR más maduras y/u otros fenotipos de EPR maduro que tienden a correlacionarse de forma general con un aumento de la pigmentación.

45 El nivel de pigmentación puede medirse como un promedio de melanina por célula para una población, p.ej., expresado como picogramos por célula (pg/célula), ya que se apreciará que en general puede haber algo de variación en el nivel de melanina entre las células de una población. Por ejemplo, el contenido promedio de melanina puede ser inferior a 8 pg/célula, inferior a 7 pg/célula, inferior a 6 pg/célula o inferior a 5 pg/célula, p.ej., entre 0,1-8 pg/célula, entre 0,1-7 pg/célula, entre 0,1-6 pg/célula, entre 0,1-5 pg/célula, entre 0,1-4 pg/célula, entre 0,1-3 pg/célula, entre 0,1-2 pg/célula, entre 0,1-1 pg/célula, entre 1-8 pg/célula, entre 1-7 pg/célula, entre 1-6 pg/célula, entre 1-5 pg/célula, entre 1-4 pg/célula, entre 1-3 pg/célula, entre 1-2 pg/célula, entre 2-6 pg/célula, entre 3-5 pg/célula o entre 4-5 pg/célula, tal como 4,2-4,8 pg/célula o entre 0,1-5 pg/célula. En un ejemplo adicional, el contenido promedio de melanina puede ser inferior a 5 pg/célula, p.ej., entre 0,1-5 pg/célula, entre 0,2-5 pg/célula, 0,5-5 pg/célula, 1-5 pg/célula, 2-5 pg/célula, 3-5 pg/célula, 4-5 pg/célula o 4,5-5 pg/célula.

El contenido de melanina se puede medir usando una variedad de métodos, que incluyen métodos que utilizan extractos celulares, métodos basados en FACS, y otros. Véase, p.ej., Boissy et al., *Cytometry*. Nov 1989; 10(6): 779-87; Swope et al., *J Invest Dermatol*. Sep 1997; 109(3): 289-95; Watts et al., *Cancer Res* 1981; 41: 467-472; Rosenthal et al., *Anal Biochem*. Nov. 1973; 56(1): 91-9. Por ejemplo, para determinar el contenido medio de melanina, se puede

determinar el número de células en una muestra representativa, las células de la muestra representativa pueden lisarse, y se puede determinar el contenido de melanina total del lisato celular (p.ej., de una partícula de células extraída con NaOH) (p.ej., mediante espectrofotometría) y dividirse por el número de células en la muestra representativa para dar lugar a un contenido promedio de melanina por célula. Opcionalmente, el número de células de la muestra representativa puede determinarse ignorando las células que no sean EPR en el cultivo (p.ej., contando células que son positivas para uno o más marcadores de EPR y/o que exhiben una morfología de célula EPR característica) dando lugar de este modo al contenido promedio de melanina por célula EPR en la muestra representativa.

El contenido promedio de melanina puede determinarse para la población celular excluyendo el cinco por ciento de células EPR más pigmentadas y el cinco por ciento de células EPR menos pigmentadas.

Se pueden obtener fácilmente poblaciones EPR que tienen el contenido promedio de melanina deseado. Por ejemplo, el contenido de melanina de EPR activas metabólicamente que no están en división (p.ej., en un cultivo confluyente) tiende a aumentar con el tiempo debido a la acumulación de melanina sintetizada, mientras que la melanina acumulada se diluye en la división celular, de tal modo que el contenido de melanina es relativamente menor en células en división. Véase, p.ej., Dunn et al., *Exp Eye Res.* Feb 1996; 62(2): 155-69. Por consiguiente, se puede obtener una población de EPR que tiene un contenido promedio de melanina deseado seleccionando el historial de crecimiento apropiado, p.ej., mantenimiento como población quiescente durante un tiempo que da como resultado el contenido promedio de melanina deseado, p.ej., como un cultivo quiescente durante 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, o durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas. Otros historiales de crecimiento adicionales que también pueden usarse para controlar el contenido promedio de melanina incluyen el mantenimiento durante un tiempo como población quiescente, seguido de permitir que las células se vuelvan a dividir durante un tiempo especificado o un número de divisiones especificado (reduciendo de este modo el contenido promedio de melanina respecto al obtenido en la población quiescente). El contenido de melanina también puede controlarse mediante el uso de medios de cultivo variables y/o suplementos de medio, p.ej., se ha publicado que la acumulación de melanina en EPR cultivadas disminuye en presencia de inhibidores de proteína quinasa (p.ej., H-7, W-7, H-8 y estaurosporina) (Kishi et al., *Cell Biol Int.* 2000; 24(2): 79-83), y aumenta en presencia de ácido retinoico completamente trans (de 10(-5) a 10(-7) M) o TGF-beta 1 (de 1 a 100 U/mL) (Kishi et al., *Curr Eye Res.* May 1998; 17(5): 483-6). El contenido de melanina también puede aumentar mediante el tratamiento de células con zinc alfa-2-glicoproteína (ZAG) (véase la Patente de EE.UU. 7.803.750) y/o con un antagonista de receptor de adenosina 1, un agonista de receptor de adenosina 2, un agonista de receptor de adenosina 1, un antagonista de receptor de adenosina 2 y una combinación de un antagonista de receptor de adenosina 1, agonista de receptor de adenosina 2, o combinación de los mismos (véase la Patente de EE.UU. 5.998.423). Cada uno de los anteriores documentos es incorporado en su totalidad a la presente memoria a modo de referencia.

Alternativa o adicionalmente a los métodos anteriores, también se pueden obtener células EPR que tengan un contenido promedio de melanina deseado mediante clasificación celular, p.ej., usando un citómetro de flujo. Por ejemplo, las células que contienen melanina son detectables por sus características de dispersión de luz, que incluyen una elevada dispersión lateral y una dispersión hacia delante reducida; estas características pueden usarse para clasificar una población por el nivel de pigmentación, purificando de este modo una población que tiene el contenido de melanina promedio deseado. Boissy et al., *Cytometry.* Nov 1989; 10(6): 779-87; Swope et al., *J Invest Dermatol.* Sep 1997; 109(3): 289-95, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente memoria a modo de referencia.

Modificación de genes MHC en células madre embrionarias humanas para obtener células EPR de complejidad reducida

Las células madre embrionarias humanas (hES) (p.ej., a partir de las cuales se puede derivar EPR como se describe en la presente memoria) pueden derivar de una biblioteca de células madre embrionarias humanas. La biblioteca de células madre embrionarias humanas puede comprender células madre, cada una de las cuales hemicigota, homocigota, o nulicigota para al menos un alelo MHC presente en una población humana, en donde cada miembro de dicha biblioteca de células madre es hemicigoto, homocigoto o nulicigoto para un conjunto diferente de alelos MHC respecto al resto de miembros de la biblioteca. La biblioteca de células madre embrionarias humanas puede comprender células madre que son hemicigotas, homocigotas o nulicigotas para todos los alelos MHC presentes en una población humana. En el contexto de la descripción, las células madre que son homocigotas para uno o más genes de antígeno de histocompatibilidad incluyen células que son nulicigotas para uno o más de dichos genes (y en algunas realizaciones, para todos). Nulicigoto para una localización genética significa que el gen es nulo en dicha localización (es decir, ambos alelos de dicho gen están borrados o inactivados).

Una célula hES puede comprender modificaciones en uno de los alelos de cromosomas hermanos en el complejo MHC de la célula. Se puede usar una variedad de métodos para generar modificaciones genéticas, tal como el tratamiento dirigido a genes, para modificar los genes del complejo MHC. Adicionalmente, los alelos modificados del complejo MHC de las células pueden ser modificados posteriormente para ser homocigotos, de tal modo que alelos idénticos estén presentes en cromosomas hermanos. Se pueden utilizar métodos tales como la pérdida de heterocigosidad (LOH) para modificar células que tienen alelos homocigotos del complejo MHC. Por ejemplo, se puede dirigir la modificación a uno o más genes de un conjunto de genes MHC de un alelo parental para generar células hemicigotas. El otro conjunto de genes MHC se puede eliminar mediante modificación génica dirigida o LOH para

fabricar una línea nula. Esta línea nula puede usarse además como línea de células embrionarias en la que dejar caer sistemas de los genes HLA, o genes individuales, para fabricar un banco hemicigoto u homocigoto con un fondo genético por lo demás uniforme. Las células madre que son nulicigotas para todos los genes MHC pueden producirse mediante métodos estándar conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, la modificación dirigida de genes y/o la pérdida de heterocigosidad (LOH). Véase, por ejemplo, Las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2004/0091936, 2003/0217374 y 2003/0232430, y la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. Número 60/729.173.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere a métodos para obtener células EPR, que incluyen una biblioteca de células EPR, con complejidad de MHC reducida. Las células EPR con complejidad de MHC reducida pueden usarse para aumentar el suministro de células disponibles para aplicaciones terapéuticas, ya que pueden eliminar las dificultades asociadas la compatibilidad de pacientes. Dichas células pueden derivar de células madre modificadas para ser hemicigotas u homocigotas para genes del complejo MHC.

La presente descripción también proporciona una biblioteca de células EPR (y/o células de linaje EPR), en donde se seleccionan y diferencian varias líneas de células ES en células EPR. Estas células EPR y/o células de linaje EPR pueden usarse para un paciente que necesite una terapia basada en células. La descripción también proporciona una biblioteca de células EPR, cada una de las cuales es hemicigota, homocigota o nulicigota para al menos un alelo MHC presente en una población humana, en donde cada miembro de dicha biblioteca de células EPR es hemicigoto, homocigoto o nulicigoto para un conjunto diferente de alelos de MHC respecto al resto de miembros de la biblioteca. La descripción proporciona una biblioteca de células EPR humanas que son hemicigotas, homocigotas o nulicigotas para todos los alelos de MHC presentes en una población humana.

Medio de cultivo

En los métodos descritos en la presente memoria se puede usar cualquier medio que sea capaz de soportar cultivos celulares, tal como medio para cultivo vírico, bacteriano o de células eucarióticas. Por ejemplo, el medio puede ser un EB-DM o EPR-GM/MM. Como ejemplo adicional, el medio puede ser un medio libre de proteínas, de alto contenido en nutrientes, o un medio bajo en proteínas, de alto contenido en nutrientes. Adicionalmente, el medio también puede incluir componentes nutrientes tales como albúmina, suplemento B-27, etanolamina, fetuína, glutamina, insulina, peptona, material de lipoproteína purificada, selenita sódica, transferrina, vitamina A, vitamina C o vitamina E. Por ejemplo, el medio bajo en proteínas, rico en nutrientes, puede ser cualquier medio que soporte el crecimiento de células en cultivo y que tenga un bajo contenido de proteínas. Por ejemplo, los medios bajos en proteínas, ricos en nutrientes, incluyen, aunque sin limitación, MDBK-GM, OptiPro SFM, VP-SFM, DMEM, medio RPMI 1640, IDMEM, MEM, mezcla de nutrientes F-12, mezcla de nutrientes F-10, EGM-2, medio DMEM/F-12, medio 1999 o MDBK-MM. Véase también la Tabla 1. Adicionalmente, el medio bajo en proteínas, rico en nutrientes, puede ser un medio que no soporte el crecimiento o el mantenimiento de células madre embrionarias.

Cuando se usa un medio bajo en proteínas, el medio puede contener al menos aproximadamente 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,20%, 0,10%, 0,05%, 0,02%, 0,016%, 0,015% o 0,010% de un componente que contiene proteína derivada de animales (p.ej., 10% de FBS). Nótese que la referencia al porcentaje de proteína presente en el medio bajo en proteínas se refiere solo al menos y no tiene en cuenta la proteína presente, por ejemplo, en el suplemento B-27. De esta manera, se entiende que cuando las células son cultivadas en medio bajo en proteínas y suplemento B-27, el porcentaje de proteína presente en el medio puede ser mayor.

El medio bajo en proteína o libre de proteína está suplementado con suplemento B-27 libre de suero. Los componentes nutrientes del suplemento B-27 pueden comprender biotina, L-carnitina, corticosterona, etanolamina, D+-galactosa, glutatión reducida, ácido linoleico, ácido linoléico, progesterona, putrescina, acetato de retinilo, selenio, triodo-1-tironina (T3), DL-alfa-tocoferol (vitamina E), acetato de DL-alfa-tocoferol, albúmina de suero bovino, catalasa, insulina, superóxido dismutasa y transferrina. Cuando las células se cultivan en medio libre de proteínas suplementado con B-27, libre de proteínas se refiere al medio antes de la adición de B-27.

Los factores de crecimiento, agentes y otros suplementos descritos en la presente memoria se pueden usar solos o en combinación con otros factores, agentes o suplementos para su inclusión en el medio. Los factores, agentes y suplementos se pueden añadir al medio inmediatamente, o en cualquier momento durante o después del cultivo celular.

El medio también puede contener suplementos tales como heparina, hidrocortisona, ácido ascórbico, suero (p.ej., suero fetal bovino), o una matriz de crecimiento (p.ej., matriz extracelular de epitelio corneal bovino, Matrigel(TM) (matriz de membrana de base), o gelatina), fibronectina, fragmentos proteolíticos de fibronectina, laminina, trombospondina, agregan y syndezan.

El medio de cultivo se puede suplementar con uno o más factores o agentes.

Los factores de crecimiento que pueden usarse incluyen, por ejemplo, EGF, FGF, VEGF y factor de crecimiento de tipo insulina recombinante. Los factores de crecimiento que pueden usarse en la presente descripción también incluyen

6Ckina (recombinante), activina A, α -interferón, alfa-interferón, anfirregulina, angiogenina, factor de crecimiento de célula endotelial β , beta celulina, β -interferón, factor neurotrófico derivado de cerebro, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, quimioattractor 1 de neutrófilo inducido por citocina, suplemento de crecimiento de célula endotelial, eotaxina, factor de crecimiento epidérmico, péptido-78 activador de neutrófilo epitelial, eritropoyetina, receptor α de estrógeno, receptor β de estrógeno, factor de crecimiento de fibroblasto (ácido/básico, estabilizado con heparina, recombinante), ligando FLT-3/FLK-2 (ligando FLT-3), interferón gamma, factor neurotrófico derivado de línea celular glial, Gly-His-Lys, factor estimulante de colonia de granulocito, factor estimulante de colonia de granulocito macrófago, GRO-alfa/MGSA, GRO-B, GRO-gamma, HCC-1, factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocito, herregulina-alfa (dominio EGF), proteína-1 de unión a factor de crecimiento de insulina, complejo IGF-1/proteína-1 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento nervioso (NGF) 2.5S, 7S-NGF, proteína-1 β inflamatoria de macrófago, proteína-2 inflamatoria de macrófago, proteína-3 α inflamatoria de macrófago, proteína-3 β inflamatoria de macrófago, proteína-1 quimiotáctica de monocito, proteína-2 quimiotáctica de monocito, proteína-3 quimiotáctica de monocito, neurotrofina 3, neurotrofina 4, NGF- β (humano o recombinante de rata), oncostatina M (humana o recombinante de ratón), extracto de pituitaria, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento de célula endotelial derivada de plaqueta, factor de crecimiento derivado de plaqueta, pleyotrofina, rantes, factor de célula madre, factor 1B derivado de célula estromal/factor estimulante de crecimiento de célula pre-B, trombopoyetina, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante β 1, factor de crecimiento transformante β 2, factor de crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento transformante β 5, factor de necrosis tumoral (α y β), y factor de crecimiento endotelial vascular.

Los agentes que pueden usarse de acuerdo a la presente descripción incluyen citocinas tales como interferón α , interferón α A/D, interferón β , interferón γ , proteína-10 inducible por interferón γ , interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3, interleucina 4, interleucina 5, interleucina 6, interleucina 7, interleucina 8, interleucina 9, interleucina 10, interleucina 11, interleucina 12, interleucina 13, interleucina 15, interleucina 17, factor de crecimiento de queratinocito, leptina, factor inhibidor de leucemia, factor estimulante de colonia de macrófagos y proteína 1 α inflamatoria de macrófago.

El medio de cultivo puede estar suplementado con hormonas y antagonistas de hormonas, que incluyen, aunque sin limitación, 17B-estradiol, hormona adrenocorticotrópica, adrenomedulina, hormona estimulante de alfa-melanocito, gonadotropina coriónica, globulina de unión corticosteroide, corticosterona, dexametasona, estriol, hormona estimulante de foliculo, gastrina 1, glucagón, gonadotropina, hidrocortisona, insulina, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, L-3,3',5'-triyodotironina, L-3,3',5'-triyodotironina, leptina, hormona leutinizante, L-tiroxina, melatonina, MZ-4, oxitocina, hormona paratiroidea, PEC-60, hormona de crecimiento pituitario, progesterona, prolactina, secretina, globulina de unión a hormona sexual, hormona estimulante de tiroides, factor de liberación de tiotropina, globulina de unión a tiroxina, y vasopresina. El medio de cultivo puede estar suplementado con anticuerpos para diversos factores que incluyen, aunque sin limitación, anticuerpo anti-receptor de lipoproteína de baja densidad, anticuerpo interno anti-receptor de progesterona, anticuerpo anti-cadena 2 de receptor de interferón alfa, anticuerpo anti-receptor 1 de quimiocina c-c, anticuerpos anti-CD 118, anticuerpo anti-CD 119, anticuerpo anti-factor 1 estimulante de colonia, anticuerpo anti-receptor CSF-1/c-fins, anticuerpo anti-factor de crecimiento epidérmico (AB-3), anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento epidérmico, anticuerpo fosfo-específico anti-receptor de factor de crecimiento epidérmico, anticuerpo anti-factor de crecimiento epidérmico (AB-1), anticuerpo anti-receptor de eritropoyetina, anticuerpo anti-receptor de estrógeno, anticuerpo C-terminal anti-receptor de estrógeno, anticuerpo anti-receptor B de estrógeno, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de fibroblasto, anticuerpo básico anti-factor de crecimiento de fibroblasto, anticuerpo de cadena anti-receptor de interferón gamma, anticuerpo recombinante humano anti-interferón gamma, anticuerpo C-terminal anti-GFR alfa-1, anticuerpo C-terminal anti-GFR alfa-2, anticuerpo anti-factor estimulante de colonia de granulocitos (AB-1), anticuerpo anti-receptor de factor estimulante de colonia de granulocitos, anticuerpo anti-receptor de insulina, anticuerpo anti-receptor de factor 1 de crecimiento de tipo insulina, anticuerpo recombinante humano anti-interleucina 6, anticuerpo recombinante humano anti-interleucina 1, anticuerpo recombinante humano anti-interleucina 2, anticuerpo recombinante de ratón anti-leptina, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento nervioso, anti-p60, anticuerpo de pollo, anticuerpo anti-proteína de tipo hormona paratiroides, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, anticuerpo anti-receptor B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, anticuerpo anti-factor alfa de crecimiento derivado de plaquetas, anticuerpo anti-receptor de progesterona, anticuerpo anti-receptor de ácido retinoico, anticuerpo anti-receptor nuclear de hormona tiroidea, anticuerpo anti-receptor alfa 1/Bi nuclear de hormona tiroidea, anticuerpo anti-receptor de transferrina/CD71, anticuerpo anti-factor alfa de factor de crecimiento transformante, anticuerpo anti-factor B3 de crecimiento transformante, anticuerpo anti-factor alfa de necrosis tumoral, y anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular.

Los ejemplos de medios de crecimiento potencialmente adecuados para uso en los métodos descritos en la presente memoria se incluyen en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones de medios de crecimiento

| Nombre del medio | Formulación |
|--------------------------------------|---|
| Crecimiento de MEF (MEF-GM) | 500 mL de IMDM 55 mL de FBS |
| Crecimiento de hES (hES-GM) | 200 mL de D-MEM Knockout® 30 mL de reemplazo de suero Knockout® 2 mL de GlutaMAX®-I 2 mL de NEAA 200 µL de 2-mercaptoetanol 10 ng/mL de bFGF 10 ng/mL de LIF |
| Crecimiento de EB (EB-GM) | 1 L de MDBK-GM EX -CELL® 16,5 mL de GlutaMAX®-I o 1 L de OptiPRO-SFM 20 mL de GlutaMAX®-I o EB-DM (descrito en el Ejemplo 4) |
| Formación de EB (EB-FM) | 1 L de MDBK-GM EX -CELL® 16,5 mL de GlutaMAX®-I 20 mL de suplemento B-27 o 1 L de OptiPRO-SFM 20 mL de GlutaMAX®-I 20 mL de suplemento B-27 o EB-DM (descrito en el Ejemplo 4) |
| Mantenimiento de EPR (EPR-MM) | 1 L de MDBK-MM EX -CELL® 20 mL de GlutaMAX®-I o 1 L de VP-SFM 20 mL de GlutaMAX®-I o EPR-GM/MM (descrito en el Ejemplo 4) |
| Crecimiento de EPR (EPR-GM) | 500 mL de EBM® -2 10 mL de FBS 0,2 mL de hidrocortisona 2,0 mL de rhFGF-B 0,5 mL de R3-IGF-1 0,5 mL de ácido ascórbico 0,5 mL de rhEGF 0,5 mL de heparina 0,5 mL de VEGF o EPR-GM/MM (descrito en el Ejemplo 4) |

Métodos terapéuticos

5 Las células EPR y las preparaciones farmacéuticas que comprenden células EPR producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para tratamientos basados en células. La descripción proporciona métodos para tratar una afección que implica una degeneración de la retina, que comprende administrar una cantidad efectiva de una preparación farmacéutica que comprende células EPR, en donde las células EPR derivan de células madre pluripotentes in vitro. Las afecciones que implican degeneración de la retina incluyen, por ejemplo, coroideremia, retinopatía diabética, atrofia retinal, desprendimiento de retina, displasia retinal, retinitis pigmentosa,

estrías angioides (también conocidas como estrías de Knapp o líneas de Knapp, que se caracterizan por pequeñas grietas en la membrana de Bruch que puede calcificarse y romperse), y degeneración macular miópica (también conocida como miopía degenerativa). Las células EPR descritas en la presente memoria también pueden usarse en métodos para tratar la degeneración macular que incluyen, aunque sin limitación, la degeneración macular relacionada con la edad (seca o húmeda), la distrofia macular de Carolina del Norte, la distrofia de fondo de Sorsby, la enfermedad de Stargardt, la distrofia de patrón, la enfermedad de Best, malattia leventinese, coroiditis de panal de abeja de Doyme, drusen dominante, y drusen radical. Las células EPR descritas en la presente memoria también pueden usarse en métodos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (PD).

Una característica común del trasplante celular descrito en publicaciones previas es la baja supervivencia de injerto, por ejemplo, en muchos estudios de trasplante celular tiende a haber una pérdida de células inmediatamente después del trasplante (p.ej., en la primera semana). Esta pérdida de células no parece ser debida a rechazo de las células trasplantadas, sino más bien a una incapacidad de un determinado porcentaje de las células para ser retenidas en la zona de trasplante. Esta carencia de retención celular se debe muy probablemente a una serie de factores tales como el fallo de las células al unirse a una estructura subyacente, una falta de nutrientes suficientes, o estrés físico en la zona de trasplante. Después de esta primera caída del número de células, la supervivencia celular a diferentes tiempos post-trasplante puede variar considerablemente de un estudio a otro. Así, aunque algunos estudios muestran una caída constante del número, otros muestran resultados en los que las células injertadas pueden alcanzar un número estable. Sin embargo, un factor importante al considerar el éxito de un trasplante es el porcentaje de receptores con injertos supervivientes tras el trasplante celular.

Al contrario que preparaciones previas, las células EPR de las preparaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden sobrevivir a largo plazo tras el trasplante. Por ejemplo, las células EPR pueden sobrevivir al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días. Adicionalmente, las células EPR pueden sobrevivir al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas; al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 meses; o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años. Adicionalmente, las células EPR pueden sobrevivir a lo largo de la esperanza de vida del receptor del trasplante. Adicionalmente, al menos el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de los receptores de las células EPR descritas en la presente memoria pueden mostrar supervivencia de las células EPR trasplantadas. Adicionalmente, las células EPR descritas en la presente memoria pueden incorporarse con éxito en la capa de EPR en el receptor del trasplante, formando una línea semi-continua de células y retener la expresión de marcadores moleculares de EPR claves (p.ej., RPE65 y bestrofina). Las células EPR descritas en la presente memoria también pueden unirse a la membrana de Bruch, formando una capa de EPR estable en el receptor del trasplante. Asimismo, las células EPR descritas en la presente memoria están sustancialmente libres de células ES y los receptores del trasplante no muestran crecimiento anormal o formación de tumores en la zona de trasplante.

Los métodos para tratar a un paciente que padece una afección asociada a degeneración de la retina pueden comprender administrar una composición de la descripción localmente (p.ej., mediante inyección intraocular o inserción de una matriz que comprende la preparación farmacéutica de la descripción). La administración intraocular de la preparación farmacéutica de la descripción incluye, por ejemplo, la administración en el cuerpo vítreo, transcornealmente, sub-conjuntivamente, sub-retinalmente, submacular (p.ej., mediante inyección submacular transfoveal), juxtaescleral, escleral posterior, y en porciones sub-tenon del ojo. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. nº 7.794.704, 7.795.025, 6.943.145 y 6.943.153.

La descripción también proporciona un método para administrar células EPR humanas que han sido derivadas de células madre embrionarias de complejidad recudida a un paciente. Este método puede comprender: (a) identificar un paciente que necesita un tratamiento que implica que le administren células EPR humanas; (b) identificar proteínas de MHC expresadas en la superficie de las células del paciente; (c) proporcionar una biblioteca de células EPR humanas de complejidad MHC reducida preparadas mediante el método para producir células EPR de la presente descripción; (d) seleccionar las células EPR de la biblioteca que coincidan con las proteínas de MHC del paciente en sus células; (e) administrar cualquiera de las células de la etapa (d) a dicho paciente. Este método puede llevarse a cabo en un centro regional, tal como, por ejemplo, un hospital, clínica, consultorio médico, y otras instalaciones de cuidados médicos. Adicionalmente, las células EPR seleccionarse para ser compatibles con el paciente, si se almacenan en números pequeños, pueden expandirse antes del tratamiento del paciente.

Las células EPR pueden cultivarse en condiciones que aumenten la expresión de las subunidades 1-6 o 9 de alfa integrina con respecto a células EPR no cultivadas u otras preparaciones de células EPR antes del trasplante. Las células EPR descritas en la presente memoria pueden cultivarse para elevar el nivel de expresión de las subunidades 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 9 de alfa integrina. Las células EPR descritas en la presente memoria pueden cultivarse en condiciones que promueven la expresión de las subunidades 1-6 de alfa integrina. Por ejemplo, las células EPR pueden cultivarse con agentes activantes de integrina que incluyen, aunque sin limitación, manganeso y el anticuerpo monoclonal activante (mAb) TS2/16. Véase Afshari et al. Brain (2010) 133(2): 448-464.

El régimen de tratamiento particular, la ruta de administración y la terapia de adyuvante pueden ajustarse en base a la afección particular, a la gravedad de la afección y la salud general del paciente. La administración de las preparaciones farmacéuticas que comprenden células EPR puede ser efectiva para reducir la gravedad de los síntomas y/o para prevenir una degeneración adicional en la afección del paciente. Por ejemplo, la administración de

una preparación farmacéutica que comprende células EPR puede mejorar la agudeza visual del paciente. Adicionalmente, en determinadas realizaciones, la administración de las células EPR puede ser efectiva para restaurar completamente cualquier pérdida de visión u otros síntomas. Adicionalmente, la administración de células EPR puede tratar los síntomas de lesiones en la capa endógena de EPR.

5 Preparaciones farmacéuticas de células EPR

Las células EPR pueden formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las células EPR se pueden administrar solas o como un componente de una formulación farmacéutica. Los compuestos objeto pueden formularse para administración en cualquier modo conveniente para uso en medicina. Las preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración pueden comprender las células EPR, en combinación con una o más disoluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables (p.ej., disolución salina equilibrada (BSS)), dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden ser reconstituidos en disoluciones o dispersiones estériles inyectables justo antes de ser usadas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos o agentes de suspensión o espesamiento. Los ejemplos de preparaciones farmacéuticas comprenden las células EPR en combinación con ALCON® BSS PLUS® (una disolución salina equilibrada que contiene, en cada mL, cloruro sódico 7,14 mg, cloruro potásico 0,38 mg, dihidrato de cloruro cálcico 0,154 mg, hexahidrato de cloruro magnésico 0,2 mg, fosfato sódico dibásico 0,42 mg, bicarbonato sódico 2,1 mg, dextrosa 0,92 mg, disulfuro de glutatona (glutatona oxidada) 0,184 mg, ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico (para ajustar el pH a aproximadamente 7,4) en agua).

Los ejemplos de composiciones de la presente descripción pueden ser una formulación adecuada para uso en el tratamiento de un paciente humano, tal como libre de pirógenos o esencialmente libre de pirógenos, y libre de patógenos. Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas para uso en esta descripción pueden estar en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos, libre de patógenos. La preparación que comprende células EPR usada en los métodos descritos en la presente memoria puede ser trasplantada en una suspensión, gel, coloide, lechada o mezcla. Adicionalmente, la preparación deseablemente puede ser encapsulada o inyectada en una forma viscosa en el humor vítreo para administración en el sitio de daño retinal o coroidal. Asimismo, en el momento de la inyección, las células EPR criopreservadas pueden ser resuspendidas con una disolución salina equilibrada disponible comercialmente para alcanzar la osmolaridad y concentración deseadas para la administración mediante inyección subretinal. La preparación se puede administrar a un área de la mácula pericentral que no estuviera totalmente perdida por la enfermedad, lo cual puede promover la unión y/o la supervivencia de las células administradas.

Las composiciones de la presente descripción pueden incluir un inhibidor de proteína quinasa asociada a rho (ROCK), tal como la Stemolécula de Stemgent Y-27632. Por ejemplo, los ejemplos de composiciones pueden incluir EPR y un inhibidor de ROCK, que puede estar presente en una cantidad suficiente para promover la supervivencia de EPR y/o el injerto tras administración a un paciente.

Las células EPR de la descripción pueden administrarse en una formulación oftálmica farmacéuticamente aceptable mediante inyección intraocular. Cuando se administra la formulación mediante inyección intravítrea, por ejemplo, la disolución puede concentrarse de tal modo que se puedan administrar volúmenes minimizados. Las concentraciones para inyecciones pueden ser en cualquier cantidad que sea efectiva y no tóxica, dependiendo de los factores descritos en la presente memoria. Las preparaciones farmacéuticas de células EPR para tratamiento de un paciente pueden formularse en dosis de al menos aproximadamente 10^4 células/mL. Las preparaciones de células EPR para tratamiento de un paciente se formulan en dosis de al menos aproximadamente 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} células EPR/mL. Por ejemplo, las células EPR pueden formularse en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las preparaciones farmacéuticas de células EPR descritas en la presente memoria pueden comprender al menos aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000 o 9.000 células EPR. Las preparaciones farmacéuticas de células EPR pueden comprender al menos aproximadamente 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} o 9×10^{10} células EPR. Las preparaciones farmacéuticas de células EPR pueden comprender al menos aproximadamente $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$, $1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$, $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ o $1 \times 10^3 - 1 \times 10^6$ células EPR. Las preparaciones farmacéuticas de células EPR pueden comprender al menos aproximadamente 10.000, 20.000, 25.000, 50.000, 75.000, 100.000, 125.000, 150.000, 175.000, 180.000, 185.000, 190.000 o 200.000 células EPR. Por ejemplo, la preparación farmacéutica de células EPR puede comprender al menos aproximadamente 20.000 – 200.000 células EPR en un volumen de al menos aproximadamente 50 – 200 μ L. Adicionalmente, la preparación farmacéutica de células EPR puede comprender aproximadamente 50.000 células en un volumen de 150 μ L, aproximadamente 200.000 células EPR en un volumen de 150 μ L o al menos aproximadamente 180.000 células EPR en un volumen de al menos aproximadamente 150 μ L.

En las preparaciones y composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente, el número de células EPR o la concentración de células EPR puede determinarse contando células viables y excluyendo las células no viables. Por ejemplo, las EPR no viables pueden detectarse por fallo al excluir un colorante vital (tal como azul de tripano), o usando

un ensayo funcional (tal como la capacidad de adherirse a un sustrato de cultivo, fagocitosis, etc.). Adicionalmente, el número de células EPR o la concentración de células EPR pueden determinarse contando las células que expresan uno o más marcadores de célula EPR y/o excluyendo las células que expresan uno o más marcadores indicativos de un tipo celular diferente a EPR.

5 Las células EPR pueden formularse para administración en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de tal modo que la preparación se mantiene en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que las células penetren en las regiones afectadas del ojo, como por ejemplo, la cámara anterior, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la córnea, iris/ciliar, lente, coroides, retina, esclerótica, espacio supracoroideo, conjuntiva, espacio subconjuntival, espacio epiescleral, espacio intracorneal, espacio epicorneal, pars plana, regiones avasculares inducidas quirúrgicamente, o la mácula.

10 Las células EPR pueden estar contenidas en una lámina de células. Por ejemplo, se puede preparar una lámina de células que comprende células EPR cultivando células EPR sobre un sustrato a partir del cual se puede liberar una lámina intacta de células, p.ej., un polímero termorresponsivo tal como un poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) termorresponsivo anclado a superficie, sobre el cual las células se adhieren y proliferan a la temperatura de cultivo, y después, mediante un cambio de temperatura, las características superficiales son alteradas provocando la liberación de la lámina cultivada de células (p.ej., enfriando por debajo de la temperatura de disolución crítica más baja (LCST) (véase da Silva et al., Trends Biotechnol. Dic. 2007; 25 (12): 577-83; Hsiue et al., Transplantation. 15 Feb 2006; 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.

