

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 473**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/079 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2008 PCT/US2008/011669**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09051671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008 E 08839134 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2209888**

54 Título: **Métodos mejorados para producir células RPE y composiciones de células RPE**

30 Prioridad:

12.10.2007 US 998668 P

12.10.2007 US 998766 P

02.01.2008 US 9911 P

02.01.2008 US 9908 P

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

03.06.2020

73 Titular/es:

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

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

72 Inventor/es:

MALCUIT, CHRISTOPHER;

LEMIEUX, LINDA;

HOLMES, WILLIAM;

HUERTAS, PEDRO y

VILNER, LUCY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 764 473 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos mejorados para producir células RPE y composiciones de células RPE

Solicitudes Relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las solicitudes provisionales de Estados Unidos números 60/998.766, presentada el 12 de octubre de 2007, 60/998.668, presentada el 12 de octubre de 2007, 61/009.908, presentada el 2 de enero de 2008, y 61/009.911, presentada el 2 de enero de 2008.

Antecedentes de la invención

10 El epitelio pigmentario retiniano (RPE) es la capa de células pigmentadas justo en el exterior de la retina neurosensorial. Esta capa de células nutre a las células visuales retinianas, y está unida al coroides subyacente (la capa de vasos sanguíneos tras la retina) y reviste las células visuales retinianas. El RPE actúa como filtro para determinar qué nutrientes alcanzan la retina desde el coroides. Además, el RPE proporciona aislamiento entre la retina y el coroides. La ruptura del RPE interfiere con el metabolismo de la retina, lo que provoca el estrechamiento de la retina. El estrechamiento de la retina puede tener consecuencias graves. Por ejemplo, el estrechamiento de la retina puede provocar degeneración macular "seca", y también puede conducir a la formación inadecuada de vasos sanguíneos que puede provocar degeneración macular "húmeda").

15 Dada la importancia del RPE en el mantenimiento de la salud visual y retiniana, se han hecho esfuerzos significativos en el estudio del RPE y en el desarrollo de metodologías para la producción de células RPE *in vitro*. Las células RPE producidas *in vitro* se podrían usar para estudiar el desarrollo del RPE, para identificar los factores que provocan la ruptura del RPE, o para identificar los agentes que se pueden usar para estimular la reparación de las células RPE endógenas. Además, las propias células RPE producidas *in vitro* se podrían usar como terapia para sustituir o restablecer la totalidad o una porción de las células RPE dañadas de un paciente. Cuando se usan de esta manera, las células RPE pueden proporcionar una aproximación para tratar la degeneración macular, así como otras enfermedades y afecciones provocadas, completamente o en parte, por el daño del RPE.

20 El uso de células RPE producidas *in vitro* para el cribado o como agente terapéutico se basa en métodos que se pueden usar para producir un gran número de células RPE de una manera sistemática y dirigida. Tales métodos de diferenciación sistematizados proporcionarían ventajas significativas respecto de los esquemas previos basados, por ejemplo, en la diferenciación espontánea de las células RPE a partir de líneas celulares transformadas u otras fuentes.

Compendio de la invención

30 La presente invención proporciona un método para diferenciar células RPE a partir de células madre pluripotentes humanas, tales como células madre embrionarias humanas y células madre pluripotentes inducidas humanas. El método se usa para producir un gran número de células RPE diferenciadas para el uso en ensayos de cribado, para estudiar la biología básica del RPE, y como terapia. Como se describe en la presente memoria, las células RPE diferenciadas a partir de células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias humanas, mediante el uso de esta aproximación son molecularmente diferentes de las células madre embrionarias humanas, así como de las células RPE adultas y fetales.

35 La presente invención también proporciona preparaciones y preparaciones farmacéuticas de células RPE derivadas de células madre pluripotentes humanas. Tales preparaciones de células RPE son molecularmente diferentes de las células madre embrionarias humanas, así como de las células RPE adultas y fetales.

40 La presente invención proporciona, por primera vez, una caracterización molecular detallada de las células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas. La caracterización detallada incluye comparaciones con las células RPE derivadas de otras fuentes (p.ej., células RPE adultas y células RPE fetales), así como con células madre embrionarias humanas. Este análisis no solamente proporciona una comprensión más profunda de las células RPE, sino que también reveló que las células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas tienen propiedades moleculares diferentes que distinguen estas células de las células RPE descritas previamente.

45 La presente invención proporciona preparaciones de células RPE, que incluyen preparaciones sustancialmente purificadas de células RPE. Las células RPE ejemplares se diferencian de las células madre pluripotentes humanas, tales como las células madre embrionarias humanas o las células iPS. Las células RPE derivadas de células madre pluripotentes humanas se pueden formular y usar para tratar enfermedades degenerativas retinianas. Además, las células RPE derivadas de células madre pluripotentes humanas se pueden usar en ensayos de cribado para identificar agentes que modulan la supervivencia de las células RPE (*in vitro* y/o *in vivo*), para estudiar la maduración de las células RPE, o para identificar agentes que modulan la maduración de las células RPE. Los agentes identificados mediante el uso de tales ensayos de cribado se pueden usar *in vitro* o *in vivo*, y pueden proporcionar agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar solos o en combinación con las células RPE para tratar enfermedades degenerativas retinianas.

55 La presente invención proporciona métodos mejorados para la producción de células RPE a partir de células madre

embrionarias o de otras células madre pluripotentes. Los métodos de la invención se pueden usar para producir células RPE diferenciadas. Opcionalmente, el nivel de maduración, tal como se determina mediante los niveles de pigmentación, de las células RPE diferenciadas se puede modular de forma que se produzcan células RPE diferenciadas, células RPE maduras, o mezclas de las mismas. También se proporcionan métodos mejorados para el tratamiento de trastornos oculares. En particular, estos métodos implican el uso de células RPE derivadas de células madre embrionarias humanas para tratar o mejorar los síntomas de trastornos oculares, en particular trastornos oculares provocados o exacerbados, completamente o en parte, por el daño o la ruptura de la capa endógena de RPE.

En ciertos aspectos, la invención proporciona un método para producir un cultivo de células epiteliales pigmentarias retinianas (RPE). En ciertas realizaciones, el cultivo es un cultivo sustancialmente purificado que contiene al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más del 99% de células RPE diferenciadas (al menos un 75% del cultivo es una célula RPE diferenciada, independientemente del nivel de madurez). En ciertas realizaciones, el cultivo sustancialmente purificado contiene al menos un 30%, 35%, 40% o 45% de células RPE diferenciadas maduras. En ciertas realizaciones, el cultivo sustancialmente purificado contiene al menos un 50% de células RPE diferenciadas maduras. En otras realizaciones, el cultivo sustancialmente purificado contiene al menos un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más del 99% de células RPE diferenciadas maduras. En ciertas realizaciones, las células RPE diferenciadas derivan de células madre embrionarias humanas, células iPS humanas, u otras células madre pluripotentes.

En ciertas realizaciones, el método comprende las etapas de

- a) proporcionar células madre embrionarias humanas;
- b) cultivar las células madre embrionarias humanas en forma de cuerpos embrioides en un medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, cuyo medio contiene opcionalmente un suplemento B-27 sin suero;
- c) cultivar los cuerpos embrioides en forma de un cultivo adherente en un medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, cuyo medio contiene opcionalmente un suplemento B-27 sin suero;
- d) cultivar el cultivo adherente de células de (c) en un medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, cuyo medio no contiene un suplemento B-27 sin suero;
- e) cultivar las células de (d) en un medio capaz de mantener el crecimiento de un cultivo de células somáticas de alta densidad, por lo cual las células RPE aparecen en el cultivo de células;
- f) poner en contacto el cultivo de (e) con una enzima;
- g) seleccionar las células RPE del cultivo y transferir las células RPE a un cultivo diferente que contiene un medio suplementado con un factor de crecimiento para producir un cultivo enriquecido de células RPE; y
- h) propagar el cultivo enriquecido de células RPE para producir un cultivo sustancialmente purificado de células RPE.

En algunos otros aspectos, la invención proporciona un método de producción de una célula epitelial pigmentaria retiniana (RPE) madura, y dicho método comprende las etapas de

- a) proporcionar células madre embrionarias humanas;
- b) cultivar las células madre embrionarias humanas en forma de cuerpos embrioides en un medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, cuyo medio contiene opcionalmente un suplemento B-27 sin suero;
- c) cultivar los cuerpos embrioides en forma de un cultivo adherente en un medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, cuyo medio contiene opcionalmente un suplemento B-27 sin suero;
- d) cultivar el cultivo adherente de células de la etapa (c) en un medio rico en nutrientes, bajo en proteínas, cuyo medio no contiene un suplemento B-27 sin suero;
- e) cultivar las células de (d) en un medio capaz de mantener el crecimiento de un cultivo de células somáticas de alta densidad, por lo cual las células RPE aparecen en el cultivo de células;
- f) poner en contacto el cultivo de (e) con una enzima;
- g) seleccionar las células RPE del cultivo y transferir las células RPE a un cultivo diferente que contiene un medio suplementado con un factor de crecimiento para producir un cultivo enriquecido de células RPE;
- h) propagar el cultivo enriquecido de células RPE; y
- i) cultivar el cultivo enriquecido de células RPE para producir células RPE maduras.

En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, el cultivo sustancialmente purificado de células RPE puede

contener tanto células RPE diferenciadas como células RPE diferenciadas maduras. Entre las células RPE maduras, el nivel de pigmento puede variar. Sin embargo, las células RPE maduras se pueden distinguir visualmente de las células RPE basándose en el nivel incrementado de pigmentación y en la forma más cilíndrica.

5 En ciertas realizaciones, el porcentaje de células RPE diferenciadas maduras en el cultivo se puede reducir disminuyendo la densidad del cultivo. Así, en ciertas realizaciones, el método comprende además subcultivar una población de células RPE maduras para producir un cultivo que contiene un porcentaje más pequeño de células RPE maduras.

10 En ciertas realizaciones, el medio usado cuando se cultivan las células en forma de cuerpos embrioides se puede seleccionar de cualquier medio adecuado para cultivar células en forma de cuerpos embrioides. Por ejemplo, un experto en la técnica puede seleccionarlo entre los medios disponibles comercialmente o patentados. Se puede usar cualquier medio que sea capaz de mantener cultivos de alta densidad, tal como un medio para el cultivo de partículas virales, células bacterianas, o eucarióticas. Por ejemplo, el medio puede ser un medio alto en nutrientes, sin proteínas o un medio alto en nutrientes, bajo en proteínas. Por ejemplo, las células madre embrionarias humanas se pueden cultivar en MDBK-GM, OptiPro SFM, VP-SFM, EGM-2, o MDBK-MM. En ciertas realizaciones, el medio puede contener también un suplemento B-27.

15 En ciertas realizaciones, el medio descrito en la presente memoria también se puede suplementar con uno o más factores de crecimiento. Los factores de crecimiento que se pueden usar incluyen, por ejemplo, EGF, bFGF, VEGF, y factor de crecimiento similar a insulina recombinante. El medio también puede contener suplementos tales como heparina, hidrocortisona, ácido ascórbico, suero (tal como, por ejemplo, suero bovino fetal), o una matriz de crecimiento (tal como, por ejemplo, matriz extracelular de epitelio córneo bovino, matrigel (BD biosciences), o gelatina).

20 En ciertas realizaciones, se usan métodos mecánicos o enzimáticos para seleccionar las células RPE entre los agrupamientos de células distintas de RPE en un cultivo de cuerpos embrioides, o para facilitar el subcultivo de las células adherentes. Los métodos mecánicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, la trituración con una pipeta o el corte con una aguja de vidrio. Los métodos enzimáticos ejemplares incluyen, pero sin limitación, cualquier enzima adecuada para disociar células (p.ej., tripsina, colagenasa, dispasa). En ciertas realizaciones, se usa una disolución no enzimática para disociar las células, tal como una disolución que contiene un nivel elevado de EDTA tal como, por ejemplo, tampón de disociación celular basado en disolución de Hanks.

25 En ciertas realizaciones, para cualquiera de las etapas articuladas anteriores, las células se cultivan durante entre alrededor de 3 días y 45 días, tal como 7 días, 7-10 días, 7-14 días, o 14-21 días. En ciertas realizaciones, las células se cultivan durante alrededor de 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, o alrededor de 46 días. En ciertas realizaciones, las células se cultivan durante un periodo menor o igual a alrededor de: 45, 40, 35, 30, 25, 21, 20, 18, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 días. Obsérvese que, para cada una de las etapas del método anteriormente articulado, 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.

30 En ciertas realizaciones, las células RPE se cultivan adicionalmente para producir un cultivo de células RPE maduras. Las células RPE y las células RPE maduras son células RPE diferenciadas. Sin embargo, las células RPE maduras se caracterizan por un nivel incrementado de pigmento en comparación con las células RPE diferenciadas. El nivel de madurez y pigmentación se puede modular incrementando o disminuyendo la densidad del cultivo de células RPE diferenciadas. Así, un cultivo de células RPE se puede cultivar adicionalmente para producir células RPE maduras. De manera alternativa, se puede disminuir la densidad de un cultivo que contiene células RPE maduras para disminuir el porcentaje de células RPE diferenciadas maduras y para incrementar el porcentaje de células RPE diferenciadas.

35 El medio usado para cultivar las células RPE es cualquier medio adecuado para el cultivo de células, y el experto lo puede seleccionar. Por ejemplo, se puede usar cualquier medio que sea capaz de mantener cultivos de alta densidad, tal como un medio para el cultivo de partículas virales, células bacterianas, o animales. Por ejemplo, las células descritas en la presente memoria se pueden cultivar en VP-SFM, EGM-2, y MDBK-MM.

40 En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, dicho cultivo sustancialmente purificado de células RPE (con o sin células RPE maduras) se congela para el almacenamiento. Las células se pueden almacenar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, p.ej., congeladas criogénicamente, y se pueden congelar a cualquier temperatura adecuada para el almacenamiento de las células. Por ejemplo, las células se pueden congelar a aproximadamente -20 °C, -80 °C, -120 °C, o a cualquier otra temperatura adecuada para el almacenamiento de células. Las células congeladas criogénicamente se almacenan en recipientes adecuados y se preparan para el almacenamiento para reducir el riesgo de daño celular, y para maximizar la probabilidad de que las células sobrevivan a la descongelación. En otras realizaciones, las células RPE se mantienen a temperatura ambiente, o se refrigeran, por ejemplo, a aproximadamente 4 °C.

45 En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, el método se lleva a cabo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células madre embrionarias humanas a partir de las cuales se diferencian las células RPE se obtuvieron de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación

(BPF). En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células madre embrionarias humanas a partir de las cuales se diferencian las células RPE se obtuvieron de uno o más blastómeros retirados de un embrión en etapa temprana sin destruir el embrión restante.

5 En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, el método se usa para producir una preparación que comprende al menos 1×10^5 células RPE, al menos 5×10^5 células RPE, al menos 1×10^6 células RPE, al menos 5×10^6 células RPE, al menos 1×10^7 células RPE, al menos 2×10^7 células RPE, al menos 3×10^7 células RPE, al menos 4×10^7 células RPE, al menos 5×10^7 células RPE, al menos 6×10^7 células RPE, al menos 7×10^7 células RPE, al menos 8×10^7 células RPE, al menos 9×10^7 células RPE, al menos 1×10^8 células RPE, al menos 2×10^8 células RPE, al menos 5×10^8 células RPE, al menos 7×10^8 células RPE, o al menos 1×10^9 células RPE. En ciertas realizaciones, el número de células RPE en la preparación incluye las células RPE diferenciadas, independientemente del nivel de madurez e independientemente de los porcentajes relativos de células RPE diferenciadas y células RPE maduras. En otras realizaciones, el número de células RPE en la preparación se refiere al número de células RPE diferenciadas o de células RPE maduras.

En ciertas realizaciones, el método comprende además formular las células RPE diferenciadas y/o las células RPE maduras diferenciadas para producir una preparación de células RPE adecuadas para el trasplante.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una afección caracterizada por degeneración retiniana, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una preparación que comprende células RPE, cuyas células RPE derivan de células madre embrionarias humanas, células iPS, u otras células madre pluripotentes. Las afecciones caracterizadas por degeneración retiniana incluyen, por ejemplo, distrofia macular de Stargardt, degeneración macular relacionada con la edad (seca o húmeda), retinopatía diabética, y retinosis pigmentaria. En ciertas realizaciones, las células RPE se obtienen de células madre pluripotentes humanas mediante el uso de uno o más de los métodos descritos en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, la preparación se crioconservó previamente y se descongeló antes del trasplante.

25 En ciertas realizaciones, el método de tratamiento comprende además la administración de ciclosporina o uno o más inmunosupresores diferentes. Cuando se usan inmunosupresores, se pueden administrar de manera sistémica o local, y se pueden administrar antes, a la vez, o tras la administración de las células RPE. En ciertas realizaciones, la terapia inmunosupresora continúa durante semanas, meses, años, o indefinidamente tras la administración de las células RPE.

30 En ciertas realizaciones, el método de tratamiento comprende la administración de una única dosis de células RPE. En otras realizaciones, el método de tratamiento comprende un curso de terapia en el que las células RPE se administran múltiples veces a lo largo de cierto periodo. Los cursos de tratamiento ejemplares pueden comprender tratamientos semanales, bisemanales, mensuales, trimestrales, semestrales, o anuales. De manera alternativa, el tratamiento puede desarrollarse en fases, por lo que se requieren múltiples dosis inicialmente (p.ej., dosis diarias durante la primera semana), y posteriormente son necesarias menos dosis y con menos frecuencia. Se contemplan numerosos regímenes de tratamiento.

35 En ciertas realizaciones, las células RPE administradas comprenden una población mixta de células RPE diferenciadas y células RPE maduras. En otras realizaciones, las células RPE administradas comprenden una población sustancialmente purificada de células RPE diferenciadas o de células RPE maduras. Por ejemplo, las células RPE administradas pueden contener menos del 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o menos del 1% del otro tipo de células RPE.