20 La lámina de células puede ser adherente a un sustrato adecuado para el trasplante, tal como un sustrato que puede disolverse *in vivo* cuando la lámina es trasplantada en el organismo hospedante, p.ej., preparado cultivando las células sobre un sustrato adecuado para el trasplante, o liberando las células de otro sustrato (tal como un polímero termorresponsivo) sobre un sustrato adecuado para el trasplante. Un ejemplo de sustrato potencialmente adecuado para el trasplante puede comprender gelatina (véase Hsiue et al., ver anterior). Los sustratos alternativos que pueden ser adecuados para el trasplante incluyen matrices basadas en fibrina y otros. La lámina de células se puede usar en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad de degeneración de la retina. La lámina de células EPR puede formularse para la introducción en el ojo de un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, la lámina de células puede introducirse en un ojo que lo necesite mediante membranectomía subfoveal con trasplante de la lámina de células EPR, o puede usarse para la fabricación de un medicamento para trasplante tras membranectomía subfoveal.

25 El volumen de preparación administrado según los métodos descritos en la presente memoria puede depender de factores tales como el modo de administración, el número de células EPR, la edad y el peso del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad que esté siendo tratada. Si se administra mediante inyección, el volumen de una preparación farmacéutica de células EPR de la descripción puede ser al menos de aproximadamente 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 o 5 mL. El volumen puede ser al menos aproximadamente 1-2 mL. Por ejemplo, si se administra mediante inyección, el volumen de una preparación farmacéutica de células EPR de la descripción puede ser al menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 100, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 o 200 μ L (microlitros). Por ejemplo, el volumen de una preparación de la descripción puede ser al menos aproximadamente 10-50, 20-50, 25-50 o 1-200 μ L. El volumen de una preparación de la descripción puede ser al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 μ L, o más.

45 Por ejemplo, la preparación puede comprender al menos aproximadamente 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 células EPR por μ L. La preparación puede comprender 2000 células EPR por μ L, por ejemplo, 100.000 células EPR por 50 μ L o 180.000 células EPR por 90 μ L.

50 El método de tratamiento de la degeneración de la retina puede comprender además la administración de un inmunosupresor. Los inmunosupresores que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, anticuerpo policlonal anti-linfocito globulina (ALG), anticuerpo policlonal anti-timocito globulina (ATG), azatioprina, BASILIXIMAB® (anticuerpo anti-receptor de IL-2R α), ciclosporina (ciclosporina A), DACLIZUMAB® (anticuerpo anti-receptor de IL-2R α), everolimus, ácido micofenólico, RITUXIMAB® (anticuerpo anti-CD20), sirolimus y tacrolimus. Los inmunosupresores pueden dosificarse al menos aproximadamente a 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg. Cuando se usan inmunosupresores, éstos pueden administrarse sistémicamente o localmente, y pueden administrarse antes, concomitantemente o después de la administración de las células EPR. La terapia inmunosupresora puede continuar durante semanas, meses, años o indefinidamente tras la administración de células EPR. Por ejemplo, al paciente se le puede administrar 5 mg/kg de ciclosporina durante 6 semanas después de la administración de las células EPR.

El método de tratamiento de la degeneración de la retina puede comprender la administración de una dosis individual de células EPR. Asimismo, los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria pueden comprender un curso de terapia en el que las células EPR son administradas a múltiples tiempos a lo largo de un determinado periodo. Los ejemplos de cursos de tratamiento pueden comprender tratamientos semanales, bisemanales, mensuales, trimestrales, bianuales, o anuales. Alternativamente, el tratamiento puede desarrollarse por fases, en donde inicialmente se administran dosis múltiples (p.ej., dosis diarias durante la primera semana), y posteriormente se necesitan menos dosis y menos frecuentes.

Si se administran mediante inyección intraocular, las células EPR pueden administrarse uno o más veces periódicamente a lo largo de la vida de un paciente. Por ejemplo, las células EPR pueden administrarse una vez al año, una vez cada 6-12 meses, una vez cada 3-6 meses, una vez cada 1-3 meses, o una vez cada 1-4 semanas. Alternativamente, puede ser deseable una administración más frecuente para determinadas afecciones o trastornos. Si se administran mediante un implante o dispositivo, las células EPR pueden administrarse una vez, o una o más veces periódicamente a lo largo de la vida del paciente, según sea necesario para el paciente y el trastorno o afección particulares que estén siendo tratados. De forma similar, se contempla un régimen terapéutico que cambie con el tiempo. Por ejemplo, puede ser necesario un tratamiento más frecuente al principio (p.ej., tratamiento diario o semanal). Con el tiempo, según va mejorando la afección del paciente, puede ser necesario un tratamiento menos frecuente o incluso ningún tratamiento adicional.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender además la etapa de monitorizar la eficacia del tratamiento o la prevención midiendo respuestas de electroretinograma, umbral de agudeza optométrica, o umbral de luminancia en el sujeto. El método también puede comprender la monitorización de la eficacia del tratamiento o la prevención monitorizando la inmunogenicidad de las células o la migración de las células en el ojo.

Las células EPR se pueden usar en la fabricación de un medicamento para tratar la degeneración de la retina. La descripción también abarca el uso de la preparación que comprende células EPR en el tratamiento de la ceguera. Por ejemplo, las preparaciones que comprenden células EPR humanas pueden usarse para tratar la degeneración de la retina asociada a una serie de dolencias de alteración de la visión que dan como resultado un daño fotorreceptor o ceguera, tales como la retinopatía diabética, la degeneración macular (que incluye la degeneración macular relacionada con la edad, p.ej., degeneración macular relacionada con la edad húmeda y degeneración macular relacionada con la edad seca), retinitis pigmentosa y enfermedad de Stargardt (fundus flavimaculatus). La preparación puede comprender al menos aproximadamente 5.000-500.000 células EPR (p.ej., 100.00 células EPR) que pueden ser administradas a la retina para tratar la degeneración de la retina asociada a una serie de dolencias de alteración de la visión que dan como resultado un daño fotorreceptor y ceguera, tales como la retinopatía diabética, la degeneración macular (que incluye la degeneración macular relacionada con la edad), retinitis pigmentosa y enfermedad de Stargardt (fundus flavimaculatus).

Las células EPR proporcionadas en la presente memoria pueden ser células EPR humanas. Nótese, sin embargo, que las células humanas pueden usarse en pacientes humanos, así como en modelos animales o pacientes animales. Por ejemplo, las células humanas pueden probarse en modelos de ratón, rata, gato, perro o primate no humano de degeneración de la retina. Adicionalmente, las células humanas pueden usarse terapéuticamente para tratar animales que lo necesiten, tal como en la medicina veterinaria.

Modos de administración

La preparación farmacéutica puede formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable según la ruta de administración. Por ejemplo, la preparación puede formularse para ser administrada al espacio subretinal del ojo. La preparación que comprende células EPR puede administrarse a un ojo o a ambos ojos del mismo paciente. La administración a ambos ojos puede ser secuencia o simultánea. Por ejemplo, la preparación que comprende células EPR puede formularse como una suspensión, una disolución, lechada, gel o coloide.

Las células EPR de la descripción pueden administrarse localmente mediante inyección (p.ej., inyección intravitreal), o como parte de un dispositivo o implante (p.ej., un implante). Como se ha indicado anteriormente, las células EPR pueden tener varias disposiciones posibles tal como células individuales, cúmulos, agrupaciones, láminas, o cualquier combinación de las mismas, que pueden estar contenidas en un vehículo acuoso, gel, matriz, polímero o similar. Por ejemplo, la preparación puede administrarse mediante inyección en el espacio subretinal del ojo. Asimismo, la preparación puede administrarse transcornealmente. Por ejemplo, las células de la presente descripción pueden trasplantarse en el espacio subretinal usando cirugía de vitrectomía. Adicionalmente, en el momento de la inyección, las células EPR pueden resuspenderse con una disolución salina equilibrada disponible comercialmente (p.ej., Alcon BSS PLUS®) para alcanzar la osmolaridad y concentración deseadas para la administración mediante inyección subretinal.

Opcionalmente, las células EPR pueden administrarse mediante un método que comprende cirugía de vitrectomía de pars plana, tal como una vitrectomía de pars plana de 3 puertos. El método puede incluir una retinotomía pequeña. Antes de la administración de células, se puede formar un bleb subretinal, p.ej., mediante la inyección de salino o cualquier otro fluido adecuado (un "pre-bleb"), que a continuación puede ser retirado antes de la administración de las células. Sin embargo, las células también pueden ser administradas sin formación de pre-bleb. Las células pueden

administrarse en un bleb en una posición temporal foveal. Por ejemplo, el bleb puede extenderse opcionalmente dentro de los vasos sanguíneos de galería. El bleb puede posicionarse de tal modo que no separa la fovea de la mácula central.

5 Dependiendo del método de administración, las células EPR se pueden añadir a disoluciones acuosas tamponadas y equilibradas en electrolitos, disoluciones acuosas tamponadas y equilibradas en electrolitos con un polímero lubricante, pomadas basadas en aceite mineral o vaselina, otros aceites, liposomas, ciclodextrinas, polímeros o geles de liberación sostenida.

Matrices para uso con las células EPR

10 Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender una etapa de administración de células EPR de la descripción como un implante o dispositivo. En determinadas realizaciones, el dispositivo es un implante bioerosionable para tratar una afección médica del ojo que comprende un agente activo disperso dentro de una matriz polimérica biodegradable, en donde al menos aproximadamente un 75% de las partículas del agente activo tienen un diámetro inferior a aproximadamente 10 μm . El implante bioerosionable puede dimensionarse para implante en una región ocular. La región ocular puede ser una cualquiera o más de la cámara anterior, la cámara posterior, la cavidad vítreo, el coroides, el espacio supracoroidal, la conjuntiva, el espacio subconjuntival, el espacio epiescleral, el espacio intracorneal, el espacio epicorneal, la esclerótica, la pars plana, las regiones avasculares inducidas quirúrgicamente, la mácula y la retina. El polímero biodegradable puede ser, por ejemplo, un copolímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), películas biodegradables de poli(ácido DL-láctico-co-glicólico), o sustratos poliméricos de PLLA/PLGA. La ratio de monómeros de ácido láctico a glicólico en el polímero es de aproximadamente 25/75, 40/60, 15 50/50, 60/40, 75/25 en porcentaje en peso, más preferiblemente aproximadamente 50/50. El copolímero de PLGA puede constituir aproximadamente el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a aproximadamente 90 por ciento en peso del implante bioerosionable. El copolímero de PLGA puede constituir desde aproximadamente el 30 a aproximadamente el 50 por ciento en peso, preferiblemente aproximadamente el 40 por ciento en peso, del implante bioerosionable. Las células EPR se pueden trasplantar en conjunción con un polímero biocompatible tal como ácido poliláctico, poli(ácido láctico-co-glicólico), PDLGA 50:50, PDLGA 85:15, y membrana biodegradable INION GTR® (mezcla de polímeros biocompatibles). Véanse las Patentes de EE.UU. nº 6.331.313, 7.462.471 y 7.625.582. Véase también Hutala, et al. (2007) "In vitro biocompatibility of degradable biopolymers in cell line cultures from various ocular tissues: Direct contact studies". Journal of Biomedical Materials Research 83A(2): 407-413; Lu et al. (1998) J Biomater Sci Polym Ed 9: 1187-205; y Tomita et al. (2005) Stem Cells 23: 1579-88.

30 En otro aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende EPR situado en una membrana, y un método para usar el mismo en la prevención o el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección de la retina. Por ejemplo, la membrana puede ser una membrana como la descrita en el documento U.S. PGPub. Nº 20110236464. La membrana puede ser sustancialmente no biodegradable y porosa, teniendo los poros un diámetro entre aproximadamente 0,2 μm y 0,5 μm . Por ejemplo, el diámetro de poro puede estar entre 0,3 μm y 0,45 μm . El uso de una membrana no biodegradable puede asegurar que permanece para soportar las células una vez trasplantada en el ojo, por ejemplo durante al menos 5 años, al menos 10 años o al menos 15 años después de la inserción en el cuerpo.

40 La densidad de poros puede estar entre aproximadamente 1×10^7 y 3×10^8 poros por cm^2 , tal como entre 5×10^7 y 1×10^8 poros por cm^2 . Esta densidad puede permitir los niveles de permeabilidad deseados y también puede permitir la vascularización. En particular, el tamaño y la densidad de los poros pueden permitir el movimiento de nutrientes de un lado de la membrana al otro y también permitir la vascularización a través de la membrana, p.ej., post-implante. El cuerpo del polímero puede recibir vascularización del lecho coroidal rico. Esto ha sido demostrado en lechos vasculares ricos fuera del ojo (Cassell et al, 2002; Patrick et al, 1999; Saxena et al 1999, Peter et al 1998) pero solo puede producirse si la porosidad es suficiente (Menger et al, 1990).

45 Por ejemplo, la conductancia hidráulica de la membrana puede ser mayor de $50 \times 10^{-10} \text{ m sec}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Específicamente, la conductancia hidráulica de la membrana puede ser de aproximadamente 33 mL/min/cm^2 . Esto es igual a $801,21 \times 10^{-10} \text{ m sec}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, que es ocho veces la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch cadavérica macular joven. Este incremento de la conductividad es potencialmente útil, ya que la membrana artificial puede depender enteramente de procesos pasivos. Así como ser capaz de cumplir con las demandas de las células depositadas en términos de difusión de nutrientes, preferiblemente no es un obstáculo para el transporte de fluidos desde el lado basal de la capa de EPR, de otro modo las EPR se pueden separar de la superficie del polímero. Consistente con esta expectativa, se ha planteado la hipótesis de que la conductividad hidráulica reducida de la membrana de Bruch en la gente mayor produce separación del epitelio pigmentario en AMD (Bird & Marshall, 1986).

55 Preferiblemente, la membrana puede esterilizarse mediante irradiación gamma, óxido de etileno, autoclavado o esterilización de UV sin degradación.

Preferiblemente, la membrana puede sellarse mediante sellado ultrasónico, sellado de radio frecuencia o moldeado de inserto. Esto permite que se unan otras capas a la membrana, por ejemplo uniendo capas farmacéuticas o de recubrimiento a la membrana. Por ejemplo, uno podría desear unir una capa biodegradable más rígida, tal como PLGA,

para proporcionar rigidez a la membrana y favorecer la administración. Alternativamente, se pueden unir capas que contienen agentes farmacológicos o biológicos, o capas que soportan otras células.

5 La membrana preferiblemente tiene un espesor máximo de aproximadamente 11 μm . Más preferiblemente, el espesor de la membrana está entre 9 μm y 11 μm . El espesor de la membrana se puede seleccionar de tal modo que permita la difusión de nutrientes, para permitir la vascularización y también permitir que la membrana sea insertada fácilmente en el ojo.

10 Por consiguiente, se puede proporcionar EPR sobre una membrana o cultivado sobre una membrana para soportar el crecimiento de células, siendo la membrana sustancialmente no biodegradable y porosa y presentando un espesor máximo de aproximadamente 11 μm . La membrana preferiblemente es sustancialmente plana y su dimensión más pequeña preferiblemente es inferior a aproximadamente 11 μm . Puede variar en espesor en esa dimensión, pero preferiblemente está entre 9 μm y 11 μm de espesor.

15 La membrana puede tener un peso máximo de aproximadamente 1,5 mg/cm^2 . Más preferiblemente el peso de la membrana está entre 1,0 mg/cm^2 y 1,4 mg/cm^2 . La resistencia a la tracción mínima de la membrana preferiblemente es de al menos 100 bar, para proporcionar una resistencia suficiente para permitir un comportamiento adecuado durante la cirugía. La resistencia a la tracción máxima preferiblemente es de 300 bar, nuevamente para permitir que la membrana sea manejada fácilmente durante la cirugía. La resistencia al estallido de la membrana preferiblemente es al menos de 0,69 bar (10 psi).

Preferiblemente, la membrana es hidrofílica. Esto puede conferir a la membrana una buena mojabilidad y permitir la unión de células y otros recubrimientos deseables con facilidad.

20 La membrana preferiblemente tiene un pH fisiológicamente aceptable, p.ej., un pH de 4 a 8.

25 La membrana preferiblemente comprende un recubrimiento en al menos un lado. El recubrimiento preferiblemente es una proteína o una glicoproteína, tal como laminina, Matrigel(TM), colágeno, fibronectina y/o PLGA poli(ácido láctico-co-glicólico). El recubrimiento también puede comprender un agente farmacológico o biológico, unido al componente de recubrimiento. Por ejemplo, el recubrimiento puede incluir un agente neurotrófico, un agente anti-inflamatorio o un agente antiangiogénico.

30 En particular, el recubrimiento preferiblemente contiene laminina, especialmente laminina-1 o un fragmento de la misma, tal como IgVAV. En particular, el recubrimiento puede contener más laminina-1 que otra proteína o glicoproteína. Preferiblemente el recubrimiento puede comprender al menos un 30% o al menos un 40% de laminina, tal como laminina-1. El recubrimiento puede aplicarse para producir una concentración de laminina-1 sobre la membrana de aproximadamente 40 – 45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Por consiguiente, el EPR puede proporcionarse o cultivarse sobre una membrana para soportar el crecimiento de células, comprendiendo dicha membrana una capa soporte porosa y sustancialmente no biodegradable recubierta en al menos un lado con un recubrimiento que comprende laminina-1.

35 La membrana puede estar hecha de un polímero hidrofílico. También se pueden usar polímeros hidrofóbicos que hayan sido hechos hidrofílicos mediante luz UV brillante sobre dicho polímero. Los ejemplos de polímeros incluyen poliésteres tales como polietileno tereftalato, polibutileno tereftalato; poliuretanos y poliurea-uretanos, en particular los que contienen policarbonato y polisiloxano, y aquellos basados en poliéster o poliéter, poliamidas tales como el nylon; poliéter-ésteres tales como Sympatex; policarbonatos tales como Makrolon; poliacrílicos tales como Perspex; poli(tetrafluoroeteno) (PTFE); polisiloxanos; poliolefinas tales como polietileno y polipropileno; y polioximetileno (POM) comúnmente conocido con el nombre comercial Delrin de la Dupont. Es particularmente preferido que la membrana esté hecha de polietileno tereftalato o polibutileno tereftalato. En otra realización preferida, la membrana está hecha de poliéster.

45 La membrana puede usarse para crecer una capa de las células EPR de la presente descripción. La membrana puede comprender preferiblemente una capa de células sobre la membrana. Las células pueden ser cualesquier células seleccionadas según el uso pretendido de la membrana y las células.

La membrana y la capa de células tienen una longitud y una anchura preferiblemente de al menos 3 mm x 5 mm. Preferiblemente la membrana y la capa de células tienen unas dimensiones de al menos 4 mm x 6 mm.

50 La membrana y la capa de células pueden trasplantarse en el ojo de un paciente que lo necesite, p.ej., en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad, de desgarros retinales, distrofia macular, coroidemia, amarosis congénita de Leber, enfermedad de Stargardt, y otras enfermedades o afecciones de la retina.

Ensayos de cribado

La descripción proporciona un método para el cribado de identificación de agentes que modulan la madurez celular de EPR. Por ejemplo, las células EPR diferenciadas de células ES humanas pueden usarse para el cribado de agentes que promueven la maduración de EPR. Los agentes identificados pueden usarse, solos o en combinación con las

células EPR, como parte de un régimen de tratamiento. Alternativamente, los agentes identificados pueden usarse como parte de un método de cultivo para mejorar la supervivencia de células EPR diferenciadas *in vitro*.

5 Las células EPR pueden usarse como herramienta de investigación en instalaciones tales como una compañía farmacéutica, química o biotecnológica, un hospital, o una institución académica o de investigación. Dichos usos incluyen el uso de las células EPR diferenciadas a partir de células madre embrionarias en ensayos de cribado para identificar, por ejemplo, agentes que pueden usarse para promover la supervivencia de EPR *in vitro* o *in vivo*, o que pueden usarse para promover la maduración, supervivencia y/o injerto de EPR. Los agentes identificados pueden estudiarse *in vitro* o en modelos animales para evaluar, por ejemplo, su potencial uso solos o en combinación con células EPR.

10 La descripción proporciona un método para identificar agentes que promueven la maduración de EPR que comprende proporcionar una célula EPR, poner en contacto dicha célula EPR con un agente, evaluar dicha célula EPR para determinar signos de madurez, y a continuación identificar un agente que promueve la maduración de EPR cuando dicho agente hace que la célula EPR muestre signos de madurez. Los signos de madurez pueden ser el nivel de pigmentación, niveles de expresión génica, y la morfología, tal como se discute en la presente memoria.

15 Aplicaciones comerciales y métodos

Determinados aspectos de la presente descripción pertenecen a la producción de células EPR para alcanzar cantidades comerciales. Las células EPR pueden ser producidas a gran escala, almacenadas si se desea, y suministradas a hospitales, clínicas u otras instalaciones sanitarias.

20 Por consiguiente, determinados aspectos de la presente invención se refieren a métodos de producción, almacenamiento y distribución de las células EPR producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria. Después de la producción de EPR, las células EPR pueden ser recolectadas, purificadas y opcionalmente almacenadas antes del tratamiento de un paciente. Las células EPR pueden ser opcionalmente específicas de paciente o seleccionarse de forma específica en base a HLA u otro perfil inmunológico. Por ejemplo, una vez que un paciente se presenta con una indicación tal como, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular (que incluye degeneración macular relacionada con la edad), retinitis pigmentosa, atrofia retinal, desprendimiento de retina, displasia retinal y enfermedad de Stargardt (fundus flavimaculatus), estrías angioides o degeneración macular miópica, se puede realizar el pedido de células EPR y suministrarlas de un modo oportuno. Por consiguiente, la presente descripción se refiere a métodos de producción de células EPR para obtener células a escala comercial, preparaciones celulares que comprende células EPR derivadas de dichos métodos, así como métodos para proporcionar (es decir, producir, almacenar opcionalmente, y vender) las células EPR a hospitales y clínicas. La producción de células EPR diferenciadas o células EPR diferenciadas maduras se puede escalar para uso comercial.

30 La presente descripción también proporciona métodos para llevar a cabo un negocio farmacéutico que comprende establecer un sistema de distribución para distribuir la preparación para su venta, o puede incluir establecer un grupo de ventas para comercializar la preparación farmacéutica.

35 La presente descripción proporciona métodos para suministrar células EPR a hospitales, centros sanitarios y consultorios médicos, mediante los cuales las células EPR producidas con los métodos descritos en la presente memoria son almacenadas, solicitadas a demanda por un hospital, centro sanitario o consultorio médico, y administradas a un paciente que necesita una terapia de células EPR. Un hospital, centro sanitario o consultorio médico solicita las células EPR en base a los datos específicos del paciente, las células EPR son producidas de acuerdo a las especificaciones del paciente y posteriormente son suministradas al hospital o consultorio médico que ha realizado el pedido. Por ejemplo, una vez que se selecciona una determinada preparación de células EPR como adecuada para un paciente, es expandida entonces hasta alcanzar las cantidades apropiadas para el tratamiento del paciente.

45 Otros aspectos adicionales de la descripción se refieren a una biblioteca de células EPR que pueden proporcionar células compatibles con pacientes receptores potenciales. Por consiguiente, la descripción proporciona un método para llevar a cabo un negocio farmacéutico, que comprende la etapa de proporcionar preparaciones de células EPR que son homocigotas para al menos un antígeno de histocompatibilidad, en donde las células se eligen de un banco de dichas células que comprende una biblioteca de células EPR que pueden ser expandidas mediante los métodos descritos en la presente memoria, en donde cada preparación de células EPR es hemicigota u homocigota para al menos un alelo de MHC presente en la población humana, y en donde dicho banco de células EPR comprende células que son cada una hemicigotas u homocigotas para un conjunto diferente de alelos de MHC en relación a otros miembros del banco de células. Como se ha mencionado anteriormente, se puede usar la modificación dirigida de genes o la pérdida de heterocigosidad para genera las células madre de alelo de MHC hemicigotas u homocigotas para derivar las células EPR.

55 La presente descripción también incluye métodos para obtener o producir células ES humanas (p.ej., células pluripotentes inducidas (iPS), o células ES producidas mediante transferencia nuclear de célula somática, o células ES producidas mediante otros métodos de reprogramación) a partir de un paciente o un donante histocompatible, y a continuación generando y expandiendo células EPR derivadas de las células ES. Dichas células EPR pueden ser

almacenadas. Adicionalmente, dichas células EPR pueden usarse para tratar al paciente del cual se han obtenido las ES o un pariente de dicho paciente o un individuo histocompatible.

5 La presente descripción demuestra que las células EPR humanas pueden diferenciarse y expandirse de forma fiable a partir de células ES humanas en condiciones bien definidas y reproducibles –representando una fuente inagotable de células para pacientes con trastornos degenerativos de la retina. La concentración de dichas células no estaría limitada por la disponibilidad, sino que podría valorarse para los requisitos clínicos precisos del individuo. La infusión o trasplante repetido de la misma población de células a lo largo de la vida del paciente también sería posible, si lo juzga necesario el médico responsable. Adicionalmente, la capacidad para crear bancos de compatibilidad o líneas hES de HLA de complejidad reducida a partir de los cuales se podrían producir las células EPR podría reducir potencialmente, o eliminar completamente, la necesidad de fármacos inmunosupresores y/o protocolos inmunomoduladores.

EJEMPLOS

15 Habiendo descrito ya la invención de forma general, será más fácil de entender en referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

En el manuscrito adjunto se incluye información adicional relativa a los resultados presentados en los ejemplos y/o resultados experimentales adicionales, que se incluye inmediatamente antes de las reivindicaciones en la presente solicitud.

Ejemplo 1

20 Métodos

Generación del banco de células maestras hESC

25 La línea hESC usada en estos estudios se describió previamente como MA09 (22), derivada de un embrión de fertilización in vitro (IVF) no usado obtenido bajo consentimiento informado completo y usado de acuerdo al “Advanced Cell Technology’s Ethics Advisory Board” y el “Institutional Review Board”. La reserva de siembra de MA09 fue descongelada y expandida a lo largo de cuatro pasajes en serie sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) inactivados mitóticamente usando las actuales Buenas Prácticas de Fabricación. El banco de células maestras hESC clínico (hESC-MCB) fue criopreservado, y se confirmó que tenía un cariotipo femenino (46, XX) y estaba libre de contaminantes bacterianos y micoplasmáticos, así como de virus humanos, bovinos, porcinos y de ratón. El análisis de PCR mostró que no había cambios o mutaciones en los genes asociados a la degeneración macular, que incluyen CTRP5, EVLV4, RPE-65, VMD2 y ABCA4 (ver Tabla 3 más adelante).

Fabricación de epitelio pigmentario de la retina

35 Los viales de hESC-MCB fueron descongelados y expandidos en MEF tratado con mitomicina C durante tres pasajes. Puestos que las hESCs fueron co-cultivadas con células animales, los derivados diferenciados se clasifican como un producto de xenotrasplante y se someten a las directrices de la FDA para el procesamiento de animal donante y producto, evaluación y archivo, así como la monitorización y registro del paciente (descrito adicionalmente a continuación en el Ejemplo 2). Después de la expansión de hESC, las células fueron inducidas secuencialmente para formar cuerpos embrioides seguidos de sobrecrecimiento celular y diferenciación localizada en parches de EPR pigmentados. La producción de EPR usada en este Ejemplo se describe adicionalmente a continuación en el Ejemplo 4. Los parches pigmentados fueron aislados con colagenasa, y tras purificación y tripsinización, las células disociadas fueron sembradas, crecidas hasta confluencia, e inducidas a rediferenciarse durante un total de tres pasajes en serie. Las EPR del pasaje 2 fueron criopreservadas y sirvieron como material de partida para formular células para uso clínico.

Estudios preclínicos

45 Las células EPR derivadas de ESC humanas fueron inyectadas subretinalmente en ratones nude inmunes NIH III (estudios de tumorigenicidad y biodistribución) y en ratas RCS distróficas y ratones ELOV4 (estudios de eficacia) como se ha descrito previamente (8). La detección de células humanas en los ojos inyectados y otros órganos se llevó a cabo mediante Q-PCR de ADN diseñado para amplificar secuencias Alu Y ADN humanas y mediante inmunotinción de secciones de parafina para mitocondrias humanas y bestrofina humana (descrito adicionalmente en el Ejemplo 2).

Caracterización celular y evaluación de seguridad

50 Las células EPR fueron evaluadas en términos de seguridad y caracterizadas para una serie de atributos específicos de EPR a diferentes tiempos, que incluyen la evaluación durante el proceso y la evaluación llevada a cabo después de la descongelación, la formulación de producto final, y el cultivo hasta madurez para simular el destino de las células trasplantadas *in vitro*. La evaluación de la seguridad para potenciales bacterias, micoplasma, virus de ratón y ADN de ratón residual se llevó a cabo según los protocolos estándar de WuXi Apptec, Inc. St. Paul, MN. El análisis citogenético

para el cariotipado, la huella dactilar de ADN para la certificación de línea celular y la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) fueron llevadas a cabo por Cell Lines Genetics, Madison, WI. La evaluación de endotoxinas se llevó a cabo sobre EPR criopreservado formulado como producto final para inyección clínica por parte de Cape Cod Associates, Inc., East Falmouth, MA. La tinción inmunohistoquímica cuantitativa fue llevada a cabo usando métodos estándar con el porcentaje de células teñidas positivas normalizado respecto al número de núcleos teñidos con DAPI inspeccionados. La evaluación de la pureza de EPR y el grado de diferenciación se basaron en el porcentaje de células teñidas con bestrofina, Pax6, ZO-1 y/o MITF. El cribado para confirmar la ausencia de marcadores de pluripotencia se llevó a cabo teñiendo para OCT-4 y fosfatasa alcalina. La fagocitosis (ensayo de potencia) se evaluó mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia cuantitativa (FACS) de cultivos EPR expuestos a biopartículas fluorescentes PhRodo™ (Invitrogen). Se llevaron a cabo ensayos de PCR de transcripción inversa cuantitativos (q-RT) para confirmar la regulación al alza de genes específicos de EPR (RPE-65, PAX-6, MITF, bestrofina) y la regulación a la baja de genes específicos de hESC (OCT-4, NANOG, SOX-2). El contenido de melanina por célula se midió espectrofotométricamente en partículas extraídas con NaOH con números de células conocidos (descrito adicionalmente en el Ejemplo 2).

Formulación de células e inyección

Los viales de EPR-MA09 fueron descongelados, lavados 3X mediante centrifugación, y resuspendidos a una densidad de 2×10^3 células viables/ μL de BSS PLUS® (Alcon). Se administró al OR un vial que contenía el volumen apropiado de EPR formuladas y un vial emparejado que contenía el volumen apropiado de BSS PLUS® a 2-8 C. Inmediatamente antes de la inyección, los dos viales fueron reconstituidos en una jeringa de 1 mL para obtener una densidad celular de carga que daría como resultado la administración del número deseado de EPR (50.000 células EPR viables en el espacio subretinal de cada ojo del paciente). Para asegurar una administración precisa de la dosis pretendida, la densidad celular de carga se incrementó para compensar la pérdida esperada de EPR viables durante la mezcla, la carga y la administración a través de la cánula. Esta pérdida de células viables se midió como se describe en el Ejemplo 3 y se demostró que era dependiente de la cánula usada. En estos ejemplos, se usó la cánula MEDONE POLYTIP® Cannula 25/38 (una cánula de 0,50mm (25g) x 28mm con punta de 0,12mm (38g) x 5mm), y la densidad celular de carga fue de 444 células viables / μL para dar lugar a una administración esperada de 336 +/- 40 células viables / μL (N=6), dando lugar a una administración esperada de 50.400 EPR viables en un volumen de 150 μL en el espacio subretinal de cada ojo del paciente.

Selección de pacientes

Los pacientes fueron seleccionados en base a una serie de criterios de inclusión y exclusión (Tabla 7 y Tabla 8, más adelante), que incluyen la enfermedad de estadio final, la pérdida de visión central, la ausencia de otra patología oftálmica significativa, un historial médico sin cáncer, cribado de cáncer actual, ausencia de contraindicaciones para inmunosupresión sistémica, capacidad de pasar por un procedimiento quirúrgico vitreoretinal bajo cuidado de anestesia monitorizada y adecuación psicológica para participar en un primer ensayo clínico en humanos que implica tejido de trasplante derivado de hESC.

Trasplante y razones

Se llevó a cabo la vitrectomía de pars plana, que incluye la inducción quirúrgica de la separación del vítreo posterior del nervio óptico antes del borde posterior de la base vítrea. Se administró una inyección submacular de 5×10^4 células hESC-EPR en un volumen de 150 μL en un área pre-seleccionada de la mácula pericentral que no está totalmente perdida debido a la enfermedad. Las zonas de trasplante se eligieron cuidadosamente en base a la presencia de EPR y fotorreceptores asociados nativos, aunque comprometidos, para optimizar las probabilidades de integración del trasplante y el potencial de rescate de células fotorreceptoras. La unión del trasplante en un complejo patoanatómico macular central completamente atrófico es improbable y no imita el estatus macular central en los estadios tempranos de la degeneración, lo cual puede constituir la diana terapéutica final de una estrategia de trasplante regenerativa basada en células madre.

El régimen de inmunosupresión incluye bajas dosis de tacrolimus (objetivo de niveles en sangre de 3-7 ng/mL) y micofenolato mofetil (MMF, oscilando entre 0,25g – 2g oralmente/día) una semana antes del procedimiento quirúrgico y continuó durante un periodo de 6 semanas. En la semana 6, el régimen indica el abandono de tacrolimus y una continuación del MMF durante otras seis semanas adicionales.

Resultados

Caracterización de EPR

La diferenciación de hESC controlada dio como resultado un EPR casi 100% puro (Fig. 1). Una única placa de 6 pocillos (9,6 cm²) de parches pigmentados (Fig. 1A) produjo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células EPR (p.ej., suficiente para tratar 50 pacientes con una dosis de hasta 3×10^6 células por paciente). Las células presentaron el comportamiento típico de EPR, perdiendo su morfología de adoquín pigmentado durante la proliferación (tras tripsinización); una vez restablecida la confluencia, se re-diferenciaron en una monocapa de epitelio pigmentado cuboidal poligonal. La Q-PCR mostró que los marcadores de pluripotencia (Oct-4, NANOG y SOX2) fueron regulados

a la baja de forma significativa, mientras que los marcadores de EPR, bestrofina, RPE65, Pax6, MITF, fueron expresados en niveles elevados (Fig. 1B-F y Tabla 5). La inmunotinción de cultivos maduros mostró que la bestrofina, un marcador tardío de EPR diferenciadas, se organizó en modo de membrana en la mayoría de las células antes de la recolección; todas (>99%) las células fueron positivas para bestrofina y/o PAX6 (PAX6 se hizo más débil o desapareció en las células más maduras) y para ZO-1, un componente de las uniones estrechas (no mostrado). Tras la criopreservación, los viales de células fueron descongelados y formulados para trasplante. La tinción para el marcador retinal Pax6 y/o MITF (un marcador de células pigmentadas) confirmó un 100% de pureza de EPR (Fig. 1C). Para evaluar adicionalmente las células formuladas, éstas fueron cultivadas durante 2-3 semanas para permitir el crecimiento y la maduración hasta que se estableció la morfología de EPR. La inmunotinción con Pax6/bestrofina (Fig. 1E) y ZO-1 (Fig. 1G) fue similar a los cultivos pre-recolección, y un ensayo de potencia mostró que >85% de las células fagocitaron fragmentos de biopartículas (Fig. 1J).

Estudios de seguridad

Puesto que las hESCs fueron expuestas a células y productos animales, MCB y EPR fueron evaluados extensivamente para determinar la presencia de patógenos animales y humanos. Se confirmó que las células estaban libres de contaminantes microbianos en todos los estadios, incluyendo patógenos víricos animales y humanos (Tabla 3, más adelante). El producto EPR final presentó un cariotipo femenino normal (46, XX) (Fig. 1K) y un perfil de huella de ADN coincidente con la línea hESC MA09. Aunque el proceso de fabricación de EPR se llevó a cabo en condiciones que no soportaban células pluripotentes, se llevó a cabo un ensayo de sensibilidad para descartar la presencia de cualquier hESC contaminante en el producto EPR final. El examen de muestras de 2/9 millones de células EPR (a P1/P2) teñidas para Oct-4 y fosfatasa alcalina no mostró presencia de células pluripotentes. Los estudios de tumorigenicidad, biodistribución y adición artificial de otros elementos llevados a cabo en ratones NIH-III no mostraron episodios adversos o de seguridad en ninguno de los animales. Adicionalmente, no se observaron tumores en animales inyectados con 50.000-100.000 células EPR contaminadas artificialmente con 0,01%, 0,1% o 1% de células hES no diferenciadas. La supervivencia de las células EPR humanas se confirmó en los ojos de los animales hasta los 3 meses después de la inyección, y en el 92% de los animales en el mes 9 (Tabla 6, más adelante). Las EPR humanas sobrevivieron durante toda la vida de los animales y se integraron en la capa EPR de ratón; aunque morfológicamente casi indiscernible de las células EPR hospedantes (Fig. 2), pudieron ser identificadas mediante inmunotinción y expresaron bestrofina de un modo baso-lateral típico (Fig. 2B). La tinción de Ki-67 mostró un nivel bajo de proliferación de 1 a 3 meses después del trasplante, pero no se observaron células positivas para Ki-67 a los nueve meses, lo que indica que las EPR derivadas de hESC habían formado monocapas quiescentes maduras.

El estadio de diferenciación influye en la unión y supervivencia de las células

La unión de las células trasplantadas a la membrana de Bruch, y su posterior supervivencia e integración en la capa de EPR hospedante, se considera crítica para el éxito de esta estrategia terapéutica. Una característica distintiva de la tecnología hESC es que el grado de diferenciación se puede controlar *in vitro*. El grado de diferenciación de EPR queda manifestado a través de una serie de expresiones genotípicas y fenotípicas moduladas, que incluyen el nivel de pigmentación. Las células mantenidas en condiciones similares, pero recolectadas y criopreservadas a diferentes tiempos, presentan niveles variables de pigmentación. La Figura 3 muestra dos lotes representativos de EPR criopreservados recolectados en niveles de pigmentación visiblemente diferentes (el contenido de melanina fue de $4,8 \pm 0,3$ SD pg/célula y $10,4 \pm 0,9$ SD pg/célula para el lote más ligeramente pigmentado y el más fuertemente pigmentado, respectivamente). Las células de ambos lotes de EPR fueron procesadas y formuladas usando el protocolo de trasplante clínico. Tras la extrusión a través de la cánula de inyección, las células fueron sembradas en placas de cultivo de tejido recubierto de gelatina y se monitorizó su unión y posterior crecimiento. Las células EPR del lote pigmentado más ligeramente mostraron un número mínimo de células flotando en los cultivos de una noche; la mayoría de las células se habían unido y extendido, presentando el comportamiento y la morfología típicos de EPR para este estadio de crecimiento (Fig. 3A). Después de tres días en cultivo, el número de células EPR había aumentado desde $4,0 \times 10^4$ sembradas hasta $10,6 \times 10^4$ células (Fig. 3C y Fig. 1G). En claro contraste, el EPR más fuertemente pigmentado mostró un gran número de células flotando; solo un pequeño porcentaje de las células se unió y sobrevivió, con un número de células significativamente reducido (menos de una décima parte [$9,0 \times 10^3$] de las observadas en el lote más ligeramente pigmentado) después de tres días de cultivo (Fig. 3F y Fig. 3G). Estos resultados sugieren una fuerte correlación entre el estadio de diferenciación de EPR y la capacidad para adherirse y prosperar *in vitro*. El lote de EPR usado en el presente estudio clínico tenía un contenido de melanina de 4,1 pg/célula y mostró una unión y crecimiento comparables a los del lote más ligeramente pigmentado. El estrés asociado al ciclo de congelación-descongelación, lavados post-descongelación, centrifugación y formulación, así como la extrusión a través de la cánula de inyección, puede justificar en parte las diferencias observadas entre las células pigmentadas ligeramente y las pigmentadas fuertemente.

Resultados clínicos

La paciente de SMD es una mujer caucásica de 26 años de edad con línea base de agudeza visual mejor corregida (BCVA) de movimiento manual (HM, del inglés "hand motion") y fue incapaz de leer ninguna letra en la tabla de agudeza visual de Estudio de Retinopatía Diabética de Tratamiento Temprano (ETDRS). En ningún momento después del trasplante se detectaron signos de inflamación intraocular o hiperproliferación. La ausencia de inflamación detectable clínicamente fue corroborada mediante fotografía biomicroscópica de lámpara de rendija, fotografía de

fondo, IVFA y SD-OCT (descrito adicionalmente en el Ejemplo 2 y Fig.8 y Fig. 9). Se observó una pigmentación clínicamente creciente a nivel de EPR comenzando en la semana post-operación 1, que pareció haberse extendido fuera de la zona de trasplante quirúrgico (Fig. 4). Los campos visuales de Goldmann mejoraron desde la línea base hasta dos meses después del trasplante (los campos pre-operativo y post-operativo se muestran en la Fig. 10 y Fig. 11). A la semana 2, la BCVA era de recuento de dedos (CF)(1 letra de ETDRS), lo cual continuó mejorando durante el periodo de estudio (5 letras de ETDRS [BCVA 20/800] a 1 y 2 meses) (Tabla 2). La paciente es muy fiable y trabajó durante años como artista gráfica. Ella manifestó haber mejorado subjetivamente en la visión de color y haber mejorado en la adaptación a contraste y oscuridad en el ojo operado, sin cambios en el ojo compañero.

Tabla 2. Cambio en la agudeza visual después de trasplante de hESC-EPR en el ojo operado.

| AMD seca | BCVA* | ETDRS (nº letras)** | Stargardt | BCVA | ETDRS (nº letras) |
|------------|--------|---------------------|------------|--------------------|-------------------|
| Línea base | 20/500 | 21 | Línea base | Movimiento de mano | 0 |
| 1 Semana | 20/320 | 21 | 1 Semana | Recuento de dedos | 0 |
| 2 Semanas | 20/200 | 33 | 2 Semanas | Recuento de dedos | 1 |
| 3 Semanas | 20/200 | 32 | 3 Semanas | Recuento de dedos | 3 |
| 4 Semanas | 20/250 | 30 | 4 Semanas | 20/800 | 5 |
| 6 Semanas | 20/250 | 28 | 6 Semanas | 20/800 | 5 |
| 8 Semanas | 20/320 | 25 | 8 Semanas | 20/800 | 5 |

* BCVA = Agudeza Visual Mejor Corregida (“Best Corrected Visual Acuity”)

** ETDRS = tabla de agudeza visual de Estudio de Retinopatía Diabética de Tratamiento Temprano (“Early Treatment Diabetic Retinopathy Study”)

La paciente es una mujer caucásica de 77 años de edad con BCVA de línea base de 21 letras de ETDRS (20/500). En ningún momento durante el trasplante se detectaron signos de inflamación intraocular o hiperproliferación a pesar de un moderado incumplimiento del régimen de inmunosupresores. La ausencia de inflamación clínicamente detectable fue corroborada mediante fotografía biomicroscópica de lámpara de rendija, fotografía de fondo, IVFA y SD-OCT (descrito adicionalmente en el Ejemplo 2 y Fig.8 y Fig. 9). Las imágenes OCT se muestran en la Fig. 4 y la Fig. 7. En la semana 2 la BCVA de ETDRS fue de 33 letras (20/200). En la semana 6 la BCVA fue de 28 letras de ETDRS (20/320), y permaneció estable hasta la semana 8. El escotoma central medido mediante campo visual de Goldmann se redujo ligeramente a las ocho semanas en comparación con la línea base.

Discusión

El uso terapéutico de células madre embrionarias supone un reto traduccional abrumador. El presente informe proporciona la primera evidencia clínica que sugiere que células derivadas de hESC pueden ser trasplantadas con seguridad en pacientes humanos. En el presente estudio, se trasplantó una dosis baja (5 x 10⁴ células) de células EPR generadas a partir de hESCs en los ojos de dos pacientes con diferentes formas de degeneración macular – AMD seca y SMD, las causas principales de ceguera adulta y juvenil en el mundo desarrollado, respectivamente.

Para mejorar las posibilidades de que las células se unan a la membrana de Bruch, se seleccionó una zona de inyección submacular en la que el complejo macular (fotorreceptores, membrana de Bruch y EPR) todavía estaba presente y era potencialmente viables, aumentando de este modo la probabilidad esperada de que las células trasplantadas se integraran con el EPR nativo y potencialmente rescataran el tejido peri-macular comprometido. Ambas pacientes toleraron bien el trasplante y no se observaron signos de inflamación post-operativa, rechazo o tumorigenicidad a la fecha de este informe. Los descubrimientos clínicos y de laboratorio sugieren que las células EPR trasplantadas pueden haberse unido, integrado y comenzado a influir en el EPR nativo comprometido.

La monitorización y evaluación actualmente en marcha de las pacientes puede determinar si las hESC-EPR trasplantadas presentan una inmunogenicidad reducida, si podrían sufrir rechazo en ausencia de inmunosupresión a largo plazo, y si la mejora visual observada persistirá en el tiempo. Es de esperar que las reacciones inmunes, si las hubiera, puedan gestionarse mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen regímenes inmunosupresores y/o tolerizantes. También es de esperar que se obtengan mayores mejoras visuales a través de la administración de un mayor número de células EPR. Adicionalmente, es de esperar que la administración de células EPR frenará o detendrá la pérdida visual asociada a afecciones de degeneración de la retina, que incluyen AMD, SMD y otras.

Aunque el trasplante de láminas intactas y suspensiones de células EPR primarias se ha intentado previamente (11-19), el EPR derivado de donantes de órganos adultos está restringido tanto en su capacidad para proliferar (23) como en su capacidad para diferenciarse *in vitro*, además de fallar en la expresión de los genes requeridos para biosíntesis de melanina usando condiciones de cultivo estándar (24). Clínicamente, las láminas de EPR adulto injertado en el espacio subretinal de pacientes de AMD no han conseguido mejorar la función visual (25). Aunque el EPR derivado de tejido pre- y post-natal ha sido disociado con éxito e inducido para crecer y madurar *in vitro* con atributos que

sugieren EPR completamente diferenciado (26-28), dichas fuentes son extremadamente limitadas y variables en términos de calidad y capacidad de expansión. Al contrario que el tejido adulto y fetal, una característica de las hESCs es que presentan la capacidad de proliferar indefinidamente sin sufrir senescencia, proporcionando una fuente virtualmente ilimitada de células "jóvenes" como material de partida para la diferenciación. Otra ventaja esperada del uso de la progenie obtenida de hESCs es que el estadio de diferenciación *in vitro* puede controlarse para maximizar la supervivencia y la funcionalidad post-trasplante. De hecho, los datos presentados en la presente memoria muestran que el grado de madurez y pigmentación de EPR afecta drásticamente a la posterior unión y crecimiento de las células *in vitro*.

El material de partida para las EPR usadas en este estudio fue un banco maestro de células hESC bien caracterizado generado usando procedimientos optimizados para producir de forma fiable grandes cantidades de células madre pluripotentes en condiciones controladas. Aunque el procedimiento de diferenciación de EPR es no permisivo para soportar la supervivencia de hESC, estudios preclínicos extensivos de seguridad confirmaron que las hESC-EPR trasplantadas no produjeron formación de tejido ectópico o tumores durante la vida de los animales. Un ensayo basado en inmunofluorescencia capaz de detectar menos de una célula hES sin diferenciar entre más de un millón de células, confirmó que el lote clínico de EPR usado en este estudio no tenía células pluripotentes detectables, lo que representa un nivel de detección cinco órdenes de magnitud inferior a los niveles de hESCs que han demostrado producir tumores en estudios de adición *in vivo*. La generación del hESC-MCB y la fabricación de cada lote de células EPR implicaron la propagación en capas cebadoras de fibroblastos de embrión de ratón primario. Por lo tanto, las hESC-EPR se clasifican como producto de xenotrasplante y fueron sometidas a toda la evaluación y monitorización requerida por las directrices de xenotrasplantes de la FDA a fin de asegurar que las células estaban libres de patógenos de ratón. Las EPR también fueron sometidas a una batería de tests de seguridad para confirmar la ausencia de contaminantes microbianos y virus, y fueron caracterizadas mediante una variedad de atributos específicos de EPR que incluyen la capacidad de fagocitosis, expresión génica, evaluaciones morfológicas y tinción inmunohistoquímica para marcadores específicos de EPR. Antes de iniciar estos ensayos clínicos, el trasplante de hESC-EPR en animales distróficos demostró que las células eran capaces de rescatar fotorreceptores y la función visual de un modo dependiente de la dosis.

El presente estudio está diseñado para evaluar la seguridad y la tolerabilidad de las hESC-EPR en pacientes con SMD y AMD seca de estadio avanzado. Hasta la fecha, las células parecen haber sido trasplantadas en ambas pacientes sin ninguna proliferación anormal, formación de teratoma, rechazo de injerto u otras reacciones patológicas indebidas. Se indica el seguimiento continuado y estudios adicionales. Sin embargo, la meta terapéutica última será tratar a los pacientes antes de que la enfermedad progrese, aumentando potencialmente la probabilidad de rescate de fotorreceptores y visual central.

Ejemplo 2

Este ejemplo proporciona información suplementaria y métodos relativos al Ejemplo 1.

Las características del banco maestro clínico de células hESC (hESC-MCB) (a partir del cual se produjeron las células EPR usadas en el Ejemplo 1) se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización del banco maestro de células hESC MA09.

| Test | Método de test para MCB | hESC MCB |
|--|---|----------|
| Esterilidad | USP <71> método de inoculación (WuXi SOP 30744) | Negativo |
| Micoplasma | Cultivo indirecto con tinción Hoechst y cultivo directo (WuXi SOP 30055) | Negativo |
| Retrovirus: | Co-cultivo con células <i>Mus dunni</i> y PG-4 (S ⁺ L ⁻) para detección de retrovirus (WuXi SOP 30201) | Negativo |
| | Detección de transcriptasa inversa vírica basada en PCR (WuXi SOP 30357) | Negativo |
| | Microscopía electrónica ultraestructural de morfología celular y detección de partículas víricas (WuXi SOP 30610) | Negativo |
| Detección <i>in vitro</i> de virus en células | Incubación con células MRC-5, VERO, NIH3T3 y HeLa (WuXi SOP 37000E) - efecto citopático | Negativo |
| | - hemoadsorción | Negativo |
| | - hemoaglutinación | Negativo |
| Detección <i>in vivo</i> de virus no evidentes | Inoculación en ratones lactantes y adultos (WuXi SOP 30194) | Negativo |

ES 2 734 453 T3

| Test | Método de test para MCB | hESC MCB |
|--|---|--|
| | Inoculación en cobayas | Negativo |
| | Inoculación en huevos de gallina embrionados – rutas de saco de yema y alantoico | Negativo |
| Virus minute en ratones (MVM) | Detección de ADN de MVM mediante qPCR (WuXi SOP 30910) | Negativo |
| Producción de anticuerpos de ratón | Títulos de anticuerpos en ratones inoculados para 19 virus, LDHEV y LCMV (WuXi SOP 30001) | Negativo |
| Ensayo de placa XC | Detección <i>in vitro</i> de virus ecotrópico de ratón (duración extendida) (WuXi SOP 30024) | Negativo |
| Virus bovinos | Detección de virus bovinos adventicios (WuXi SOP 30236) | Negativo |
| Virus porcinos | Detección de virus porcinos adventicios (WuXi SOP 30129) | Negativo |
| Virus de hepatitis B | Detección de ADN de HBV mediante qPCR (WuXi SOP 32827) | Negativo |
| Virus de hepatitis C | Detección de ADN de HBC mediante qPCR (WuXi SOP 30730) | Negativo |
| Herpes simple 6A y 6B | Detección de ADN de HSV6A y HSV6B humano mediante qPCR (WuXi SOP 30863) | Negativo |
| Virus de inmunodeficiencia humano (VIH) tipo 1 | Detección de ADN de VIH-1 mediante qPCR (WuXi SOP 30768) | Negativo |
| VIH tipo 2 | Detección de ADN de VIH-2 mediante qPCR (WuXi SOP 30798) | Negativo |
| Virus linfotrópico de célula T humano (HTLV) tipo 1 | Detección de ADN de HTLV-1 mediante qPCR (WuXi SOP 32491) | Negativo |
| HTLV tipo 2 | Detección de ADN de HTLV-2 mediante qPCR (WuXi SOP 32492) | Negativo |
| Cito-megalovirus humano (hCMV) | Detección de ADN de hCMV mediante qPCR (WuXi SOP 30705) | Negativo |
| Virus de Epstein Barr humano (hEBV) | Detección de ADN de hEBV mediante qPCR (WuXi SOP 30713) | Negativo |
| Parvovirus humano B19 | Detección de ADN de parvovirus humano B19 mediante q PCR (WuXi SOP 30761) | Negativo |
| Huella de ADN | Perfil de repetición tándem corta (STR) (CLG SOP 401) | Conforme al patrón esperado |
| Cariotipo con banda G | Análisis citogenético de células de metafase con banda 20 G (CLG SOP 100) | 46, femenino normal |
| Análisis FISH | 200 núcleos de interfase evaluados mediante FISH para los cromosomas 12 y 17 (CLG SOP 201) | Patrón de señal normal |
| Expresión de marcadores específicos de hES | qPCR de marcadores de hESC <i>OCT-4</i> , <i>REX-1</i> , <i>NANOG</i> y <i>SOX-2</i> (ACT Quality SOP-0022) | Dentro de 1 log ₁₀ de valores de banco de referencia de control |
| Ausencia de mutaciones genéticas de degeneración retinal | Cribado de formas mutantes de los genes <i>ABCA4</i> , <i>ELOVL4</i> , <i>VMD2</i> , <i>RPE-65</i> y <i>CTRP5</i> mediante PCR y análisis de secuencia (Laboratorio de Diagnóstico Molecular Oftálmico en la Universidad de California) | No mutaciones detectadas |
| Morfología | Evaluación microscópica de células y colonias (ACT BR-009A) | Conforme a morfología hESC |

Banco maestro de células de fibroblastos de embrión de ratón (MEF)

Según las directrices para industria de abril de 2003 “Source Animal, Product, Preclinical, and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Humans” y “Points to Consider on Xenogeneic Cell Therapy Medicinal Products” (EMA/CHMP/CPWP/83508/2009), las células MA09-hEPR se definen como un producto de xenotrasplante ya que estas células humanas han tenido contacto ex vivo con células no humanas (de ratón). La colonia de cría en Charles River Laboratories (Instalaciones Kingston, Stoneridge, NY, EE.UU.) se usó como fuente de células MEF. Estas instalaciones acreditadas por AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Care International) albergan una colonia cerrada de ratones CD-1, específicos libres de patógenos (SPF), en un cuarto barrera bajo monitorización sanitaria exhaustiva. Los animales donantes fueron emparejados por fecha y segregados durante el embarazo. Doce días después del emparejamiento antes del sacrificio, un veterinario realizó exámenes físicos de salud a todos los ratones; los animales fueron sometidos a eutanasia, y se tomaron muestras de sangre de cada ratón donante: para leucocitos y preparación de plasma a archivar y para evaluación serológica para determinar patógenos de ratón en Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Un patólogo veterinario certificado por el panel llevó a cabo una necropsia a los cadáveres y al útero de cada animal donante y en un embrión de cada camada. Los órganos de cada animal fueron archivados durante al menos 30 años junto con el plasma y los leucocitos criopreservados (como se requiere en la EMA/CHMP/CPWP/83508/2009). Se aislaron MEF y cultivos como se ha descrito previamente (Klimanskaya y McMahon, 2005), se congelaron a P1 y se usaron a P2 tras inactivación de mitomicina C. Para minimizar el riesgo de introducir virus de ratón y otros patógenos, los MEF fueron evaluados y caracterizados por WuXi AppTec, Inc. Las especificaciones y los resultados de la evaluación del lote MEF-08 usados en la preparación del hESC-MCB y el lote clínico de hEPR se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Caracterización del banco maestro de células MEF.

| Test | Método | Especificación | Lote MEF-08 |
|--|---|---------------------|----------------------|
| Esterilidad | USP - método de inoculación (WuXi SOP 30744) | Negativo | Negativo |
| Micoplasma | Cultivo indirecto con tinción Hoechst y cultivo directo (WuXi SOP 30055) | Negativo | Negativo |
| Retrovirus: | Co-cultivo con células <i>Mus dunni</i> y PG-4 (S ⁺ L ⁻) para detección de retrovirus (WuXi SOP 30201) | Negativo | Negativo |
| | Detección de transcriptasa inversa vírica basada en PCR (WuXi SOP 30357) | Negativo | Negativo |
| | Microscopía electrónica ultraestructural de morfología celular y detección de partículas víricas (WuXi SOP 30610) | Negativo | Negativo |
| Detección <i>in vitro</i> de virus en células | Incubación con células MRC-5, VERO, NIH3T3 y HeLa (WuXi SOP C30177) - efecto citopático | Negativo | Negativo |
| | - hemoadsorción | Negativo | Negativo |
| | - hemoaglutinación | Negativo | Negativo |
| Detección <i>in vivo</i> de virus no evidentes | Inoculación en ratones lactantes y adultos (WuXi SOP 30194) | Negativo | Negativo |
| | Inoculación en cobayas | Negativo | Negativo |
| | Inoculación en huevos de gallina embrionados – rutas de saco de yema y alantoico | Negativo | Negativo |
| Virus Minute de ratones (MVM) | Detección de ADN MVM mediante qPCR (WuXi SOP 30910) | Negativo | Negativo |
| Producción de anticuerpos de ratón | Títulos de anticuerpos en ratones inoculados para 19 virus, virus elevador de lactato deshidrogenasa (LDHEV) y virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) (WuXi SOP 30001) | Negativo | Negativo |
| Tumorigenicidad <i>in vitro</i> | Formación de colonia en agar blando (WuXi SOP 30006) | Negativo | Negativo |
| Evaluación de ID de línea celular | Perfiles de movilidad de electroforesis de isoenzima (WuXi SOP 30330) | Isoenzimas de ratón | Patrón de isoenzimas |

| Test | Método | Especificación | Lote MEF-08 |
|----------------------------------|---|-----------------------------|--|
| | | | representativo de células de ratón |
| Ensayo de placa XC | Detección <i>in vitro</i> de virus ecotrópico de ratón (duración extendida) (WuXi SOP 30024) | Reportar resultados | Positivo: MuLV ecotrópico detectado ¹ |
| Calificación de resultado de MEF | Evaluación de la capacidad de MEF para soportar el crecimiento y los atributos de células hES MA-09 en cultivo (ACT SOP QCS-0004) | Comparable a MEF de control | Pasa |

¹ Las líneas celulares de ratón son inherentemente capaces de producir retrovirus de ratón infecciosos y se han presentado evidencias que indican que los viriones de leucemia de ratón (MuLV) producidos por MEFs son no infecciosos y son incompetentes para replicación en células humanas (Amit et al 2004).

5 q-PCR de ADN para ADN humano

La detección del contenido de ADN humano en tejidos de ratón se llevó a cabo por parte de AltheaDX, Inc., San Diego, CA, usando el ensayo Taqman para la secuencia Alu Y con una sensibilidad de 1 célula humana por 150.000 células de ratón.

Tabla 5. Caracterización de células EPR y ensayos de seguridad.

| Test | Especificación | Lote 0211-B1A |
|--|--|---|
| Esterilidad | Negativo | Negativo |
| Micoplasma | Negativo | Negativo |
| Densidad celular | 1-2 millones de células viables/mL (post dilución) | 2 x 10 ⁶ células viables/mL |
| Viabilidad celular | Recolección final: >85% | 99% |
| | Post-descongelación: >70% | 95% |
| Morfología | Epitelio confluyente de adoquín, pigmentación media | Pasa |
| Cariotipo | 46, XX, normal | 46, XX, normal |
| Huella de ADN | Conforme a MCB hESC | Conforme |
| ARNm de hERP para: <i>BEST-1</i> <i>RPE-65</i> <i>PAX6</i> <i>MITF</i> | Regulado al alza por un mínimo de 1 log ₁₀ en comparación con hESC | RPE-6 1,32 PAX6 2,80 MITF 2,89 BEST-1 3,81 |
| mARN de hESC para: <i>OCT-4</i> <i>NANOG</i> <i>SOX-2</i> | Regulado a la baja con respecto a hESC (log ₁₀): <i>OCT-4</i> ≤ -2,13 <i>NANOG</i> ≤ -1,95 <i>SOX-2</i> ≤ -0,63 | OCT-4 -3,18 NANOG -2,49 SOX-2 -2,07 |
| Madurez mediante tinción de bestrofina | > 70% de tinción | 71% |
| Pureza tras inmunotinción | > 95% PAX6 y/o MITF | 100% |
| | > 95% PAX6 y/o bestrofina | 100% |
| | > 95% ZO-1 | 100% |
| Marcadores de proteína hESC | < 2 células teñidas con OCT-4 y AP en 9 millones de células examinadas | 0 |
| ADN de ratón residual | Negativo | Negativo |
| Virus de ratón por MAP | Negativo | Negativo |
| Retrovirus por co-cultivo de <i>Mus dunni</i> | Negativo | Negativo |

| | | |
|----------------------------|--------------|-------------|
| Virus de ratón ecotrópicos | Negativo | Negativo |
| Endotoxina | < 0,50 EU/mL | 0,312 EU/mL |
| Potencia de fagocitosis | Positivo | Positivo |

Inmunotinción de células

5 Las células en placas de 4 pocillos o 6 pocillos fueron fijadas con paraformaldehído al 2% (Electron Microscopy Sciences) en PBS durante 10 minutos, permeabilización durante diez minutos en sustituto de NP-40 al 0,1% (Sigma) en PBS, bloqueadas con suero de cabra al 10% en PBS durante 1 h o más, e incubadas con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Después se lavaron las células 3x15 min en Tween/PBS al 0,1%, y se incubaron con anticuerpos secundarios durante 1 h a RT, y se lavaron como se ha indicado anteriormente y montadas usando Vectashield con DAPI (Vector laboratories, Burlingame, CA). Las células teñidas fueron examinadas en microscopio de fluorescencia invertido (Nikon). Los anticuerpos usados fueron: bestrofina (Novus Biologicals), Pax6 (Covance), MITF (Abcam), ZO-1-FITC (Invitrogen), Oct-4 (Santa Cruz Biotechnologies), anti-ratón-Alexa594 (Invitrogen), anti-conejo-FITC (Jackson Immunoresearch), anti-ratón-Alexa-488 (Invitrogen), anti-conejo-Alexa-594 (Invitrogen), la actividad de fosfatasa alcalina fue detectada usando el kit Vector blue (Vector Laboratories).

Inmunotinción de secciones de tejido de ratón

15 Se incubaron secciones desparafinadas en tampón de citrato 0,1M (pH 6,0) en un recipiente de vapor durante 40 minutos para la recuperación de antígenos (bestrofina y mitocondrias humanas), o durante 30 minutos a un recipiente a presión para Ki67. La tinción de anticuerpo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente, pero en algunos casos se usaron anticuerpos secundarios conjugados a biotina después de bloquear la biotina endógena usando un kit de Vector (Burlingame, CA). Los anticuerpos usados fueron anti-bestrofina (Abcam, conejo), anti-mitocondria humana (ratón, Spring Bioscience), anti-ki67 (conejo, Abcam). Los anticuerpos secundarios fueron anti-biotina de ratón, anti-Cy3 de ratón (Jackson Immunoresearch), anti-Alexa488 de conejo (Invitrogen) y estreptavidina-Cy3 de Jackson Immunoresearch. Las secciones de teratoma de ratón formadas por hESC fueron usadas como control positivo para anti-mitocondria humana y Ki67, y las secciones de una partícula de hEPR fijada y embebida en parafina se usaron como control positivo para bestrofina. Los controles negativos fueron IgG de conejo ratón y de ratón (Novus Biologicals).

25 q-RT-PCR

Se usó el kit de aislamiento de ARN RNeasy de Qiagen para extraer ARN de las mezclas de células dando como resultado un volumen final de 30 µL de ARN por muestra. A continuación se sintetizó ADNc a partir de 10 µL de ARN con el kit de síntesis de ADNc Quantitect de Qiagen, dando como resultado un volumen final de 20 µL de ADNc. A continuación se evaluó un µL de ADNc para determinar la expresión génica relativa en réplicas por triplicado normalizadas a la señal de beta actina presente en cada muestra. Se realizó el perfil de expresión génica usando Applied Biosystems StepOne Plus con software versión 2.1 y ensayos de expresión génica TaqMan de Life Technologies siguiendo las condiciones de ciclo recomendadas por el fabricante para la cuantificación relativa de Ct comparativa. Los ensayos de qRT-PCR para marcadores de hES: Nanog, OCT4 y SOX2, y para marcadores de hEPR: RPE-65, PAX-6, MITF y bestrofina, fueron normalizados al nivel de expresión observado en la muestra de 100% de células hES (RQ = cuantificación relativa) que sirve como punto de consigna cero. La expresión génica relativa fue evaluada en réplicas por triplicado normalizadas a la señal de beta actina presente en cada muestra. Los datos se expresan como la media +/- SD para las tres réplicas.

Ensayo de fagocitosis

40 La fagocitosis se determina mediante un ensayo basado en FACS usando biopartículas fluorescente pHrodo™ de *E. coli* (Invitrogen) que fluorescen cuando se internalizan en el entorno de pH reducido de los fagosomas intracelulares. Las biopartículas fueron preparadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las EPR confluentes fueron incubadas con 50-200 µL de biopartículas por pocillo de una placa de 4 pocillos en medio independiente de CO₂ (Invitrogen) durante 16-20 horas a 37°C. Las placas de control negativas fueron incubadas a 4°C. Las células fueron examinadas en el microscopio, recolectadas mediante tripsina y analizada mediante FACS contando 10.000 eventos en un Citómetro de Flujo C6.

Determinaciones de melanina

50 Las suspensiones de células EPR fueron centrifugadas a 160 X G durante 5 minutos a temperatura ambiente y las muestras fueron eliminadas de los recuentos celulares de hemocitómetro. Las partículas se resuspendieron en NaOH 1 N y se calentaron a 80°C durante 10 minutos, se sometieron a vórtice y se midieron las absorbancias a 475 nm contra una curva de calibrado de una melanina sintética (Sigma nº cat. 8631) que variaba entre 5 y 180 µg/mL. Las muestras fueron evaluadas por triplicado y los datos se normalizaron respecto al número total de células extraídas.

Tabla 6. Supervivencia de EPR en el espacio subretinal de ratones NIH-III

Los datos de la Tabla 6 mostrada a continuación fueron compilados a partir de tres estudios: 1) un estudio de tumorigenicidad en el que se inyectaron 100.000 hES-EPR en el ojo, y los animales fueron exterminados a las 4, 12 y 40 semanas, 2) un estudio de adición en el que 100.000 hES-EPR a las que se añadió 0,01%, 0,1% y 1% de células hES pluripotentes fueron inyectadas en el ojo y los animales fueron exterminados a los 2 y 9 meses, y 3) un estudio de distribución de tejido en el que 50.000 y 100.000 hES-EPR fueron inyectadas en el ojo, y los animales fueron exterminados a 1, 3 y 9 meses. La Tabla incluye datos obtenidos mediante Q-PCR del ojo completo para determinar ADN humano y mediante inmunotinción de secciones de parafina para determinar mitocondrias humanas.