En ciertas realizaciones, las células RPE se formulan en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 En ciertas realizaciones, la preparación que comprende las células RPE se trasplanta en una suspensión, matriz o sustrato. En ciertas realizaciones, la preparación se administra mediante inyección en el espacio subretiniano del ojo. En ciertas realizaciones, se administran alrededor de 10^4 a alrededor de 10^6 células al sujeto. En ciertas realizaciones, el método comprende además la etapa de monitorizar la eficacia del tratamiento o de la prevención midiendo las respuestas del electroretinograma, el umbral de agudeza optométrica, o el umbral de luminancia en el sujeto. El método también puede comprender monitorizar la eficacia del tratamiento o de la prevención monitorizando la inmunogenicidad de las células o la migración de las células en el ojo.

45 En ciertos aspectos, la invención proporciona una preparación farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una afección caracterizada por la degeneración retiniana, que comprende una cantidad eficaz de células RPE, cuyas células RPE se obtienen de células madre embrionarias humanas o de otras células madre pluripotentes. La preparación farmacéutica se puede formular en un vehículo farmacéuticamente aceptable según la vía de administración. Por ejemplo, la preparación se puede formular para la administración en el espacio subretiniano del ojo. La composición puede comprender al menos 10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 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 , o 10^7 células RPE. En ciertas realizaciones, la composición puede comprender al menos 2×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 células RPE. En ciertas realizaciones, las células RPE pueden incluir células RPE maduras, y por tanto el número de células incluye el total de las células RPE diferenciadas y de las células RPE diferenciadas maduras.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de cribado para identificar agentes que modulan la supervivencia

5 de las células RPE. Por ejemplo, las células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas se pueden usar para el cribado de agentes que estimulan la supervivencia de las células RPE. Los agentes identificados se pueden usar, solos o en combinación con las células RPE, como parte de un régimen de tratamiento. De manera alternativa, los agentes identificados se pueden usar como parte de un método de cultivo para mejorar la supervivencia de las células RPE diferenciadas *in vitro*.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de cribado para identificar agentes que modulan la madurez de las células RPE. Por ejemplo, las células RPE diferenciadas a partir de células ES humanas se pueden usar para el cribado de agentes que estimulan la maduración de las células RPE.

10 En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, el método se lleva a cabo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células madre embrionarias humanas u otras células madre pluripotentes a partir de las cuales se diferencian las células RPE se obtuvieron de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células madre embrionarias humanas a partir de las cuales se diferencian las células RPE se obtuvieron de uno o más blastómeros retirados de un embrión en etapa temprana sin destruir el embrión restante.

15 En otro aspecto, la invención contempla que, en vez de células madre embrionarias humanas, el material inicial para producir las células RPE, o las preparaciones de las mismas, pueden ser otros tipos de células madre pluripotentes humanas. A modo de ejemplo, la invención contempla usar células madre pluripotentes inducidas (iPS) como material inicial para diferenciar las células RPE mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria. Tales células iPS se pueden obtener de un banco de células, o se pueden obtener previamente de otra manera. De manera
20 alternativa, las células iPS se pueden generar antes de comenzar la diferenciación hasta células RPE.

En una realización, se usan células RPE o preparaciones diferenciadas a partir de células madre pluripotentes, que incluyen células iPS, en un método terapéutico.

25 La presente invención también proporciona células epiteliales pigmentadas retinianas humanas (hRPEs) funcionales que están diferenciadas terminalmente a partir de células madre embrionarias humanas (hESCs) u otras células madre pluripotentes humanas. En los experimentos de trasplante en primates no humanos, estas hRPEs se pueden identificar de otras células por medio de sus características físicas exclusivas, tales como por su expresión exclusiva de mRNA y proteínas. Además, cuando se implantan en un modelo animal validado de degeneración retiniana, las hRPEs pueden tratar la degeneración retiniana en el animal enfermo. Por lo tanto, las hRPEs de la invención son útiles para tratar a pacientes afectados por diversos trastornos degenerativos retinianos. La presente invención proporciona, por
30 lo tanto, una fuente renovable de hRPEs que se pueden producir y fabricar en condiciones similares a BPL y que cumplen las BPF para el tratamiento de enfermedades y trastornos degenerativos visuales.

35 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una célula epitelial pigmentada retiniana humana derivada de una célula madre embrionaria humana, cuya célula está pigmentada y expresa al menos un gen que no se expresa en una célula que no es una célula epitelial pigmentada retiniana humana. En ciertas realizaciones, la célula epitelial pigmentada retiniana humana se aísla de al menos una proteína, molécula, u otra impureza que se halla en su medio natural.

40 En otra realización, la invención proporciona un cultivo celular que comprende células RPE humanas derivadas de células madre embrionarias humanas o de otras células madre pluripotentes, que están pigmentadas y expresan al menos un gen que no se expresa en una célula distinta de RPE humano. Cuando se usa de esta manera, pigmentado se refiere a cualquier nivel de pigmentación, por ejemplo, la pigmentación que se da inicialmente cuando las células RPE se diferencian a partir de células ES. La pigmentación puede variar con la densidad celular y la madurez de las células RPE diferenciadas. Sin embargo, cuando las células se denominan pigmentadas, se entiende que el término se refiere a todos y cada uno de los niveles de pigmentación.

45 En ciertas realizaciones, el cultivo celular comprende una población sustancialmente purificada de células RPE humanas. Una población sustancialmente purificada de células hRPE es una en la que las células hRPE constituyen al menos alrededor de un 75% de las células de la población. En otras realizaciones, una población sustancialmente purificada de células hRPE es una en la que las células hRPE constituyen al menos alrededor de un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 98%, 99%, o incluso más del 99% de las células de la población. En ciertas realizaciones, la pigmentación de las células hRPE del cultivo celular es homogénea. En otras realizaciones,
50 la pigmentación de las células hRPE del cultivo celular es heterogénea, y el cultivo de células RPE comprende tanto células RPE diferenciadas como células RPE maduras. Un cultivo celular de la invención puede comprender al menos alrededor de 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , o al menos alrededor de 10^9 células hRPE.

55 La presente invención proporciona células epiteliales pigmentadas retinianas humanas con grados variables de pigmentación. En ciertas realizaciones, la pigmentación de una célula epitelial pigmentada retiniana humana es igual que la de una célula epitelial pigmentada humana media tras la diferenciación terminal de la célula hRPE. En ciertas realizaciones, la pigmentación de una célula epitelial pigmentada retiniana humana es mayor que la de una célula epitelial pigmentada retiniana humana media tras la diferenciación terminal de la célula hRPE. En algunas otras realizaciones, la pigmentación de una célula epitelial pigmentada retiniana humana es menor que la de una célula

epitelial pigmentada retiniana humana media tras la diferenciación terminal.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona células RPE humanas diferenciadas a partir de células ES o de otras células madre pluripotentes y que expresan (a nivel de mRNA y/o de proteínas) uno o más (1, 2, 3, 4, 5, o 6) de lo siguiente: RPE-65, Bestrofina, PEDF, CRALBP, Otx2, y Mit-F. En ciertas realizaciones, la expresión génica se mide mediante la expresión de mRNA. En otras realizaciones, la expresión génica se mide mediante la expresión de proteínas. En ciertas realizaciones, las células RPE no expresan sustancialmente genes específicos de ES, tales como Oct-4, fosfatasa alcalina, nanog, y/o Rex-1. En otras realizaciones, las células RPE expresan una o más (1, 2, o 3) de pax-2, pax-6, y/o tirosinasa. En ciertas realizaciones, la expresión de pax-2, pax-6, y/o tirosinasa distingue las células RPE diferenciadas de las células RPE diferenciadas maduras. En otras realizaciones, las células RPE expresan uno o más de los marcadores presentados en la Tabla 2, y la expresión del marcador o marcadores está estimulada en las células RPE respecto de la expresión (si existe) en las células ES humanas. En otras realizaciones, las células RPE expresan uno o más de los marcadores presentados en la Tabla 3, y la expresión del marcador o marcadores está inhibida en las células RPE respecto de la expresión (si existe) en las células ES humanas.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende células RPE humanas derivadas de células madre embrionarias humanas o de otras células madre pluripotentes. Las preparaciones farmacéuticas pueden comprender al menos alrededor de 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o alrededor de 10^9 células hRPE.

En otras realizaciones, la invención proporciona una preparación criopreservada de las células RPE descritas en la presente memoria. La preparación criopreservada se puede congelar para el almacenamiento durante días o años. Las células se pueden almacenar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, p.ej., congeladas criogénicamente, y se pueden congelar a cualquier temperatura adecuada para el almacenamiento de las células. Por ejemplo, las células se pueden congelar a aproximadamente -20°C , -80°C , -120°C , o a cualquier otra temperatura adecuada para el almacenamiento de células. Las células congeladas criogénicamente se almacenan en recipientes adecuados y se preparan para el almacenamiento para reducir el riesgo de daño celular, y para maximizar la probabilidad de que las células sobrevivan a la descongelación. En otras realizaciones, las células RPE se pueden mantener a temperatura ambiente, o se pueden refrigerar, por ejemplo, a aproximadamente 4°C . Las preparaciones criopreservadas de las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender al menos alrededor de 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o alrededor de 10^9 células hRPE. En ciertas realizaciones, las células hRPE de la invención se recuperan del almacenamiento tras la criopreservación. En ciertas realizaciones, más del 65%, 70%, 75%, o más del 80% de las células RPE conservan la viabilidad tras la criopreservación. En otras realizaciones, más del 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o más del 99% de las células RPE conservan la viabilidad tras la criopreservación.

En otro aspecto, la invención proporciona preparaciones sustancialmente purificadas de células RPE humanas que tienen cualquier combinación de las características estructurales, moleculares, y funcionales descritas en la presente memoria. Tales preparaciones se pueden formular como preparaciones farmacéuticas para la administración, y/o se pueden formular para la criopreservación.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de las células RPE humanas descritas en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para tratar una afección en un paciente que lo necesita. En otra realización, la invención proporciona el uso de un cultivo celular que comprende las células RPE humanas descritas en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para tratar una afección en un paciente que lo necesita. En otra realización, la invención proporciona el uso de una preparación farmacéutica que comprende las células RPE humanas descritas en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para tratar una afección en un paciente que lo necesita. Las afecciones que se pueden tratar incluyen, sin limitación, enfermedades degenerativas de la retina, tales como distrofia macular de Stargardt, retinosis pigmentaria, degeneración macular, glaucoma, y retinopatía diabética. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de una afección caracterizada por degeneración retiniana, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una preparación que comprende células RPE, cuyas células RPE derivan de células madre embrionarias de mamífero. Las afecciones caracterizadas por degeneración retiniana incluyen, por ejemplo, distrofia macular de Stargardt, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, y retinosis pigmentaria.

En otras realizaciones, la invención proporciona una disolución de células RPE humanas derivadas de una célula madre embrionaria humana, o de otra célula madre pluripotente, cuyas células RPE tienen cualquier combinación de las características descritas en la presente memoria. Tal disolución puede comprender al menos alrededor de 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o alrededor de 10^9 células hRPE, como se describe en la presente memoria. Tales disoluciones son adecuadas para la inyección a un sujeto. Tales disoluciones son adecuadas para la criopreservación como se describe en la presente memoria. Esta invención también proporciona el uso de estas disoluciones para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad que se podría tratar mediante la administración de células RPE, tal como, por ejemplo, enfermedades degenerativas retinianas del ojo.

En otro aspecto, las células RPE de la invención se obtienen de células madre embrionarias humanas, o de otras células madre pluripotentes, previamente obtenidas en condiciones BPF. En una realización, las células ES humanas se obtienen de uno o más blastómeros de un embrión en etapa de escisión temprana, opcionalmente sin destruir el

embrión. En otra realización, las células ES humanas son de una biblioteca de células madre embrionarias humanas. En ciertas realizaciones, dicha biblioteca de células madre embrionarias humanas comprende células madre, cada una de las cuales es hemicigota, homocigota, o nulicigota para al menos un alelo del MHC presente en una población humana, en la que cada miembro de dicha biblioteca de células madre es hemicigota, homocigota, o nulicigota para un grupo diferente de alelos del MHC respecto de los miembros restantes de la biblioteca. En las realizaciones adicionales, la biblioteca de células madre embrionarias humanas comprende células madre que son hemicigotas, homocigotas, o nulicigotas para todos los alelos del MHC presentes en una población humana. En algunas otras realizaciones, la invención proporciona una biblioteca de células RPE, cada una de las cuales es hemicigota, homocigota, o nulicigota para al menos un alelo del MHC presente en una población humana, en la que cada miembro de dicha biblioteca de células RPE es hemicigoto, homocigoto, o nulicigoto para un grupo diferente de alelos del MHC respecto de los miembros restantes de la biblioteca. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una biblioteca de células RPE humanas que son hemicigotas, homocigotas, o nulicigotas para todos los alelos del MHC presentes en una población humana.

En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, dicho cultivo sustancialmente purificado de células RPE (con o sin células RPE maduras) se congela para el almacenamiento. Las células se pueden almacenar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, p.ej., congeladas criogénicamente, y se pueden congelar a cualquier temperatura adecuada para el almacenamiento de las células. Por ejemplo, las células se pueden congelar a aproximadamente -20 °C, -80 °C, -120 °C, o a cualquier otra temperatura adecuada para el almacenamiento de células. Las células congeladas criogénicamente se almacenan en recipientes adecuados y se preparan para el almacenamiento para reducir el riesgo de daño celular, y para maximizar la probabilidad de que las células sobrevivan a la descongelación. En otras realizaciones, las células RPE se pueden mantener a temperatura ambiente, o se pueden refrigerar, por ejemplo, a aproximadamente 4 °C.

En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células RPE humanas se producen de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células madre embrionarias humanas a partir de las cuales se diferencian las células RPE se obtuvieron de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células madre embrionarias humanas a partir de las cuales se diferencian las células RPE se obtuvieron de uno o más blastómeros retirados de un embrión en etapa temprana sin destruir el embrión restante. Como tal, la presente invención proporciona preparaciones que cumplen las BPF de células RPE, que incluyen preparaciones sustancialmente purificadas de células RPE. Tales preparaciones están sustancialmente exentas de contaminación o infección viral, bacteriana, y/o fúngica.

En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las composiciones o preparaciones de células RPE comprenden al menos 1×10^5 células RPE, al menos 5×10^5 células RPE, al menos 1×10^6 células RPE, al menos 5×10^6 células RPE, al menos 1×10^7 células RPE, al menos 2×10^7 células RPE, al menos 3×10^7 células RPE, al menos 4×10^7 células RPE, al menos 5×10^7 células RPE, al menos 6×10^7 células RPE, al menos 7×10^7 células RPE, al menos 8×10^7 células RPE, al menos 9×10^7 células RPE, al menos 1×10^8 células RPE, al menos 2×10^8 células RPE, al menos 5×10^8 células RPE, al menos 7×10^8 células RPE, o al menos 1×10^9 células RPE. En ciertas realizaciones, el número de células RPE en la preparación incluye las células RPE diferenciadas, independientemente del nivel de madurez e independientemente de los porcentajes relativos de células RPE diferenciadas y células RPE diferenciadas maduras. En otras realizaciones, el número de células RPE en la preparación se refiere al número de células RPE diferenciadas o de células RPE maduras.

En ciertas realizaciones, el método comprende además formular las células RPE diferenciadas y/o las células RPE maduras diferenciadas para producir una preparación de células RPE adecuadas para el trasplante.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una afección caracterizada por degeneración retiniana, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una preparación que comprende células RPE, cuyas células RPE derivan de células madre pluripotentes humanas. En ciertas realizaciones, las células RPE se obtienen mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Las afecciones caracterizadas por degeneración retiniana incluyen, por ejemplo, distrofia macular de Stargardt, degeneración macular relacionada con la edad (seca o húmeda), retinopatía diabética, y retinosis pigmentaria.

En ciertas realizaciones, la preparación se crioconservó previamente y se descongeló antes del trasplante.

En ciertas realizaciones, el método de tratamiento comprende además la administración de ciclosporina o uno o más inmunosupresores diferentes. Cuando se usan inmunosupresores, se pueden administrar de manera sistémica o local, y se pueden administrar antes, a la vez, o tras la administración de las células RPE. En ciertas realizaciones, la terapia inmunosupresora continúa durante semanas, meses, años, o indefinidamente tras la administración de las células RPE.

En ciertas realizaciones, el método de tratamiento comprende la administración de una única dosis de células RPE. En otras realizaciones, el método de tratamiento comprende un curso de terapia en el que las células RPE se administran múltiples veces a lo largo de cierto periodo. Los cursos de tratamiento ejemplares pueden comprender tratamientos semanales, bisemanales, mensuales, trimestrales, semestrales, o anuales. De manera alternativa, el tratamiento puede desarrollarse en fases, por lo que se requieren múltiples dosis inicialmente (p.ej., dosis diarias

durante la primera semana), y posteriormente son necesarias menos dosis y con menos frecuencia. Se contemplan numerosos regímenes de tratamiento.

5 En ciertas realizaciones, las células RPE administradas comprenden una población mixta de células RPE diferenciadas y células RPE maduras. En otras realizaciones, las células RPE administradas comprenden una población sustancialmente purificada de células RPE diferenciadas o de células RPE maduras. Por ejemplo, las células RPE administradas pueden contener menos del 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o menos del 1% del otro tipo de células RPE.

En ciertas realizaciones, las células RPE se formulan en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En ciertas realizaciones, la preparación que comprende las células RPE se trasplanta en una suspensión, matriz o sustrato. En ciertas realizaciones, la preparación se administra mediante inyección en el espacio subretiniano del ojo. En ciertas realizaciones, la preparación se administra de manera transcorneal. En ciertas realizaciones, se administran alrededor de 10^4 a alrededor de 10^6 células al sujeto. En ciertas realizaciones, el método comprende además la etapa de monitorizar la eficacia del tratamiento o de la prevención midiendo las respuestas del electroretinograma, el umbral de agudeza optomotora, o el umbral de luminancia en el sujeto. El método también puede comprender monitorizar la eficacia del tratamiento o de la prevención monitorizando la inmunogenicidad de las células o la migración de las células en el ojo.