5

| Tiempo de supervivencia (semanas) | Número total de animales | Número de animales con células humanas observadas en el ojo | % de animales con células humanas sobreviviendo en el ojo |
|-----------------------------------|--------------------------|---|---|
| 4 | 26 | 26 | 100% |
| 8 | 19 | 19 | 100% |
| 12 | 28 | 28 | 100% |
| 36-40 | 52 | 48 | 92% |

10

Tabla 7. Criterios de inclusión/exclusión para el estudio de AMD

| CRITERIOS DE INCLUSIÓN | |
|------------------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Adulto masculino o femenino de más de 55 años de edad. • El paciente debería tener una salud suficientemente buena para esperar de forma razonable su supervivencia durante al menos cuatro años después del tratamiento. • Observaciones clínicas consistentes con AMD seca avanzada con evidencia de una o más áreas de >250 micras de atrofia geográfica (como se define en el estudio de enfermedad ocular relacionada con la edad [AREDS]) que implique la fovea central. • GA definido como atenuación o pérdida de EPR según se observa mediante biomicroscopía, OCT y FA. • No evidencia de neovascularización coroidal actual o previa. • La agudeza visual del ojo que recibirá el trasplante no será mejor que 20/400. • La agudeza visual del ojo que NO recibirá el trasplante no será peor que 20/400. • Observaciones electrofisiológicas consistentes con AMD seca avanzada. • Médicamente adecuado para someterse a vitrectomía e inyección subretinal. • Médicamente adecuado para anestesia general o sedación despierto, si es necesario. • Médicamente adecuado para trasplante de una línea de células madre embrionarias: Cualquier valor de laboratorio que quede ligeramente fuera del rango normal será revisado por el Monitor Médico y los Investigadores para determinar su significación clínica. Si se determina que no es clínicamente significativo, el paciente puede participar en el estudio. • Química de suero normal (anализador multi-canal secuencial 20 [SMA-20]) y ensayos de cribado de hematología (recuento sanguíneo completo [CBC], tiempo de protrombina [PT], y tiempo de tromboplastina parcial activada [aPTT]). (NOTA: con la excepción de las anomalías específicamente identificadas en los criterios de exclusión). • Cribado de orina negativo para fármacos adictivos. • Serologías negativas de virus de inmunodeficiencia humano (VIH), hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV). • Sin historial de malignidades (con la excepción de haber sido tratado con éxito de carcinoma celular basal (escisión) [cáncer de piel] o haber sido tratado con éxito de carcinoma de célula escamosa de la piel). • Cribado negativo de cáncer en los 6 meses previos: <ul style="list-style-type: none"> • historial completo y examen físico; • examen de cribado dermatológico de lesiones malignas; • ensayo negativo de sangre fecal oculta y colonoscopia negativa en los 7 años previos; • roentgenograma de pecho negativo (CXR); • CBC normal y diferencial manual; • urinalisis negativo (U/A); • examen de tiroides normal; • si es hombre, examen testicular; examen rectal digital (DRE) y antígeno específico de la próstata (PSA) normales; |

| | |
|--------------------------------------|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> • si es mujer, examen pélvico normal con prueba de Papanicolaou; y • si es mujer, examen clínico de mama normal y mamografía negativa. • Si es mujer y tiene potencial de estar embarazada, voluntad de usar dos formas efectivas de control de la natalidad durante el estudio. • Si es hombre, voluntad de usar anticonceptivos de barrera y espermicida durante el estudio. • Voluntad de diferir toda donación futura de sangre, componente sanguíneo o tejido. • Capaz de entender y voluntad de firmar el consentimiento informado. |
| <p>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Presencia de CNV activo o inactivo. • Presencia o historia de distrofia retinal, retinitis pigmentosa, coriorretinitis, coroidopatía grave central, retinopatía diabética u otra enfermedad vascular retinal o degenerativa diferente a la ARMD. • Historial de neuropatía óptica. • Atrofia macular debida a causas diferentes a la AMD. • Presencia de neuropatía óptica glaucomatosa en el ojo estudiado, IOP incontrolado, o uso de dos o más agentes para controlar IOP (acetazolamida, beta bloqueante, alfa-1-agonista, antiprostaglandinas, inhibidores carbonícos anhidros). • Catarata de gravedad suficiente con probabilidad de necesitar extracción quirúrgica en el plazo de 1 año. • Historial de reparación de desprendimiento de retina en el ojo estudiado. • Miopía axial mayor a 8 dioptrías. • Longitud axial mayor a 28 mm. • Historial de malignidad (con la excepción de carcinoma de célula basal [cáncer de piel] tratado con éxito [escindido] o de carcinoma de célula escamosa de la piel tratado con éxito). • Historial de infarto de miocardio en los 12 meses previos. • Historial de diabetes mellitus. • Historial de alteraciones cognitivas o demencia que pueden afectar a la capacidad del paciente para participar en el proceso de consentimiento informado y de completar las evaluaciones apropiadamente. • Cualquier inmunodeficiencia. • Cualquier terapia inmunosupresora actual diferente a corticosteroides intermitentes o en baja dosis. • Alanina transaminasa/aspartato aminotransferasa (ALT/AST) > 1,5 veces el límite superior normal o cualquier enfermedad hepática conocida. • Insuficiencia renal, definida como un nivel de creatinina $\geq 1,3$ mg/dL. • Una concentración de hemoglobina inferior a 10 gm/dL, un recuento plaquetario inferior a $100k/mm^3$ o un recuento de neutrófilos absolutos inferior a $1000/mm^3$ a la entrada en el estudio. • Evidencia serológica de infección con Hepatitis B, Hepatitis C o VIH. • Participación actual en cualquier otro ensayo clínico. • Participación en los 6 meses previos en cualquier ensayo clínico de un fármaco por administración ocular o sistémica. • Cualquier otra enfermedad ocular que amenaza la vista. • Cualquier historial de enfermedad vascular retinal (barrera hematoencefálica comprometida). • Glaucoma. • Uveítis u otra enfermedad inflamatoria intraocular. • Opacidades significativas de la lente u otra opacidad del medio. • Extracción de la lente ocular en los 3 meses previos. • Cirugía ocular en el ojo estudiado en los 3 meses previos. • Si es mujer, embarazo o lactancia. • Cualquier otra afección médica, que, a juicio del investigador, interferirá con la capacidad del paciente para cumplir con el protocolo, comprometa la seguridad del paciente o interfiera con la interpretación de los resultados del estudio. |

Tabla 8. Criterios de inclusión/exclusión para el estudio de SMD.

| | |
|--------------------------------------|--|
| <p>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Adulto masculino o femenino de más de 18 años de edad. • Diagnóstico clínico de SMD avanzada. • Si se conoce, el genotipo del paciente será registrado en el historial médico, si se desconoce, el paciente permitirá el envío de una muestra para genotipado. • Descubrimientos clínicos consistentes con SMD. • La agudeza visual del ojo que recibirá el trasplante no será mejor que el movimiento de mano. • La agudeza visual del ojo que no recibirá el trasplante no será mejor que 24 (20/320) letras del Estudio de Retinopatía Diabética de Tratamiento Temprano (ETDRS). • Constricción de campo visual periférico documentada en el test de campo visual estándar. • Observaciones electrofisiológicas consistentes con SMD. • Médicamente adecuado para someterse a vitrectomía e inyección subretinal. • Médicamente adecuado para anestesia general o sedación despierto, si es necesario. • Médicamente adecuado para trasplante de una línea de células madre embrionarias: <ul style="list-style-type: none"> • Química de suero normal (analizador multi-canal secuencial 20 [SMA-20]) y ensayos de cribado de hematología (recuento sanguíneo completo [CBC], tiempo de protrombina [PT], y tiempo de tromboplastina parcial activada [aPTT]). • Cribado de orina negativo para fármacos adictivos. • Serologías negativas de virus de inmunodeficiencia humano (VIH), hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV). • Sin historial de malignidades. • Cribado negativo de cáncer en los 6 meses previos: <ul style="list-style-type: none"> • historial completo y examen físico; • examen de cribado dermatológico de lesiones malignas; • ensayo negativo de sangre fecal oculta y si tiene más de 50 años colonoscopia negativa en los 7 años previos; • roentgenograma de pecho negativo (CXR); • CBC normal y diferencial manual; • urinalísis negativo (U/A); • examen de tiroides normal; • si es hombre, examen testicular; si tiene más de 40 años examen rectal digital (DRE) y antígeno específico de la próstata (PSA) normales; • si es mujer, examen pélvico normal con prueba de Papanicolaou; y • si es mujer, examen clínico de mama normal y si tiene 40 años de edad o más, mamografía negativa. • Si es mujer y tiene potencial de estar embarazada, voluntad de usar dos formas efectivas de control de la natalidad durante el estudio. • Si es hombre, voluntad de usar anticonceptivos de barrera y espermicida durante el estudio. • Voluntad de diferir toda donación futura de sangre, componente sanguíneo o tejido. • Capaz de entender y voluntad de firmar el consentimiento informado. |
| <p>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Historial de malignidad. • Historial de infarto de miocardio en los 12 meses previos. • Historial de diabetes mellitus. • Cualquier inmunodeficiencia. • Cualquier terapia inmunosupresora actual diferente a corticosteroides intermitentes o en baja dosis. • Evidencia serológica de infección con Hepatitis B, Hepatitis C o VIH. • Participación actual en cualquier otro ensayo clínico. • Participación en los 6 meses previos en cualquier ensayo clínico de un fármaco por administración ocular o sistémica. • Cualquier otra enfermedad ocular que amenaza la vista. • Cualquier medicación ocular crónica. • Cualquier historial de enfermedad vascular retinal (barrera hematoencefálica comprometida). • Glaucoma. • Uveítis u otra enfermedad inflamatoria intraocular. • Opacidades significativas de la lente u otra opacidad del medio. • Extracción de la lente ocular en los 3 meses previos. • Si es mujer, embarazo o lactancia. |

| | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Cualquier otra afección médica, que, a juicio del investigador, interferirá con la capacidad del paciente para cumplir con el protocolo, comprometa la seguridad del paciente o interfiera con la interpretación de los resultados del estudio. |
|--|---|

Ejemplo 3

Ajuste de la densidad celular para asegurar la administración de una dosis precisa

5 Este estudio describe la determinación del impacto de las etapas en el proceso de carga e inyección sobre la administración de EPR viables. Específicamente, en este ejemplo se muestra que el proceso de carga e inyección da como resultado alguna pérdida de células viables, que dicha pérdida puede medirse fácilmente (y puede variar con el protocolo de administración, p.ej., dependiendo de la cánula de inyección específica usada), y que dicha pérdida puede tenerse en cuenta para aumentar la concentración de células, permitiendo la administración del número esperado de células. Adicionalmente, se demostró que la siembra y crecimiento de células no se vio afectada de forma significativamente adversa tras la carga y extrusión a través de dos cánulas.

10 Estos estudios incorporaron el proceso completo de carga e inyección que incluyen: (1) Adición final de BSS-Plus frío al producto final concentrado de células EPR a 2000 células/μL para obtener la densidad deseada de células a inyectar. (2) Mezclamiento suave de las células EPR y BSS-Plus usando una aguja de punta roma 18g (BD) unida a una jeringa de inyección de 1 mL (BD LUER-LOK (TM)). (3) Extrusión de 150 μL de células EPR formuladas desde la jeringa llena a través de la cánula de inyección.

15 El mantenimiento de las células EPR en Alcon BSS BSS-Plus® en hielo se mostró constante a lo largo de 4 horas, siempre que las células sean formuladas en una concentración de 1000 células/μL o más. En estas condiciones, no existe pérdida detectable en el número de células viables. Para asegurar la integridad celular, se administrará un volumen exacto de producto final de células EPR al quirófano (OR) a 2000 células viables/μL. Cada tubo de células EPR vendrá acompañado de un segundo tubo que contiene el volumen exacto de BSS-Plus frío a añadir a las células y se mezclará justo antes de la inyección. Las células EPR predispensadas y el BSS-Plus se administrarán al OR a 2-8 grados C en tubos de microcentrífuga estériles.

20 Estudio 1 – Cánula 23/38 MEDONE POLYTIP®

25 Se descongelaron células EPR similares en características al lote de EPR clínicas pretendidas, se procesaron y se formularon en BSS-Plus frío como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se recuperó un total de 4,1 millones de células viables post-descongelación y formulación. La viabilidad inicial fue del 91% y el número de células recuperadas post-descongelación y formulación fue el típico para este lote. Las células se diluyeron a las concentraciones iniciales indicadas en BSS-Plus frío y se almacenaron en hielo. A continuación las células fueron trituradas suavemente usando una aguja de llenado roma 18g (BD) unida a una jeringa de 1 mL (BD LUER-LOK TM). Se transfirieron aproximadamente 200 μL de células en la jeringa a través de la aguja de llenado. La aguja de llenado se retiró y se unió una cánula 23/38 MEDONE POLYTIP® a la jeringa que contenía las células. El émbolo de la jeringa fue presionado suavemente para administrar 150 L de células a través de la cánula de inyección. El tiempo total de la inyección fue de 2-3 minutos. Las células fueron recolectadas en un tubo estéril y se evaluó el número de células viables.

30 El estudio 1 demostró que las células EPR cargadas y extruidas a través de una cánula MedOne dan como resultado una pérdida predecible de la densidad celular en el rango de densidades celulares evaluado (de 295 a 1144 células viables/μL). La pérdida media de densidad celular fue de 22,8 +/- 7,0% (N=6). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 9.

35 Tabla 9. Pérdida de células viables tras administración a través de la cánula 23/38 MEDONE POLYTIP®. La disminución media en el porcentaje de células administradas fue de 22,8 +/- 7,0% células viables/L (N=6).

| Células iniciales / μL | Células extruidas / μL | % de disminución tras carga y administración con cánula |
|------------------------|------------------------|---|
| 1144 | 883 | 23 |
| 830 | 615 | 26 |
| 668 | 495 | 26 |
| 532 | 440 | 18 |
| 335 | 296 | 12 |
| 295 | 199 | 32 |

La disminución del número de células administradas a través de la cánula de inyección se observó para todas las densidades celulares evaluadas, que oscilan entre 295 y 1144 células viables/ μ L. El porcentaje de disminución de la densidad celular resulta de forma general constante en el rango evaluado. El porcentaje de disminución observado a las dos densidades más bajas evaluadas (199 y 296) es más variable y probablemente refleja la precisión del recuento celular a dichas menores densidades celulares.

Las células extruidas a través de la cánula MedOne, las células de control formuladas pero no extruidas a través de la cánula fueron centrifugadas, resuspendidas en medio de crecimiento de EPR y sembradas en placas de 96 pocillos de área completamente recubierta de gelatina a una concentración de 10.000 células por pocillo. Para comparación, se cargaron porciones de la misma preparación celular y se pasaron a través de la cánula Synergetics (cánula de micro inyección rígida 39ga, Angled) y se procesaron y sembraron como se ha indicado antes. Cuatro días después de la siembra, las células fueron tripsinizadas y contabilizadas. La Tabla 10, mostrada a continuación, presenta el número de células medio \pm SD para tres recuentos celulares.

Tabla 10. Siembra y crecimiento celular después de cargar y extruir a través de una cánula.

| Número de células después de 4 días en cultivo (células sembradas a 10.000 células por pocillo) | |
|--|------------------------|
| Células de control | 20533 \pm 3085 (N=3) |
| Extruidas con Synergetics | 21047 \pm 1702 (N=3) |
| Extruidas con MedOne | 24460 \pm 5207 (N=3) |

La siembra y crecimiento posteriores de células extruidas a través de las cánulas fueron comparables a las células de control no extruidas a través de cánula.

Estudio 2 – Cánula de inyección de Synergetics, Inc., Angled, 39g

Se descongelaron células EPR similares en características al lote de EPR clínicas pretendidas, se procesaron y se formularon en BSS-Plus frío como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se recuperó un total de 2,6 millones de células viables post-descongelación y formulación. La viabilidad inicial fue del 97% y el número de células recuperadas post-descongelación y formulación fue el típico para este lote. Las células se diluyeron a una concentración inicial de 375 células viables/ μ L en BSS-Plus frío y se almacenaron en hielo. A continuación las células fueron trituradas suavemente usando una aguja de llenado roma 18g (BD) unida a una jeringa de 1 mL (BD LUER-LOK TM). Se transfirieron aproximadamente 200 μ L de células a la jeringa a través de la aguja de llenado. La aguja de llenado se retiró y se unió una cánula de micro inyección rígida 39ga Synergetics, Inc., Angled, a la jeringa que contenía las células. El émbolo de la jeringa fue presionado suavemente para administrar 150 L de células a través de la cánula de inyección. El tiempo total de la inyección fue de 2-3 minutos. Las células fueron recolectadas en un tubo estéril y se evaluó el número de células viables. A lo largo de una serie de ocho inyección, la media de células viables administradas fue de 238 \pm 25 células viables/ μ L o aproximadamente 100 células viables menos que la administración pretendía para la menor dosis de células de este estudio (50.000 células por ojo).

De este modo, el Estudio 2 demostró que las células EPR cargadas y extruidas a través de la cánula Synergetics dieron como resultado una pérdida predecible en la densidad celular en el rango de la menor dosis celular pretendida (se evaluó una densidad de carga de 375 células viables/ μ L). La pérdida media en la densidad de células viables fue de 38,4 \pm 6,8% (N=8). Se puede aumentar la densidad celular de carga en consecuencia para compensar las pérdidas anticipadas, asegurando de este modo una administración precisa del número pretendido de EPR viables (tal como 50.000 células/ojo, como en el presente estudio).

Estudio 3 – Cánula MedOne POLYTRIP® 23/38 y cánula de micro inyección rígida Synergetics 39ga, Angled

El Estudio 3 se llevó a cabo con el lote de EPRs usado para la administración de pacientes en el anterior Ejemplo 1. En este estudio las células EPR fueron cargadas a un 25% más de la densidad celular de dosis a administrar para compensar las pérdidas anticipadas en la carga de la jeringa y la inyección a través de la cánula MedOne. La misma compensación del 25% en la densidad de carga se usó para evaluar la cánula Synergetics.

Cuando se carga con un 25% más de células formuladas sobre la dosis diana baja (444 células viables/ μ L para administrar 333 células/ μ L), la cánula MedOne administró 336 \pm 40 células viables/ μ L. De forma similar, cuando se carga con células formuladas un 25% por encima de la dosis diana (1776 células viables/ μ L para administrar 1.333 células/ μ L), la cánula MedOne administró 1433 \pm 187 células viables/ μ L. Los resultados de las inyecciones a la menor dosis usando la cánula Synergetics confirmaron que con un aumento adicional de la densidad celular de carga de 100 células viables/ μ L se podía obtener la dosis diana a la densidad más baja.

Se descongelaron ocho viables (un total de 16 millones de células) y se procesaron como se ha descrito anteriormente (3 centrifugaciones), todo el procesamiento se realizó a RT. El rendimiento fue de 3,78 millones de células (23,6% de

recuperación, similar a descongelaciones previas) con un 95% de viabilidad. Las células fueron resuspendidas para almacenamiento y transporte a una densidad de 2 millones de células viables/mL (2.000 células viables/ μ L) en BSS-Plus frío y se mantuvieron después en hielo. Se seleccionó una densidad celular superior a 1 millón de células/mL para promover la supervivencia celular durante el almacenamiento en frío en BSS-Plus. Se dispensaron veintiuna alícuotas de 89 μ L, que contenían un total de 177.600 células viables, en tubos de microcentrifuga de cierre del producto final.

Las alícuotas de células se almacenaron en hielo hasta que se realizó la dilución final en el momento de la carga de la jeringa y la extrusión a través de la cánula. Para las administraciones a dosis baja (50.000 EPR viables/ojo), se dispensaron 311 μ L de BSS-Plus frío en un tubo que contenía las células para llevarlo a un volumen final de 400 μ L a una concentración de 444 células/ μ L. Esta densidad es un 25% superior a la densidad de administración pretendida de 333 células/ μ L para compensar las pérdidas anticipadas que se producen cuando se mezcla con la aguja de llenado, en la carga de la jeringa y en la administración a través de la cánula MedOne.

Para las administraciones a alta dosis (200.000 EPRs viables/ojo), se agruparon dos alícuotas de 89 μ L en un único tubo (356.000 células) y se dispensaron 22 μ L de BSS-Plus frío en el tubo que contiene las células para llevar el volumen final a 200 μ L con una concentración de 1.776 células/ μ L. Esta densidad es un 25% superior a la densidad de administración pretendida de 1.333 células/ μ L para compensar las pérdidas anticipadas que se producen cuando se mezcla con la aguja de llenado, en la carga de la jeringa y en la administración a través de la cánula MedOne.

Los tubos de microcentrifuga que contenía células diluidas fueron tapados y golpeados suavemente con un dedo para promover la mezcla. La aguja roma de llenado (volumen vacío de 90 μ L) se unió a la jeringa BD de 1 mL y las células fueron trituradas suavemente 1-2 veces en la aguja roma de llenado, teniendo cuidado de minimizar el contacto con la jeringa. La jeringa se llenó con aproximadamente 200 μ L de células. La aguja roma se retiró y se unió la cánula de inyección (MedOne 38g o Synergenic 39g). Se dispensaron aproximadamente 150 μ L de células en un tubo de microcentrifuga. Cada alícuota dispensada fue evaluada para determinar la densidad celular y la viabilidad mediante exclusión de azul de tripano. Estos resultados se resumen en las Tablas 11 y 12, incluidas a continuación.

Tabla 11. Efecto de la reconstitución y administración a través de la cánula MedOne sobre el número de células EPR y su viabilidad.

| Cánula MedOne | | | |
|--|--|--|--------------------------|
| Densidad de carga células viables/ μ L | Densidad objetivo células viables/ μ L | Densidad media administrada células viables/ μ L | Porcentaje de viabilidad |
| 444 | 333 | 336 +/- 40 (N=6) | 95,2 +/- 3,2 (N=5) |
| 1776 | 1333 | 1433 +/- 187 (N=3) | 94,3 +/- 5,1 (N=3) |

Tabla 12. Efecto de la reconstitución y administración a través de la cánula Synergetics sobre el número de células EPR y su viabilidad.

| Cánula Synergenics | | | |
|--|--|--|--------------------------|
| Densidad de carga células viables/ μ L | Densidad objetivo células viables/ μ L | Densidad media administrada células viables/ μ L | Porcentaje de viabilidad |
| 444 | 333 | 232 +/- 238 (N=3) | 89,0 +/- 9,6 (N=3) |
| 1776 | 1333 | 1296 (N=1) | 89 (N=1) |

El aumento de la densidad de carga inicial en un 25% sobre la dosis objetivo compensó de forma efectiva la pérdida de densidad celular observada durante la carga y la extrusión a través de la cánula MedOne. A la menor dosis a administrar, la cánula MedOne administró una densidad celular media de 336 +/- 40 células viables/ μ L (N=6) para una administración objetivo de 333 células viables/ μ L. A la mayor densidad celular a administrar (1333 células viables/ μ L), la cánula MedOne administró 1433 +/- 187 células viables/ μ L (N=3).

Después de la administración a la menor dosis a través de las cánulas MedOne o Synergetics, las células fueron diluidas en medio de crecimiento de EPR, centrifugadas, y sembradas en placas de 96 pocillos de área completamente recubierta con gelatina a una concentración de 40.000 células por pocillo. Se procesaron células de control inyectadas sin cánula tomadas de los mismos tubos que las células extruidas a través de la cánula, y se sembraron del mismo modo. Veinticuatro horas después de la siembra, todas las células se habían unido y no se observaron células flotantes indicativas de muerte celular o una mala eficacia de siembra, en ninguna de las condiciones evaluadas.

Las células extruidas a través de la cánula MedOne, a través de la cánula Synergetics, y las células de control formuladas pero no extruidas a través de ninguna cánula, fueron centrifugadas, resuspendidas en medio de

5 crecimiento EPR y sembradas en placas de 96 pocillos de área completamente recubierta de gelatina a una concentración de 40.000 células por pocillo. Tres días después de la siembra, las células fueron tripsinizadas y contabilizadas. La Tabla 13 incluida a continuación muestra el número de células medio +/- SD. Estos resultados demuestran que la siembra y crecimiento posteriores no se vieron afectados negativamente por la extrusión a través de ninguna de las cánulas. Las células de control y las inyectadas con la cánula MedOne fueron examinadas microscópicamente dos días después de la siembra en cultivo y mostraron la morfología EPR típica con células en división activa. No se observaron diferencias entre las células de control y las inyectadas con cánula.

Tabla 13. Siembra y crecimiento celular tras carga y extrusión a través de una cánula.

| Número de células después de 3 días en cultivo (células sembradas a 40.000 células por pocillo) | |
|--|----------------------|
| Células de control | 86117 +/- 3301 (N=3) |
| Extruidas con Synergetics | 98300 +/- 4554 (N=5) |
| Extruidas con MedOne | 82960 +/- 9368 (N=3) |

10 En resumen, puesto que las células EPR en BSS-Plus frío son más estables a concentraciones superiores a 1000 células/μL, el producto final puede ser resuspendido en el tubo de microcentrifuga de cierre del producto final en BSS-Plus frío a una concentración de 2000 células/μL, permitiendo que la cánula se cargue con dosis de hasta 300.000 células en un volumen de 150 μL. Tras procesar en el cuarto limpio GMP, se pueden suministrar al quirófano dos tubos de microcentrifuga a 2-8 grados C: un vial que contiene el volumen exacto de células EPR a 2000 células viables/μL y un vial que contiene el volumen exacto de BSS-Plus frío a añadir a las células para llevar la densidad celular a la densidad de inyección (es decir, la densidad que tiene en cuenta la pérdida de células viables durante la carga y extrusión a través de la cánula, p.ej., una densidad un 25% superior a la dosis objetivo final para compensar la pérdida de células viables con la cánula MedOne). Cuando hay que cargar concentraciones superiores a 1.000 células/μL o superiores a 2.000 células/μL en la cánula, la etapa de dilución se puede omitir y en su lugar se pueden administrar las células al quirófano en BSS-Plus frío a la concentración deseada.

Las densidades de carga formuladas adaptadas a la cánula MedOne y las dosis correspondientes se muestran en la Tabla 14. Una adaptación similar se podría determinar fácilmente para la cánula Synergetics o para otra cánula o sistema de administración.

25 Tabla 14. Densidades celulares de carga usadas para administrar las dosis objetivo de EPRs viables, teniendo en cuenta la pérdida de células viables durante el mezclamiento, la carga y la administración con la cánula MedOne.

| Densidad de carga células viables/μL | Densidad objetivo células viables/μL | Volumen de inyección | Dosis células viables |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| 444 | 333 | 150 μL | 50.000 |
| 888 | 666 | 150 μL | 100.000 |
| 1333 | 999 | 150 μL | 150.000 |
| 1776 | 1333 | 150 μL | 200.000 |

Ejemplo 4

Diferenciación de EPR a partir de células ES

30 Este ejemplo describe la diferenciación de EPR a partir de hESC. Las EPR resultantes fueron usadas en los estudios descritos en el Ejemplo 1.

35 El medio de diferenciación de cuerpo embrioide (EB-DM) consistió en DMEM Knockout™ suplementado con Glutamax, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptotanol y reemplazo de suero Knockout™, y se usó en el inicio de la formación de cuerpo embrioide hasta el momento en que los parches pigmentados fueron recolectados y disociados, es decir, durante la formación del cuerpo embrioide, el sobrecrecimiento y la posterior formación de parche pigmentado. Cada lote de EB-DM se preparó con 250 mL de DMEM Knockout™, 3 mL de Glutamax-1, 3 mL de aminoácidos no esenciales, 0,3 mL de 2-mercaptotanol y 38 mL de reemplazo de suero Knockout™.

40 El medio de crecimiento/mantenimiento de EPR (EPR-GM/MM) consistió en una parte de EB-DM (como se ha descrito en el párrafo precedente) y una parte de DMEM (alto en glucosa), FBS y Glutamax. Este medio se usó después de la derivación de células EPR a partir de parches pigmentados y durante el posterior crecimiento de EPR y mantenimiento durante los pasajes 0 al pasaje 2 hasta el punto de recolección del producto final sin purificar. Cada lote de EPR-

GM/MM se preparó con 100 mL de EB-DM, 90 mL de DMEM alto en glucosa, 10 mL de suero bovino fetal (FBS) (Hyclone), y 1 mL de Glutamax-1.

Las células EPR derivadas y cultivadas en estos medios expresaron los marcadores moleculares de EPR bestrofina, CRALBP, RPE65. PEDF, fueron capaces de fagocitosis, y rescataron la función visual en ratas RCS.

5 Los lotes de EPR generados usando los anteriores medios han pasado todas las evaluaciones de calidad de proceso que incluyen: evaluaciones morfológicas, tinción inmunohistoquímica y q-RT-PCR para la regulación al alza de genes EPR y la regulación a la baja de la expresión génica de células hES. Los rendimientos y la pureza celular son comparables a las células EPR preparadas previamente usando medios MDBK-GM y MDBK-MM (Sigma Aldrich), OptiPRO-SFM, o VP-SFM.

10 Los lotes de EPR se fabricaron usando EB-DM desde el momento de la formación de cuerpo embriode hasta el punto de recolección de parches pigmentados (en lugar de MDBK-GM u OptiPRO-SFM). Tras la recolección y la tripsinización de parches pigmentados, el pasaje 0, las células EPR fueron sembradas a continuación en EPR-GM (medio EGM-2) como se ha definido anteriormente) y después se cambiaron a medio de crecimiento/mantenimiento de EPR en lugar de MDBK-MM o VP-SFM. Alternativamente, las EPR pueden sembrarse directamente en EPR-GM/MM y dejarlas crecer para diferenciarse durante toda la duración de pasaje. Después de que se observase el nivel apropiado de diferenciación, las células EPR de pasaje 0 fueron recolectadas y divididas dos veces más en dichos medios hasta la recolección final y la criopreservación del producto sin purificar en el pasaje 2.

Los datos mostrados a continuación muestran un resumen de la evaluación durante el proceso de cinco sub-lotes de ERP que fueron mantenidos en EB-DM desde el momento de la formación de cuerpo embriode hasta el momento de la recolección de los parches pigmentados. En este punto, los parches pigmentados fueron recolectados de diferentes pocillos en días diferentes, fueron tripsinizados y sembrados como EPR de pasaje 0. Los lotes B1A, B2A y B2B fueron sembrados en medio EGM-2 hasta confluencia, seguido de un cambio a medio de crecimiento/mantenimiento de EPR para promover la diferenciación para los pasajes 0, 1 y 2. Los lotes B3B y B3A fueron tratados del mismo modo excepto para 1 o 2 pasajes, respectivamente, cuando fueron mantenidos exclusivamente en EPR-GM/MM durante toda la duración del pasaje. Todos los lotes fueron mantenidos por tanto en EPR-GM/MM tras alcanzar la confluencia hasta que se observó el nivel de diferenciación apropiado. Tras la terminación del pasaje 2, las células EPR fueron criopreservadas como producto sin purificar. Los lotes mantenidos en EGM-2 durante la fase de crecimiento inicial seguida de cambio a EPR-GM/MM o mantenidos en medio de crecimiento/mantenimiento de EPR durante toda la duración de los varios pasajes fueron similares excepto por una tasa de crecimiento ligeramente más rápida observada en el medio EGM-2. Todos los lotes pasaron la evaluación morfológica en los pasajes 0, 1 y 2, con especificaciones de paso que incluyen la morfología de adoquín epitelial típica y la pigmentación del medio. La expresión de marcadores de EPR se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta usando los siguientes anticuerpos primarios (las diluciones estuvieron entre 1:100 y 1:1000 y se determinaron empíricamente para cada lote de anticuerpo): bestrofina – monoclonal de ratón; Novus Biologicals (nº NB 300-164); PAX6 – Covance, policlonal de conejo (PRB-278P); ZO-1 – Invitrogen; monoclonal de ratón (339100); ZO-1 – Invitrogen; policlonal de conejo (61-7300); ZO-1 – FITC – Invitrogen; monoclonal de ratón (339111); MITF – monoclonal de ratón, Abcam (ab3201).

Se usaron anticuerpos secundarios a una dilución 1:500 (u otra dilución, según se indique) en disolución de bloqueo y fueron como se indica a continuación: Alexa Fluor 488 anti-ratón, Invitrogen nº A11001; Alexa Fluor 488 anti-conejo, Invitrogen nº A11008; Alexa Fluor 594 anti-ratón, Invitrogen nº A11032; Alexa Fluor 594 anti-conejo, Invitrogen nº A11012; Cy-3 conjugado anti-ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch Cat. nº 115-165-146), usado a 1:200.

La inmunotinción de marcadores de EPR se llevó a cabo para determinar la pureza mediante combinaciones de: PAX6 y MITF; Bestrofina y PAX6; y ZO-1 solo. La maduración de EPR se evaluó determinando el porcentaje de tinción positiva de EPR para bestrofina. La inmunotinción se llevó a cabo en 4 puntos durante la fabricación de células EPR: (1) antes de la recolección del pasaje 1 y la siembra del pasaje 2 las EPR fueron teñidas par bestrofina, PAX6 y ZO-1; (2) antes de la recolección del pasaje 2 y la criopreservación las EPR fueron teñidas para bestrofina, PAX6 y ZO-1; (3) el producto de EPR sin purificar se descongeló y se formuló como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se re-suspendió a una concentración de 1.000 células viables/ μ L en BSS-PLUS. A continuación las células fueron diluidas en EPR-GM, centrifugadas a 1000 RPM, re-suspendidas y sembradas en pacas de cuatro pocillos recubiertas de gelatina a una concentración de 100.000-300.000 células por pocillo y se incubaron de uno a dos días antes de la tinción para MITF y PAX6; (4) el producto EPR sin purificar se descongeló y se formuló como se describe en el Ejemplo 1 y se re-suspendió a una concentración de 1.000 células viables/ μ L en BSS-PLUS. Las células fueron diluidas a continuación en EPR-GM, centrifugadas a 1000 RPM, re-suspendidas y sembradas en placas de cuatro pocillos recubiertas de gelatina a una concentración de 50.000-200.000 células por pocillo y se mantuvieron hasta confluencia antes de tinción. En ese momento, los cultivos fueron cambiados a EPR-MM y mantenidos hasta que se observó la pigmentación de medio y la morfología de adoquín, momento en el cual los cultivos fueron teñidos para PAX6, Bestrofina y ZO-1. Resumidamente, las células fueron enjuagadas 2-3 veces con PBS sin Ca^{2+} , Mg^{2+} (Gibco nº 14190), fijadas con un 2% de paraformaldehído durante 10 minutos, enjuagadas con 2x PBS, incubadas con 0,1 % de disolución sustituta de NP-40 (Sigma nº 74388) en PBS durante 15 minutos, enjuagadas 2x con PBS, incubadas con disolución de bloqueo (10% de suero de cabra normal (Jackson ImmunoResearch nº 005-000-121), 16% de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences nº 15710) preparadas a la concentración de trabajo de 2% en PBS (alícuotas recién preparadas o congeladas) entre 30 minutos y una noche. A continuación las células fueron incubadas

5 con anticuerpos primarios (hasta dos anticuerpos por pocillo usando anticuerpos primarios de diferentes especies) en disolución de bloqueo e incubadas 1-2 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4 grados C, enjuagadas con PBS, lavadas tres veces en disolución PBS-Tween (PBS sin Ca²⁺, Mg²⁺ (Gibco nº 14190) con 0,5% de Tween-20 (Sigma nº P7949)), con agitación (10-15 minutos cada lavado). Entonces las muestras fueron incubadas con anticuerpos secundarios, y lavadas como con los anticuerpos primarios. Después de eliminar el último lavado, se añadieron 1-2 gotas de Vectashield con DAPI y las células fueron examinadas y contabilizadas en un microscopio de fluorescencia invertido. Se tomaron fotografías de tres a seis campos aleatorios con un aumento 20x en todos los canales, que contenían un mínimo de 1000 núcleos. Las fotografías se unieron y las imágenes se ajustaron según fuera necesario para permitir la visualización de qué células eran negativas para Bestrofina y PAX6, o negativas para PAX6 y MITF o negativas para ZO-1. Se contabilizó una célula como positiva para un marcador dado si se observaba el patrón de tinción esperado, p.ej., PAX6 localizado en los núcleos, Bestrofina localizada en la membrana plasmática con una disposición hexagonal (que demuestra tinción de bestrofina localizada en líneas estrechas en la periferia de la célula), tinción de ZO-1 presente en las uniones estrechas que bordean las células con una disposición poligonal, y tinción de MITF detectada confinada en el núcleo. El porcentaje de células positivas para cada marcador o combinación de marcadores se determinó contabilizando las células positivas en las imágenes reunidas y determinando el número total de células contando los núcleos a partir de las imágenes teñidas con DAPI no reunidas.

Tabla 15. Marcadores de EPR expresados por células EPR diferenciadas a partir de células hES. Los marcadores de EPR fueron detectados mediante tinción de inmunofluorescencia indirecta.

| Lote | Pasaje 1 marcadores | | | Pasaje 2 marcadores | | |
|----------------|---------------------|------------|---------------------|---------------------|------------|---------------------|
| | ZO-1 | Bestrofina | PAX6 y/o Bestrofina | ZO-1 | Bestrofina | PAX6 y/o Bestrofina |
| B1A | 100% | 81% | 100% | 100% | 81% | 100% |
| B2A | 100% | 90% | 100% | 100% | 82% | 100% |
| B2B | 100% | 86% | 100% | 100% | 89% | 100% |
| B3A | 100% | 98% | 100% | 100% | 81% | 100% |
| B3B | 100% | 88% | 100% | 100% | 99% | 100% |
| Especificación | >/=95% | >/=70% | >/=95% | >/=95% | >/=70% | >/=95% |

20 Adicionalmente, se detectó la expresión de ARNm mediante q-RT-PCR, como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados obtenidos de cada lote se muestran en la Tabla 16 y demuestran que los genes de EPR fueron regulados al alza y los genes de células ES fueron regulados a la baja, como era de esperar.

Tabla 16. Regulación al alza de genes EPR y regulación a la baja de genes de células ES en células EPR diferenciadas a partir de células hES.

| Lote | Pasaje 2 (log de regulación al alza) | | | | Pasaje 2 (regulación a la baja) | | |
|----------------|--------------------------------------|------|------|-------|---------------------------------|--------|--------|
| | Bestrofina | PAX6 | MITF | RPE65 | NANOG | OCT-4 | SOX2 |
| B1A | 3,4 | 1,9 | 2,06 | 3,02 | -2,78 | -3,29 | -2,68 |
| B2A | 4,2 | 1,79 | 2,5 | 1,6 | -2,53 | -2,89 | -2,72 |
| B2B | 3,5 | 2,33 | 2,82 | 1,54 | -2,08 | -3,24 | -1,86 |
| B3A | 3,39 | 2,34 | 2,77 | 1,55 | -2,54 | -2,89 | -1,85 |
| B3B | 3,73 | 1,96 | 2,48 | 3,25 | -2,76 | -3,33 | -4,01 |
| Especificación | >1 | 1 | >1 | >1 | <-1,95 | <-2,13 | <-0,63 |

25 Las EPR fabricadas usando las formulaciones de medio descritas anteriormente (EPR-GM/MM y EB-DM), así como las células EPR criopreservadas fabricadas previamente usando otros medios (MDBK-GM y MDBK-MM) fueron evaluadas para determinar su capacidad para fagocitar. En este estudio, las EPR criopreservadas fueron descongeladas y sembradas en medio de crecimiento/mantenimiento de EPR. Las células EPR de lotes actuales generados usando EB-DM durante la formación de cuerpo embriode y la formación de parche pigmentado y usando EPR-GM/MM durante la maduración de EPR fueron tripsinizadas y sembradas igualmente en EPR-GM/MM. Ambos cultivos fueron crecidos hasta confluencia y mantenidos hasta diferenciación en EPR-GM/MM antes de evaluar su capacidad para fagocitar biopartículas fluorescentes (Invitrogen Cat. nº P35361), que fluorescen cuando se internalizan en el entorno ácido de fagosomas de células EPR. Las células fueron incubadas con las biopartículas fluorescentes a 37 grados C para permitir la fagocitosis, o a 4 grados C como control negativo. Los cambios en la intensidad de fluorescencia fueron detectados mediante FACS para las células incubadas a 37 grados C (Fig. 12),

indicando la fagocitosis de las biopartículas. La integración estadística de los picos da lugar a porcentajes de células fagocíticas positivas para cada lote y temperatura de incubación.

5 Tabla 17. Fagocitosis mediante células EPR producidas usando medio MDBK (MDBK-GM y MDBK-MM) o EB-DM y EPR-GM/MM. La fagocitosis se detectó incubando células con partículas que se vuelven fluorescentes en el entorno ácido de fagosomas. Se muestran los porcentajes de células fagocíticas positivas correspondientes a células incubadas a 37 grados C o a 4 grados C (control negativo), detectadas mediante FACS. Las células producidas en EB-DM y EPR-GM/MM se compararon de forma favorable con las células producidas en medio MDBK, confirmando adicionalmente la adecuación de dichas formulaciones de medio.

| | Medio MDBK | EB-DM y EPR-GM/MM |
|-------------|------------|-------------------|
| 4 grados C | 8% | 18% |
| 37 grados C | 64% | 77% |

10 Estos resultados muestran fagocitosis en un alto porcentaje de células en ambos lotes de células EPR mantenidas en EPR-GM/MM, y adicionalmente demuestran la adecuación de usar EPR-GM/MM para el crecimiento y la maduración de células EPR.

Ejemplo 5

Ejemplos adicionales de métodos para la derivación de EPR

15 Los métodos de este ejemplo se usaron para producir EPR diferenciadas de líneas hESC adicionales que fueron producidas sin destrucción de embrión, específicamente, células iPS (específicamente, células iPS producidas usando vectores episomales no integrantes) y células hES NED (sin destrucción de embrión, del inglés “no embryo destruction”) producidas a partir de blastómeros biopsiados, en donde el embrión del que se obtiene el blastómero permaneció viable y fue criopreservado posteriormente. Las células NED fueron producidas como se describe en Chung et al. (Cell Stem Cell. 7 Feb 2008; 2(2): 113-7).

20 Las hESC fueron propagadas en Matrigel(TM) diluidas según las instrucciones del fabricante en medio mTESR-1 (Stem Cell Technologies, Inc.). Las EPR fueron producidas a partir de cuerpo embrioide (“EB”) o cultivos de hESC multicapa como se ha descrito previamente (Klimanskaya et al., Cell Stem Cells 6: 217-245 (2004), tras cultivo de suspensión los EBs fueron llevados a placa para sobrecrecimientos antes de la recolección de EPR. Sin embargo, se observó que la formación de EB era menos eficiente a partir de hESC cultivadas en Matrigel(TM), con células que exhiben menores velocidades de agregación exitosa y una viabilidad reducida. Se utilizaron las siguientes modificaciones de protocolo para mejorar la eficacia de la formación de EB:

25 Se permitió que las hESC sobrecrecieran más allá del tiempo en el que normalmente serían sometidas a pasaje, de tal modo que las colonias se hicieron más “gruesas”, es decir un poco elevadas y/o multicapa. Para la formación de EB, las hESC fueron disociadas sin permitirles disociarse en suspensiones celulares individuales, usando rascado mecánico, colagenasa I, acutasa, colagenasa con o seguida de acutasa, tampón de disociación basado en EDTA. Estos métodos permitieron que las colonias de hESC se elevaran sin disociarse en células individuales. No se utilizó tripsina (que tiende a producir con facilidad suspensiones de célula individual en las condiciones de uso ordinarias).

30 Las hESC disociadas fueron cultivadas a continuación en placas de unión ultra-baja para permitir la formación de EB. Opcionalmente, se pueden usar otros métodos tales como la gota colgante para la formación de EB. Típicamente, se cultivaron hESC procedentes de discos de 1-3 pocillos a 6 pocillos en 1-2 pocillos de placas de baja adherencia en 2-7 mL de medio de cultivo. Las células fueron cultivadas en medio EB (bloqueado con DMEM alto en glucosa, 1% de disolución de aminoácidos no esenciales, 2 mM de GlutaMAX 1, 0,1 mM de beta-mercaptoetanol, y 13% de reemplazo de suero (SR, Invitrogen)). Durante los primeros 2-3 días de cultivo en medio EB mientras se están formando los EB, el medio de EB fue suplementado con 10 micromolar de Stemolécula de Stemgent Y-27632, un inhibidor de proteína quinasa asociada a rho (ROCK) (ver Watanabe et al., Nat Biotechnol. Jun 2007; 25(6): 681-6, que se incorpora en su totalidad a la presente memoria a modo de referencia). El uso de inhibidor ROCK mejoró la viabilidad celular, particularmente para células hES obtenidas usando EDTA o disociación enzimática. El uso del inhibidor ROCK era opcional para hESC rascadas mecánicamente, que sobrevivieron bien incluso sin él.

35 Entre 7-12 días después de la formación de EB, los EBs fueron llevados a placas recubiertas de gelatina para sobrecrecimiento. Los EPR fueron identificados fácilmente por su morfología epitelial (apariencia de adoquín) y su pigmentación.

40 También se produjeron EPRs a partir de cultivos multicapa de hESC crecidas sobre Matrigel(TM) esencialmente como se ha descrito previamente (Klimanskaya et al., 2004, ver anterior), excepto que las células fueron cultivadas sobre Matrigel(TM) en lugar de células cebadoras. Resumidamente, se dejaron sobrecrecer hESC en Matrigel(TM) en medio mTESR-1 hasta que las colonias de hESC se volvieron multicapa (aproximadamente 10-14 días de cultivo), momento en el cual el medio de cultivo fue reemplazado con medio EB (como se ha descrito anteriormente). Se incluyó

opcionalmente inhibidor ROCK en el medio de cultivo pero no fue necesario para una formación y recuperación eficientes de EPR. Las EPR fueron identificadas fácilmente por su morfología epitelial (aparición de adoquín) y pigmentación. El medio se cambió cada 1-2 días hasta que se observaron células EPR pigmentadas (típicamente en 4-5 semanas).

5 Las EB resultantes o los cultivos multicapa exhibieron una apariencia "moteada" que contenían regiones más oscuras visibles a simple vista. El examen con microscopio confirmó que dichas regiones más oscuras estaban constituidas por células EPR identificables por su característica pigmentación y morfología epitelial de adoquín. El cultivo de células EPR resultante se muestra en la Figura 19. Tras diferenciación a partir de hESC, las células EPR fueron aisladas mediante disociación mecánica o enzimática.

10 **Ejemplo 6**

Métodos de trasplante de EPR

Los siguientes métodos se usan para trasplante de células en pacientes de degeneración macular seca relacionada con la edad (AMD) y en pacientes de distrofia macular de Stargardt (SMD).

15 No se administraron corticosteroides al paciente inmediatamente antes de la cirugía. La cirugía se llevó a cabo con anestesia general o local, con o sin sedación despierto, a discreción del cirujano.

20 Las células para el trasplante fueron proporcionadas como una suspensión congelada almacenada en la fase vapor de un sistema de almacenamiento en nitrógeno líquido (aproximadamente -140°C). Para formular las células para administración, los viales fueron retirados del congelador de nitrógeno líquido y a continuación llevados a un baño de agua a 37°C con agitación constante durante 1-2 minutos hasta descongelación. El vial se roció a continuación con isopropanol al 70% y secado. El contenido de cada vial (1 mL de medio de criopreservación que contenía 1 millón de células en el momento de la congelación) fue transferido a un tubo cónico de 50 mL y enjuagado con 40 mL de DMEM sin suero. Las células fueron centrifugadas y cada partícula fue resuspendida en 40 mL de BSS-PLUS. La suspensión celular fue centrifugada de nuevo y la(s) partícula(s) fue agrupada si se había descongelado más de un criovial. El volumen se llevó a un volumen final de 10 mL en BSS PLUS y se centrifugó una tercera vez. El sobrenadante fue aspirado completamente y las células se llevaron a un volumen final de aproximadamente 150 µL de BSS PLUS por cada 1 mL de células descongeladas (se pueden usar volúmenes más pequeños si se desea una suspensión más concentrada). Las muestras fueron retiradas y se llevó a cabo un recuento de células viables. Se determinó el número total de células viables y se añadió el volumen apropiado de BSS-PLUS para obtener la concentración de células viables objetivo, tal como 2.000 células viables por µL. Se transfirió el volumen apropiado de producto formulado a un tubo de microcentrífuga estéril de 0,5 mL y las muestras fueron retiradas para archivo, determinaciones de viabilidad, tinción Gram y evaluación de esterilidad. También se prepararon tubos estériles de 0,5 mL emparejados que contenían el volumen exacto de BSS-Plus y se etiquetaron. Se permitió que los viales emparejados se almacenaran a 2-8°C durante no más de 4 horas de espera para la mezcla final y el trasplante en el quirófano.

35 Se realizó una vitrectomía estándar de pars plana de 3 puertos en el paciente. Se aplicó una pequeña retinotomía y a continuación se realizó una infusión de BSS Plus en el espacio subretinal usando el sistema de inyección de fluido a través de la máquina de vitrectomía hasta que se creó un pequeño desprendimiento retinal neurosensorial. El cirujano se aseguró de que el bleb se había creado en una posición foveal temporal. El bleb puede extenderse opcionalmente dentro de los vasos sanguíneos de galería, pero no desprendió la mácula central/fóvea. Si se observaba que el bleb se extendía hacia la mácula central, el cirujano tenía la opción de parar y crear otra retinotomía, observando las mismas reglas en cuanto a su localización. El BSS Plus inyectado subretinalmente fue retirado a continuación.

40 Entonces se introdujo una cánula pre-cargada y las células fueron infundidas en el espacio creado a lo largo de aproximadamente un minuto en un volumen de 150 µL. Se llevó a cabo una monitorización mediante visión directa para asegurar el correcto posicionamiento de la cánula. La posición exacta del bleb se registró mediante la operación del microscopio por fotografía o (preferiblemente) vídeo, a fin de que los descubrimientos post-operatorios pudieran ser correlacionados exactamente con la posición del bleb.

45 Se implantó una suspensión que contiene el número deseado de células EPR derivadas de hESC (p.ej., 50.000, 100.000, 150.000 o 200.000) en 150 µL de BSS Plus. Las células fueron infundidas a lo largo de aproximadamente un minuto. La cánula se mantuvo en posición durante un minuto adicional para evitar reflujos. A discreción del cirujano, por ejemplo, si la retinotomía se hacía más grande, se llevó a cabo opcionalmente un intercambio aire-fluido. A continuación se utilizaron procedimientos estándar para cerrar las incisiones. Se recuperó entonces al paciente de la anestesia, pero se le mantuvo en posición supina durante 6 horas.

No se permitió la administración de corticosteroides durante 48 horas después del procedimiento. Se permitieron agentes anti-inflamatorios no esteroideos tópicos o sistémicos para uso en la gestión de molestias, si eran necesarios.

Ejemplo 7

55 Estabilidad de preparaciones de células EPR criopreservadas

Este ejemplo demuestra que las células EPR criopreservadas superaron los criterios de liberación y permanecieron adecuadas para uso cuando se evaluaron a los 6 y los 12 meses después de la congelación. En base a esto, se muestra que las EPR criopreservadas retienen su función y atributos de producto durante 12 meses tras la criopreservación. Se anticipa que las células EPR criopreservadas permanecerán adecuadas para trasplante durante años tras ser congeladas (p.ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años).

Las muestras de células EPR criopreservadas fueron producidas como se ha descrito en el Ejemplo 4, anteriormente, y se congelaron en nitrógeno líquido en un medio de criopreservación (90% de FBS y 10% de DMSO) y se almacenaron en la fase vapor de un sistema de almacenamiento de nitrógeno líquido (aproximadamente -140°C). Después de 6 o 12 meses de almacenamiento, las células criopreservadas fueron descongeladas y lavadas como se describe en el Ejemplo 6 (resumidamente, se descongelaron en un baño de agua a 37 grados C, el exterior del recipiente se lavó con etanol al 70%, y las células fueron lavadas para eliminar el medio de criopreservación). Tras descongelar, las células fueron sometidas a pruebas para confirmar la estabilidad del producto. Se superaron todos los criterios de liberación, tal como se muestra a continuación en la Tabla 18.

Tabla 18. Estabilidad de células EPR criopreservadas durante 6 o 12 meses.

| Descripción del test | Método | Especificación | Resultado (6 meses) | Resultado (12 meses) |
|----------------------|---|--|---|---|
| Cariotipo | G-banda | Normal 46 XX (post-descongelación, formulación y cultivo) | Pasa | Pasa |
| FISH | FISH | Señal FISH normal (12 y 17) | Pasa | Pasa |
| Potencia | Ensayo de fagocitosis usando partículas fluorescentes | Internalización de partículas fluorescentes por células EPR detectada mediante análisis FACS con un desplazamiento en el pico fluorescente para células cultivadas con partículas a 37 grados C (post-descongelación, formulación y cultivo) | Pasa | Pasa |
| Recuento celular | Exclusión de azul de tripano | Informar recuperación (post-descongelación y formulación) | 32,6% | 29% |
| Viabilidad | Exclusión de azul de tripano | Al menos 70% (post-descongelación y formulación) | 95% | 97% |
| Esterilidad | Método de inmersión (USP/21 CFR 610.12) | Negativo (viales descongelados) | Negativo | Negativo |
| Morfología | Evaluación morfológica | Morfología de adoquín aceptable, células cubiodales (post-descongelación, formulación y cultivo) | Pasa | Pasa |
| Pureza | Inmunotinción de marcadores de EPR | Al menos 95% de positivos para Bestrofina y/o Pax6 Al menos 95% de positivos para ZO-1 (post-descongelación, formulación y cultivo) | 97% Bestrofina + 100% Pax6 + 100% ZO-1+ | 96% Bestrofina + 100% Pax6 + 100% ZO-1+ |

Ejemplo 8

Estabilidad de células EPR formuladas

Este ejemplo demuestra que las células EPR permanecieron adecuadas para uso durante al menos 4 horas después de descongelar y durante la preparación para administración cuando se mantenían entre 2-6 grados C.

Las células criopreservadas fueron descongeladas y formuladas como se describe en el Ejemplo 6, anteriormente, y almacenadas a 2-8°C en el recipiente del producto final (tubo de microcentrifuga estéril de 0,5 mL con cesta). La Tabla 19 muestra la viabilidad porcentual media ± SD determinada mediante exclusión de azul de tripano para estos dos lotes evaluados en el momento de la formulación y después de cuatro horas en almacenamiento en frío (3 formulaciones finales por lote).

Tabla 19. Viabilidad inicial y a 4 horas de células EPR en producto clínico.

| | Viabilidad a 0 horas (%) | Viabilidad a 4 horas (%) |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| Lote A (N=3) | 82,7 ± 6,7 | 82,3 ± 1,5 |
| Lote B (N=3) | 84,3 ± 1,5 | 85,3 ± 4,1 |

Estos datos mostraron que las células EPR formuladas mantienen la viabilidad celular hasta 4 horas después de la preparación.

5 En experimentos adicionales el producto final de células EPR fue formulado a 2.000 células viables/μL y almacenado en frío durante diversos tiempos antes de extrusión a través de la cánula MedOne REF 3233 POLYTIP® 23/38. En este estudio (datos mostrados en la Tabla 20) se descongeló un lote de células EPR (que había pasado la prueba de liberación de producto en masa para uso clínico) y se procesó como se ha indicado. Las células fueron resuspendidas y almacenadas con una densidad de 2.000 células viables/μL en BSS-Plus y se mantuvieron después de eso en hielo. Se seleccionó una densidad celular superior a 1.000 células viables/μL para promover la supervivencia celular durante el almacenamiento en frío en BSS-Plus. En dicho momento, se dispensaron veintiuna alícuotas de 89 μL de células que contenían 177.600 células viables totales en los tubos de microcentrífuga de cierre de producto final. Las alícuotas de células fueron almacenadas en hielo hasta que se llevó a cabo la dilución final en el momento de la carga de la jeringa y la extrusión a través de la cánula. Para las administraciones de dosis bajas, se dispensaron 311 μL de BSS-Plus frío en un tubo que contenía células para llevarlo a un volumen final de 400 μL a una concentración de 444 células/μL. Esta densidad es un 25% superior a la densidad de administración objetivo de 333 células/μL para compensar las pérdidas anticipadas que se producen cuando se mezcla con la aguja de llenado, se carga la jeringa y se administra a través de la cánula MedOne.

20 Para las administraciones de dosis elevadas, se agruparon dos alícuotas de 89 μL de células en un único tubo (356.000) y se dispensaron 22 μL de BSS-Plus frío en el tubo que contenía las células para llevar el volumen final a 400 μL a una concentración de 1.776 células/μL. Esta densidad es un 25% superior a la densidad de administración objetivo de 1.333 células/μL para compensar las pérdidas anticipadas que se producen cuando se mezcla con la aguja de llenado, se carga la jeringa y se administra a través de la cánula MedOne.

25 Los tubos de microcentrífuga que contienen células diluidas fueron tapados y golpeados suavemente con un dedo para promover la mezcla. La aguja roma de llenado (volumen vacío de 90 μL) se unió a la jeringa BD de 1 mL y las células fueron trituradas suavemente 1-2 veces en la aguja roma de llenado, teniendo cuidado de minimizar el contacto con la jeringa. La jeringa se llenó con aproximadamente 200 μL de células. La aguja roma se retiró y se unió la cánula de inyección MedOne 38g. Se dispensaron aproximadamente 150 μL de células en un tubo de microcentrífuga. Cada alícuota dispensada fue evaluada para determinar la densidad celular y la viabilidad mediante exclusión de azul de tripano. El tiempo post-formulación son los minutos transcurridos desde la re-suspensión de las células en BSS-Plus frío a 2.000 células viables/μL. Estos resultados se muestran en la Tabla 20 para células administradas a las concentraciones indicadas.

Tabla 20. Viabilidad de células EPR administradas con cánula almacenadas tras formulación.

| Dosis baja (Formulada a 444 células viables/μL: objetivo 333 células viables/μL) | | |
|---|--|-----------------|
| Minutos post-formulación | Densidad celular administrada (células viables/μL) | % de viabilidad |
| 22 | 331 | 99 |
| 85 | 346 | 97 |
| 91 | 374 | 91 |
| 187 | 363 | ND |
| 193 | 339 | 93 |
| 207 | 260 | 96 |
| Media 336 +/- 40 (N=6) | | |
| Dosis intermedia (Formulada a 1561 células viables/μL: objetivo 1172 células viables/μL) | | |
| Minutos post-formulación | Densidad celular administrada (células viables/μL) | % de viabilidad |
| 248 | 1178 | 90 |
| Dosis alta (Formulada a 1776 células viables/μL: objetivo 1333 células viables/μL) | | |

| Minutos post-formulación | Densidad celular administrada (células viables/ μ L) | % de viabilidad |
|---------------------------------|--|-----------------|
| 48 | 1308 | 100 |
| 176 | 1648 | 93 |
| 293 | 1343 | 90 |
| Media 1433 +/- 187 (N=3) | | |

Los datos muestran que el número de células viables del producto final de células EPR extruidas a través de la cánula de inyección no disminuye cuando se almacenan en frío a lo largo de los tiempos evaluados. Las densidades de células viables observadas para tiempos que exceden los 240 minutos (4 horas) post-formulación apoyan un tiempo de expiración de al menos 4 horas. En este estudio, las células EPR en BSS-Plus fueron almacenadas en el producto final cerrado en hielo. La temperatura de BSS-Plus en los tubos de microcentrifuga almacenados en hielo se ha medido posteriormente usando una sonda calibrada y se observó que era de 3°C.

Experimentos adicionales probaron la viabilidad de las células EPR formuladas durante hasta seis horas. Se determinó la viabilidad en el momento de la formulación (0 horas) y después de 4 y 6 horas en almacenamiento en frío (2-8°C). El lote de EPR usado en este estudio se fabricó y criopreservó usando procedimientos, procesos y materiales descritos para la fabricación GMP. Los viales criopreservados de células EPR fueron descongelados y formulados siguiendo los procedimientos descritos antes en el Ejemplo 6. Las células fueron evaluadas para determinar el número de células viables en el momento de la formulación (0 horas) y después de 4 y 6 horas en almacenamiento en frío (2-8°C). Adicionalmente, las células de 0, 4 y 6 horas fueron sembradas y cultivadas para realizar evaluaciones posteriores de pureza y potencia. Para cada tiempo sembrado (0, 4 y 6 horas), se evaluó la pureza mediante inmunotinción de MITF y PAX6 y para fagocitosis de partículas fluorescentes, mediante análisis FACS.

La densidad de células viables se determinó contando las células que excluyen azul de tripano en un hemocitómetro. Los datos son la media +/- SD de recuentos llevados a cabo en 4 cámaras de hemocitómetro. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 21.

Tabla 21. Viabilidad de células almacenadas entre 2-8 grados C tras formulación.

| Experimento n° 1 | | |
|-------------------------|--|-------------------|
| | Células viables/μL | Viabilidad |
| 0 horas | 2590 +/- 332 | 86% |
| 4 horas | 2850 +/- 148 | 79% |
| 6 horas | 2875 +/- 145 | 89% |
| Experimento n° 2 | | |
| | Células viables/μL | Viabilidad |
| 0 horas | 1700 +/- 78 | 88% |
| 4 horas | 1680 +/- 123 | 82% |
| 6 horas | 1550 +/- 248 | 85% |

Las lecturas de temperatura del refrigerador de almacenamiento GMP en el que se almacenaron las células formuladas confirmaron que la temperatura permaneció en 6 grados C a lo largo de los experimentos.

Las densidades de células viables iniciales, a 0 horas, de 2.590/ μ L y 1.700/ μ L incluyen las 2.000 células/ μ L objetivo para algunas formulaciones clínicas. No se observó pérdida en el número de células viables en el rango de densidades celulares iniciales evaluado hasta las seis horas en almacenamiento en frío.

Ejemplo 9

Este ejemplo proporciona los resultados del tratamiento inicial de dos pacientes adicionales de la enfermedad de Stargardt. Los dos pacientes fueron tratados con 50.000 células EPR derivadas de una fuente de hESC (como se ha descrito en el Ejemplo 1) usando los métodos de trasplante de EPR descritos antes en el Ejemplo 6. Las fotografías de fondo que incluyen retina, disco óptico, mácula y polo posterior para los dos pacientes de Stargardt indican la zona de inyección y el área del bleb creado tras la inyección de la disolución que contiene las células EPR (Fig. 15).

Otras fotografías de fondo adicionales muestran el establecimiento de áreas dentro del bleb de inyección, que tienen parches crecientes de células EPR pigmentadas para los dos pacientes de SMD (Fig. 16 y 17). Estos resultados sugieren el injerto y el resurgir de áreas de la retina con una nueva capa de EPR.

También se midió la agudeza visual en el ojo tratado del paciente mostrado en la Fig. 16. El eje vertical indica la puntuación del Estudio de Retinopatía Diabética de Tratamiento Temprano (ETDRS) y el eje horizontal muestra el número de días post-cirugía.

5 Estos resultados indican el injerto estable de células EPR que persiste durante al menos 3 meses después del tratamiento. La agudeza visual en el ojo tratado había vuelto a los niveles de línea base a los 14 días post-tratamiento y permaneció por encima de la línea base hasta los 84 días, en el tiempo final mostrado.

Ejemplo 10

Evaluación de paciente de un año

10 La paciente de AMD y la paciente de SMD fueron evaluadas a lo largo de un periodo de un año tras el tratamiento de ERP descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

La fotografía de fondo del ojo de la paciente de SMD demostró la presencia de células pigmentadas en el ojo tratado un año post-tratamiento (Fig. 20B). Por el contrario, las células pigmentadas no fueron detectables en la línea base antes del tratamiento (Fig. 20A). Estos resultados indican el injerto a largo plazo de EPR que fue sostenido durante al menos un año tras el tratamiento.

15 Para el paciente de AMD, en la Fig. 21 se muestra gráficamente la puntuación de ETDRS/BVCA periférica. Desde un valor inicial de línea base de 21, la puntuación de ERTDS-BVCA periférica de la paciente disminuyó a cero en los días 1 y 3 post-cirugía pero volvió a niveles de, al menos, la línea base al séptimo día tras la cirugía, y después de eso permaneció por encima de la línea base. Un año después del tratamiento, la puntuación ERTDS-BVCA periférica de la paciente era de 34.

20 Para el paciente de SMD, un año después del tratamiento, la puntuación ERTDS-BVCA central era de 15. En la Fig. 22 se ilustra gráficamente la puntuación periférica. Desde un valor inicial de línea base de 0, dos semanas después de la cirugía la puntuación de ERTDS-BVCA periférica de la paciente aumentó a 1 y después continuó creciendo hasta un valor de 15 al año del tratamiento.

25 Estos resultados indican una mejora en la agudeza visual tanto en la paciente de AMD como en la de SMD, como resultado de la administración de las células EPR, que fue sostenida durante al menos un año post-tratamiento.

REFERENCIAS CITADAS

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 2008; 282: 1145-1147.

30 2. Fink DW, Bauer SR. Stem cell-based therapies: Food and Drug Administration product and pre-clinical regulatory considerations. En: Lanza R, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas, ED, Thomson J, Wilmot I, eds. *Essentials of Stem Cell Biology*. San Diego: Academic Press/Elsevier, 2009: 619-630.

3. Lanza RP, Chung HY, Yoo JJ, et al. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nature Biotechnology* 2002; 20, 689 - 696.

35 4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131, 861-872.

5. Kim D, Kim, CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cells* 2009; 4, 472-476.

40 6. Kaplan HJ, Tezel TH, Berger AS, Del Priore LV. Retinal transplantation. En: Streilein JW, ed. *Immune Response and the Eye*. Chem Immunol. Basel: Karger, 1999: 207-219.

7. Lund RO, Wang S, Klimanskaya I, et al. Human embryonic stem cell derived cells rescue visual function in dystrophic rats. *Cloning and Stem Cells* 2006; 8, 189-199.

8. Lu B, Malcuit C, Wang S, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 2009; 21, 2125-2135.

45 9. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 2010; 10, 802-823.

10. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85, 845-881.