15 En ciertos aspectos, la invención proporciona una preparación farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una afección caracterizada por degeneración retiniana, que comprende una cantidad eficaz de células RPE, cuyas células RPE derivan de células madre embrionarias humanas. La preparación farmacéutica se puede formular en un vehículo farmacéuticamente aceptable según la vía de administración. Por ejemplo, la preparación se puede formular para la administración en el espacio subretiniano o la córnea del ojo. La composición puede comprender al menos 10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 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 , o 10^7 células RPE. En ciertas realizaciones, la composición puede comprender al menos 2×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 células RPE. En ciertas realizaciones, las células RPE pueden incluir células RPE maduras, y por tanto el número de células incluye el total de las células RPE diferenciadas y de las células RPE diferenciadas maduras.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un método de cribado para identificar agentes que modulan la supervivencia de las células RPE. Por ejemplo, las células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas se pueden usar para el cribado de agentes que estimulan la supervivencia de las células RPE. Los agentes identificados se pueden usar, solos o en combinación con las células RPE, como parte de un régimen de tratamiento. De manera alternativa, los agentes identificados se pueden usar como parte de un método de cultivo para mejorar la supervivencia de las células RPE diferenciadas *in vitro*.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de cribado para identificar agentes que modulan la madurez de las células RPE. Por ejemplo, las células RPE diferenciadas a partir de células ES humanas se pueden usar para el cribado de agentes que estimulan la maduración de las células RPE.

35 En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, el método se lleva a cabo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células madre embrionarias humanas a partir de las cuales se diferencian las células RPE se obtuvieron de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células madre embrionarias humanas a partir de las cuales se diferencian las células RPE se obtuvieron de uno o más blastómeros retirados de un embrión en etapa temprana sin destruir el embrión restante.

40 En otro aspecto, la invención contempla que, en vez de células madre embrionarias humanas, el material inicial para producir las células RPE, o las preparaciones de las mismas, pueden ser otros tipos de células madre pluripotentes humanas. A modo de ejemplo, la invención contempla que las células madre pluripotentes inducidas (iPS), que tienen la característica de hES, se pueden usar de forma similar como material inicial para diferenciar las células RPE mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria. Tales células iPS se pueden obtener de un banco de células, o se pueden obtener previamente de otra manera. De manera alternativa, las células iPS se pueden generar antes de comenzar la diferenciación hasta células RPE.

En una realización, se usan células RPE o preparaciones diferenciadas a partir de células madre pluripotentes, que incluyen células iPS, en un método terapéutico.

50 La invención contempla cualquier combinación de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente o posteriormente. Por ejemplo, las preparaciones de células RPE que comprenden cualquier combinación de células RPE diferenciadas y células RPE maduras se pueden usar en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria. De forma similar, los métodos descritos en la presente memoria para producir células RPE mediante el uso de células madre embrionarias humanas como material inicial se pueden llevar a cabo de forma similar mediante el uso de cualquier célula madre pluripotente humana como material inicial.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un modelo esquemático que muestra la ontogenia del desarrollo de células RPE humanas derivadas de células madre embrionarias humanas.

5 La Figura 2 es un gráfico que muestra una comparación de la expresión génica de células hES y células RPE derivadas de células madre embrionarias humanas mediante PCR con transcripción inversa, cuantitativa y en tiempo real (qPCR).

La Figura 3 es un gráfico que muestra una comparación de la expresión génica de células ARPE-19 (una línea de células RPE previamente obtenida) y células RPE derivadas de células madre embrionarias humanas mediante PCR con transcripción inversa, cuantitativa y en tiempo real (qPCR).

10 La Figura 4 es un gráfico que muestra una comparación de la expresión génica de células RPE fetales y células RPE derivadas de células madre embrionarias humanas mediante PCR con transcripción inversa, cuantitativa y en tiempo real (qPCR).

La Figura 5 es un gráfico que muestra una comparación de la expresión génica de células RPE maduras y células hES mediante PCR con transcripción inversa, cuantitativa y en tiempo real (qPCR).

15 La Figura 6 es una fotomicrografía que muestra un análisis de transferencia de Western de marcadores específicos de hES y específicos de RPE. Las células RPE derivadas de células madre embrionarias (carril 1) derivadas de células hES (carril 2) no expresaron las proteínas específicas de hES Oct-4, Nanog, y Rex-1. Sin embargo, las células RPE derivadas de células madre embrionarias expresan proteínas específicas de RPE, incluidas RPE65, CRALBP, PEDF, Bestrofina, PAX6, y Otx2. Se usó actina como control de carga de proteínas.

20 La Figura 7 es un gráfico que muestra una representación del análisis de los componentes principales de expresiones génicas con micromatrices. El Componente 1, que representa un 69% de la variabilidad, representa el tipo celular, mientras el Componente 2 representa la línea celular (es decir, la variabilidad genética). Una dispersión casi lineal de los perfiles de expresión génica caracteriza la ontogenia del desarrollo de las hRPE derivadas de las células hES.

Descripción detallada de la invención

25 Para que la invención descrita en el presente documento se pueda comprender completamente, se expone la siguiente descripción detallada. Se describen con detalle diversas realizaciones de la invención, y se pueden ilustrar adicionalmente mediante los ejemplos proporcionados.

30 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que los que entiende normalmente alguien de experiencia habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la invención o en el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos, y no pretenden ser limitantes.

Para definir adicionalmente la invención, se proporcionan los siguientes términos y definiciones en la presente memoria.

35 Tal como se usa en la descripción en la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones siguientes, el significado de "un", "uno/una", y "el/la" incluyen la referencia plural, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. Además, tal como se usa en la descripción en la presente memoria, el significado de "en" incluye "en" y "sobre", a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

40 A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender", o las variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un número entero o grupos de números enteros indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

45 "Embrión" o "embrionario" significa una masa de células en desarrollo que no se ha implantado en la membrana uterina de un hospedador materno. Una "célula embrionaria" es una célula aislada de o contenida en un embrión. Esto también incluye los blastómeros, obtenidos en forma de blastómeros tempranos como en la etapa de dos células, y los blastómeros agregados.

50 La expresión "células madre embrionarias" se refiere a las células derivadas de un embrión. De manera más específica, se refiere a células no humanas aisladas de la masa celular interna de los blastocistos o de las mórulas, y que se han sometido a pases en serie en forma de líneas celulares. La expresión también incluye células aisladas de uno o más blastómeros de un embrión, preferiblemente y en el caso de un embrión humano sin destruir el resto del embrión. La expresión también incluye células madre embrionarias no humanas producidas mediante transferencia nuclear de células somáticas, incluso cuando se usan células no embrionarias en el proceso.

La expresión "células madre embrionarias humanas" (células hES) se usa en la presente memoria como se usa en la técnica. Las células madre embrionarias humanas se pueden identificar basándose en (i) la capacidad de diferenciarse

en células de las tres capas germinales, (ii) la expresión de al menos Oct-4 y fosfatasa alcalina, y (iii) la capacidad de producir teratomas cuando se trasplantan en animales inmunodeprimidos.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "células madre pluripotentes" incluye las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas. Las células madre pluripotentes se definen funcionalmente como células madre que: (a) son capaces de inducir teratomas cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes (SCID); (b) son capaces de diferenciarse en los tipos de células de las tres capas germinales (p.ej., pueden diferenciarse en tipos de células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas); y (c) expresan uno o más marcadores de células madre embrionarias (p.ej., expresan Oct 4, fosfatasa alcalina, antígeno superficial SSEA-3, antígeno superficial SSEA-4, nanog, TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2, REX1, etc.). Las células madre pluripotentes ejemplares incluyen las células madre pluripotentes inducidas (células iPS) generadas reprogramando una célula somática expresando o induciendo la expresión de una combinación de factores (denominados en la presente memoria factores de reprogramación). Las células iPS se pueden generar mediante el uso de células somáticas fetales, posnatales, neonatales, juveniles o adultas. En ciertas realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar las células somáticas hasta células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct4 (a veces denominado Oct 3/4), Sox2, c-Myc, y Klf4. En otras realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar las células somáticas hasta células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct 4, Sox2, Nanog, y Lin28. En otras realizaciones, las células somáticas se reprograman expresando al menos 2 factores de reprogramación, al menos tres factores de reprogramación, o cuatro factores de reprogramación. En otras realizaciones, se identifican los factores de reprogramación adicionales y se usan solos o en combinación con uno o más factores de reprogramación conocidos para reprogramar una célula somática hasta una célula madre pluripotente.

Las expresiones "célula RPE" y "célula RPE diferenciada" y "célula RPE derivada de ES" y "célula RPE humana" se usan de manera intercambiable a lo largo de la presente memoria para referirse a una célula RPE diferenciada a partir de una célula madre embrionaria humana mediante el uso de un método de la invención. La expresión se usa de manera genérica para referirse a las células RPE diferenciadas, independientemente del nivel de madurez de las células, y así puede abarcar las células RPE de diversos niveles de madurez. Las células RPE diferenciadas se pueden reconocer visualmente por su morfología de tipo empedrado y el aspecto inicial del pigmento. Las células RPE diferenciadas también se pueden identificar molecularmente basándose en la carencia sustancial de expresión de marcadores de células madre embrionarias tales como Oct-4 y nanog, así como basándose en la expresión de marcadores de RPE tales como RPE-65, PEDF, CRALBP, y bestrofina. Obsérvese que cuando se hace referencia a otras células similares a RPE, en general se hace referencia específicamente como células adultas, fetales o APRE19. Así, a menos que se especifique de otra manera, las células RPE, tal como se usan en la presente memoria, se refieren a células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas.

Las expresiones "célula RPE madura" y "célula RPE diferenciada madura" se usan de manera intercambiable a lo largo de la presente memoria para referirse a los cambios que se dan tras la diferenciación inicial de las células RPE. De manera específica, aunque las células RPE se pueden reconocer, en parte, basándose en el aspecto inicial del pigmento, tras la diferenciación las células RPE maduras se pueden reconocer basándose en la pigmentación incrementada. La pigmentación post-diferenciación no es indicativa de un cambio en el estado de RPE de las células (p.ej., las células todavía son células RPE diferenciadas). Más bien, los cambios del pigmento post-diferenciación corresponden a la densidad a la que las células RPE se cultivan y se mantienen. Así, las células RPE maduras tienen una pigmentación incrementada que se acumula tras la diferenciación inicial. Las células RPE maduras están más pigmentadas que las células RPE, aunque las células RPE tienen cierto nivel de pigmentación. Las células RPE maduras se pueden subcultivar hasta una densidad inferior, de forma que la pigmentación disminuya. En este contexto, las células RPE maduras se pueden cultivar para producir células RPE. Tales células RPE todavía son células RPE diferenciadas que expresan los marcadores de diferenciación de RPE. Así, en contraste con el aspecto inicial de la pigmentación que se da cuando las células RPE comienzan a diferenciarse, los cambios de pigmentación post-diferenciación son fenomenológicos, y no reflejan la desdiferenciación de las células desde un destino de RPE. Obsérvese que los cambios de pigmentación post-diferenciación también se correlacionan con los cambios en la expresión de pax-2. Obsérvese que cuando se hace referencia a otras células similares a RPE, en general se hace referencia específicamente como células adultas, fetales o APRE19. Así, a menos que se especifique de otra manera, las células RPE, tal como se usan en la presente memoria, se refieren a células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas.

"APRE-19" se refiere a las células de una línea celular RPE humana previamente derivada. Las células APRE-19 surgen espontáneamente, y no se obtienen a partir de embriones humanos o células madre embrionarias.

Resumen

Esta invención proporciona preparaciones y composiciones que comprenden células epiteliales pigmentadas retinianas (RPE) humanas derivadas de células madre embrionarias humanas o de otras células madre pluripotentes humanas. Las células RPE están pigmentadas, al menos en cierto grado. Las células RPE no expresan (en cualquier nivel apreciable) los marcadores de células madre embrionarias Oct-4, nanog, o Rex-1. De manera específica, la expresión de estos genes de células ES es aproximadamente 100-1000 veces menor en las células RPE que en las células ES, cuando se analiza mediante RT-PCR cuantitativa. Las células RPE expresan, tanto a nivel de mRNA como de proteínas, uno o más de lo siguiente: RPE65, CRALBP, PEDF, Bestrofina, MitF y/o Otx2. En algunas otras

realizaciones, las células RPE expresan, tanto a nivel de mRNA como de proteínas, uno o más de Pax-2, Pax-6, MitF, y tirosinasa. En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células RPE son células RPE maduras con una pigmentación incrementada en comparación con las células RPE diferenciadas.

5 La invención proporciona células RPE humanas, cultivos celulares que comprenden una población sustancialmente purificada de células RPE humanas, preparaciones farmacéuticas que comprenden células epiteliales pigmentadas retinianas humanas y preparaciones criopreservadas de las células RPE humanas. En ciertas realizaciones, la invención proporciona el uso de las células RPE humanas en la fabricación de un medicamento para tratar una afección en un paciente que lo necesita. De manera alternativa, la invención proporciona el uso de los cultivos celulares en la fabricación de un medicamento para tratar una afección en un paciente que lo necesita. La invención también
10 proporciona el uso de las preparaciones farmacéuticas en la fabricación de un medicamento para tratar una afección en un paciente que lo necesita. En cualquiera de lo anterior, las preparaciones que comprenden células RPE pueden incluir células RPE diferenciadas de niveles variables de madurez, o pueden estar sustancialmente puras con respecto a las células RPE diferenciadas de un nivel particular de madurez. En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las preparaciones que comprenden células RPE se preparan de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF) (p.ej., las preparaciones cumplen las BPF). En ciertas realizaciones, las preparaciones que comprenden células RPE
15 están sustancialmente exentas de contaminación o infección bacteriana, viral, o fúngica.

Las células RPE humanas (derivadas de células madre pluripotentes) se pueden identificar y caracterizar basándose en sus propiedades estructurales. De manera específica, y en ciertas realizaciones, estas células son únicas en cuanto a que se pueden identificar o caracterizar basándose en la expresión o ausencia de expresión (como se determina a
20 nivel de genes o a nivel de proteínas) de uno o más marcadores. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las células RPE derivadas de ES diferenciadas se pueden identificar o caracterizar basándose en la expresión de uno o más (p.ej., las células se pueden caracterizar basándose en la expresión de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis) de los siguientes marcadores: RPE-65, Bestrofina, PEDF, CRALBP, Otx2, y Mit-F. Además o de manera alternativa, las células RPE derivadas de ES se pueden identificar o caracterizar basándose en la expresión de PAX2, tirosinasa, y/o PAX6. Además o de manera alternativa, las células hRPE se pueden identificar o caracterizar basándose en la expresión o ausencia de expresión (como se determina a nivel de genes o a nivel de proteínas) de uno o más (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de 10) marcadores analizados en cualquiera de las Tablas 1-3.

Además o de manera alternativa, las células RPE derivadas de ES también se pueden identificar y caracterizar basándose en el grado de pigmentación de la célula. Las células hRPE diferenciadas que se dividen rápidamente están ligeramente pigmentadas. Sin embargo, cuando la densidad celular alcanza la capacidad máxima, o cuando las células hRPE maduran de manera específica, las hRPE toman su forma hexagonal fenotípica característica e incrementan el nivel de pigmentación acumulando melanina y lipofuscina. Como tal, la acumulación inicial de pigmentación sirve como indicador de la diferenciación de RPE, y la pigmentación incrementada asociada a la
30 densidad celular sirve como indicador de la madurez de RPE.

Las preparaciones que comprenden células RPE incluyen las preparaciones que son sustancialmente puras, con respecto a los tipos de células distintas de RPE, pero que contienen una mezcla de células RPE diferenciadas y células RPE diferenciadas maduras. Las preparaciones que comprenden células RPE también incluyen las preparaciones que están sustancialmente puras con respecto a los tipos de células distintas de RPE y con respecto a las células RPE con otros niveles de madurez.

Para cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención contempla que las células RPE (caracterizadas como se describió anteriormente) se pueden obtener de células madre pluripotentes humanas, por ejemplo células iPS y células madre embrionarias. En ciertas realizaciones, las células RPE se obtienen de células madre pluripotentes humanas mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

45 *Diferenciación de Células RPE*

Las células madre (ES) embrionarias se pueden mantener indefinidamente *in vitro* en un estado indiferenciado, y todavía son capaces de diferenciarse en prácticamente cualquier tipo de célula, lo que proporciona un suministro ilimitado de células rejuvenecidas e histocompatibles para la terapia de trasplantes. El problema del rechazo inmunitario se puede superar con la tecnología de transferencia nuclear y partenogenética. Así, las células madre embrionarias humanas (hES) son útiles para los estudios sobre la diferenciación de células humanas, y se pueden considerar como una fuente potencial para las terapias de trasplante. Hasta la fecha, se ha informado de la diferenciación de células ES humanas y de ratón en numerosos tipos de células (revisado por Smith, 2001) que incluyen los cardiomiocitos [Kehat et al. 2001, Mummery et al., 2003 Carpenter et al., 2002], neuronas y precursores neuronales (Reubinoff et al. 2000, Carpenter et al. 2001, Schuldiner et al., 2001), adipocitos (Bost et al., 2002, Aubert et al., 1999), células similares a hepatocitos (Rambhatla et al., 2003), células hematopoyéticas (Chadwick et al., 2003), ovocitos (Hubner et al., 2003), células similares a timocitos (Lin RY et al., 2003), células de los islotes pancreáticos (Kahan, 2003), y osteoblastos (Zur Nieden et al., 2003).

La presente invención proporciona la diferenciación de células ES humanas hasta una célula especializada en el linaje neuronal, el epitelio pigmentario retiniano (RPE). El RPE es una monocapa epitelial densamente pigmentada entre el

coroides y la retina neural. Sirve como parte de una barrera entre el torrente sanguíneo y la retina. Sus funciones incluyen la fagocitosis de los segmentos externos de los conos y bastones desprendidos, la absorción de la luz dispersa, el metabolismo de la vitamina A, la regeneración de retinoides, y la reparación tisular (Grierson et al., 1994, Fisher y Reh, 2001, Marmorstein et al., 1998). El RPE se puede reconocer por su morfología celular de tipo empedrado de células pigmentadas negras. Además, hay varios marcadores conocidos de RPE, que incluyen la proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), una proteína citoplasmática que también se halla en las microvellosidades apicales (Bunt-Milam y Saari, 1983); RPE65, una proteína citoplasmática implicada en el metabolismo de retinoides (Ma et al., 2001, Redmond et al., 1998); bestrofina, el producto del gen de la distrofia macular viteliforme Best (VMD2, Marmorstein et al., 2000), y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), una proteína secretada de 48 kD con propiedades angiostáticas (Karakousis et al., 2001, Jablonski et al., 2000).

RPE desempeña un papel importante en el mantenimiento de los fotorreceptores, y diversas disfunciones del RPE *in vivo* están asociadas con varias dolencias con alteración de la visión, tales como desprendimiento de RPE, displasia, atrofia, retinopatía, retinosis pigmentaria, distrofia o degeneración macular, que incluye degeneración macular relacionada con la edad, que pueden dar como resultado el daño de los fotorreceptores y ceguera. Debido a sus capacidades de cicatrización de heridas, el RPE se ha estudiado exhaustivamente en la aplicación a la terapia de trasplantes. Se ha demostrado en varios modelos animales y en seres humanos (Gouras et al., 2002, Stanga et al., 2002, Binder et al., 2002, Schraermeyer et al., 2001, revisado por Lund et al., 2001) que el trasplante de RPE tiene una buena capacidad de restablecimiento de la visión. Recientemente, se propuso otro nicho prospectivo para el trasplante de RPE e incluso alcanzó la fase de ensayos clínicos: debido a que estas células secretan dopamina, se podrían usar para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Subramanian, 2001). Sin embargo, incluso en un ojo inmuno-privilegiado, existe un problema de rechazo del injerto, lo que dificulta el progreso de esta aproximación si se usa un trasplante alogénico. El otro problema es la dependencia del tejido fetal, ya que el RPE adulto tiene una capacidad proliferativa muy baja. La presente invención disminuye la probabilidad de que se dé el rechazo del injerto, y elimina la dependencia del uso de tejido fetal.

Como fuente de tejidos inmunocompatibles, las células hES son prometedoras para la terapia de trasplantes, ya que el problema del rechazo inmunitario se puede superar con la tecnología de transferencia nuclear. El uso de los nuevos derivados de diferenciación de células ES humanas, que incluyen las células similares al epitelio pigmentario retiniano y las células precursoras neuronales, y el uso del sistema de diferenciación para producir las mismas ofrece un suministro potencial atractivo de RPE y de células precursoras neuronales para trasplante.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un método mejorado para generar células RPE derivadas de células madre embrionarias humanas, que se pueden purificar y/o aislar. Tales células son útiles para la terapia de enfermedades con degeneración retiniana, tales como, por ejemplo, retinosis pigmentaria, degeneración macular y otros trastornos oculares. Los tipos de células que se pueden producir mediante el uso de esta invención incluyen, pero sin limitación, células RPE y células progenitoras de RPE. Las células que también se pueden producir incluyen las células epiteliales pigmentadas del iris (IPE) y otras células neuronales asociadas con la visión, tales como neuronas internunciales (p.ej. neuronas "relé" de la capa nuclear interna (INL) y células amacrinas. Además, se pueden producir células retinianas, bastones, conos y células corneales. En otra realización de la presente invención, también se pueden producir las células que proporcionan la vasculatura del ojo.

Las células madre embrionarias humanas son el material inicial de este método. Las células madre embrionarias se pueden cultivar de cualquier manera conocida en la técnica, tal como en presencia o ausencia de células de soporte.

En la primera etapa de este método para producir células RPE, las células madre embrionarias humanas se cultivan en forma de cuerpos embrioides. Las células madre embrionarias se pueden sedimentar, resuspender en un medio de cultivo, y colocar en placas de cultivo (p.ej., placas de cultivo de baja adhesión). Las células se pueden cultivar en cualquier medio que sea suficiente para el crecimiento de las células a una densidad elevada, tal como, un medio disponible comercialmente para el cultivo de partículas virales, células bacterianas, de insecto, o animales. En ciertas realizaciones, se usa un medio rico en nutrientes, bajo en proteínas (p.ej., medio MDBK-GM, que contiene alrededor de 150 mg/mL (0,015%) de proteína animal). Cuando se usa un medio bajo en proteínas, el medio contiene, por ejemplo, una cantidad menor o igual a alrededor del 5%, 4%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,016%, 0,015%, o incluso menor o igual al 0,010% de proteína animal. Obsérvese que la referencia al porcentaje de proteína presente en el medio bajo en proteína se refiere al medio solo, y no tiene en cuenta la proteína presente, por ejemplo, en el suplemento B-27. Así, se entiende que cuando las células se cultivan en un medio bajo en proteína y con el suplemento B-27, el porcentaje de proteína presente en el medio puede ser mayor.

En ciertas realizaciones, se usa un medio rico en nutrientes, sin proteínas (p.ej., medio MDBK-MM). Otros ejemplos de medios de cultivo incluyen, por ejemplo, OptiPro SFM, VP-SFM, y EGM-2. Tales medios pueden incluir componentes nutritivos tales como insulina, transferrina, selenito sódico, glutamina, albúmina, etanolamina, fetuina, peptona, material de lipoproteínas purificadas, vitamina A, vitamina C, y vitamina E.

En ciertas realizaciones, los cultivos celulares en un medio bajo en proteínas o sin proteínas se suplementan con un suplemento B-27 sin suero (Brewer et al., Journal of Neuroscience Research 35:567-576 (1993)). Los componentes nutritivos del suplemento B27 pueden incluir biotina, L-carnitina, corticosterona, etanolamina, D+-galactosa, glutatión reducido, ácido linoleico, ácido linoléico, progesterona, putrescina, acetato de retinilo, selenio, triyodo-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 un medio sin proteínas suplementado con B-27, sin proteínas se refiere al medio antes de la adición de B-27.

5 El medio también puede contener suplementos tales como heparina, hidrocortisona, ácido ascórbico, suero (tal como, por ejemplo, suero bovino fetal), o una matriz de crecimiento (tal como, por ejemplo, matriz extracelular de epitelio córneo bovino, matrigel (BD biosciences), o gelatina).

10 En este método de la presente invención, las células RPE se diferencian a partir de los cuerpos embrioides. El aislamiento de las células RPE a partir de los EBs permite la expansión de las células RPE en un cultivo enriquecido *in vitro*. Para las células humanas, las células RPE se pueden obtener a partir de EBs cultivados durante menos de 90 días. En ciertas realizaciones de la presente invención, las células RPE surgen de EBs humanos cultivados durante 7-14 días. En otras realizaciones, las células RPE surgen de EBs humanos cultivados durante 14-28 días. En otra realización, las células RPE se identifican y se pueden aislar a partir de EBs humanos cultivados durante 28-45 días. En otra realización, las células RPE surgen de EBs humanos cultivados durante 45-90 días. El medio usado para cultivar las células madre embrionarias, los cuerpos embrioides, y las células RPE se puede eliminar y/o sustituir con medios iguales o diferentes en cualquier intervalo. Por ejemplo, el medio se puede eliminar y/o sustituir tras 0-7 días, 7-10 días, 10-14 días, 14-28 días, o 28-90 días. En ciertas realizaciones, el medio se sustituye al menos diariamente, cada dos días, o al menos cada tres días.

20 En ciertas realizaciones, las células RPE que se diferencian a partir de los EBs se lavan y se disocian (p.ej., mediante Tripsina/EDTA, colagenasa B, colagenasa IV, o dispasa). En ciertas realizaciones, se usa una disolución no enzimática para disociar las células, tal como una disolución que contiene un nivel elevado de EDTA tal como, por ejemplo, tampón de disociación celular basado en disolución de Hanks.

25 Las células RPE se seleccionan de las células disociadas y se cultivan por separado para producir un cultivo sustancialmente purificado de células RPE. Las células RPE se seleccionan basándose en las características asociadas con las células RPE. Por ejemplo, las células RPE se pueden reconocer por la morfología celular de tipo empedrado y la pigmentación. Además, hay varios marcadores conocidos de RPE, que incluyen la proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), una proteína citoplasmática que también se halla en las microvellosidades apicales (Bunt-Milam y Saari, 1983); RPE65, una proteína citoplasmática implicada en el metabolismo de retinoides (Ma et al., 2001, Redmond et al., 1998); bestrofina, el producto del gen de la distrofia macular viteliforme Best (VMD2, Marmorstein et al., 2000), y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), una proteína secretada de 48 kD con propiedades angiostáticas (Karakousis et al., 2001, Jablonski et al., 2000). De manera alternativa, las células RPE se pueden seleccionar basándose en la función celular, tal como mediante la fagocitosis de los segmentos externos de los conos y bastones desprendidos, la absorción de la luz dispersa, el metabolismo de la vitamina A, la regeneración de retinoides, y la reparación tisular (Grierson et al., 1994, Fisher y Reh, 2001, Marmorstein et al., 1998). La evaluación también se puede llevar a cabo mediante el uso de ensayos conductuales, angiografía fluorescente, histología, conductividad de uniones estrechas, o evaluación mediante el uso de microscopía electrónica. Otra realización de la presente invención es un método de identificación de células RPE comparando los transcritos de ARN mensajero de tales células con las células obtenidas *in vivo*. En ciertas realizaciones, se toma una alícuota de células en diversos intervalos durante la diferenciación de las células madre embrionarias hasta células RPE, y se ensaya la expresión de cualquiera de los marcadores descritos anteriormente. Estas características distinguen a las células RPE diferenciadas.

40 Los medios de cultivo de células RPE se pueden suplementar con uno o más factores de crecimiento o agentes. Los factores de crecimiento que se pueden usar incluyen, por ejemplo, EGF, FGF, VEGF, y factor de crecimiento similar a insulina recombinante. Otros factores de crecimiento que se pueden usar en la presente invención incluyen 6Cquina (recombinante), activina A, AlfaA-interferón, alfa-interferón, anfirregulina, angiogenina, factor de crecimiento de células endoteliales B, beta celulina, B-interferón, factor neurotrófico derivado de cerebro, C10 (recombinante), cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas 1, suplemento de crecimiento de células endoteliales, eotaxina, factor de crecimiento epidérmico, péptido activante de neutrófilos epiteliales 78, eritropoyetina, receptor de estrógeno alfa, receptor de estrógeno B, factor de crecimiento de fibroblastos (ácido/básico, estabilizado con heparina, recombinante), ligando FLT-3/FLK-2 (ligando FLT-3), gamma-interferón, factor neurotrófico derivado de la glía, Gly-His-Lys, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, GRO-alfa/MGSA, GRO-B, GRO-gamma, HCC-1, factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico con unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, herregulina alfa (dominio EGF), proteína de unión al factor de crecimiento de insulina 1, complejo de proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina 1/IGF-1, factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento similar a insulina II, factor de crecimiento nervioso 2.5S (NGF), 7S-NGF, proteína inflamatoria de macrófagos 1B, proteína inflamatoria de macrófagos 2, proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 3B, proteína quimiotáctica de monocitos 1, proteína quimiotáctica de monocitos 2, proteína quimiotáctica de monocitos 3, neurotrofina 3, neurotrofina 4, NGF-B (recombinante humano o de rata), oncostatina M (recombinante humana o de ratón), extracto de hipófisis, factor de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, pleiotrofina, rantes, factor de células madre, factor derivado de células estromales 1B/factor estimulante del crecimiento de células pre-B, trombopoyetina, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante B1, factor de crecimiento transformante B2, factor de

crecimiento transformante B3, factor de crecimiento transformante B5, factor de necrosis tumoral (alfa y B), y factor de crecimiento endotelial vascular. Los agentes que se pueden usar según la presente invención incluyen citocinas tales como interferón-alfa A, interferón-alfa A/D, interferón-beta, interferón-gamma, proteína inducible por interferón-gamma 10, 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 queratinocitos, leptina, factor inhibitorio de leucemia, factor estimulante de colonias de macrófagos, y proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa.

Los agentes según la invención también incluyen hormonas y antagonistas de hormonas, tales como 17B-estradiol, hormona adrenocorticotrópica, adrenomedulina, hormona estimulante de melanocitos alfa, gonadotropina coriónica, globulina de unión a corticosteroides, corticosterona, dexametasona, estriol, hormona estimulante del folículo, gastrina 1, glucagón, gonadotropina, hidrocortisona, insulina, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina, L-3,3',5'-triyodotironina, L-3,3',5'-triyodotironina, leptina, hormona luteinizante, L-tiroxina, melatonina, MZ-4, oxitocina, hormona paratiroidea, PEC-60, hormona de crecimiento hipofisario, progesterona, prolactina, secretina, globulina de unión a hormonas sexuales, hormona estimulante del tiroides, factor de liberación de tiotropina, globulina de unión a tiroxina, y vasopresina.

Además, los agentes según la invención incluyen componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, fragmentos proteolíticos de fibronectina, laminina, trombospondina, agregcano, y sindecano.

Los agentes según la invención también incluyen anticuerpos hacia diversos factores, tales como anticuerpo anti-receptor de lipoproteínas de baja densidad, anti-receptor de progesterona, anticuerpo interno, anticuerpo anti-cadena del receptor de interferón alfa 2, anticuerpo anti-receptor de quimiocina c-c 1, anticuerpo anti-CD 118, anticuerpo anti-CD 119, anticuerpo anti-factor estimulante de colonias 1, anticuerpo anti-receptor CSF-1/c-fins, anticuerpo anti-factor de crecimiento epidérmico (AB-3), anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento epidérmico, anti-receptor de factor de crecimiento epidérmico, anticuerpo fosfo-específico, anticuerpo anti-factor de crecimiento epidérmico (AB-1), anticuerpo anti-receptor de eritropoyetina, anticuerpo anti-receptor de estrógeno, anti-receptor de estrógeno, anticuerpo C-terminal, anticuerpo anti-receptor de estrógeno B, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de fibroblastos, anti-factor de crecimiento de fibroblastos, anticuerpo básico, anticuerpo anti-cadena de receptor de interferón gamma, anticuerpo anti-interferón gamma recombinante humano, anticuerpo anti-GFR alfa-1 C-terminal, anticuerpo anti-GFR alfa-2 C-terminal, anticuerpo anti-factor estimulante de colonias de granulocitos (AB-1), anticuerpo anti-receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos, anticuerpo anti-receptor de insulina, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento similar a insulina 1, anticuerpo anti-interleucina 6 recombinante humana, anticuerpo anti-interleucina 1 recombinante humana, anticuerpo anti-interleucina 2 recombinante humana, anticuerpo anti-leptina recombinante de ratón, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento nervioso, anti-p60, anticuerpo de pollo, anticuerpo anti-proteína similar a hormona paratiroidea, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas B, anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa, anticuerpo anti-receptor de progesterona, anticuerpo anti-receptor de ácido retinoico alfa, anticuerpo anti-receptor nuclear de hormona tiroidea, anticuerpo anti-receptor nuclear de hormona tiroidea alfa 1/Bi, anticuerpo anti-receptor de transferrina/CD71, anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante alfa, anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante B3, anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa, y anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular.

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. Los factores, agentes, y suplementos se pueden añadir a los medios inmediatamente o en cualquier momento tras el cultivo celular.

En ciertas realizaciones, las células RPE se cultivan adicionalmente para producir un cultivo de células RPE maduras. El medio usado para cultivar las células RPE puede ser cualquier medio adecuado para el crecimiento de un cultivo celular de alta densidad, tal como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, las células descritas en la presente memoria se pueden cultivar en VP-SFM, EGM-2, y MDBK-MM.

Más adelante se proporciona una descripción más detallada de ciertas combinaciones operativas de las características de la invención descritas anteriormente .

En ciertas realizaciones, se proporciona un cultivo previamente derivado de células madre embrionarias humanas. Las células ES humanas se cultivan en forma de un cultivo en suspensión para producir cuerpos embrioides (EBs). Los cuerpos embrioides se cultivan en suspensión durante aproximadamente 7-14 días. Sin embargo, en ciertas realizaciones, los EBs se pueden cultivar en suspensión durante menos de 7 días (menos de 7, 6, 5, 4, 3, 2, o menos de 1 día) o más de 14 días. Los EBs se pueden cultivar en un medio opcionalmente suplementado con un suplemento B-27.

Después de cultivar los EBs en un cultivo en suspensión, los EBs se pueden transferir para producir un cultivo adherente. Por ejemplo, los EBs se pueden colocar en un medio en placas revestidas de gelatina. Cuando se cultivan en forma de un cultivo adherente, los EBs se pueden cultivar en el mismo tipo de medios que cuando se cultivan en suspensión. En ciertas realizaciones, los medios no se suplementan con el suplemento B-27 cuando las células se cultivan en forma de cultivo adherente. En otras realizaciones, el medio se suplementa con B-27 inicialmente (p.ej.,

durante un periodo menor o igual a alrededor de 7 días), pero posteriormente se cultiva sin B-27 durante el resto del periodo en forma de un cultivo adherente. Los EBs se pueden cultivar en forma de un cultivo adherente durante aproximadamente 14-28 días. Sin embargo, en ciertas realizaciones, los EBs se pueden cultivar durante menos de 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 28 días.

5 Las células RPE comienzan a diferenciarse de las células del cultivo adherente de EBs. Las células RPE se pueden reconocer visualmente basándose en su morfología de tipo empedrado y el aspecto inicial de la pigmentación. A medida que las células RPE continúan diferenciándose, se pueden observar agrupamientos de células RPE.

Para enriquecerlos en células RPE y para establecer cultivos sustancialmente purificados de células RPE, las células RPE se disocian entre sí y de las células distintas de RPE mediante el uso de métodos mecánicos y/o químicos. Después se puede transferir una suspensión de células RPE a un medio nuevo y un recipiente de cultivo nuevo para proporcionar una población enriquecida de células RPE.

10 Los cultivos enriquecidos de células RPE se pueden cultivar en un medio adecuado, por ejemplo, medio EGM-2. Esto, o un medio funcionalmente equivalente o similar, se puede suplementar con uno o más factores de crecimiento o agentes (p.ej., bFGF, heparina, hidrocortisona, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento similar a insulina recombinante, ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico humano).