11. Binder S., et al. Outcome of transplantation of autologous retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration: a prospective trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45, 4151-4160.
12. Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994; 32, 707-716.
- 5 13. Kaplan HJ, Tezel TH, Berger AS, Del Priore LV. Retinal transplantation. *Chem Immunol* 1999; 73, 207-219.
14. Binder S, Stolba U, Krebs I, et al. Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: a pilot study. *Am J Ophthalmol* 2002; 133, 215-225.
- 10 15. MacLaren RE, Bird AC, Sathia P J, Aylward GW. Long-term results of submacular surgery combined with macular translocation of the retinal pigment epithelium in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2005; 112, 2081-2087.
16. Lappas A, Weinberger A W, Foerster AM, Kube T, Rezai KA, Kirchof B. Iris pigment epithelial cell translocation in exudative age-related macular degeneration. A pilot study in patients, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 38, 631-641.
- 15 17. Aisenbrey S, Lafaut BA, Szurman P, et al. Iris pigment epithelial translocation in the treatment of exudative macular degeneration: a 3-year follow-up. *Arch Ophthalmol* 2006; 124, 183-188.
18. Thumann G, Aisenbrey S, Schraermeyer U, et al. Transplantation of autologous iris pigment epithelium after removal of choroidal neovascular membranes. *Arch Ophthalmol* 2000; 118, 1350-1355.
- 20 19. Berger AS, Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa: short-term follow-up. *Ophthalmology* 2003; 110, 383-391.
20. Drukker M, Katchman H, Katz G, et al. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells *Stem Cells* 2006; 24, 221-229.
21. Okamura RM, Lebkowski J, Au M, Priest CA, Denham J, Majumdar AS. Immunological properties of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cells. *J Neuroimmunol* 2007; 192, 134-144.
- 25 22. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006; 444, 481-485.
23. Tezel TH, Del Priore LV. Serum-free media for culturing and serially passaging of adult human retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 1998; 66, 807-815.
- 30 24. Lu F, Zhou X, Hu DN, et al. Expression of melanin-related genes in cultured adult retinal pigment epithelium and uveal melanoma cells. *Mol Vis* 2007; 13, 2066-2072.
25. Tezel TH, Del Priore LV, Berger AS, et al. Adult retinal pigment epithelial transplantation in exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2007; 142, 584-595.
26. Song MK, Lui GM. Propagation of fetal human RPE cells: preservation of original culture morphology after serial passage. *J Cell Physiol* 1990; 143, 196-203.
- 35 27. Gamm DM, Wright LS, Capowski EE, et al. Regulation of prenatal human retinal neurosphere growth and cell fate potential by retinal pigment epithelium and Mash 1. *Stem Cells* 2008; 26, 3182-3193.
28. Maminishkis A, Chen S, Jalickee S, et al. Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47, 3612-3624.

40

Los especialistas en la técnica apreciarán, o serán capaces de determinar usando simplemente experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en la presente memoria. Se pretende que dichos equivalentes sean abarcados por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

una pluralidad de células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR); y

un vehículo farmacéuticamente aceptable;

5 en donde el contenido medio de melanina de dicha pluralidad de células EPR es inferior a 8 pg/células;

y en donde la composición farmacéutica comprende entre 1.000 y 1×10^9 células EPR viables.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la concentración de dichas células EPR va desde aproximadamente 444 células EPR viables/ μL a aproximadamente 1766 células EPR viables/ μL , o es al menos de aproximadamente 1.000 células/ μL .

10 3. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70% o al menos el 80% de las células EPR de dicha composición farmacéutica son bestrofina+.

15 4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% de las células EPR de dicha composición farmacéutica son PAX6+ y/o MITF+.

5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde no más de aproximadamente una células por millón de células, y opcionalmente no más de dos células por nueve millones de células, en dicha composición farmacéutica son positivas para la expresión de OCT-4 y alcalina fosfatasa (AP).

20 6. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichas células EPR son humanas.

7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende al menos un inhibidor de angiogénesis que se administra a un sujeto que lo necesite antes, concurrentemente, posteriormente y/o con dichas células EPR.

25 8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichas células EPR están modificadas genéticamente, por ejemplo para producir uno o más factores que inhiben la angiogénesis.

9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichas células EPR son producidas *in vitro* a partir de una célula madre pluripotente.

30 10. Un kit que comprende una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un recipiente separado que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable en un volumen suficiente para diluir dicha pluralidad de células EPR hasta una concentración objetivo deseada.

11. Una composición criopreservada que comprende:

una pluralidad de células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) criopreservadas contenidas en un medio de criopreservación;

35 en donde el contenido medido de melanina de dicha pluralidad de células EPR criopreservadas es inferior a 8 pg/célula y las células EPR tienen un nivel de madurez medio en el momento de congelación tal que las células EPR recuperadas con posterioridad a la descongelación presentan una eficiencia de siembra de al menos el 60%, y en donde dicha composición criopreservada comprende entre 5.000 y 1×10^8 células EPR viables en el momento de la congelación.

40 12. Un método para producir células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) para uso en una preparación farmacéutica, que comprende:

(a) cultivar las células EPR en condiciones adherentes para formar un cultivo sustancialmente de monocapa de células EPR pigmentadas que tienen morfología de adoquín;

(b) someter a pasajes las células EPR al menos una vez en el momento previo a que las células EPR alcancen un contenido medio de melanina superior a 8 pg/célula; y

45 (c) después de uno o más pasajes, recolectar las células EPR para criopreservación o formulación farmacéutica, en donde en el momento de recolección las células EPR tienen un contenido medio de melanina inferior a 8 pg/célula.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dichas células EPR son producidas a partir de células madre pluripotentes.

14. Una preparación farmacéutica que comprende células EPR adecuadas para el tratamiento de la degradación de la retina, en donde dichas células EPR (a) son diferenciadas a partir de células madre pluripotentes, (b) contienen un contenido medio de melanina inferior a 8 pg/célula, y (c) tienen al menos una de las siguientes propiedades:

se unen a la membrana de Bruch tras el trasplante,

absorben luz extraviada tras el trasplante,

tienen una mayor longitud de telómero que las células EPR derivadas de tejido humano donado,

tienen una mayor esperanza de vida replicativa en cultivo que las células EPR derivadas de tejido humano donado,

tienen un menor contenido de A2E que las células EPR derivadas de tejido humano donado,

tienen un menor contenido de lipofuscina que las células EPR derivadas de tejido humano donado,

exhiben menos daño acumulado por ultravioleta que las células EPR derivadas de tejido humano donado, o

contienen un mayor número de fagosomas que las células EPR derivadas de tejido humano donado.

15. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la preparación según la reivindicación 14, para uso en el tratamiento de la degeneración de la retina, que incluye la degeneración macular, tal como la degeneración macular debida a la edad, la enfermedad de Stargardt, las estrías angioides y la degeneración macular miópica.

16. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la preparación según la reivindicación 14, en donde la composición o preparación se formula para trasplante con una matriz, sustrato, estructura o injerto.

17. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la preparación según la reivindicación 14, en donde dichas células EPR exhiben una o más de las siguientes características:

una esperanza de vida replicativa que es mayor que la esperanza de vida replicativa de células EPR obtenidas de ojos adultos o tejido fetal;

una longitud media de telómero que es al menos el 30 por ciento de la longitud de telómero de una célula hESC y/o iPS humana (o de la media de una población de células hESC y/o iPS humanas), o al menos el 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de la longitud de telómero de una célula hESC y/o iPS humana;

una longitud media de fragmento de restricción terminal (TRF) que se mayor de 4 kb, o mayor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso 13 kb, o 10 kb o mayor;

un contenido medio de lipofuscina que es inferior al 50 por ciento del contenido medio de lipofuscina del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o inferior al 40, 30, 20 o 10 por ciento del contenido medio de lipofuscina del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos;

un contenido medio de N-retiniliden-N-retiniletanolamina (A2E) que es inferior al 50 por ciento del contenido medio de A2E del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o inferior al 40, 30, 20 o 10 por ciento del contenido medio de A2E del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos;

un contenido medio de N-retiniliden-N-retiniletanolamina (A2E) que es inferior a 50 ng por 10^5 (100.000) células;

una tasa de fagocitosis de segmentos exteriores de fotorreceptor (POS) que es al menos un 50 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de POS correspondiente a un número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o al menos un 75, 100, 150 o 200 por ciento superior a la tasa de fagocitosis de POS correspondiente a un número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos;

una tasa de fagocitosis de segmentos exteriores de fotorreceptor (POS) que es al menos un 20 por ciento de la concentración total de POS después de 24 horas, o al menos un 25, 30, 25, 40 o 50 por ciento de la concentración total de POS después de 24 horas;

un nivel reducido de estrés oxidativo acumulado y/o daño de ADN en comparación con células EPR aisladas de un hospedante adulto;

una actividad media de proteosoma que es al menos un 50 por ciento superior a la actividad media de proteosoma del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o al menos un 60, 70, 80, 90 o 100 por ciento superior a la actividad de proteosoma del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos;

5 una acumulación media de conjugados de ubiquitina que es al menos un 50 por ciento de la acumulación media de conjugados de ubiquitina para un número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos, o inferior al 40, 30, 20 o incluso 10 por ciento de la acumulación media de conjugados de ubiquitina del número equivalente de células EPR aisladas de ojos adultos.

10 **18.** La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, la composición criopreservada de según la reivindicación 11, el método según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, o la preparación según la reivindicación 14, en donde el contenido medio de melanina de dichas células EPR es inferior a 8 pg/célula, inferior a 7 pg/célula, inferior a 6 pg/célula, inferior a 5 pg/célula, inferior a 4 pg/célula, inferior a 3 pg/célula, inferior a 2 pg/célula y al menos 0,1 pg/célula y opcionalmente al menos 0,5 pg/célula o 1 pg/célula; entre 0,1-8 pg/célula, entre 0,1-7 pg/célula, entre 0,1-6 pg/célula, entre 0,1-5 pg/célula, entre 0,1-4 pg/célula, entre 0,1-3 pg/célula, entre 0,1-2 pg/célula, entre 0,1-1 pg/célula, entre 1-7 pg/célula, entre 0,5-6 pg/célula, o entre 1-5 pg/célula.

15 **19.** La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende además un inhibidor ROCK, tal como Y-27632.

FIG. 1

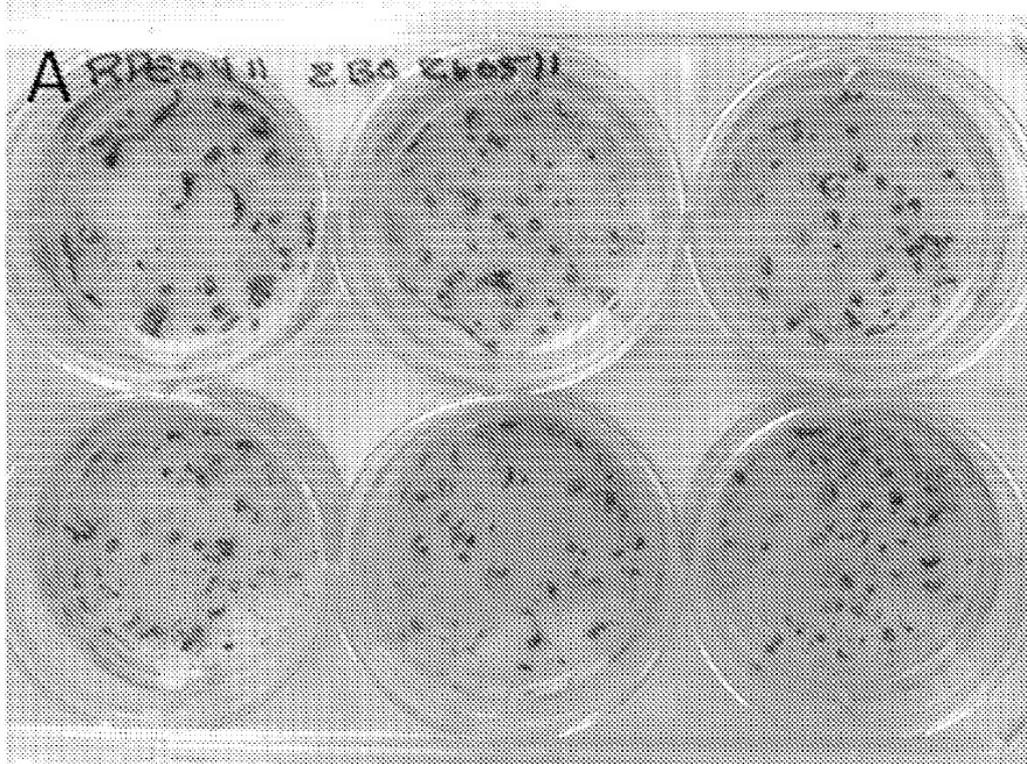


FIG. 1, continuación

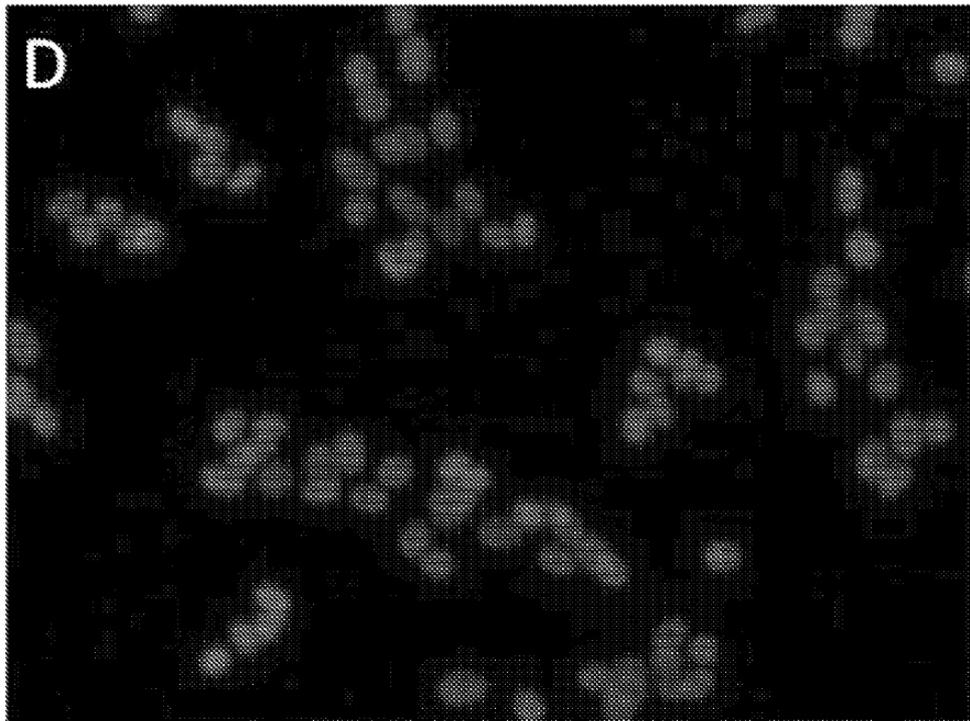
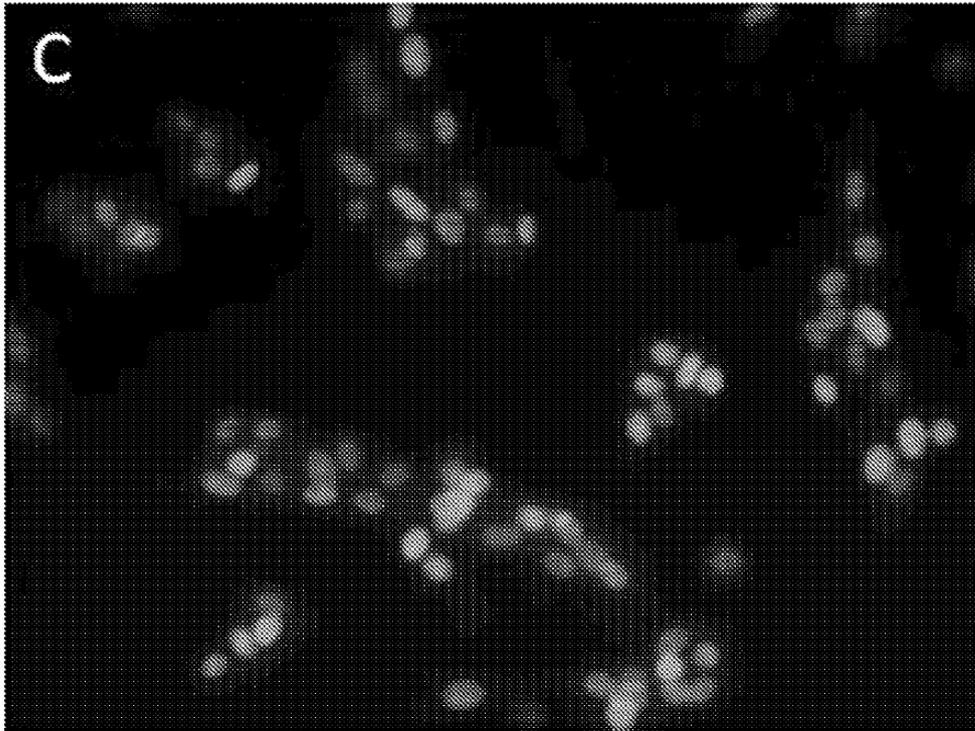


FIG. 1, continuación

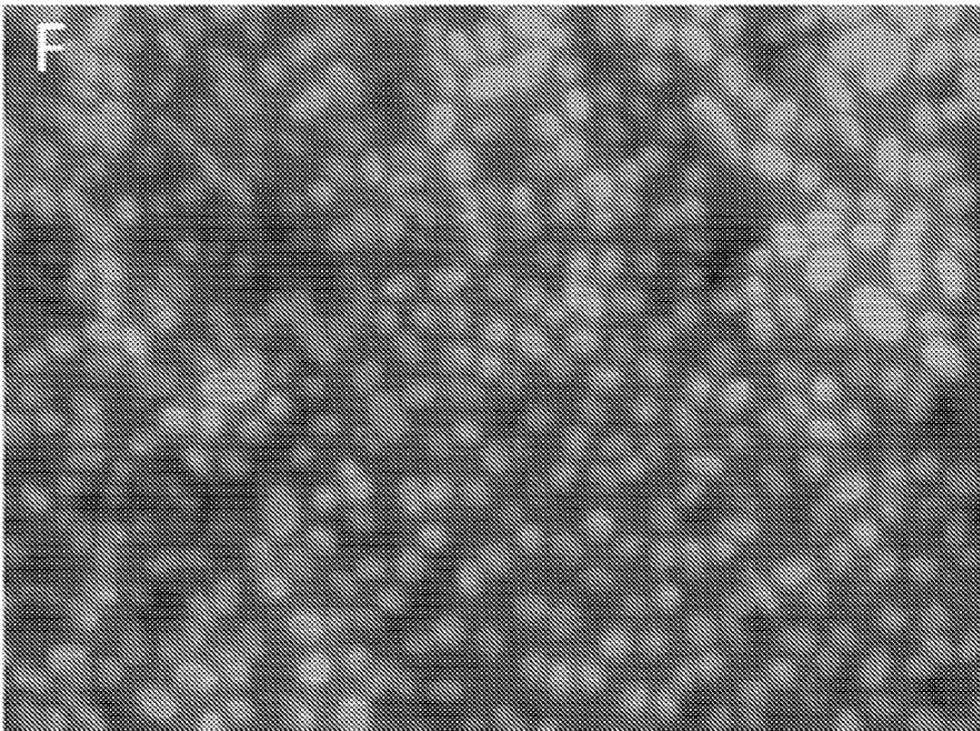
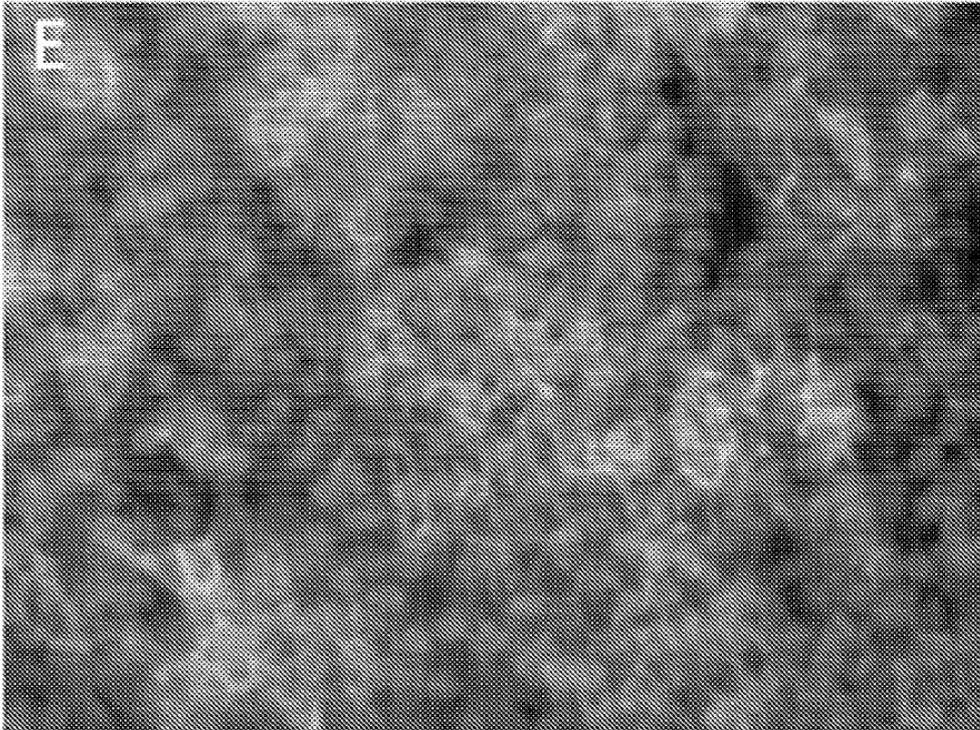


FIG. 1, continuación

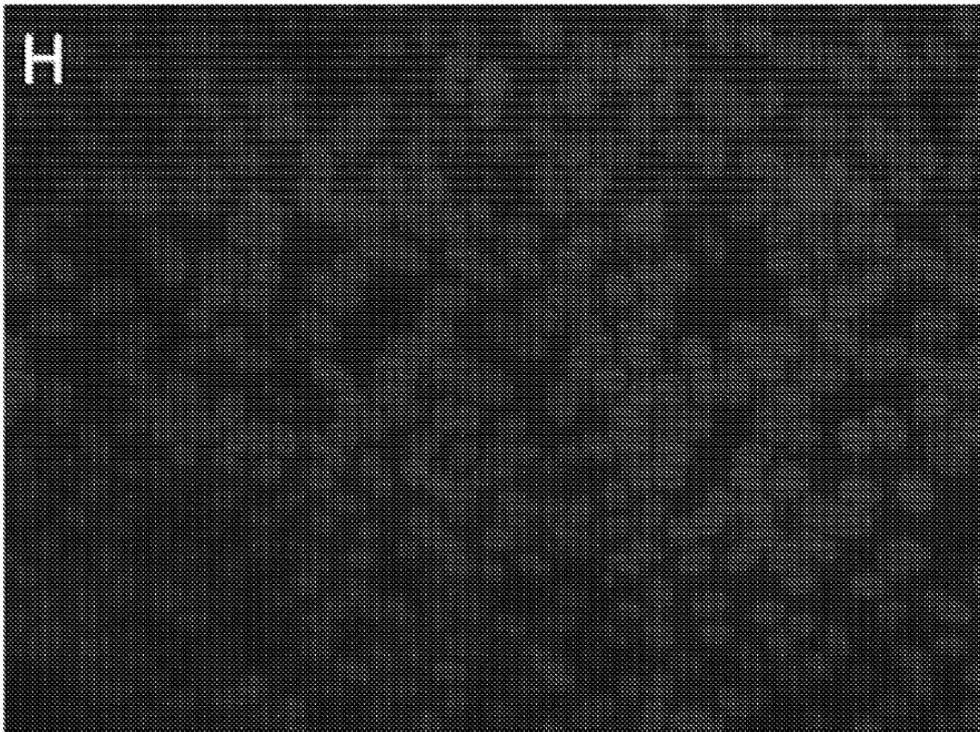
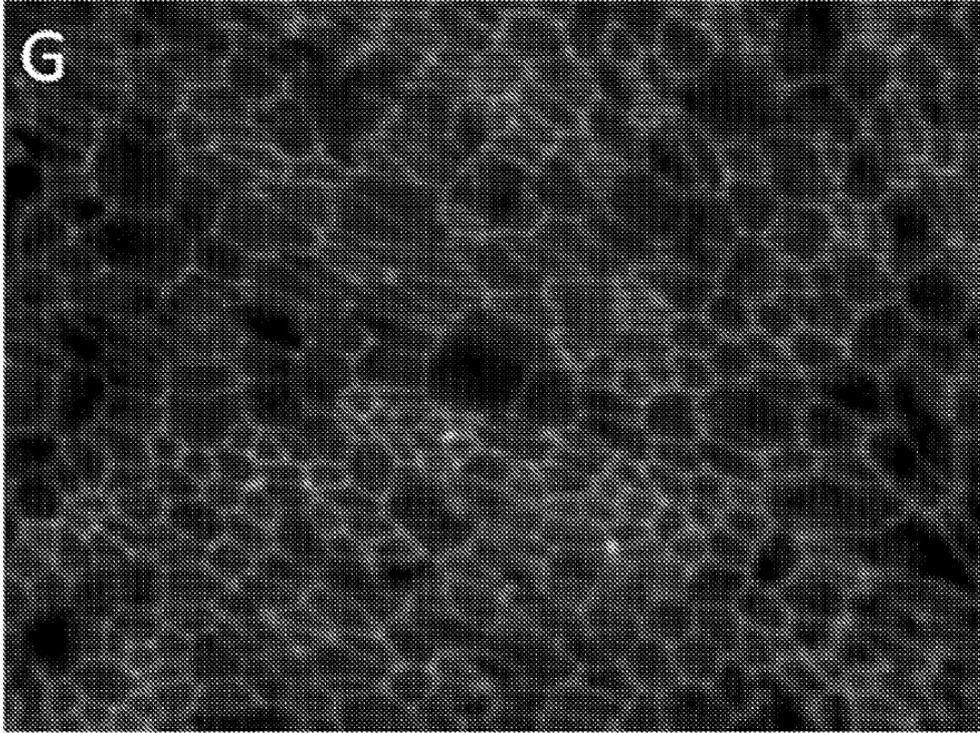