15 Para las realizaciones en las que las células RPE se maduran, las células RPE se pueden cultivar adicionalmente, por ejemplo, en medio MDBK-MM hasta que se obtiene el nivel deseado de maduración. Esto se puede determinar monitorizando el incremento del nivel de pigmentación durante la maduración. Como alternativa al medio MDBK-MM, se puede usar un medio funcionalmente equivalente o similar. Independientemente del medio particular usado para madurar las células RPE, el medio se puede suplementar opcionalmente con uno o más factores de crecimiento o agentes.

20 El cultivo de células RPE, y por tanto las preparaciones de células RPE preparadas a partir de estos cultivos, pueden ser células RPE sustancialmente puras que contienen menos del 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o menos del 1% de células distintas de RPE. En ciertas realizaciones, los cultivos sustancialmente purificados (con respecto a las células distintas de RPE) contienen células RPE de niveles variables de madurez. En otras realizaciones, los cultivos están sustancialmente puros tanto con respecto a las células distintas de RPE como con respecto a las células RPE de un nivel variable de madurez.

25 Para cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención contempla que las células RPE (caracterizadas como se describió anteriormente) se pueden obtener de células madre pluripotentes humanas, por ejemplo células iPS y células madre embrionarias. En ciertas realizaciones, las células RPE se obtienen de células madre pluripotentes humanas mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

Preparaciones de Células RPE Derivadas de Células Madre Pluripotentes Diferenciadas

30 La presente invención proporciona preparaciones de células RPE derivadas de células madre pluripotentes humanas. En ciertas realizaciones, la preparación es una preparación de células RPE derivadas de células madre embrionarias humanas. En ciertas realizaciones, la preparación es una preparación de células RPE derivadas de células iPS. En ciertas realizaciones, las preparaciones son preparaciones sustancialmente purificadas (con respecto a las células distintas de RPE) que comprenden células RPE derivadas de ES diferenciadas. Sustancialmente purificadas, con respecto a las células distintas de RPE, significa que la preparación comprende al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o incluso más del 99% de células RPE. En otras palabras, la preparación sustancialmente purificada de células RPE contiene menos del 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o menos del 1% de tipos de células distintas de RPE. En ciertas realizaciones, las células RPE en tal preparación sustancialmente purificada contienen células RPE de niveles variables de madurez/pigmentación. En otras realizaciones, las células RPE están sustancialmente puras, tanto con respecto a las células distintas de RPE como con respecto a las células RPE de otros niveles de madurez. En ciertas realizaciones, las preparaciones están sustancialmente purificadas, con respecto a las células distintas de RPE, y enriquecidas en células RPE maduras. Enriquecidas en células RPE maduras significa que al menos un 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o incluso más del 99% de las células RPE son células RPE maduras. En otras realizaciones, las preparaciones están sustancialmente purificadas, con respecto a las células distintas de RPE, y enriquecidas en células RPE diferenciadas en vez de células RPE maduras. Enriquecidas significa que al menos un 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o incluso más del 99% de las células RPE son células RPE diferenciadas en vez de células RPE maduras. En ciertas realizaciones, las células RPE maduras se distinguen de las células RPE por uno o más de: el nivel de pigmentación, el nivel de expresión de Pax-2, Pax-6, y/o tirosinasa. En ciertas realizaciones, las preparaciones incluyen al menos 1×10^3 células RPE, 5×10^3 células RPE, 1×10^4 células RPE, 5×10^4 células RPE, 1×10^5 células RPE, 2×10^5 células RPE, 3×10^5 células RPE, 4×10^5 células RPE, 5×10^5 células RPE, 6×10^5 células RPE, 7×10^5 células RPE, 8×10^5 células RPE, 9×10^5 células RPE, 1×10^6 células RPE, 5×10^6 células RPE, 6×10^6 células RPE, 7×10^6 células RPE, 8×10^6 células RPE, 9×10^6 células RPE, 1×10^7 células RPE, 5×10^7 células RPE, 1×10^8 células RPE, 1×10^9 células RPE, o incluso más de 1×10^9 células RPE.

En ciertas realizaciones, las células RPE derivadas de ES no expresan marcadores de células ES. Por ejemplo, la expresión de los genes de células ES Oct-4, nanog, y/o Rex-1 es aproximadamente 100-1000 veces inferior en las células RPE que en las células ES, tal como se determina mediante RT-PCR cuantitativa. Así, en comparación con las células ES, las células RPE son sustancialmente negativas para la expresión génica de Oct-4, nanog, y/o Rex-1.

5 En ciertas realizaciones, las células RPE derivadas de ES expresan, a nivel de mRNA y de proteínas, uno o más de lo siguiente: RPE65, bestrofina, PEDF, CRALBP, Otx2, y MitF. En ciertas realizaciones, las células RPE expresan dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o seis de estos marcadores. En ciertas realizaciones, las células RPE expresan adicionalmente o alternativamente, a nivel de mRNA y de proteínas, uno o más (1, 2, o 3) de lo siguiente: pax-2, pax6, y tirosinasa. En otras realizaciones, el nivel de madurez de las células RPE se determina mediante la
10 expresión de uno o más (1, 2, o 3) de pax-2, pax6, y tirosinasa.

En ciertas realizaciones, las células RPE derivadas de ES expresan, a nivel de mRNA y/o de proteínas, uno o más (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9) de los genes específicos de RPE enumerados en la Tabla 1 (pax-6, pax-2, RPE65, PEDF, CRALBP, bestrofina, mitF, Otx-2, y tirosinasa, así como uno o más (1, 2, 3, o 4) de los genes de la neuroretina enumerados en la Tabla 1 (CHX10, NCAM, nestina, beta-tubulina). Sin embargo, las células RPE no expresan
15 sustancialmente los genes específicos de células ES Oct-4, nanog, y/o Rex-1 (p.ej., la expresión de los genes específicos de células ES es 100-1000 veces menor en las células RPE, tal como se determina mediante RT-PCR cuantitativa).

En ciertas realizaciones, las células RPE derivadas de ES expresan, a nivel de mRNA y/o de proteínas, uno o más (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,
20 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, o más de 48) de los genes enumerados en la Tabla 2, y la expresión de uno o más genes está incrementada en las células RPE respecto del nivel de expresión (si existe) en las células ES humanas. De manera alternativa o adicional, las células RPE derivadas de ES expresan, a nivel de mRNA y/o de proteínas, uno o más (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o más de 25) de los genes enumerados en la Tabla 3, pero la expresión de uno o más genes está disminuida (lo que incluye disminuida
25 a niveles prácticamente indetectables) en las células RPE respecto del nivel de expresión en las células ES humanas.

En ciertas realizaciones, la preparación sustancialmente purificada de células RPE comprende células RPE de niveles variables de madurez (p.ej., células RPE diferenciadas y células RPE diferenciadas maduras). En tales casos, puede haber variabilidad en la preparación con respecto a la expresión de los marcadores indicativos de la pigmentación. Por ejemplo, aunque tales células RPE pueden tener sustancialmente la misma expresión de RPE65, PEDF, CRALBP,
30 y bestrofina. Las células RPE pueden variar, dependiendo del nivel de madurez, con respecto a la expresión de uno o más de pax-2, pax-6, mitF, y/o tirosinasa.

En ciertas realizaciones, las células RPE derivadas de ES son células RPE diferenciadas de manera terminal estables que no se des-diferencian hasta un tipo de célula distinta de RPE. En ciertas realizaciones, las células RPE derivadas de ES son células RPE funcionales.

35 En ciertas realizaciones, las células RPE derivadas de ES se caracterizan por la capacidad de integrarse en la retina tras el trasplante o administración córnea, sub-retiniana, o de otro tipo en un animal.

Las preparaciones se producen de acuerdo con los estándares de BPF. Como tales, en ciertas realizaciones, las preparaciones son preparaciones que cumplen las BPF. En otras realizaciones, las preparaciones están sustancialmente exentas de infección y contaminación viral, bacteriana, y/o fúngica.

40 En ciertas realizaciones, las preparaciones se crioconservan para el almacenamiento y uso futuro. Así, la invención proporciona preparaciones crioconservadas que comprenden células RPE sustancialmente purificadas. Las preparaciones crioconservadas se formulan en excipientes adecuados para mantener la viabilidad celular durante y después de la crioconservación. En ciertas realizaciones, la preparación crioconservada comprende al menos 1×10^3 células RPE, 5×10^3 células RPE, 1×10^4 células RPE, 5×10^4 células RPE, 1×10^5 células RPE, 2×10^5 células RPE, 3×10^5
45 células RPE, 4×10^5 células RPE, 5×10^5 células RPE, 6×10^5 células RPE, 7×10^5 células RPE, 8×10^5 células RPE, 9×10^5 células RPE, 1×10^6 células RPE, 5×10^6 células RPE, 6×10^6 células RPE, 7×10^6 células RPE, 8×10^6 células RPE, 9×10^6 células RPE, 1×10^7 células RPE, 5×10^7 células RPE, 1×10^8 células RPE, 1×10^9 células RPE, o incluso más de 1×10^9 células RPE. Las preparaciones crioconservadas pueden tener los mismos niveles de pureza con respecto a las células distintas de RPE y/o con respecto a las células RPE de niveles variables de madurez, como se detalló
50 anteriormente. En ciertas realizaciones, al menos un 65% de las células RPE de una preparación crioconservada de células RPE conservan la viabilidad tras la descongelación. En otras realizaciones, al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 81%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más del 99% de las células RPE de una preparación crioconservada de células RPE conservan la viabilidad tras la descongelación.

55 Las células RPE proporcionadas en la presente memoria son células humanas. Obsérvese, sin embargo, que las células humanas se pueden usar en pacientes humanos, así como en modelos animales o pacientes animales. Por ejemplo, las células humanas se pueden ensayar en modelos de rata, perro, o de primate no humano de degeneración retiniana. Además, las células humanas se pueden usar terapéuticamente para tratar a animales que lo necesitan, tal como en un ámbito de medicina veterinaria.

Las preparaciones se pueden formular como preparaciones farmacéuticas preparadas en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las preparaciones preferidas se formulan específicamente para la administración en el ojo (p.ej., sub-retiniana, córnea, ocular, etc.)

5 En ciertas realizaciones de cualquiera de lo anterior, las células RPE se obtienen de células madre pluripotentes humanas, tales como células madre embrionarias humanas o células iPS humanas. La invención contempla que se puede obtener cualquiera de las preparaciones descritas en la presente memoria a partir de una célula madre pluripotente humana adecuada.

Se contemplan las preparaciones que incluyen una o más de cualquiera de las características anteriores.

10 La invención contempla que cualquiera de las preparaciones anteriores de células RPE, que incluyen las preparaciones sustancialmente purificadas y las preparaciones que tienen un número mínimo particular de células RPE, se pueden usar en el tratamiento de cualquiera de las indicaciones descritas en la presente memoria. Además, las células RPE diferenciadas mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar en el tratamiento de cualquiera de las indicaciones descritas en la presente memoria.

Terapias basadas en células RPE

15 Las células RPE y las preparaciones farmacéuticas que comprenden las células RPE producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria y/o que tienen las características de las preparaciones de células RPE descritas en la presente memoria se pueden usar para tratamientos basados en células en los que las células RPE son necesarias o mejorarían el tratamiento. La siguiente sección describe los métodos de uso de las células RPE proporcionadas por la presente invención para tratar diversas afecciones que se pueden beneficiar de las terapias
20 basadas en células RPE. El régimen de tratamiento particular, la vía de administración, y cualquier terapia adyuvante se adaptarán basándose en la afección particular, la gravedad de la afección, y la salud general del paciente. Además, en ciertas realizaciones, la administración de células RPE puede ser eficaz para restablecer completamente cualquier pérdida de visión u otros síntomas. En otras realizaciones, la administración de células RPE puede ser eficaz para reducir la gravedad de los síntomas y/o para prevenir la degeneración adicional en la afección del paciente. La
25 invención contempla que se puede usar la administración de una preparación que comprende células RPE para tratar (lo que incluye reducir la gravedad de los síntomas, completamente o en parte) cualquiera de las afecciones anteriores o siguientes. Además, la administración de células RPE se puede usar para ayudar a tratar los síntomas de cualquier lesión en la capa endógena de RPE.

30 La invención contempla que las células RPE, lo que incluye las preparaciones que comprenden células RPE, obtenidas mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, se pueden usar en el tratamiento de cualquiera de las indicaciones descritas en la presente memoria. Además, la invención contempla que cualquiera de las preparaciones que comprenden las células RPE descritas en la presente memoria se puede usar en el tratamiento de cualquiera de las indicaciones descritas en la presente memoria.

35 La retinosis pigmentaria es una afección hereditaria en la que los receptores de la visión se destruyen gradualmente debido a una programación genética anormal. Ciertas formas causan una ceguera total a edades relativamente jóvenes, mientras otras formas muestran cambios retinianos con "espículas óseas" característicos con poca destrucción de la visión. Esta enfermedad afecta a unos 1,5 millones de personas en todo el mundo. Se han hallado dos defectos génicos que provocan la retinosis pigmentaria autosómica recesiva en genes expresados exclusivamente en el RPE. Uno se debe a una proteína del RPE implicada en el metabolismo de la vitamina A (proteína de unión a cis
40 retinaldehído). El segundo implica otra proteína exclusiva del RPE, RPE65. Esta invención proporciona métodos y composiciones para tratar estas dos formas de retinosis pigmentaria mediante la administración de células RPE.

En otra realización, la presente invención proporciona métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos asociados con la degeneración retiniana, que incluye la degeneración macular.

45 Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de células RPE para la terapia de enfermedades oculares, que incluyen las enfermedades oculares hereditarias y adquiridas. Los ejemplos de enfermedades oculares adquiridas o hereditarias son la degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma y retinopatía diabética.

50 La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la causa más habitual de ceguera legal en los países occidentales. La atrofia del epitelio pigmentario retiniano submacular y el desarrollo de neovascularizaciones coroideas (CNV) dan como resultado de manera secundaria la pérdida de la agudeza visual central. Para la mayoría de pacientes con CNV subfoveal y atrofia geográfica no existe en la actualidad un tratamiento para prevenir la pérdida de la agudeza visual central. Los signos tempranos de AMD son depósitos (drusas) entre el epitelio pigmentario retiniano y la membrana de Bruch. Durante la enfermedad se dan brotes de vasos coroideos en el espacio subretiniano de la mácula. Esto conduce a la pérdida de la visión central y de la capacidad de leer.

55 El glaucoma es el nombre dado a un grupo de enfermedades en las que la presión en el ojo se incrementa anormalmente. Esto conduce a limitaciones del campo visual y a la disminución general de la capacidad de ver. La forma más habitual es el glaucoma primario; se distinguen dos formas del mismo: glaucoma de ángulo obtuso crónico y de ángulo agudo cerrado. El glaucoma secundario puede estar provocado por infecciones, tumores o lesiones. Un

tercer tipo, el glaucoma hereditario, deriva normalmente de alteraciones del desarrollo durante el embarazo. El humor acuoso del globo ocular está bajo una cierta presión que es necesaria para las propiedades ópticas del ojo. Esta presión intraocular es normalmente de 15 a 20 milímetros de mercurio, y se controla mediante el equilibrio entre la producción acuosa y el flujo de salida acuoso. En el glaucoma, el flujo de salida del humor acuoso en el ángulo de la cámara anterior está bloqueado, de forma que se eleva la presión dentro del ojo. El glaucoma se desarrolla normalmente en la madurez o a edades avanzadas, pero no son infrecuentes las formas y enfermedades hereditarias en niños y adolescentes. Aunque la presión intraocular está solamente ligeramente elevada, y por otra parte no hay síntomas evidentes, se da un daño gradual, especialmente la limitación del campo visual. El ángulo agudo cerrado, en contraste, provoca dolor, enrojecimiento, dilatación de las pupilas y alteraciones graves de la visión. La córnea se vuelve turbia, y la presión intraocular se incrementa enormemente. A medida que la enfermedad progresa, el campo visual se estrecha cada vez más, lo que se puede detectar fácilmente mediante el uso de un campímetro, un instrumento oftalmológico. El glaucoma crónico generalmente responde bien a los medicamentos administrados localmente que incrementan el flujo de salida acuoso. A veces se proporcionan sustancias activas sistémicas para reducir la producción acuosa. Sin embargo, el tratamiento medicinal no siempre es eficaz. Si la terapia medicinal fracasa, se usa la terapia láser u operaciones convencionales para crear un flujo de salida nuevo para el humor acuoso. El glaucoma agudo es una urgencia médica. Si la presión intraocular no se reduce en 24 horas, se produce un daño permanente.

La retinopatía diabética surge en casos de diabetes mellitus. Puede conducir al engrosamiento de la membrana basal de las células endoteliales vasculares como resultado de la glicosilación de las proteínas. Es la causa de la esclerosis vascular temprana y la formación de aneurismas capilares. Estos cambios vasculares conducen a lo largo de los años a la retinopatía diabética. Los cambios vasculares provocan la hipoperfusión de las regiones capilares. Esto conduce a depósitos de lípidos (exudados duros) y a vasoproliferación. La evolución clínica es variable en los pacientes con diabetes mellitus. En la diabetes relacionada con la edad (diabetes tipo II), primero aparecen aneurismas capilares. Después, debido a la perfusión capilar alterada, aparecen exudados duros y blandos y petequias en el parénquima retiniano. En las etapas tardías de la retinopatía diabética, los depósitos grasos se disponen en forma de corona alrededor de la mácula (retinitis circinada). Estos cambios con frecuencia van acompañados de edema en el polo posterior del ojo. Si el edema involucra a la mácula se produce un deterioro agudo grave de la visión. El problema principal en la diabetes tipo I es la proliferación vascular en la región del fondo del ojo. La terapia habitual es la coagulación láser de las regiones afectadas del fondo del ojo. La coagulación láser se lleva a cabo inicialmente de manera focal en las áreas afectadas de la retina. Si los exudados persisten, se amplía el área de coagulación láser. El centro de la retina con el sitio de visión más nítida, es decir, la mácula y el haz papilomacular, no se puede coagular debido a que el procedimiento daría como resultado la destrucción de las partes de la retina que son más importantes para la visión. Si la proliferación ya se ha producido, a menudo es necesario que los focos se presionen muy densamente debido a la proliferación. Esto conlleva la destrucción de áreas de la retina. El resultado es una pérdida correspondiente de campo visual. En la diabetes tipo I, la coagulación láser a tiempo a menudo es la única posibilidad de salvar de la ceguera a los pacientes.

En ciertas realizaciones, se pueden usar las células RPE de la invención para tratar trastornos del sistema nervioso central. Las células RPE se pueden trasplantar en el SNC. Hasta la fecha, se han empleado varios tipos de células diferentes en los experimentos con animales o en pacientes con enfermedad de Parkinson en estudios clínicos. Los ejemplos son las células fetales obtenidas de cerebros de fetos humanos. Las células fetales del mesencéfalo ventral o las neuronas dopaminérgicas ya se han trasplantado en estudios clínicos en más de 300 pacientes con enfermedad de Parkinson (para una revisión, véase Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE (2000) (Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. Prog Neurobiol 60: 409 470). Se han usado varios tipos de células diferentes, que incluyen células no neuronales, p.ej. células de la corteza suprarrenal, células de Sertoli de las gónadas o células glómicas de los cuerpos carotídeos, fibroblastos o astrocitos, en pacientes con enfermedad de Parkinson o en modelos animales con el objetivo de sustituir la dopamina espontáneamente o tras transferencia génica (Alexi et al. 2000, anteriormente mencionado). La tasa de supervivencia de las neuronas dopaminérgicas fetales trasplantadas es del 58%, lo cual fue suficiente para provocar una ligera mejora en los signos y síntomas (Alexi et al. 2000, anteriormente mencionado).

En años recientes, se han aislado células madre neuronales de cerebros de vertebrados adultos, se han expandido *in vitro* y se han reimplantado en el SNC, tras lo cual se diferenciaron hasta neuronas puras. Sin embargo, su función en el SNC sigue sin conocerse. También se han usado células precursoras neuronales para la transferencia génica (Raymon HK, Thode S, Zhou J, Friedman GC, Pardinias JR, Barrere C, Johnson RM, Sah DW (1999) Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. J Neurosci 19: 5420 5428). Las células de Schwann que sobreexpresaron NGF y GDNF tuvieron efectos neuroprotectores en los modelos de Parkinsonismo (Wilby MJ, Sinclair SR, Muir EM, Zietlow R, Adcock KH, Horellou P, Rogers JH, Dunnett SB, Fawcett JW (1999) A glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting clone of the Schwann cell line SCTM41 enhances survival and fiber outgrowth from embryonic nigral neurons grafted to the striatum and to the lesioned substantia nigra. J Neurosci 19: 2301 2312).

Otro aspecto de la presente invención es, por lo tanto, el uso de células epiteliales pigmentarias para la terapia de enfermedades neurológicas, en particular una enfermedad del sistema nervioso, preferiblemente del SNC, especialmente la enfermedad de Parkinson.

Un ejemplo de una enfermedad común del SNC es la enfermedad de Parkinson, que es una enfermedad degenerativa crónica del cerebro. La enfermedad está provocada por la degeneración de las células neuronales especializadas de la región de los ganglios basales. La muerte de las neuronas dopaminérgicas da como resultado una síntesis reducida de dopamina, un neurotransmisor importante, en los pacientes con enfermedad de Parkinson. La terapia habitual es la terapia médica con L-dopa. La L-dopa se metaboliza en los ganglios basales hasta dopamina, y asume la función del neurotransmisor endógeno que falta. Sin embargo, la terapia con L-dopa pierde su actividad después de algunos años.

Los modelos animales de retinosis pigmentaria que se pueden tratar o usar para ensayar la eficacia de las células RPE producidas mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria incluyen roedores (ratón rd, ratón con inactivación de RPE-65, ratón con el gen similar a Tuppy, rata RCS), gatos (gato abisinio), y perros (perro con degeneración de conos "cd", perro con degeneración progresiva de bastones-conos "prcd", perro con degeneración retiniana temprana "erd", perros con displasia de bastones-conos 1, 2 y 3 "rcd1, rcd2 y rcd3", perro con displasia de fotorreceptores "pd", y Briard "RPE-65" (perro)).

Otra realización de la presente invención es un método para la obtención de líneas de RPE o precursores de células RPE que tienen una capacidad incrementada de prevenir la neovascularización. Tales células se pueden producir mediante el envejecimiento de una célula somática de un paciente de forma que la telomerasa se acorta cuando ha pasado al menos un 10% de la vida útil replicativa normal de la célula, y después el uso de dicha célula somática como célula donante de transferencia nuclear para crear células que sobreexpresan inhibidores de la angiogénesis tales como factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF/EPC-1). De manera alternativa, tales células se pueden modificar genéticamente con genes exógenos que inhiben la neovascularización.

La invención contempla que se pueden usar preparaciones de células RPE diferenciadas a partir de células madre pluripotentes humanas (p.ej., células madre embrionarias humanas, células iPS, u otras células madre pluripotentes) para tratar cualquiera de las enfermedades o afecciones anteriores, así como lesiones de la capa endógena de RPE. Estas enfermedades se pueden tratar con preparaciones de células RPE que comprenden una mezcla de células RPE diferenciadas de niveles variables de madurez, así como con preparaciones de células RPE diferenciadas que están enriquecidas en células RPE diferenciadas maduras o células RPE diferenciadas.

Modos de administración

Las células RPE de la invención se pueden administrar de manera tópica, sistémica, o local, tal como mediante inyección (p.ej., inyección intravítrea), o como parte de un dispositivo o implante (p.ej., un implante de liberación sostenida). Por ejemplo, las células de la presente invención se pueden trasplantar en el espacio subretiniano mediante el uso de la cirugía de vitrectomía.

Dependiendo del método de administración, las células RPE se pueden añadir a disoluciones acuosas tamponadas y equilibradas con electrolitos, disoluciones acuosas tamponadas y equilibradas con electrolitos con un polímero lubricante, aceite mineral o pomada basada en petrolato, otros aceites, liposomas, ciclodextrinas, polímeros de liberación sostenida o geles. Estas preparaciones se pueden administrar de manera tópica en el ojo 1 a 6 veces durante un periodo que puede ser hasta la totalidad de la vida del paciente.

En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de un paciente que padece una afección asociada a degeneración retiniana comprenden administrar una composición de la invención localmente (p.ej., mediante inyección intraocular o inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libera una composición de la invención), mediante medios tópicos o mediante administración sistémica (p.ej., mediante vías de administración que permiten la absorción sistémica *in vivo* o la acumulación de fármacos en el torrente sanguíneo, seguido de distribución por todo el cuerpo, que incluye, sin limitación, mediante vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, inhalación, oral, intrapulmonar e intramuscular). La administración intraocular de las composiciones de la invención incluye, por ejemplo, la administración en el cuerpo vítreo, transcórnea, subconjuntiva, yuxtaescleral, escleral posterior, y en porciones sub-Tenon del ojo. Véanse, por ejemplo, patentes de EE.UU. n.ºs 6.943.145; 6.943.153; y 6.945.971.

Las células RPE de la invención se pueden administrar en una formulación oftálmica farmacéuticamente aceptable mediante inyección intraocular. Cuando se administra la formulación mediante inyección intravítrea, por ejemplo, la disolución se debería concentrar de forma que se puedan administrar volúmenes minimizados. Las concentraciones para las inyecciones pueden ser en cualquier cantidad que sea eficaz y atóxica, dependiendo de los factores descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, las células RPE para el tratamiento de un paciente se formulan a dosis de alrededor de 10^4 células/mL. En otras realizaciones, las células RPE para el tratamiento de un paciente se formulan a dosis de alrededor de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} células/mL.

Las células RPE se pueden formular para administración en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de forma que la composición 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, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/ciliar, lente, coroides, retina, esclerótica, espacio supracoroideo, conjuntiva, espacio subconjuntivo, espacio epiesclerótico, espacio intracórneo, espacio epicórneo, pars plana, regiones avasculares inducidas quirúrgicamente, o la mácula. Los productos y sistemas, tales como los

vehículos de administración, que comprenden los agentes de la invención, especialmente aquellos formulados como composiciones farmacéuticas, así como los kits que comprenden tales vehículos de administración y/o sistemas, también se prevén como parte de la presente invención.

5 En ciertas realizaciones, un método terapéutico de la invención incluye la etapa de administrar las células RPE de la invención en forma de un implante o dispositivo. En ciertas realizaciones, el dispositivo es un implante bioerosionable para tratar una afección médica del ojo que comprende un agente activo dispersado en una matriz de polímero biodegradable, en la que al menos alrededor del 75% de las partículas del agente activo tienen un diámetro menor de alrededor de 10 μm . El implante bioerosionable tiene un tamaño adecuado para la implantación en una región ocular. La región ocular puede ser una o más de la cámara anterior, la cámara posterior, la cavidad vítrea, el coroides, el espacio supracoroidal, la conjuntiva, el espacio subconjuntivo, el espacio epiesclerótico, el espacio intracórneo, el espacio epicórneo, la esclerótica, la pars plana, regiones avasculares inducidas quirúrgicamente, la mácula, y la retina. El polímero biodegradable puede ser, por ejemplo, un copolímero de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). En ciertas realizaciones, la proporción de monómeros de ácido láctico respecto de ácido glicólico en el polímero es de alrededor de un porcentaje en peso 25/75, 40/60, 50/50, 60/40, 75/25, más preferiblemente alrededor de 50/50. Además, el copolímero de PLGA puede ser de alrededor de un 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a alrededor de un 90 por ciento en peso del implante bioerosionable. En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero de PLGA puede ser de alrededor del 30 a alrededor del 50 por ciento en peso, preferiblemente alrededor del 40 por ciento en peso del implante bioerosionable.

20 El volumen de la composición administrada según los métodos descritos en la presente memoria también depende de factores tales como el modo de administración, el número de células RPE, la edad y el peso del paciente, y el tipo y la gravedad de la enfermedad a tratar. Por ejemplo, si se administra de manera oral como un líquido, el volumen de líquido que comprende una composición de la invención puede ser de alrededor de 0,5 mililitros a alrededor de 2,0 mililitros, de alrededor de 2,0 mililitros a alrededor de 5,0 mililitros, de alrededor de 5,0 mililitros a alrededor de 10,0 mililitros, o de alrededor de 10,0 mililitros a alrededor de 50,0 mililitros. Si se administra mediante inyección, el volumen de líquido que comprende una composición de la invención puede ser de alrededor de 5,0 microlitros a alrededor de 50 microlitros, de alrededor de 50 microlitros a alrededor de 250 microlitros, de alrededor de 250 microlitros a alrededor de 1 mililitro, de alrededor de 1 mililitro a alrededor de 5 mililitros, de alrededor de 5 mililitros a alrededor de 25 mililitros, de alrededor de 25 mililitros a alrededor de 100 mililitros, o de alrededor de 100 mililitros a alrededor de 1 litro.

30 Si se administran mediante inyección intraocular, las células RPE se pueden administrar una o más veces periódicamente a lo largo de la vida del paciente. Por ejemplo, las células RPE se pueden administrar 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. De manera alternativa, puede ser deseable una administración más frecuente para ciertas afecciones o trastornos. Si se administran mediante un implante o dispositivo, las células RPE se pueden administrar una vez, o una o más veces periódicamente a lo largo de la vida del paciente, según sea necesario para el paciente particular y el trastorno o la afección a tratar. Se contempla de forma similar un régimen terapéutico que cambie a lo largo del tiempo. Por ejemplo, puede ser necesario un tratamiento más frecuente al comienzo (p.ej., tratamiento diario o semanal). A lo largo del tiempo, a medida que mejora la afección del paciente, puede ser necesario un tratamiento menos frecuente o incluso ningún tratamiento adicional.

40 En ciertas realizaciones, a los pacientes también se les administra una terapia inmunosupresora, antes, a la vez, o después de la administración de las células RPE. La terapia inmunosupresora puede ser necesaria a lo largo de la vida del paciente, o durante un periodo de tiempo más corto.

45 En ciertas realizaciones, las células RPE de la presente invención se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las células RPE se pueden administrar solas o como un componente de una formulación farmacéutica. Los presentes compuestos se pueden formular para la administración de cualquier manera adecuada para el uso en la medicina humana. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender las células RPE, en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones, acuosas o no acuosas, isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, que se pueden reconstituir en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

60 Las composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agente isotónicos, tales como hidratos de carbono, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, se puede provocar la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de uno o más agentes que retrasan la absorción,

tales como, p.ej., monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando se administra, la composición terapéutica para el uso en esta invención, por supuesto, está en una forma fisiológicamente aceptable y apirógena. Además, la composición se puede encapsular o inyectar de manera deseable en una forma viscosa en el humor vítreo para la administración en el sitio de daño retiniano o coroideo.

5 *Modificación de genes del MHC en las células madre embrionarias humanas para obtener células RPE de complejidad reducida*

Las células madre embrionarias humanas usadas como punto de partida para el método de producción de células RPE de esta invención también pueden derivar de una biblioteca de células madre embrionarias humanas, cada una de las cuales es hemicigota u homocigota para al menos un alelo del MHC presente en una población humana. En ciertas realizaciones, cada miembro de dicha biblioteca de células madre es hemicigota u homocigota para un grupo diferente de alelos del MHC respecto de los miembros restantes de la biblioteca. En ciertas realizaciones, la biblioteca de células madre es hemicigota u homocigota para todos los alelos del MHC que están presentes en una población humana. En el contexto de esta invención, las células madre que son homocigotas para uno o más genes de antígenos de histocompatibilidad incluyen las células que son nulicigotas para uno o más (y en ciertas realizaciones, todos) de tales genes. Nulicigoto para un locus genético significa que el gen es nulo en ese locus, es decir, ambos alelos de ese gen están deletados o inactivados. Se pueden producir células madre que son nulicigotas para todos los genes del MHC mediante métodos habituales conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, selección de genes y/o pérdida de heterocigosidad (LOH). Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes de Estados Unidos US 20040091936, US 20030217374 y US 20030232430, y la solicitud provisional número US 60/729.173.

20 Por lo tanto, la presente invención se refiere a métodos de obtención de células RPE, que incluyen una biblioteca de células RPE, con una complejidad del MHC reducida. Las células RPE con una complejidad del MHC reducida incrementarán el suministro de células disponibles para las aplicaciones terapéuticas, ya que eliminarán las dificultades asociadas con la coincidencia con el paciente. Tales células se pueden obtener de células madre que se modifican para ser hemicigotas u homocigotas para los genes del complejo del MHC.

25 Una célula ES humana puede comprender modificaciones en uno de los alelos de los cromosomas hermanos del complejo del MHC de la célula. Se puede usar una diversidad de métodos para generar modificaciones génicas, tales como la selección génica, para modificar los genes del complejo del MHC. Además, los alelos modificados del complejo del MHC de las células se pueden modificar posteriormente para que sean homocigotos, de forma que hay presentes alelos idénticos en los cromosomas hermanos. Se pueden utilizar métodos tales como la pérdida de heterocigosidad (LOH) para modificar células para que tengan alelos homocigotos del complejo del MHC. Por ejemplo, se pueden seleccionar como objetivo uno o más genes de un grupo de genes del MHC de un alelo original para generar células hemicigotas. El otro grupo de genes del MHC se puede eliminar mediante selección génica o LOH para producir una línea nula. Esta línea nula se puede usar además como la línea celular embrionaria en la que eliminar grupos de genes de HLA, o genes individuales, para hacer un banco hemicigoto u homocigoto con un trasfondo genético por otra parte uniforme.

35 En un aspecto, se usa una biblioteca de líneas de células ES, en la que cada miembro de la biblioteca es homocigoto para al menos un gen de HLA, para obtener células RPE según los métodos de la presente invención. En otro aspecto, la invención proporciona una biblioteca de células RPE (y/o células del linaje RPE), en la que varias líneas de células ES se seleccionan y se diferencian en células RPE. Estas células RPE y/o células del linaje RPE se pueden usar para un paciente que necesita una terapia basada en células.

40 Por lo tanto, ciertas realizaciones de esta invención se refieren a un método de administración de células RPE humanas que se han obtenido a partir de células madre embrionarias de complejidad reducida a un paciente que lo necesita. En ciertas realizaciones, este método comprende las etapas de: (a) identificar a un paciente que necesita un tratamiento que implica administrarle células RPE humanas; (b) identificar las proteínas del MHC expresadas en la superficie de las células del paciente; (c) proporcionar una biblioteca de células RPE humanas de complejidad reducida del MHC producidas mediante el método de producción de células RPE de la presente invención; (d) seleccionar las células RPE a partir de la biblioteca que coinciden con las proteínas del MHC de las células de este paciente; (e) administrar cualquiera de las células de la etapa (d) a dicho paciente. Este método se puede llevar a cabo en un centro regional, tal como, por ejemplo, un hospital, una clínica, una consulta de un médico, y otras instalaciones de atención sanitaria. Además, las células RPE seleccionadas por coincidir con el paciente, si se almacenan en pequeño número, se pueden expandir antes de tratar al paciente.

Otras aplicaciones y métodos comerciales

55 Ciertos aspectos de la presente invención se refieren a la producción de células RPE para alcanzar cantidades comerciales. En las realizaciones particulares, se producen células RPE a gran escala, se almacenan si es necesario, y se suministran a hospitales, médicos u otras instalaciones de asistencia sanitaria. Una vez que un paciente presenta una indicación tal como, por ejemplo, distrofia macular de Stargardt, degeneración macular relacionada con la edad, o retinosis pigmentaria, se pueden encargar las células RPE y suministrarlas a tiempo. Por lo tanto, la presente invención se refiere a métodos para producir células RPE para obtener células a escala comercial, preparaciones de

células que comprenden células RPE derivadas de dichos métodos, así como métodos para proporcionar (es decir, producir, opcionalmente almacenar, y comercializar) células RPE a hospitales y médicos.

5 Por lo tanto, ciertos aspectos de la presente invención se refieren a métodos de producción, almacenamiento, y distribución de células RPE producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria. Tras la producción de RPE, las células RPE se pueden recoger, purificar y opcionalmente almacenar antes del tratamiento de un paciente. Las células RPE pueden ser opcionalmente específicas del paciente o seleccionarse específicamente basándose en el perfil de HLA u otro perfil inmunológico.