FIG. 1, continuación

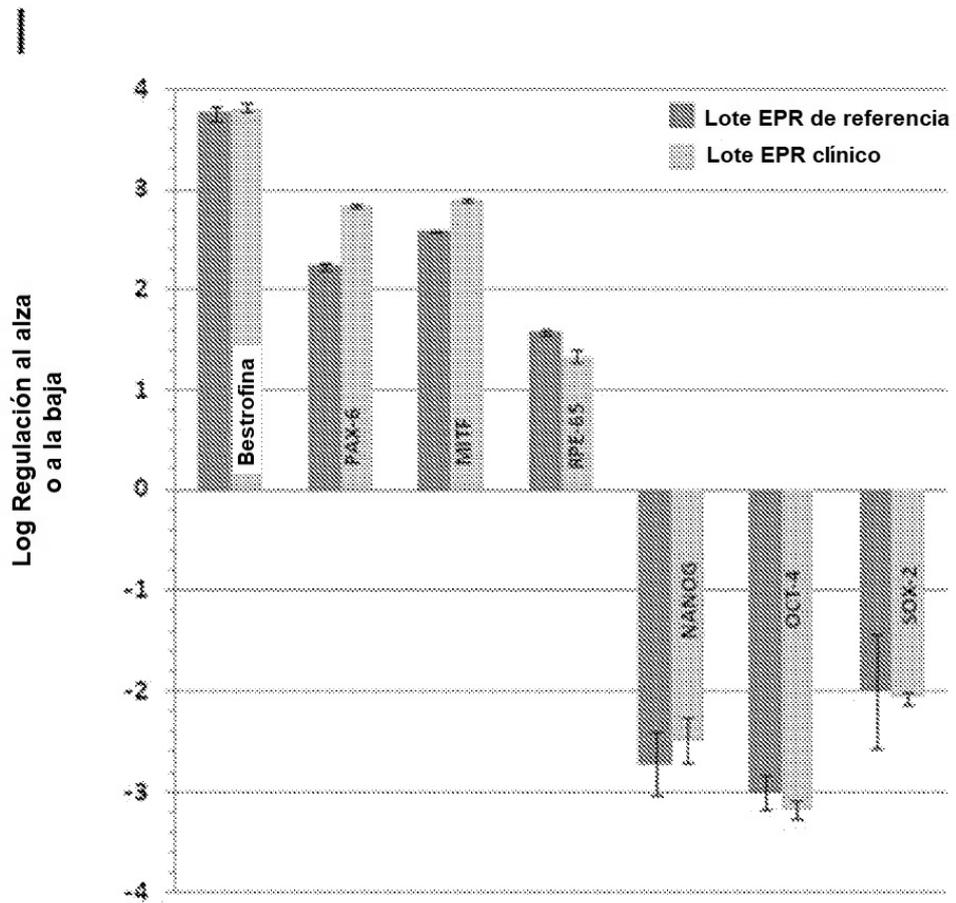


FIG. 1, continuación

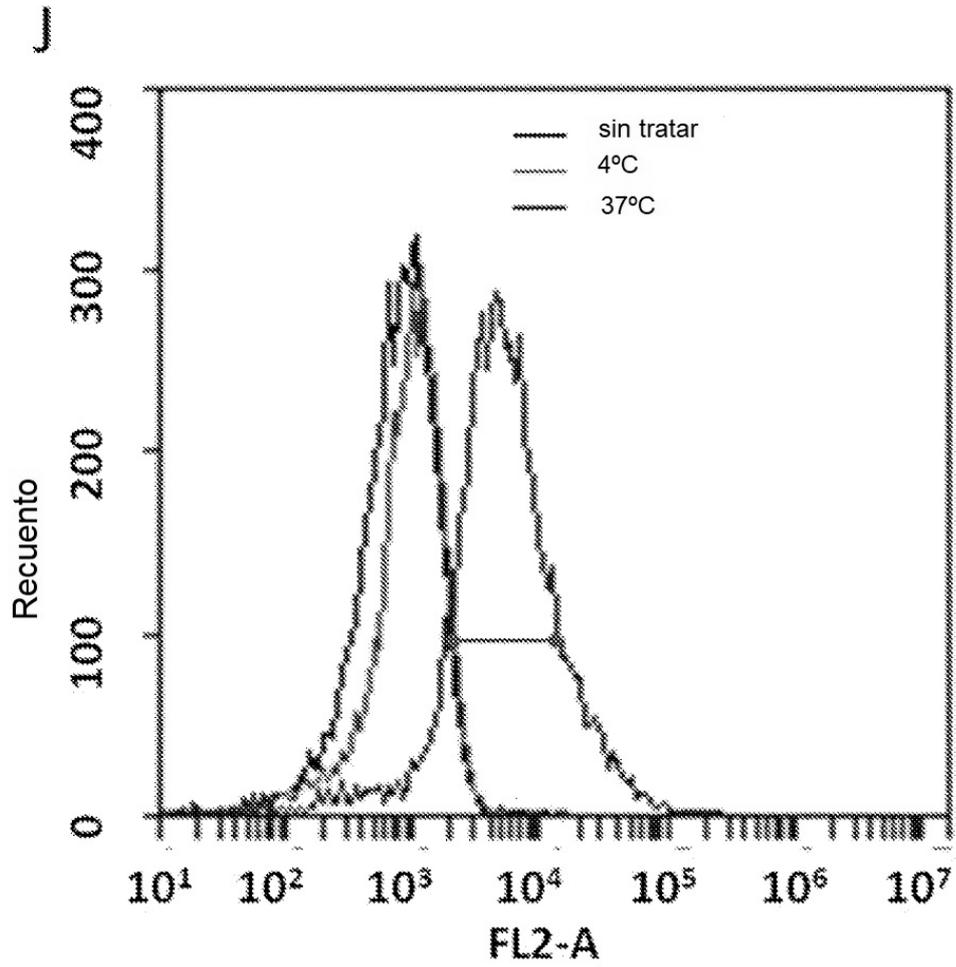


FIG. 1, continuación

K

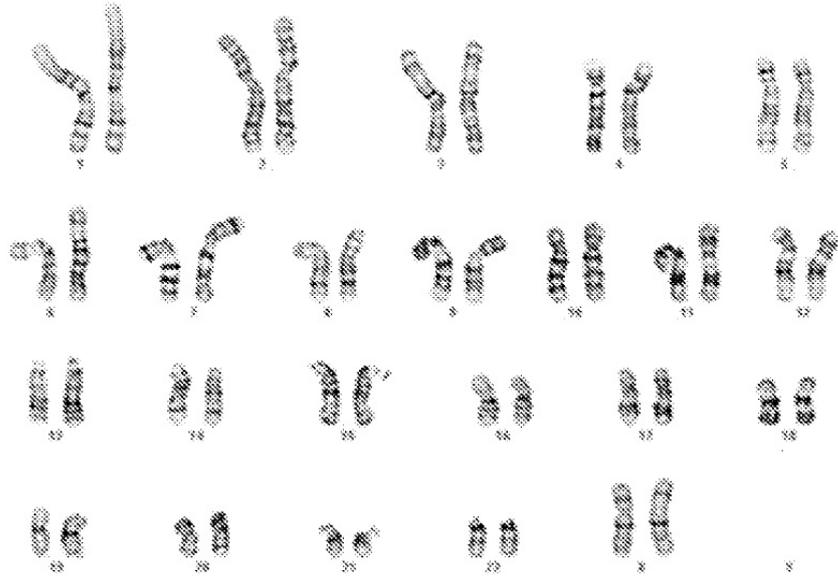


FIG. 2

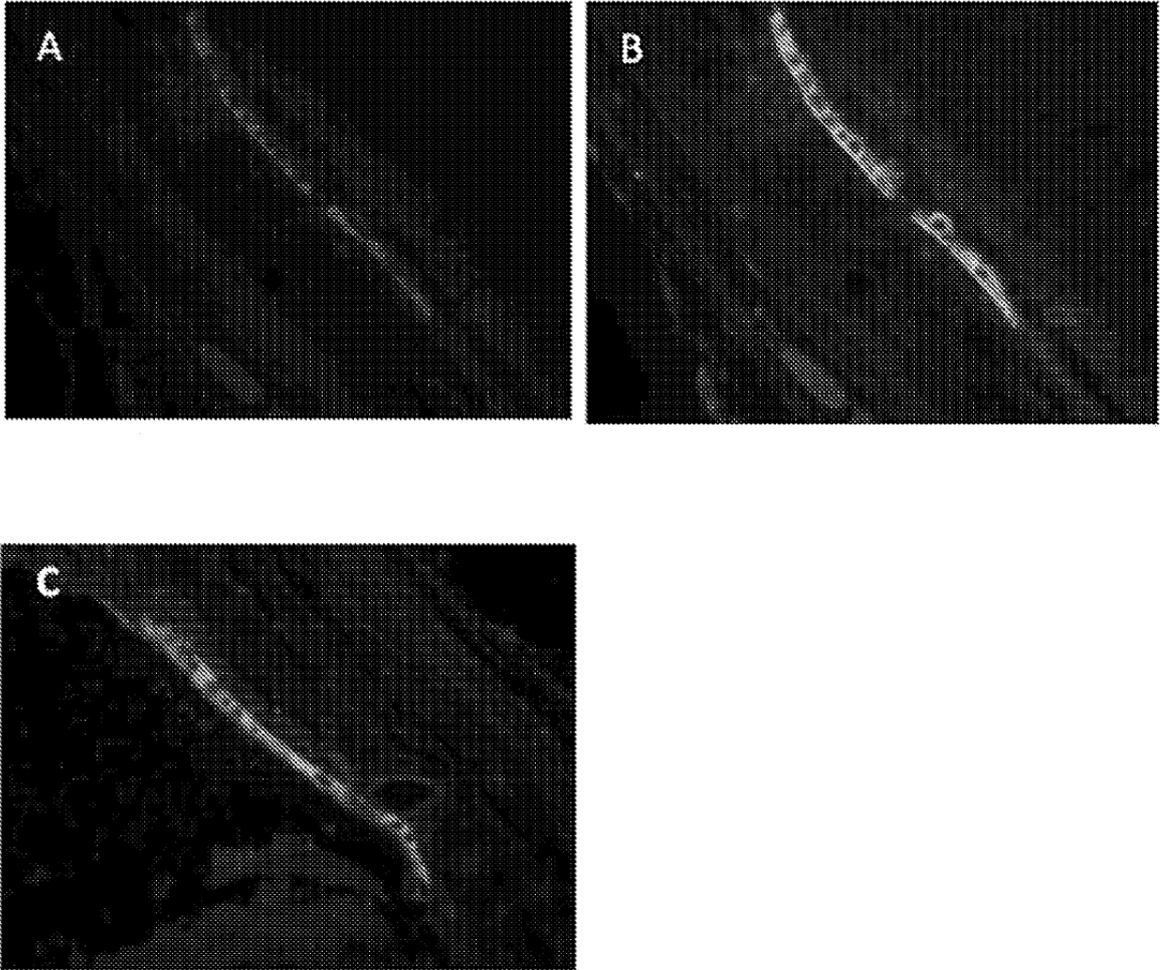


FIG. 2, continuación

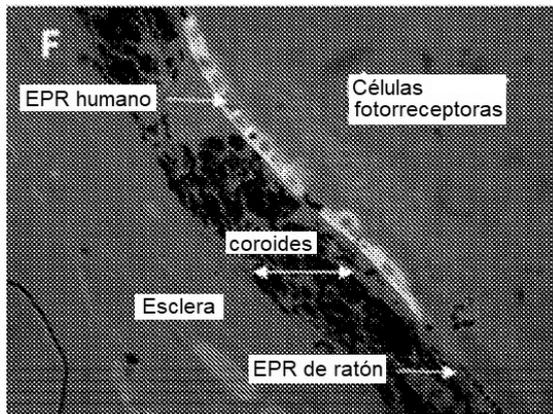
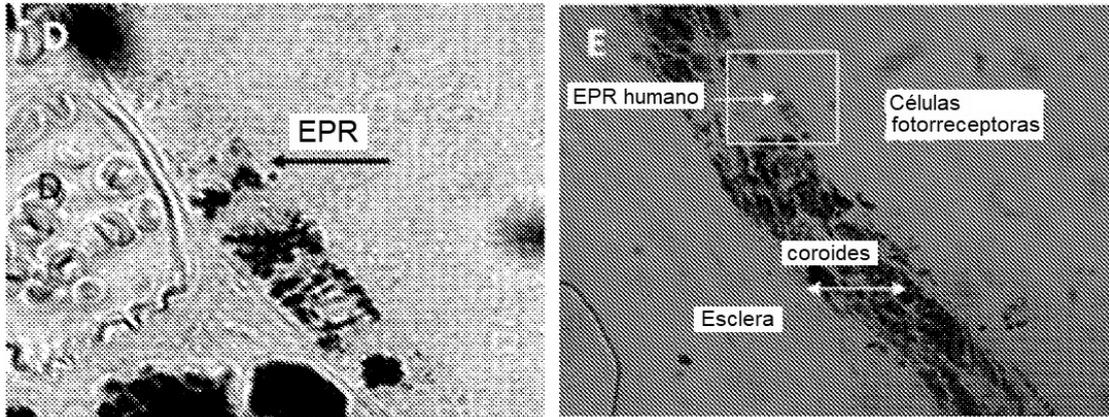


FIG. 3

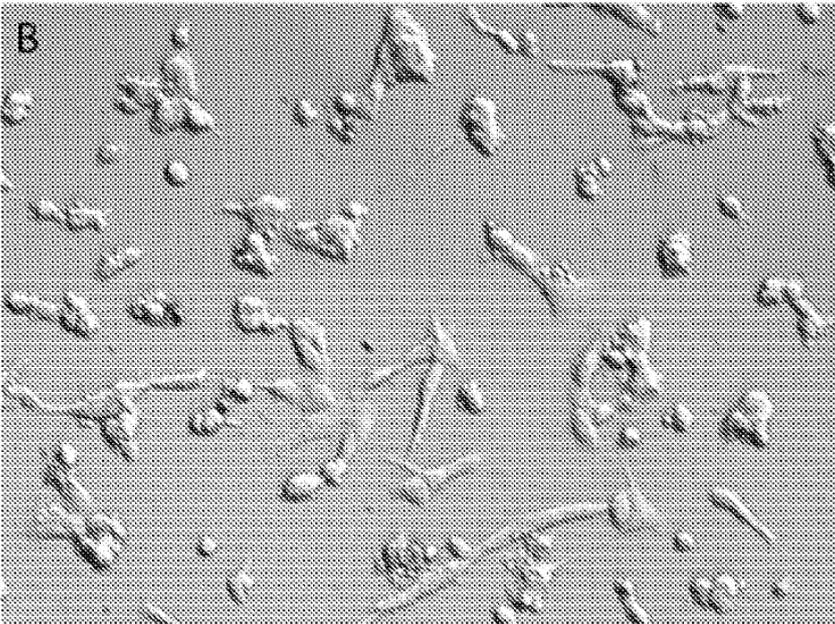
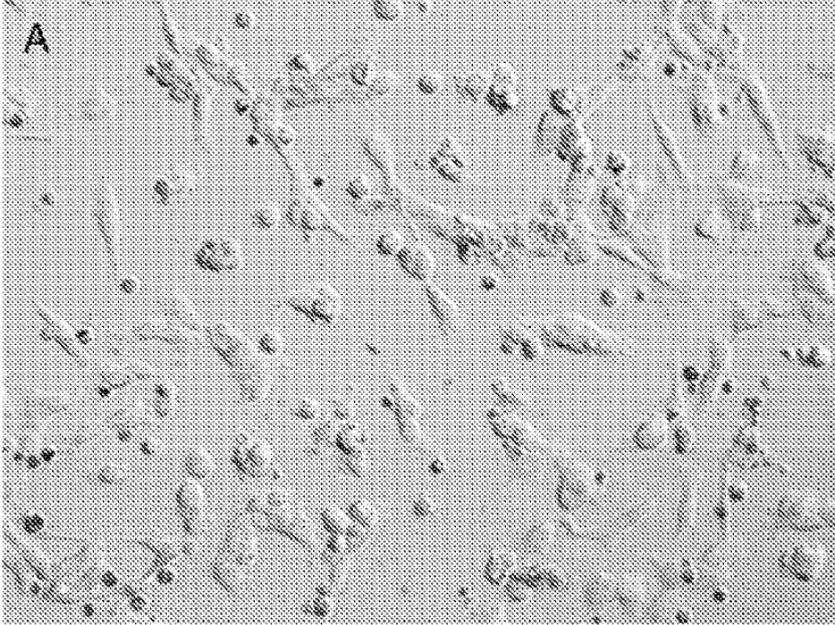


FIG. 3, continuación

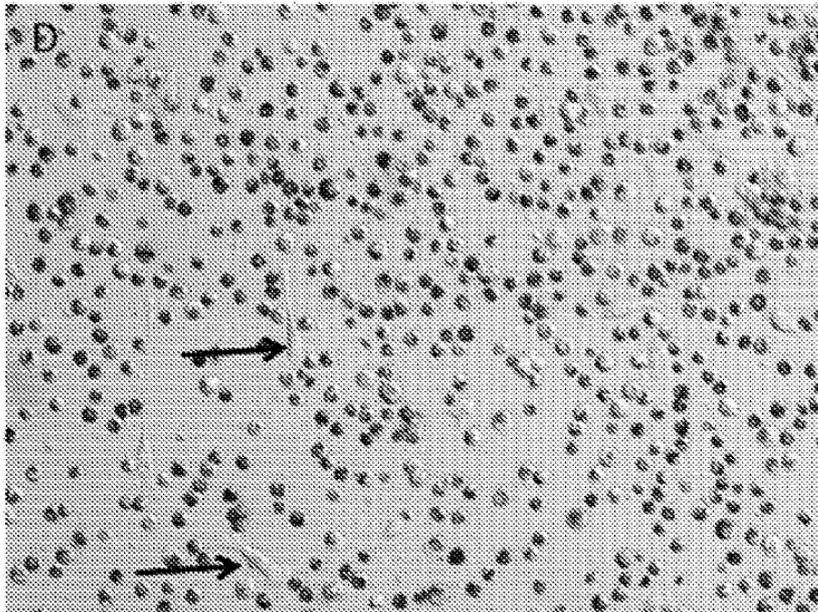
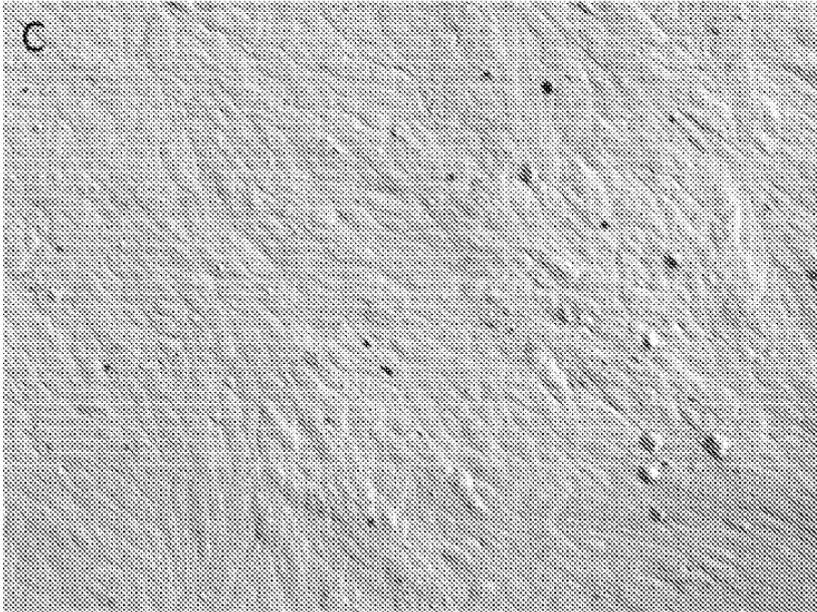


FIG. 3, continuación

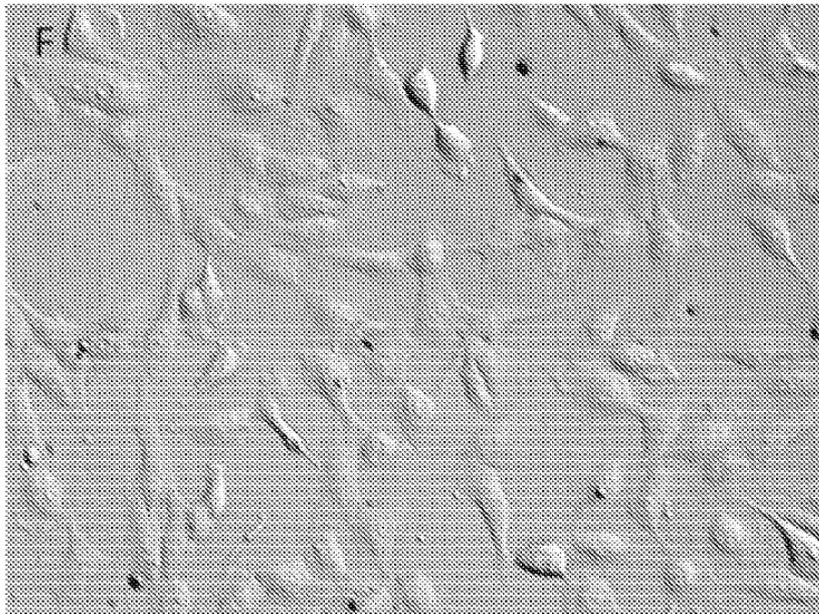
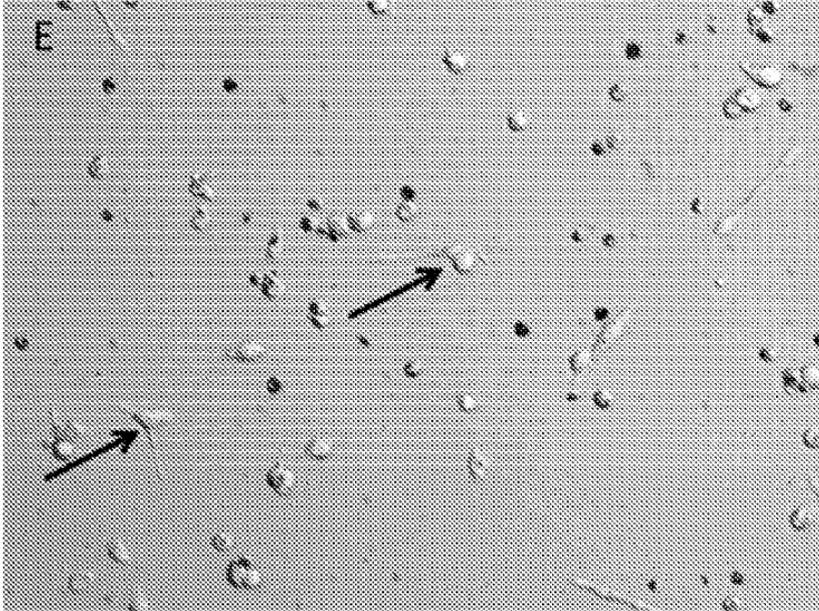


FIG. 3, continuación

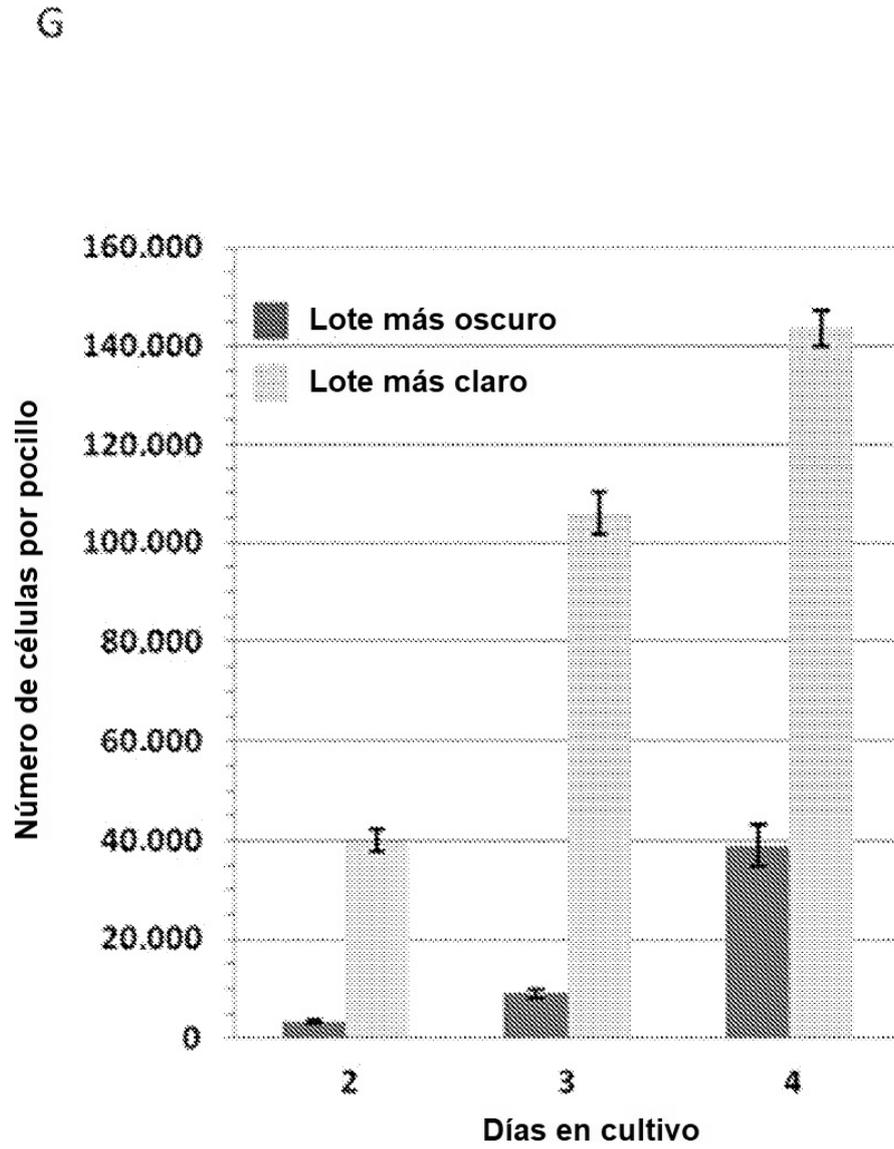


FIG. 4

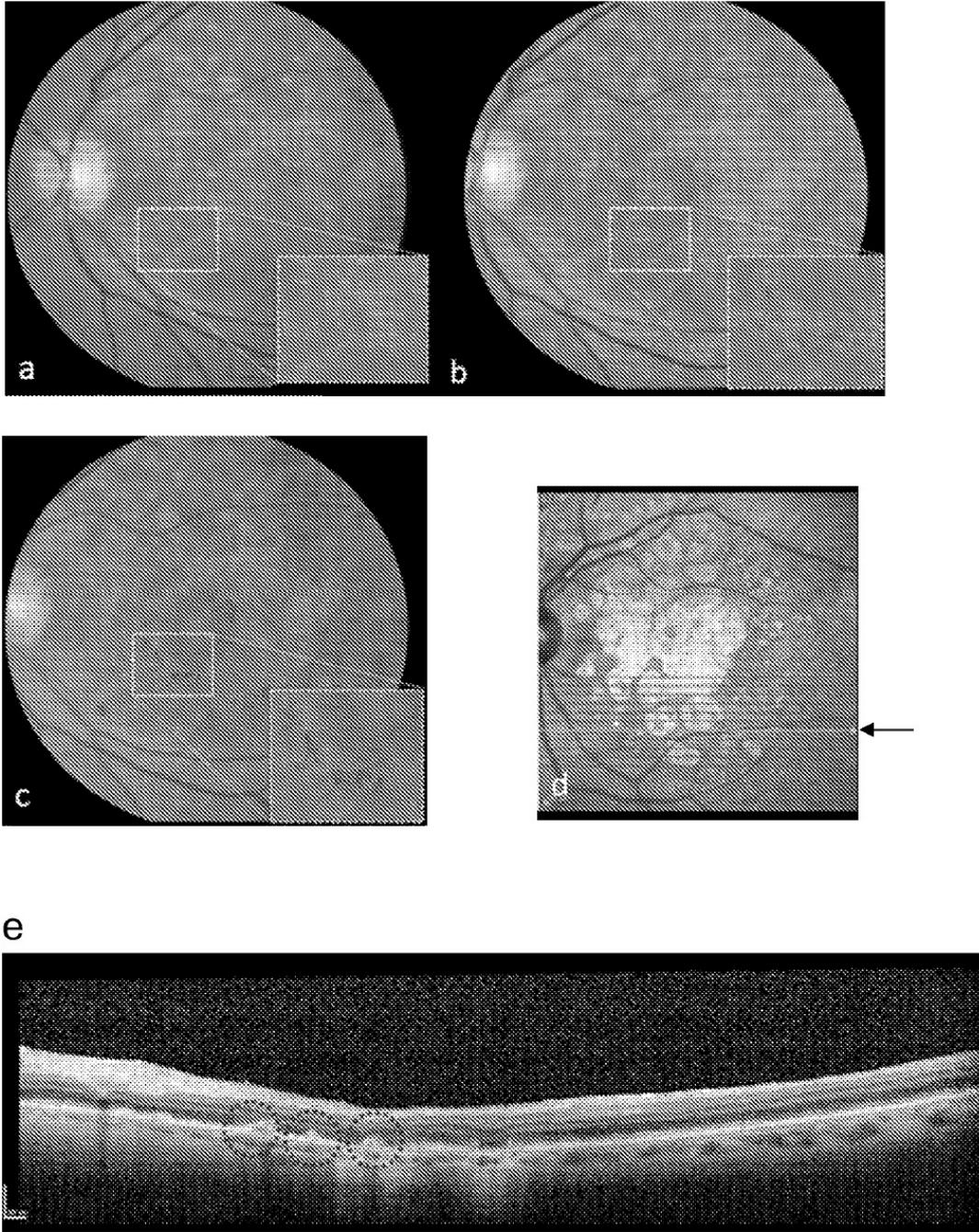


FIG. 5

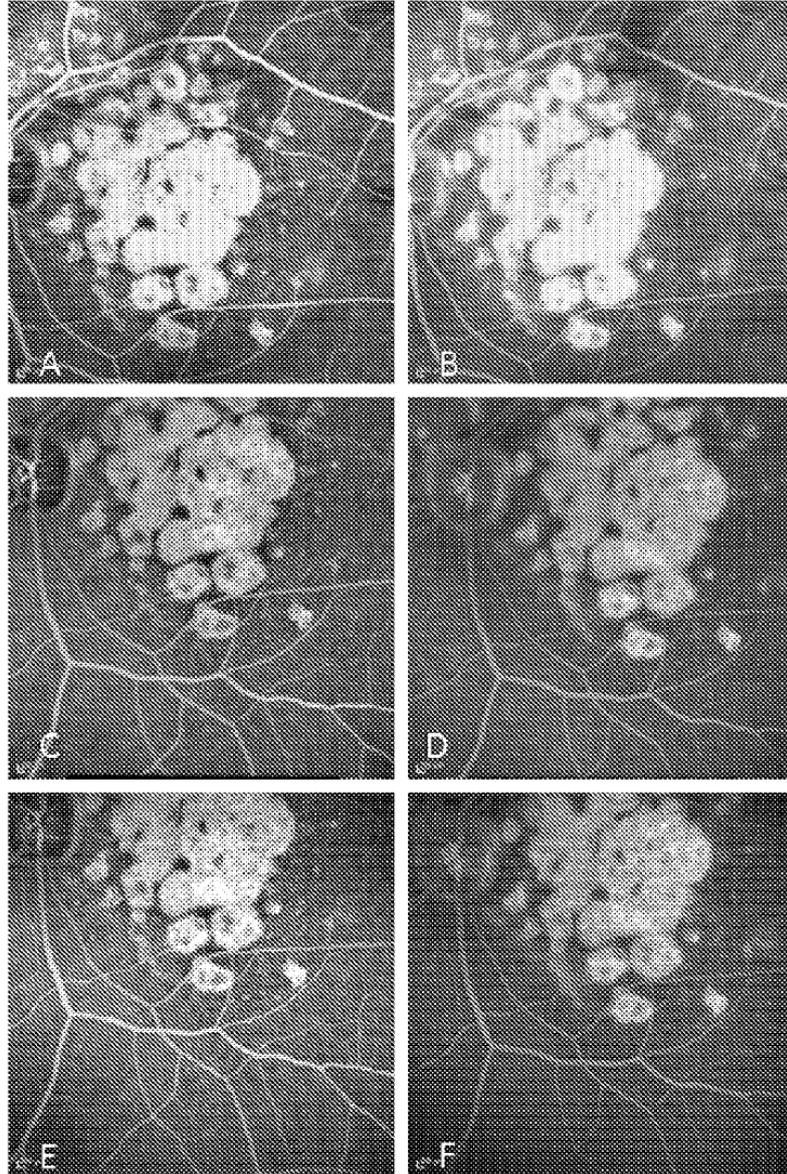


FIG. 6.

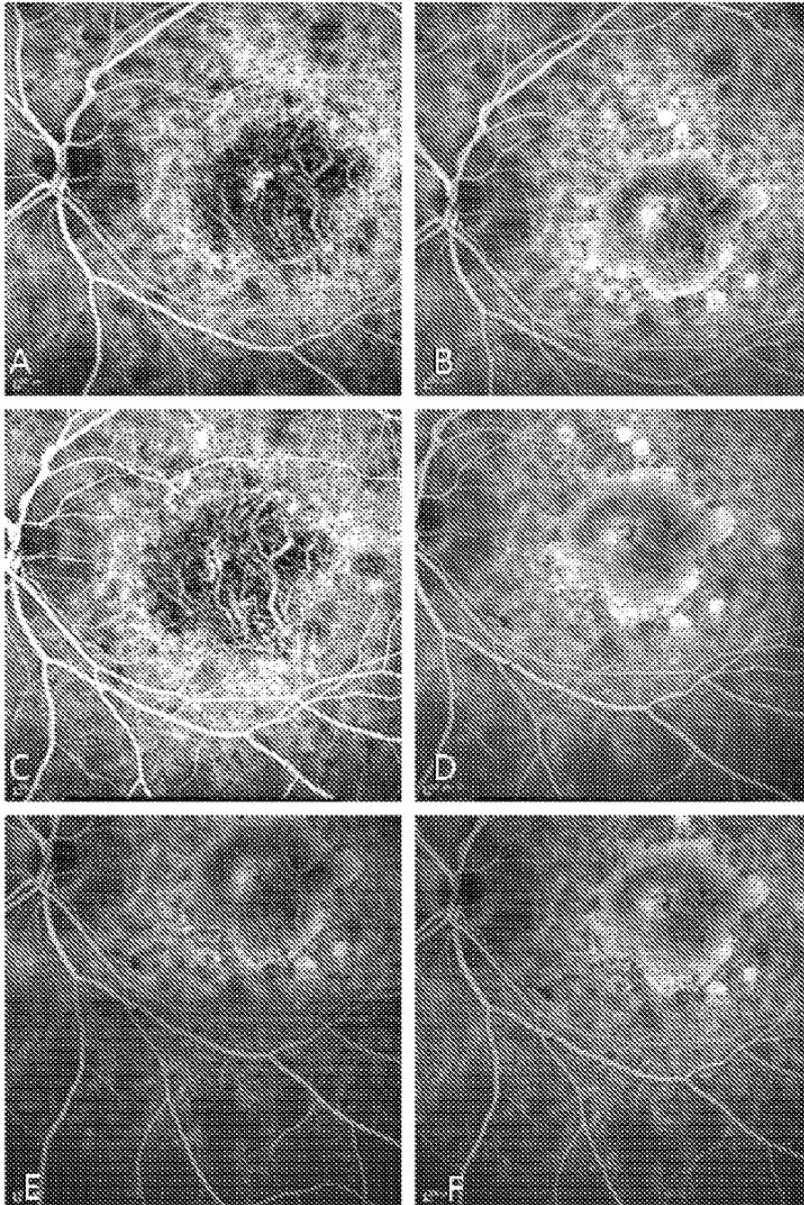


FIG. 7.

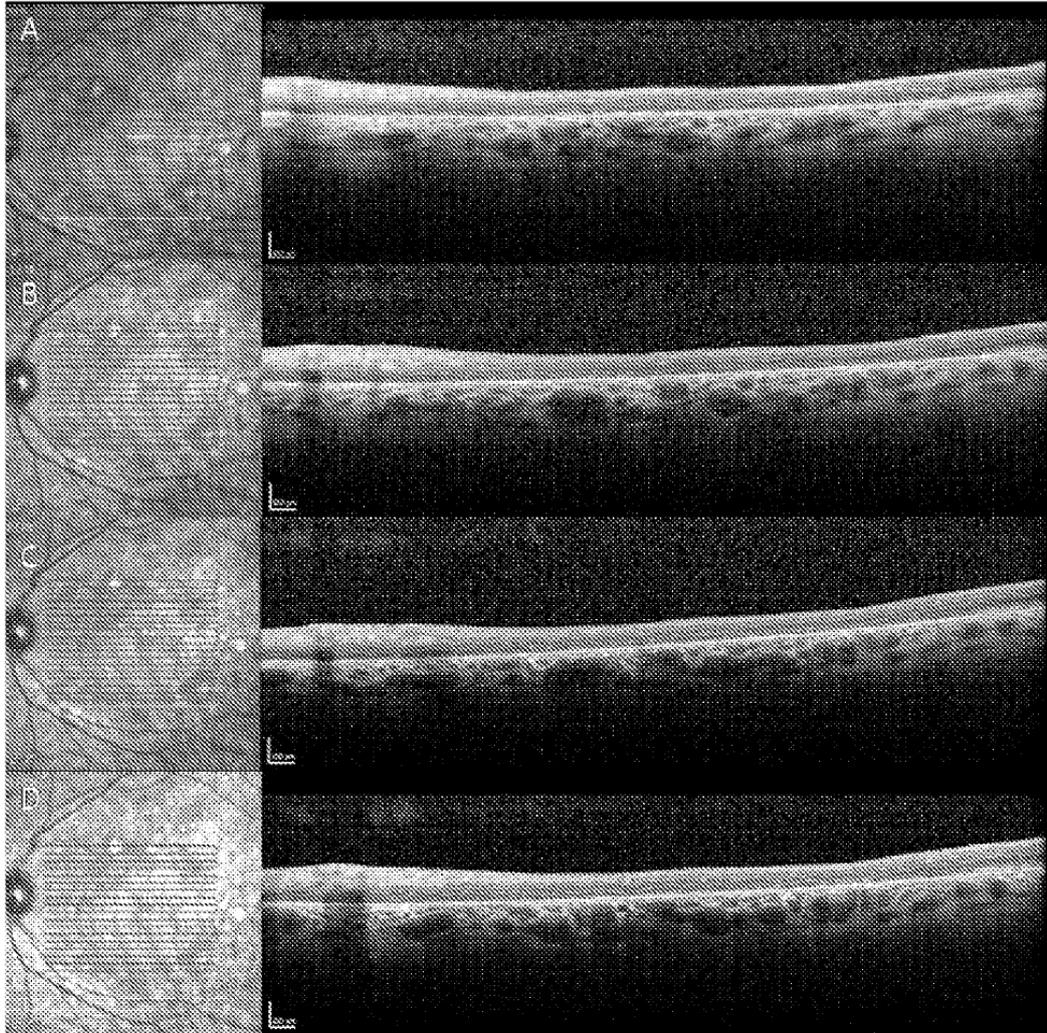


FIG. 8.