10 Así, en las realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos para suministrar células RPE a hospitales, centros de asistencia sanitaria, y médicos, por los que las células RPE producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria se almacenan, se encargan a petición de un hospital, centro de asistencia sanitaria, o médico, y se administran a un paciente que necesita una terapia con células RPE. En las realizaciones alternativas, un hospital, centro de asistencia sanitaria, o médico encarga células RPE basándose en datos específicos de un paciente, las células RPE se producen según las especificaciones del paciente y posteriormente se suministran al hospital o médico que realizó el encargo.

15 En ciertas realizaciones, el método de diferenciación de células RPE de las células madre embrionarias humanas se lleva a cabo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). En ciertas realizaciones, la derivación o producción inicial de células madre embrionarias humanas también se lleva a cabo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (BPF). Las células se pueden analizar en uno o más puntos a lo largo del protocolo de diferenciación para asegurarse, por ejemplo, de que no existe infección o contaminación viral, bacteriana, o fúngica en las células o en el medio de cultivo. De forma similar, las células madre embrionarias humanas usadas como material inicial se pueden analizar para asegurarse de que no existe infección o contaminación viral, bacteriana, o fúngica.

20 En ciertas realizaciones, la producción de células RPE diferenciadas o células RPE diferenciadas maduras se amplía para uso comercial. Por ejemplo, el método se puede usar para producir al menos 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , o 1×10^{10} células RPE.

Los aspectos adicionales de la invención se refieren a una biblioteca de células RPE que puede proporcionar células coincidentes con los receptores del paciente potencial. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un método para establecer un negocio farmacéutico, que comprende la etapa de proporcionar preparaciones de células RPE que son homocigotas para al menos un antígeno de histocompatibilidad, en el que las células se eligen de un banco de tales células que comprende una biblioteca de células RPE que se pueden expandir mediante los métodos descritos en la presente memoria, en el que cada preparación de células RPE es hemicigota u homocigota para al menos un alelo del MHC presente en la población humana, y en el que dicho banco de células RPE comprende células que son hemicigotas u homocigotas para un grupo diferente de alelos del MHC respecto de los otros miembros del banco de células. Como se mencionó anteriormente, se puede usar la selección génica o la pérdida de heterocigosidad para generar las células madre con alelo del MHC hemicigotas u homocigotas usadas para obtener las células RPE. En una realización, después de elegir que una preparación particular de células RPE es adecuada para un paciente, se expande para conseguir cantidades adecuadas para el tratamiento del paciente. Los métodos para llevar a cabo un negocio farmacéutico también pueden comprender establecer un sistema de distribución para distribuir la preparación para la venta, o pueden incluir establecer un grupo de ventas para comercializar la preparación farmacéutica.

30 Otros aspectos de la invención se refieren al uso de las células RPE de la presente invención como herramienta de investigación en ámbitos tales como una empresa farmacéutica, química, o biotecnológica, un hospital, o una institución académica o de investigación. Tales usos incluyen el uso de células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias en ensayos de cribado para identificar, por ejemplo, los agentes que se pueden usar para estimular la supervivencia de las células RPE *in vitro* o *in vivo*, o que se pueden usar para estimular la maduración de las células RPE. Los agentes identificados se pueden estudiar *in vitro* o en modelos animales para determinar, por ejemplo, su uso potencial solos o en combinación con las células RPE.

35 La presente invención también incluye métodos para obtener células ES humanas de un paciente, y después generar y expandir las células RPE derivadas de las células ES. Estas células RPE se pueden almacenar. Además, estas células RPE se pueden usar para tratar al paciente de que se obtuvieron las ES, o a un familiar de ese paciente.

40 Como los métodos y aplicaciones descritas anteriormente se refieren a tratamientos, preparaciones farmacéuticas, y al almacenamiento de células RPE, la presente invención también se refiere a disoluciones de células RPE que son adecuadas para tales aplicaciones. La presente invención, por lo tanto, se refiere a disoluciones de células RPE que son adecuadas para la inyección en un paciente. Tales disoluciones pueden comprender las células formuladas en un líquido fisiológicamente aceptable (p.ej., solución salina normal, solución salina tamponada, o una solución salina equilibrada). El número de células en la disolución puede ser de al menos alrededor de 10^2 y menos de alrededor de 10^9 células. En otras realizaciones, el número de células en la disolución puede oscilar de alrededor de 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , o 10^8 a alrededor de 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 , en donde los límites superior e inferior se seleccionan independientemente, excepto porque el límite inferior es siempre menor que el límite

superior. Además, las células se pueden administrar en una administración individual o en múltiples administraciones.

Las células proporcionadas por los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar inmediatamente, o se pueden congelar y crioconservar durante días o años. Así, en una realización, la presente invención proporciona una preparación crioconservada de células RPE, en la que dicha preparación crioconservada comprende al menos alrededor de 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , o 10^6 . Las preparaciones crioconservadas pueden comprender además al menos alrededor de 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 15×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , o 10^{10} células. De forma similar, se proporcionan métodos de crioconservación de células RPE. Las células RPE se pueden crioconservar inmediatamente tras la diferenciación, tras la maduración *in vitro*, o después de cierto periodo de tiempo en cultivo. Las células RPE de las preparaciones pueden comprender una mezcla de células RPE diferenciadas y células RPE maduras.

Otras Células Pluripotentes

La discusión anterior se centra en el uso de células madre embrionarias humanas como material inicial para producir células RPE únicas, así como en las preparaciones y los métodos de uso de las células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas. Sin embargo, los métodos y usos detallados anteriormente se pueden usar de forma similar para generar células RPE (y preparaciones adecuadas) mediante el uso de otros tipos de células madre pluripotentes humanas como material inicial. Por lo tanto, la invención contempla que cualquiera de los aspectos y realizaciones anteriores o siguientes de la invención se pueden aplicar de forma similar a los métodos y usos de las células RPE diferenciadas a partir de otros tipos de células madre pluripotentes humanas. Cabe destacar que, dado que las células madre pluripotentes inducidas (iPS) tienen las características de las células madre embrionarias, se pueden usar tales células para producir células RPE que son idénticas o sustancialmente idénticas a las células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "células madre pluripotentes" incluye las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas. Las células madre pluripotentes se definen funcionalmente como células madre que: (a) son capaces de inducir teratomas cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes (SCID); (b) son capaces de diferenciarse hasta tipos celulares de las tres capas germinales (p.ej., pueden diferenciarse hasta tipos celulares ectodérmicos, mesodérmicos, y endodérmicos); y (c) expresan uno o más marcadores de células madre embrionarias (p.ej., expresan Oct 4, fosfatasa alcalina, antígeno superficial SSEA-3, antígeno superficial SSEA-4, nanog, TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2, REX1, etc.). Las células madre pluripotentes ejemplares se pueden generar mediante el uso, por ejemplo, de métodos conocidos en la técnica. Las células madre pluripotentes ejemplares incluyen las células madre pluripotentes inducidas (células iPS) generadas reprogramando una célula somática expresando o induciendo la expresión de una combinación de factores (denominados en la presente memoria factores de reprogramación). Las células iPS se pueden generar mediante el uso de células somáticas fetales, posnatales, de recién nacido, juveniles o adultas. En ciertas realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar las células somáticas hasta células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct4 (a veces denominado Oct 3/4), Sox2, c-Myc, y Klf4. En otras realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar las células somáticas hasta células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct 4, Sox2, Nanog, y Lin28. En otras realizaciones, las células somáticas se reprograman expresando al menos 2 factores de reprogramación, al menos tres factores de reprogramación, o cuatro factores de reprogramación. En otras realizaciones, se identifican los factores de reprogramación adicionales y se usan solos o en combinación con uno o más factores de reprogramación conocidos para reprogramar una célula somática hasta una célula madre pluripotente.

Las células madre embrionarias son un ejemplo de células madre pluripotentes. Otro ejemplo son las células madre pluripotentes inducidas (iPS).

En ciertas realizaciones, la célula madre pluripotente es una célula madre embrionaria o una célula derivada de un embrión. En otras realizaciones, la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida. En ciertas realizaciones, la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida producida expresando o induciendo la expresión de uno o más factores de reprogramación en una célula somática. En ciertas realizaciones, la célula somática es un fibroblasto, tal como un fibroblasto dérmico, fibroblasto sinovial, o fibroblasto pulmonar. En otras realizaciones, la célula somática no es un fibroblasto, sino que es una célula somática no fibroblástica. En ciertas realizaciones, la célula somática se reprograma expresando al menos dos factores de reprogramación, al menos tres factores de reprogramación, o cuatro factores de reprogramación. En otras realizaciones, la célula somática se reprograma expresando al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis factores de reprogramación. En ciertas realizaciones, los factores de reprogramación se seleccionan de Oct 3/4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Myc, y Klf4. En otras realizaciones, el grupo de factores de reprogramación expresados incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro de la lista anterior de factores de reprogramación, e incluye opcionalmente otro u otros factores de reprogramación. En ciertas realizaciones, la expresión de al menos uno, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro de los factores de reprogramación anteriores u otros factores de reprogramación se induce poniendo en contacto las células somáticas con uno o más agentes, tales como agentes orgánicos de molécula pequeña, que inducen la expresión de uno o más factores de reprogramación. En ciertas realizaciones, la célula somática se reprograma mediante el uso de una aproximación combinatoria en la que se expresan uno o más factores de reprogramación (p.ej., mediante el uso de un vector viral, plásmido, y similares) y se induce la expresión de uno o más factores de reprogramación (p.ej., mediante el uso de una molécula orgánica pequeña).

5 En ciertas realizaciones, los factores de reprogramación se expresan en la célula somática mediante infección con el uso de un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral. En otras realizaciones, los factores de reprogramación se expresan en la célula somática mediante el uso de un vector no integrativo, tal como un plásmido episómico. Cuando los factores de reprogramación se expresan mediante el uso de vectores no integrativos, los factores se pueden expresar en las células mediante el uso de electroporación, transfección, o transformación de las células somáticas con los vectores.

En ciertas realizaciones, las células madre pluripotentes se generan a partir de células somáticas, y las células somáticas se seleccionan de células embrionarias, fetales, neonatales, juveniles, o adultas.

10 Los métodos para producir células iPS expresando o induciendo la expresión de factores de reprogramación se conocen en la técnica. Brevemente, las células somáticas se infectan, transfectan, o transducen de otra manera con vectores de expresión que expresan factores de reprogramación. En el caso de ratones, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, c-myc, y Klf4) mediante el uso de vectores virales integrativos fue suficiente para reprogramar una célula somática. En el caso de seres humanos, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, Nanog, y Lin28) mediante el uso de vectores virales integrativos fue suficiente para reprogramar una célula somática. Sin embargo, también puede ser suficiente la expresión (o la inducción de la expresión) de menos factores o de otros factores de reprogramación. Además, el uso de vectores integrativos es solamente un mecanismo para expresar factores de reprogramación en las células. Otros métodos incluyen, por ejemplo, el uso de vectores no integrativos.

20 En ciertas realizaciones, la expresión de al menos uno, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro de los factores de reprogramación anteriores u otros factores de reprogramación se induce poniendo en contacto las células somáticas con uno o más agentes, tales como agentes orgánicos de molécula pequeña, que inducen la expresión de uno o más factores de reprogramación. En ciertas realizaciones, la célula somática se reprograma mediante el uso de una aproximación combinatoria en la que se expresan uno o más factores de reprogramación (p.ej., mediante el uso de un vector viral, plásmido, y similares) y se induce la expresión de uno o más factores de reprogramación (p.ej., mediante el uso de una molécula orgánica pequeña).

25 Una vez que los factores de reprogramación se expresan en las células, las células se cultivan. A lo largo del tiempo, las células con características de ES aparecen en la placa de cultivo. Las células se pueden recoger y subcultivar basándose, por ejemplo, en la morfología de ES, o basándose en la expresión de un marcador seleccionable o detectable. Las células se cultivan para producir un cultivo de células que parecen células ES. Estas células son células iPS aparentes.

30 Para confirmar la pluripotencia de las células iPS, las células se pueden analizar en uno o más ensayos de pluripotencia. Por ejemplo, las células se pueden ensayar con respecto a la expresión de marcadores de células ES; las células se pueden evaluar por la capacidad de producir teratomas cuando se trasplantan en ratones SCID; las células se pueden evaluar por la capacidad de diferenciarse para producir tipos celulares de las tres capas germinales.

35 Una vez que se obtienen células iPS pluripotentes (recién obtenidas o de un banco o reserva de células previamente obtenidas), tales células se pueden usar para producir células RPE.

40 En ciertas realizaciones, la producción de células iPS es una etapa inicial en la producción de células RPE. En otras realizaciones, se usan células iPS obtenidas previamente. En ciertas realizaciones, las células iPS se generan de manera específica mediante el uso de material de un paciente particular o de un donante coincidente, con el objetivo de generar células RPE coincidentes con el tejido. En ciertas realizaciones, las células iPS son células donantes universales que no son sustancialmente inmunógenas.

La presente invención se describirá a continuación más completamente con referencia a los ejemplos siguientes, que son solamente ilustrativos y no se deberían considerar limitantes de la invención descrita anteriormente.

Ejemplos

45 La invención, que se está describiendo en general, se entenderá más fácilmente mediante referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen simplemente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

50 La pluripotencia de las células madre embrionarias se mantiene en parte mediante el delicado equilibrio recíproco de los dos factores de transcripción Oct4 (Pou5f1) y Nanog. Durante la diferenciación de las células ES, la expresión de estos genes se inhibe, y las pruebas recientes han sugerido que la hipermetilación de los genes que codifican estas proteínas es la responsable. La pérdida de la expresión de uno o ambos genes dio como resultado la activación transcripcional de genes asociados con la diferenciación celular.

55 El epitelio pigmentado retiniano (RPE) se desarrolla a partir del neuroectodermo, y se localiza en una posición adyacente a la retina neural y el coroides, lo que proporciona una barrera entre el sistema vascular y la retina. Los datos proporcionados en la presente memoria indican que las células RPE se distinguen genéticamente y funcionalmente de los fotorreceptores del entorno tras la diferenciación terminal, aunque las células pueden compartir un progenitor común.

Este modelo indica que los elementos exclusivos de las reivindicaciones del método de cultivo actúan por medio de FGF, EGF, WNT4, TGF-beta, y/o el estrés oxidativo para señalar las rutas de MAP-Quinasa y C-Jun terminal Quinasa potenciales para inducir la expresión del factor de transcripción Paired-box 6 (PAX6). PAX6 actúa de manera sinérgica con PAX2 para diferenciar de manera terminal el RPE maduro por medio de la coordinación de Mit-F y Oxt2 para transcribir genes específicos de RPE tales como Tirosinasa (Tyr), y objetivos posteriores tales como RPE-65, Bestrofina, CRALBP, y PEDF.

Para caracterizar las etapas del desarrollo durante el proceso de diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hESc) en el epitelio pigmentado retiniano (RPE), se usaron varios ensayos para identificar los niveles de expresión de los genes clave en cada etapa representativa del desarrollo. Se descubrió que se expresaron exclusivamente varios genes en forma de mRNA y proteínas en las células RPE. Por ejemplo, se descubrió que PAX6 actúa con PAX2 para diferenciar de manera terminal las células RPE maduras por medio de la coordinación de Mit-F y Oxt2 para transcribir genes específicos de RPE tales como Tirosinasa (Tyr), y objetivos posteriores tales como RPE-65, Bestrofina, CRALBP, y PEDF. De manera importante, el distintivo específico de RPE de la expresión de mRNA y proteínas no solamente fue exclusivo de las células hES, sino también de las células RPE fetales y ARPE-19. Las células RPE descritas en la presente memoria expresaron múltiples genes que no se expresaron en las células hES, las células RPE fetales, o las células ARPE-19 (Figuras 3, 4, y 6). La expresión exclusiva de mRNA y proteínas en las células RPE de la invención constituye un grupo de marcadores que hacen que estas células RPE sean diferentes de las células de la técnica, tales como las células hES, las células ARPE-19 y las células RPE fetales.

Ejemplo de Referencia 1: Diferenciación y cultivo de RPE

Las células hES crioconservadas se descongelaron y se colocaron en un cultivo en suspensión en placas Petri Lo-bind Nunclon en medio de crecimiento MDBK (Sigma-SAFC Biosciences) u OptimPro SFM (Invitrogen) suplementado con L-Glutamina, Penicilina/Estreptomicina, y suplemento B-27. Las células hES se habían obtenido previamente de blastómeros individuales obtenidos mediante biopsia de embriones humanos en etapa de escisión temprana. El resto del embrión humano no se destruyó. Se usaron dos líneas de células hES derivadas de blastómeros individuales, MA01 y MA09. Las células se cultivaron durante 7-14 días en forma de cuerpos embrioides (EBs).

Después de 7-14 días, los EBs se colocaron en placas de cultivo de tejidos revestidas con gelatina de piel porcina. Las EBs se cultivaron en forma de cultivos adherentes durante 14-28 días adicionales en Penicilina/Estreptomicina, sin suplemento B-27.

De entre las células del cultivo adherente de EBs, las células RPE se hacen visibles y se reconocen por su morfología celular de tipo empedrado y la aparición de pigmentación.

Ejemplo de referencia 2: Aislamiento y propagación de RPE

Como las células RPE diferenciadas continúan apareciendo en los cultivos adherentes, se hacen visiblemente perceptibles agrupamientos de células RPEs diferenciadas basándose en la forma de las células. La collagenasa IV congelada (20 mg/ml) se descongeló y se diluyó a 7 mg/ml. La collagenasa IV se aplicó al cultivo adherente que contenía agrupamientos de células RPE (1,0 ml a cada pocillo en una placa de 6 pocillos). A lo largo de aproximadamente 1-3 horas, la collagenasa IV disoció los agrupamientos de células. Al disociar los agrupamientos de células RPE de otras células del cultivo, se obtuvo una suspensión enriquecida en células RPE. La suspensión de células RPE enriquecida se retiró de la placa de cultivo y se transfirió a una placa de cultivo de tejidos de 100 mm con 10 ml de medio MEF. Los agrupamientos pigmentados se transfieren con una herramienta de corte de células madre (Swemed-Vitrolife) a un pocillo de una placa de 6 pocillos que contiene 3 ml de medio MEF. Después de haber recogido todos los agrupamientos, la suspensión de células pigmentadas se transfiere a un tubo cónico de 15 ml que contiene 7 ml de medio MEF y se centrifuga a 1000 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante se elimina. Se añaden 5 ml de una mezcla 1:1 de tripsina del 0,25% y de tampón de disociación celular a las células. Las células se incuban durante 10 minutos a 37 °C. Las células se dispersan pipeteando en con una pipeta de 5 ml hasta que quedan pocos agrupamientos. Se añaden 5 ml de medio MEF a las células, y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se elimina y las células se colocan en placas revestidas de gelatina con una división de 1:3 del cultivo original en medio de cultivo EGM-2 (Cambrex).