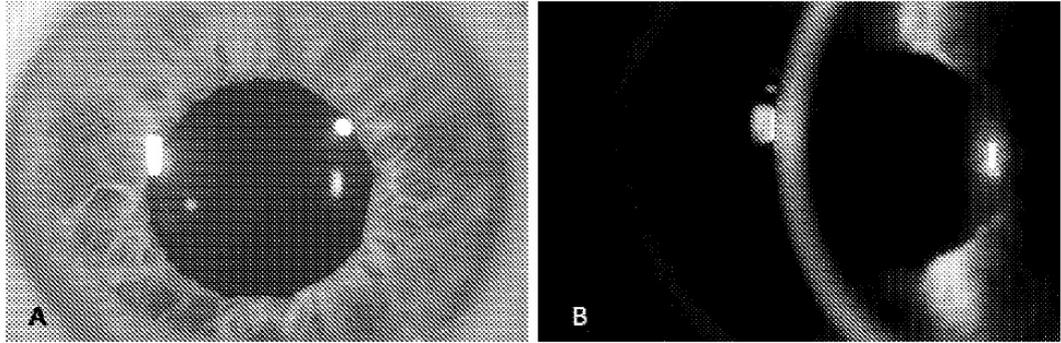


FIG. 9

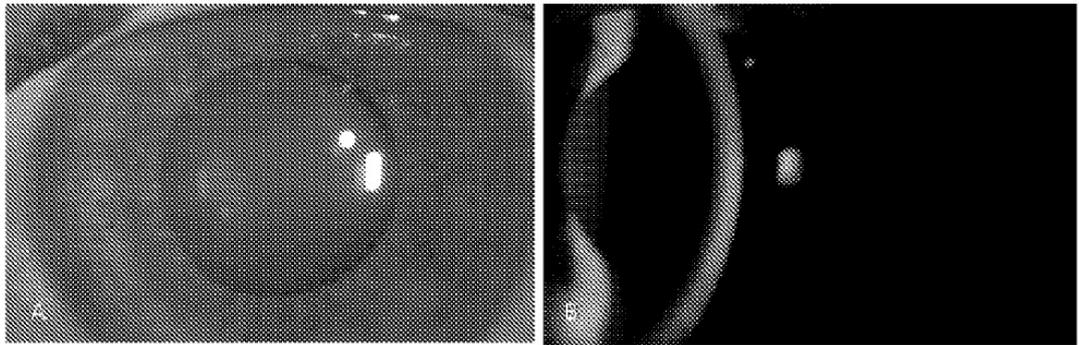


FIG. 10

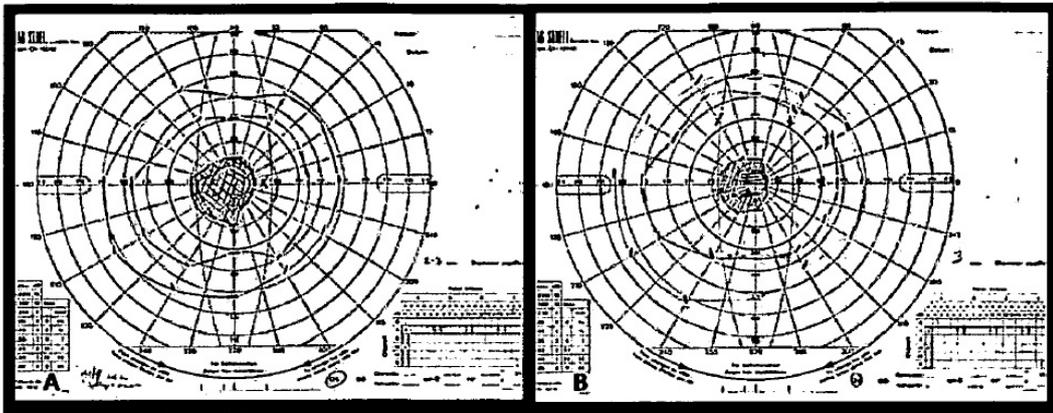


FIG. 11

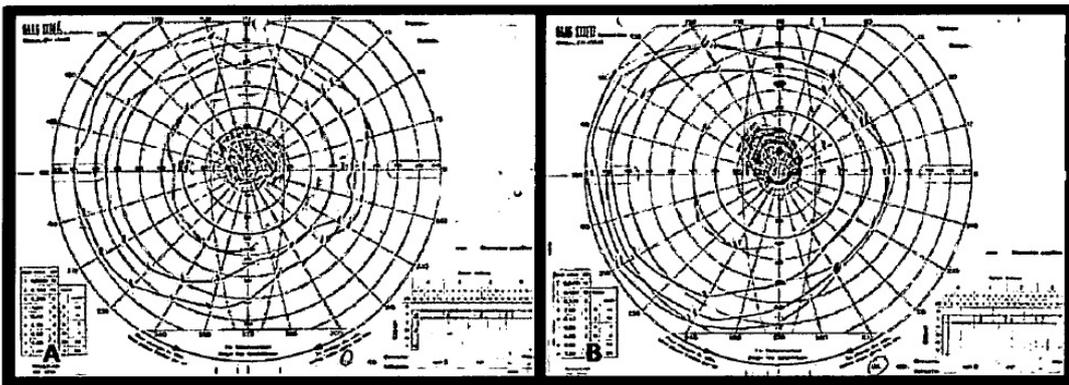
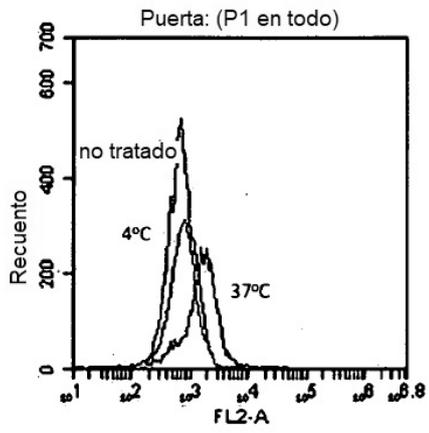


FIG. 12

A.



B.

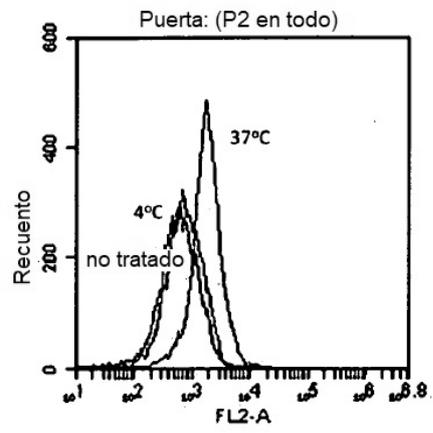


FIG. 13

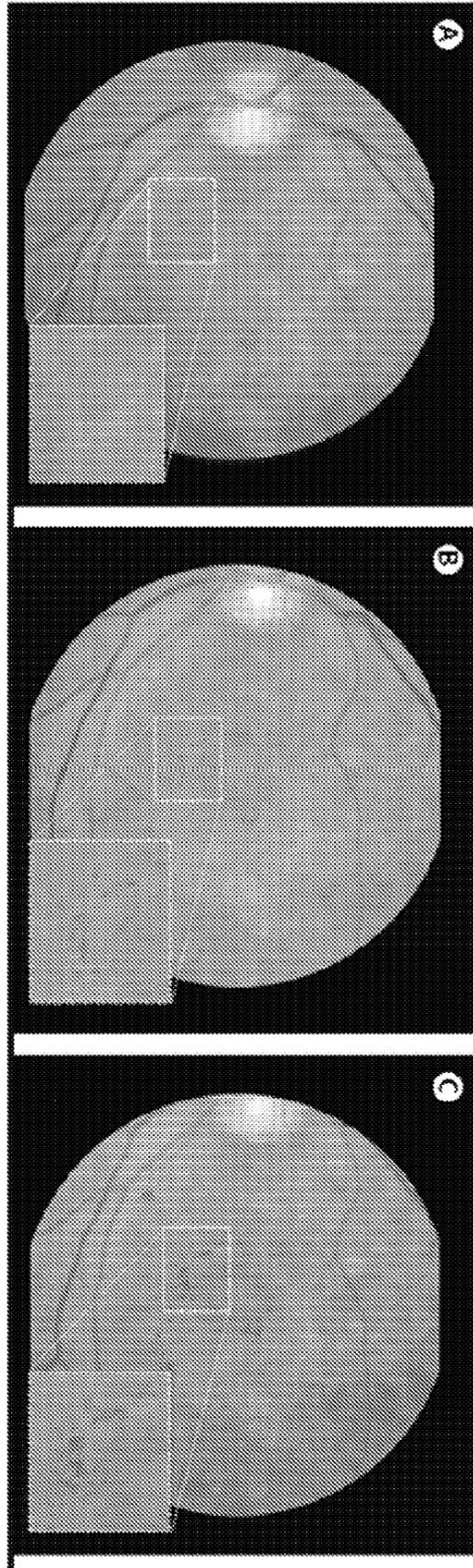


FIG. 13, continuación

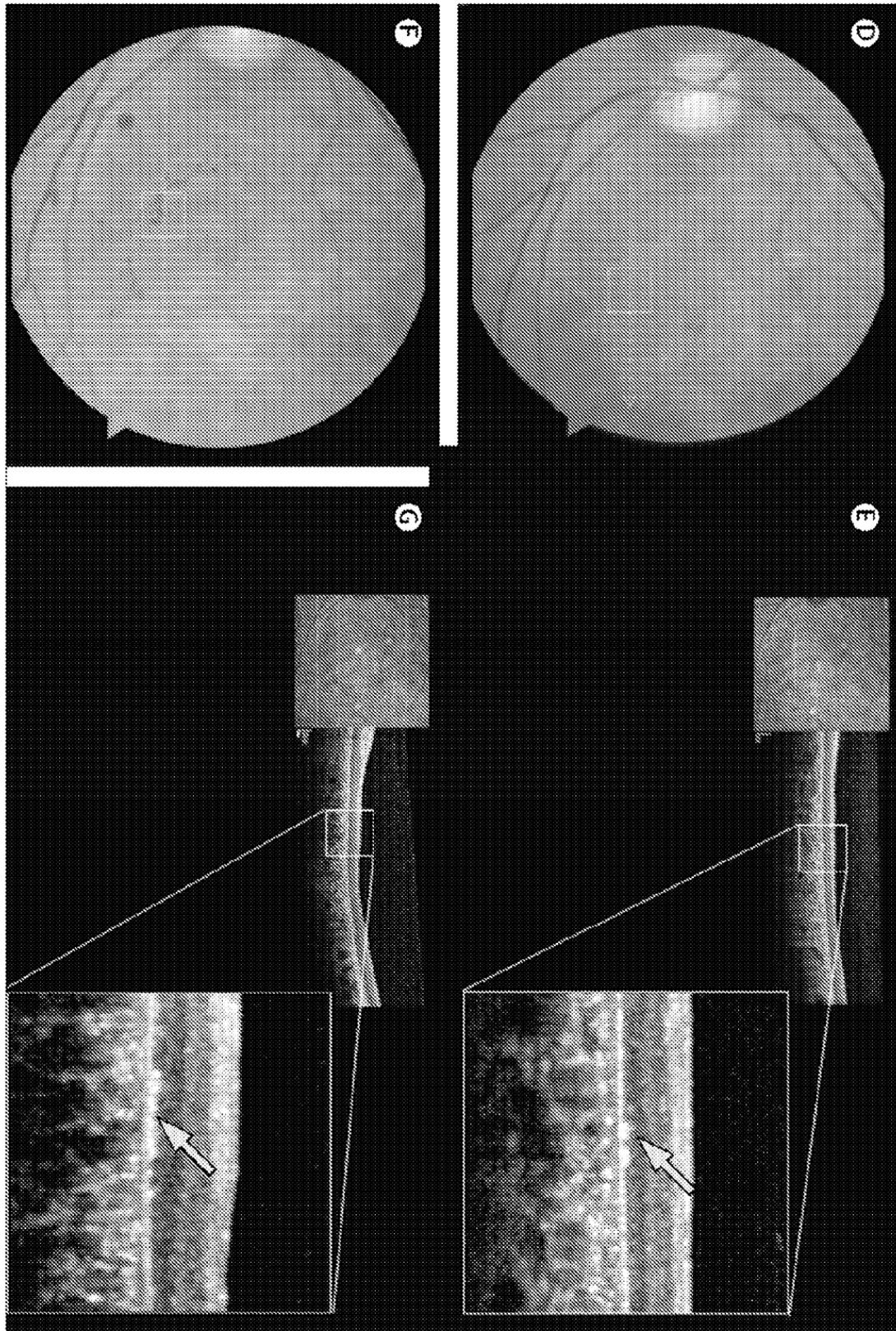


FIG. 14

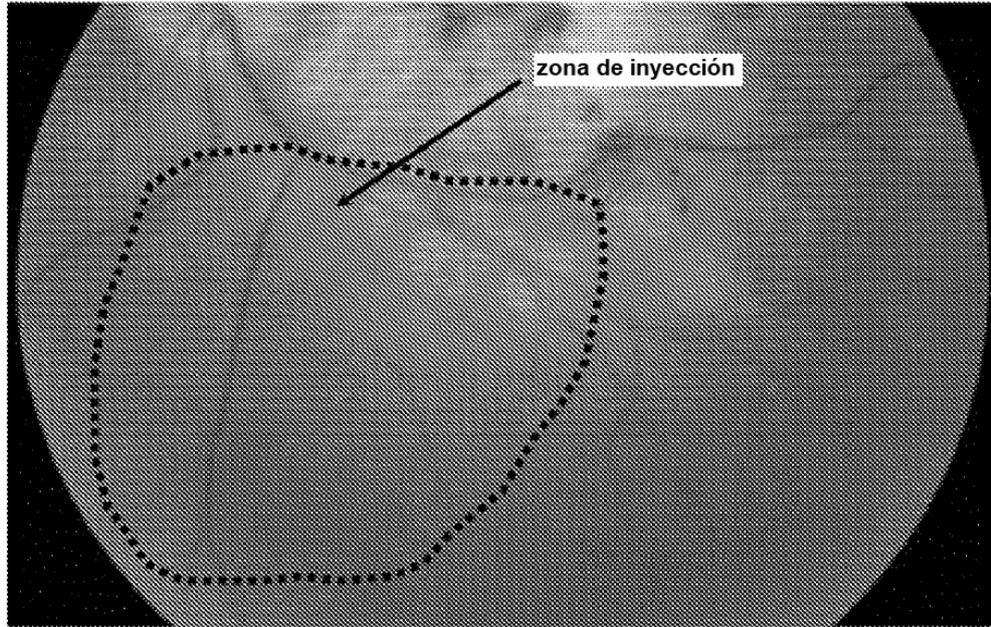
| | BCVA | ETDRS (número de letras) |
|----------------------|--------------------|-----------------------------|
| Ojo compañero | | |
| Línea base | Movimiento de mano | 0 |
| 1 semana | Movimiento de mano | 0 |
| 2 semanas | Movimiento de mano | 0 |
| 3 semanas | Movimiento de mano | 0 |
| 4 semanas | Movimiento de mano | 0 |
| 6 semanas | Movimiento de mano | 0 |
| 8 semanas | Movimiento de mano | 0 |
| 12 semanas | Movimiento de mano | 0 |
| Ojo operado | | |
| Línea base | Movimiento de mano | 0 |
| 1 semana | Recuento de dedos | 0 |
| 2 semanas | Recuento de dedos | 1 |
| 3 semanas | Recuento de dedos | 3 |
| 4 semanas | 20/800 | 5 |
| 6 semanas | 20/800 | 5 |
| 8 semanas | 20/800 | 5 |
| 12 semanas | 20/800 | 5 |

hESC=células madre embrionarias humanas. EPR=epitelio pigmentario de la retina.
BCVA=agudeza visual mejor corregida. ETDRS=tabla de agudeza visual de Estudio de Retinopatía Diabética de Tratamiento Temprano

Tabla: Cambio en la agudeza visual post-trasplante de hESC-EPR en paciente con distrofia macular de Stargardt

FIG. 15.

A.



B.

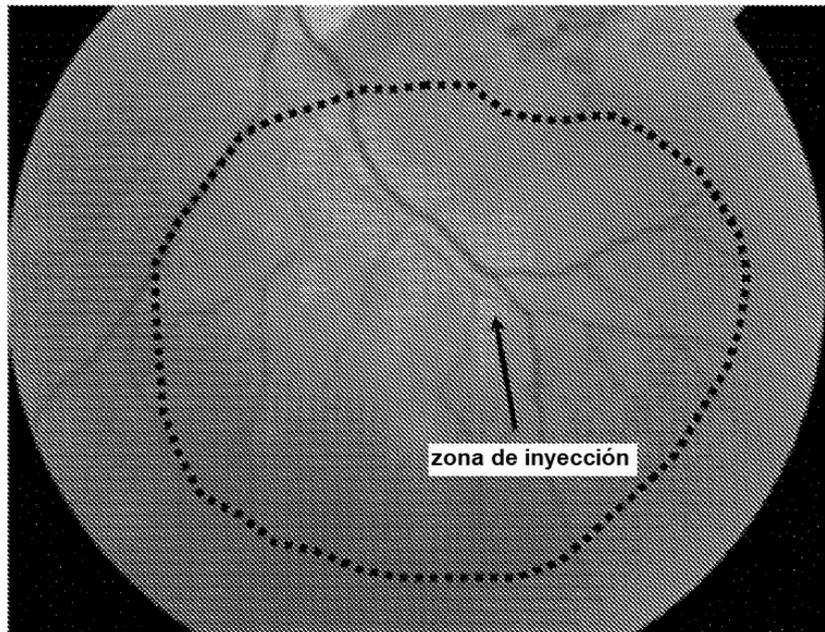
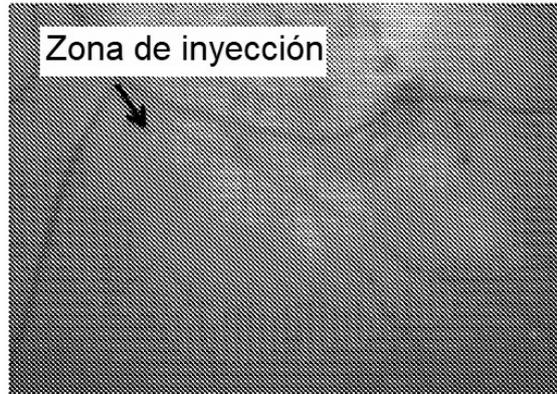
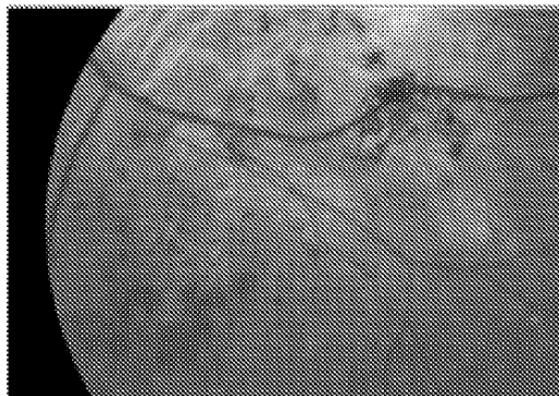


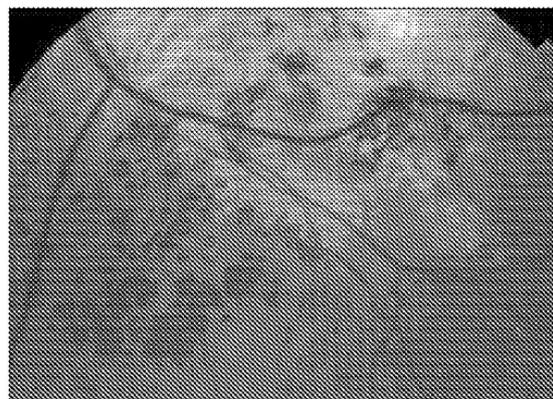
FIG. 16.



Línea base



Mes 1



Mes 3

FIG. 17.

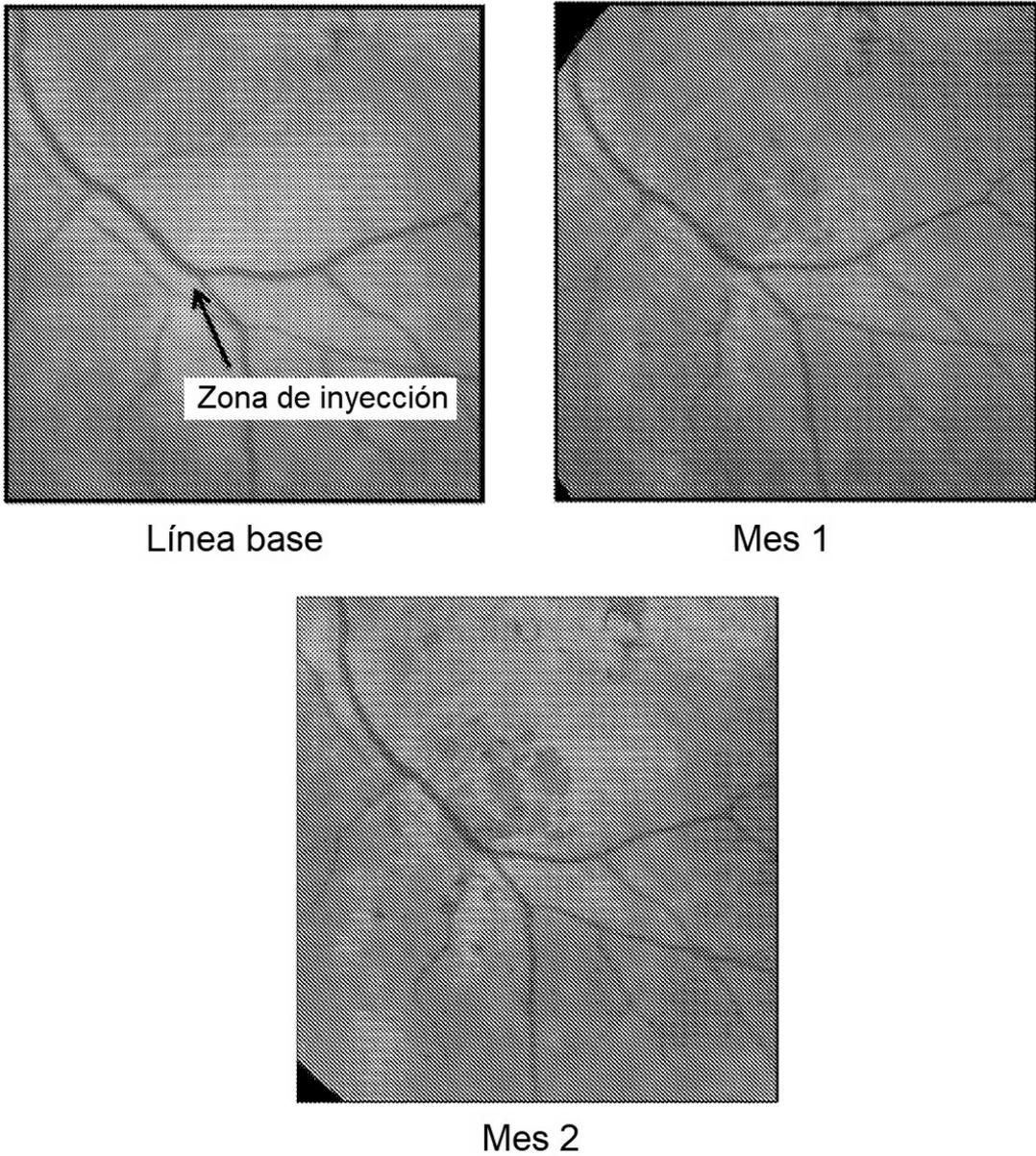


FIG. 18.

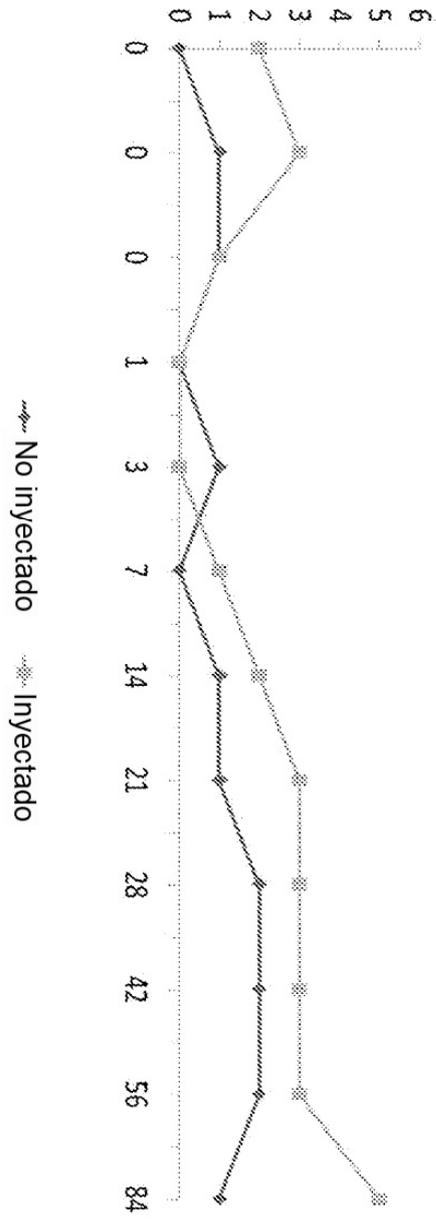
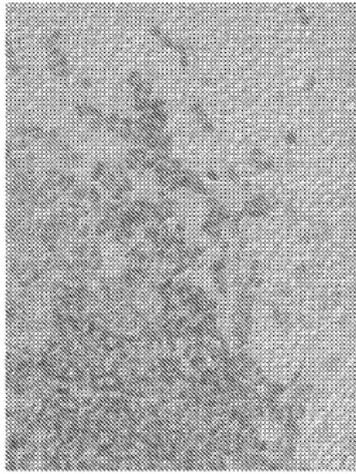
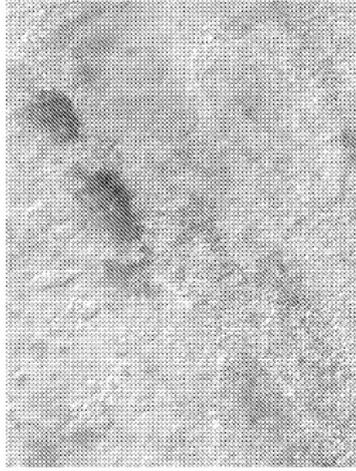


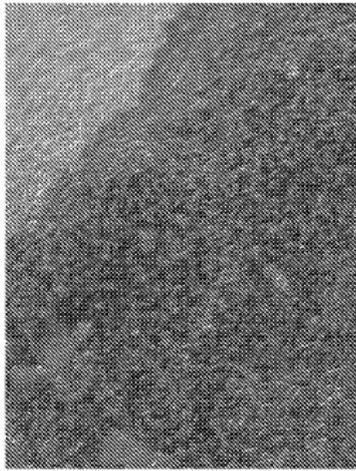
FIG. 19



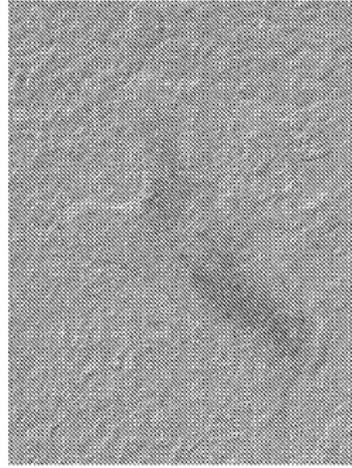
C. EPR aislado de hiPS a p0



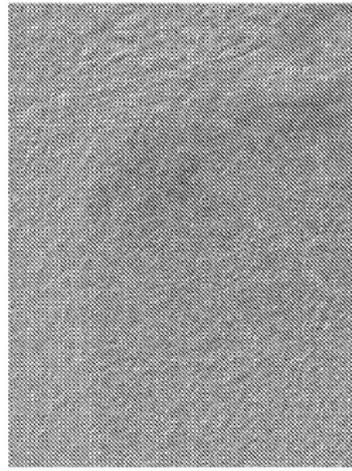
B. Parches de hiPS EPR diferenciando.



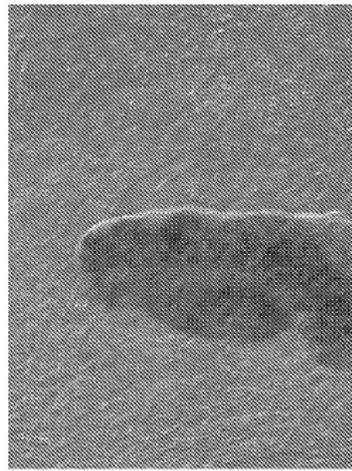
A. Parche de hiPS EPR en recolección.



F. Sobrecrecimiento de EB NED7 en 2 semanas; EBs formados con colagenasa



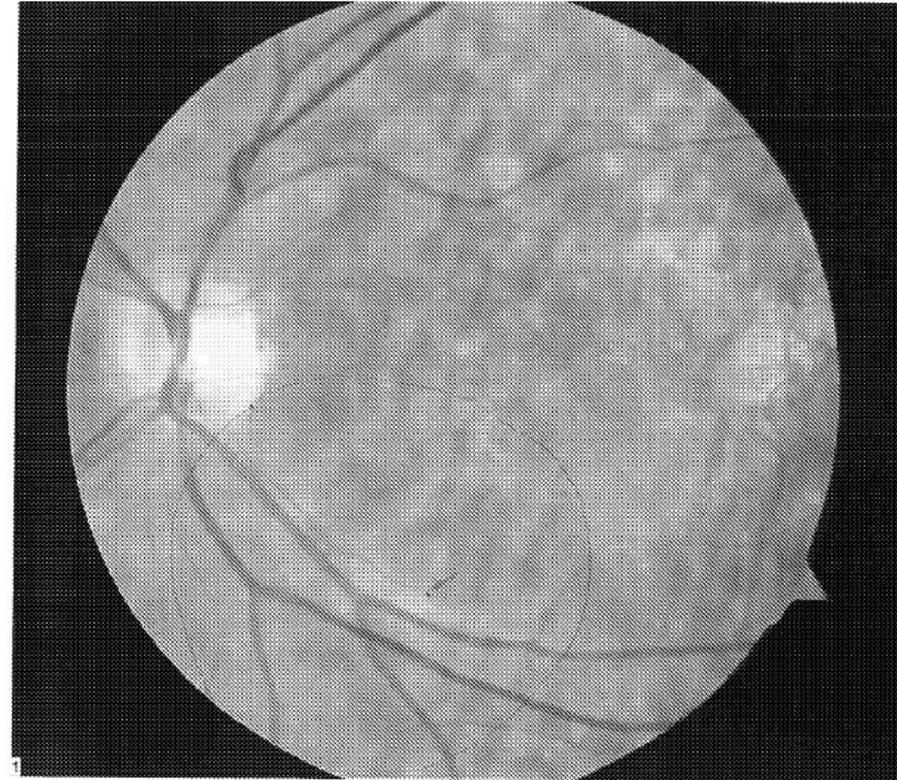
E. Sobrecrecimiento de EB NED7 tras 2 semanas. EBs formados mediante raspado mecánico.



D. D30469 diferenciándose en EPR sobre Matrigel

FIG 20. Injerto de EPR a largo plazo en paciente de SMD

A. LÍNEA BASE



B. 1 AÑO

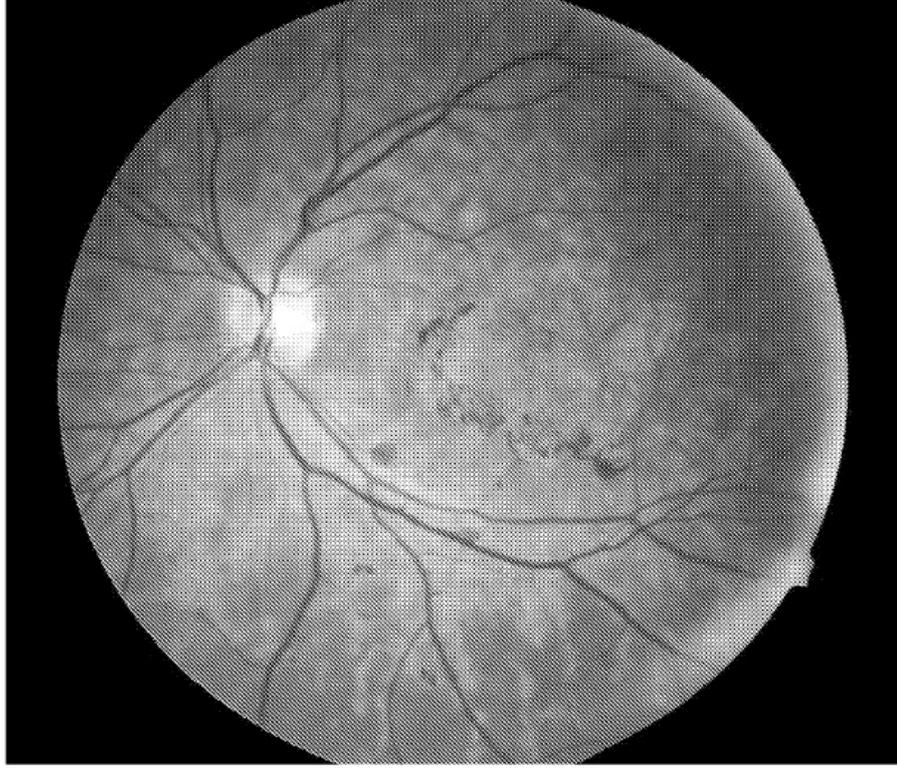


FIG. 21. Puntuación ETDRS/BCVA de Paciente de AMD Periférica

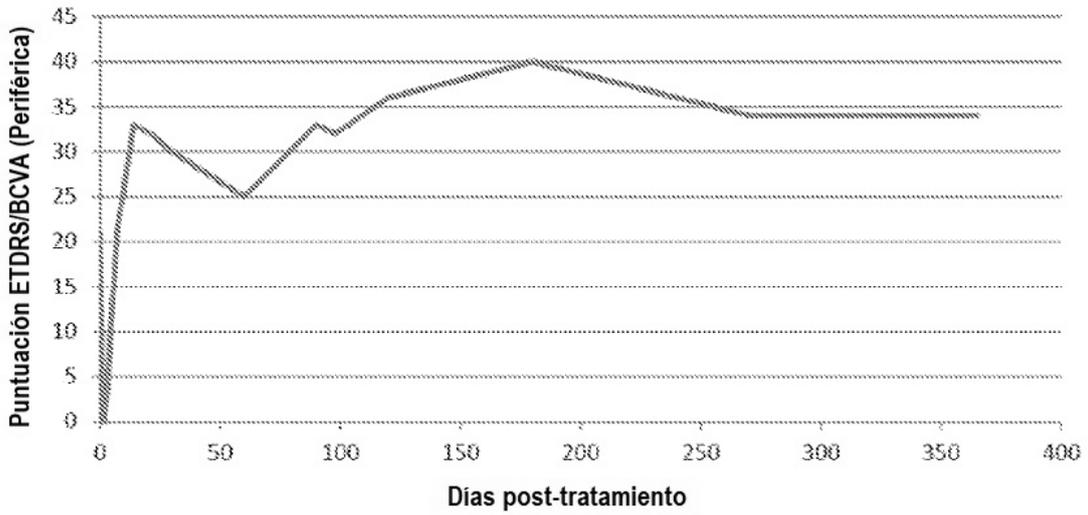


FIG. 22. Puntuación ETDRS/BCVA de Paciente de SMD Central