El cultivo de células RPE se expandió mediante cultivo continuado en el medio EGM-2. Las células se sometieron a pases, según fue necesario a una proporción 1:3 a 1:6 mediante el uso de una mezcla 1:1 de tripsina EDTA del 0,25% y tampón de disociación celular.

Para enriquecer las células RPE diferenciadas maduras, las células se cultivaron casi hasta la confluencia en EGM-2. El medio se cambió después a MDBK-MM (SAFC Biosciences) para ayudar a estimular adicionalmente la maduración de las células RPE.

Ejemplo de referencia 3: Expresión de mRNA específica de RPE medida mediante PCR con transcripción inversa, cuantitativa y en tiempo real (qPCR)

Para caracterizar las etapas del desarrollo durante el proceso de diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hES) en el epitelio pigmentado retiniano (RPE), se han empleado varios ensayos para identificar los niveles

de expresión de los genes clave en cada etapa representativa del desarrollo. Se desarrolló una qPCR para proporcionar una medida cuantitativa y relativa de la abundancia de transcritos de mRNA específicos del tipo celular de interés en el proceso de diferenciación de RPE. La qPCR se usó para determinar los genes que se expresan exclusivamente en las células madre embrionarias humanas, las células neuroretinianas durante el desarrollo del ojo, y las células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas. Los genes para cada tipo celular se enumeran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes específicos de hES, neuroretina/ojo, y células hRPE

Específicos de hESc	Neuroectodermo / Neuroretina	Genes específicos de RPE
Oct-4 (POU5F1)	CHX10	PAX-6
Nanog	NCAM	PAX-2
Rex-1	Nestina	RPE-65
TDGF-1	Beta-Tubulina	PEDF
SOX-2		CRALBP
DPPA-2		Bestrofina
		MitF
		Otx-2
		Tyr

Se determinó que los genes específicos de hES incluyeron Oct-4 (POU5F1), Nanog, Rex-1, TDGF-1, SOX-2, y DPPA-2. Los genes específicos del ectodermo neural / retina neural incluyen CHX10, NCAM, Nestina, y Beta-Tubulina. En contraste, se descubrió que las células RPE diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas expresan exclusivamente PAX-6, PAX-2, RPE-65, PEDF, CRALBP, Bestrofina, MitF, Otx-2, y Tyr mediante la medida con qPCR.

Tal como es evidente a partir de los datos de qPCR, los genes específicos de hES están sumamente inhibidos (cerca de 1000 veces) en las células RPE obtenidas a partir de hES, mientras que los genes específicos de RPE y neuroectodermo están enormemente estimulados (aproximadamente 100 veces) en las células RPE derivadas de hES.

Además, el análisis mediante qPCR del RPE completamente maduro demostró una expresión de alto nivel de los marcadores específicos de RPE RPE65, Tirosinasa, PEDF, Bestrofina, MitF, y Pax6. Este hallazgo se explica adicionalmente con la ontogenia representada anteriormente, y está de acuerdo con la bibliografía actual sobre la regulación inducida por Pax2 de MitF y la activación posterior de los genes asociados al RPE diferenciado de manera terminal.

Ejemplo de Referencia 4: Expresión de proteínas específicas de RPE identificadas mediante análisis de transferencia de Western

Para validar los resultados de qPCR anteriores, y para identificar las proteínas expresadas exclusivamente en las células RPE, se eligió un subgrupo de marcadores específicos de hES y específicos de RPE como candidatos para el ensayo mediante transferencia de Western, y de ese modo se demuestra la traducción del mensaje detectado mediante PCR. El análisis de Western proporciona una medida absoluta de la solidez de otros ensayos con datos semi-cuantitativos (por medio de densitometría) y cualitativos. Los resultados se representan en la Figura 6. Se usó actina como control de carga de proteínas.

Las células RPE derivadas de células hES no expresaron las proteínas específicas de hES Oct-4, Nanog, y Rex-1, mientras expresaron RPE65, CRALBP, PEDF, Bestrofina, PAX6, y Otx2. Estas proteínas, por lo tanto, son marcadores importantes de las células RPE diferenciadas a partir de células hES. En contraste, las células APRE-19 mostraron un patrón no concluyente de la expresión de marcadores proteómicos.

Ejemplo de Referencia 5: Perfil de la expresión génica con micromatrices de células RPE

Las hRPE diferenciadas a partir de células hES, purificadas manualmente *in vitro* experimentan eventos morfológicos significativos en cultivo durante la fase de expansión. Las suspensiones de células individuales colocadas en placas en cultivos finos se despigmentan, y el área superficial de las células se incrementa. Las células hRPE mantienen esta morfología durante la expansión, cuando las células se están dividiendo rápidamente. Sin embargo, cuando la densidad celular alcanza la capacidad máxima, las RPE toman su forma hexagonal fenotípica característica e incrementan el nivel de pigmentación acumulando melanina y lipofuscina.

El nivel de pigmentación desempeñó un papel importante en el estudio farmacológico en el modelo de rata RCS. Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica global por medio de micromatrices en células hRPE derivadas de las líneas de células hES MA01 y MA09 derivadas de un blastómero individual. Además, se analizaron

como controles líneas de células RPE fetales, ARPE-19, y de retinoblastoma.

Los datos indican que este cambio fenotípico está controlado por un cambio en el patrón de expresión génica global de estas células, específicamente con respecto a la expresión de PAX6, PAX2, Otx2, MitF, y Tyr.

5 La Figura 7 representa un gráfico de dispersión del análisis de los componentes principales de cada muestra basado en el número mínimo de genes que explican la variabilidad entre cada muestra. El Componente 1, que representa un 69% de la variabilidad, representa el tipo celular, mientras el Componente 2 representa la línea celular (es decir, la variabilidad genética). Como se puede observar claramente, una dispersión casi lineal de los perfiles de expresión génica caracteriza el desarrollo ontogénico de las hRPE derivadas de las células hES.

10 Basándose en el análisis ANOVA que compara la línea de células hES respectiva con su homólogo RPE, se seleccionaron los 100 genes expresados a nivel más alto y más bajo, y se llevaron a cabo análisis computacionales para seleccionar los genes relacionados con la pluripotencia y el desarrollo del ojo. Los genes estimulados se muestran en la Tabla 2. Los genes inhibidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2. Genes estimulados de interés informados en las micromatrices

Símbolo del Gen	Nombre del Gen	Asociado con	Descripción
BEST1/ VMD2	bestrofina (distrofia macular viteliforme 2)	desarrollo del RPE	Expresado predominantemente en la membrana basolateral del epitelio pigmentario retiniano. Forma canales de cloruro sensibles a calcio. Puede conducir otros aniones fisiológicamente significativos tales como bicarbonato. Los defectos en BEST1 son la causa de la distrofia macular viteliforme tipo 2 (VMD2); también conocida como distrofia macular de Best (BMD). VMD2 es una forma autosómica dominante de degeneración macular que comienza normalmente en la infancia o adolescencia. VMD2 se caracteriza por lesiones maculares viteliformes típicas debidas a la acumulación anormal de lipofuscina en y debajo de las células del epitelio pigmentado retiniano. La progresión de la enfermedad conduce a la destrucción del epitelio pigmentado retiniano y a la pérdida de visión. Los defectos en BEST1 son una causa de distrofia macular viteliforme de inicio en la madurez (AVMD). AVMD es un trastorno autosómico dominante poco frecuente con una penetrancia incompleta y una expresión sumamente variable. Los pacientes normalmente pasan a ser sintomáticos en la cuarta o quinta década de la vida, con una enfermedad prolongada de agudeza visual disminuida.
CLUL1 (retiniano)	similar a clusterina 1 (retiniano)	desarrollo retiniano	Asociado intensamente con los fotorreceptores de los conos, y aparece en tejidos diferentes a lo largo del desarrollo retiniano.
CRX	homeobox de conos y bastones	desarrollo retiniano	Proteína de homeodominio de tipo emparejado específica de fotorreceptores (conos, bastones), expresada en las células fotorreceptoras en desarrollo y maduras, que se une y transactiva rodopsina, homólogo de ortodenticulo de Drosophila (Otx). Esencial para el mantenimiento de los fotorreceptores de mamífero.
CRYAA	cristalina, alfa A	desarrollo ocular	Las cristalinas son los componentes estructurales dominantes del cristalino del ojo en los vertebrados. Pueden contribuir a la transparencia y al índice refractivo del cristalino. Los defectos en CRYAA son la causa de catarata nuclear central zonular, una de un número considerable de formas diferentes fenotípicamente y genotípicamente de cataratas autosómicas dominantes. Esta catarata congénita es una anomalía importante habitual del ojo que con frecuencia provoca ceguera en recién nacidos. Las cristalinas no se renuevan a medida que el cristalino envejece, lo que proporciona la posibilidad de modificaciones postraduccionales u oxidaciones. Estas modificaciones pueden cambiar las propiedades de solubilidad de las cristalinas, y favorecen la catarata senil.

CRYBA1	cristalina, beta A1	desarrollo ocular	Las cristalinas son los componentes estructurales dominantes del cristalino del ojo en los vertebrados. Las cristalinas no se renuevan a medida que el cristalino envejece, lo que proporciona la posibilidad de modificaciones postraduccionales u oxidaciones. Estas modificaciones pueden cambiar las propiedades de solubilidad de las cristalinas, y favorecen la catarata senil.
CRYBA2	cristalina, beta A2	desarrollo ocular	Las cristalinas son los componentes estructurales dominantes del cristalino del ojo en los vertebrados. Las cristalinas no se renuevan a medida que el cristalino envejece, lo que proporciona la posibilidad de modificaciones postraduccionales u oxidaciones. Estas modificaciones pueden cambiar las propiedades de solubilidad de las cristalinas, y favorecen la catarata senil.
CRYBA4	cristalina, beta A4	desarrollo ocular	Las cristalinas son los componentes estructurales dominantes del cristalino del ojo en los vertebrados. Los defectos en CRYBA4 son la causa de catarata lamelar tipo 2. Las cataratas son una causa importante de ceguera en todo el mundo, que afecta a todas las sociedades. Una proporción significativa de casos están determinados genéticamente. Se han identificado más de 15 genes relacionados con las cataratas, de los cuales los genes de las cristalinas son los que están mutados con más frecuencia. La catarata lamelar 2 es una catarata congénita autosómica dominante. Los defectos en CRYBA4 son una causa de microftalmia aislada con cataratas tipo 4 (MCOPCT4). La microftalmia consiste en un defecto del desarrollo que provoca una reducción moderada o grave del tamaño del ojo. También puede estar presente la opacidad de la córnea y del cristalino, la cicatrización de la retina y del coroides, y otras anomalías como cataratas. Las cristalinas no se renuevan a medida que el cristalino envejece, lo que proporciona la posibilidad de modificaciones postraduccionales u oxidaciones. Estas modificaciones pueden cambiar las propiedades de solubilidad de las cristalinas, y favorecen la catarata senil.
CRYBB1	cristalina, beta B1	desarrollo ocular	Las cristalinas son los componentes estructurales dominantes del cristalino del ojo en los vertebrados.
CRYBB2	cristalina, beta B2	desarrollo ocular	Las cristalinas son los componentes estructurales dominantes del cristalino del ojo en los vertebrados. Los defectos en CRYBB2 son la causa de catarata cerúlea congénita tipo 2 (CCA2); también conocida como catarata azul congénita tipo 2. CCA2 es una forma de catarata congénita autosómica dominante (ADCC). Las cataratas cerúleas tienen opacificaciones periféricas azuladas y blancas en capas concéntricas con lesiones centrales ocasionales dispuestas radialmente. Aunque las opacidades se pueden observar durante el desarrollo fetal y la infancia, normalmente la agudeza visual está reducida solamente levemente hasta la madurez, cuando normalmente es necesaria la extracción del cristalino. Los defectos en CRYBB2 son la causa de la catarata sutural con opacidades puntiformes y cerúleas (CSPC). El fenotipo asociado a esta forma de catarata congénita autosómica dominante difirió de todas las demás formas de cataratas informadas. Los defectos en CRYBB2 son una causa de cataratas de tipo Coppock (CCL). Las cristalinas no se renuevan a medida que el cristalino envejece, lo que proporciona la posibilidad de modificaciones postraduccionales u oxidaciones.

CRYBB3	cristalina, beta B3	desarrollo ocular	Las cristalininas son los componentes estructurales dominantes del cristalino del ojo en los vertebrados. Los defectos en CRYBB3 son la causa de catarata nuclear congénita autosómica recesiva 2 (CATCN2); una forma de catarata congénita no sindrómica. Las cataratas congénitas no sindrómicas varían notablemente en gravedad y morfología, afectan a la parte nuclear, cortical, polar, o subcapsular del cristalino o, en casos graves, a todo el cristalino, con una diversidad de tipos de opacidad. Son una de las causas principales de pérdida de visión en niños en todo el mundo, y son responsables de aproximadamente un tercio de las cegueras en recién nacidos. Las cataratas congénitas pueden conducir a ceguera permanente por la interferencia con el enfoque nítido de la luz en la retina durante intervalos del desarrollo cruciales. Las cristalininas no se renuevan a medida que el cristalino envejece, lo que proporciona la posibilidad de modificaciones postraduccionales u oxidaciones. Estas modificaciones pueden cambiar las propiedades de solubilidad de las cristalininas, y favorecen la catarata senil.
DCT/TYRP2	dopacromo tautomerasa (dopacromo delta-isomerasa, proteína relacionada con tirosina 2)	células pigmentadas	Metabolismo de tirosina y biosíntesis de melanina.
LHX2	LIM homeobox 2	desarrollo/ diferenciación	Proteína reguladora transcripcional implicada en el control de la diferenciación celular en tipos celulares linfoides y neuronales en desarrollo.
LIM2	proteína de la membrana intrínseca del cristalino 2, 19 kDa	desarrollo ocular	Presente en las uniones más gruesas de 16-17 nm de las células de las fibras del cristalino en mamíferos, en donde puede contribuir a la organización de las uniones celulares. Actúa como receptor para calmodulina. Puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del cristalino y en la cataratogénesis.
MITF	factor de transcripción asociado a microftalmia	desarrollo del RPE	Factor de transcripción para tirosinasa y proteína relacionada con tirosinasa 1. Se une a una secuencia de ADN simétrica (cajas E) (5'-CACGTG-3') hallada en el promotor de tirosinasa. Desempeña un papel crucial en la diferenciación de diversos tipos de células, como melanocitos derivados de la cresta neural, mastocitos, osteoclastos y epitelio pigmentado retiniano derivado de la cúpula óptica. Sumamente expresado en el epitelio pigmentado retiniano.
OCA2	albinismo oculocutáneo II (homólogo de dilución de ojo rosa, ratón)	células pigmentadas	Podría estar implicado en el transporte de tirosina, el precursor para la síntesis de melanina, en el melanocito. Regula el pH del melanosoma y la maduración del melanosoma. Uno de los componentes del sistema pigmentario de mamíferos. Parece regular el procesamiento postraduccionales de tirosinasa, que cataliza la reacción limitante en la síntesis de melanina. Puede servir como punto de control clave en el que se determina la variación étnica del color de la piel. Determinante principal del color de ojo marrón y/o azul. Los defectos en OCA2 son la causa de albinismo oculocutáneo tipo II (OCA2). OCA2 es una forma autosómica recesiva de albinismo, un trastorno de la pigmentación de la piel, pelo, y ojos. El fenotipo de los pacientes con OCA2 en general es algo menos grave que en los deficientes de tirosinasa OCA1. Hay varias formas de OCA2, desde el OCA típico hasta el "albinismo ocular autosómico recesivo" (AROA) relativamente leve. OCA2 es el tipo más prevalente de albinismo en todo el mundo. El gen OCA2 está localizado en el cromosoma 15 en 15q11.2-q12

OPN3	opsina 3	desarrollo ocular	Puede desempeñar un papel en la fotorrecepción encefálica. Se expresa intensamente en el cerebro. Se expresa intensamente en el área preóptica y en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Muestra una expresión con una pauta clara en otras regiones del cerebro, y se enriquece en regiones seleccionadas de la corteza cerebral, células de Purkinje cerebelares, un subgrupo de neuronas estriadas, núcleos talámicos seleccionados, y un subgrupo de interneuronas del asta anterior de la médula espinal.
OPN5	opsina 5	desarrollo ocular	Asociada con la percepción visual y la fototransducción.
OTX2	homólogo de ortodenticulo 2 (Drosophila)	desarrollo retiniano	Probablemente desempeña un papel en el desarrollo del cerebro y los órganos sensoriales. Los defectos en OTX2 son la causa de la microftalmia síndromica 5 (MCOPS5). La microftalmia es un trastorno clínicamente heterogéneo de la formación del ojo, que oscila desde un tamaño pequeño de un único ojo hasta una ausencia bilateral completa de los tejidos oculares. Hasta un 80% de los casos de microftalmia se dan junto con síndromes que incluyen anomalías no oculares tales como defectos cardíacos, hendiduras faciales, microcefalia e hidrocefalia. Los pacientes con MCOPS5 manifiestan microftalmia unilateral o bilateral/anofthalmia clínica y características adicionales variables que incluyen coloboma, microcórnea, catarata, distrofia retiniana, hipoplasia o agénesis del nervio óptico, agénesis del cuerpo caloso, retraso del desarrollo, laxitud articular, hipotonía, y convulsiones.
PAX6	gen Paired-box 6 (aniridia, queratitis)	desarrollo del RPE	Factor de transcripción con funciones importantes en el desarrollo del ojo, nariz, sistema nervioso central y páncreas. Necesario para la diferenciación de las células alfa de los islotes pancreáticos (por similitud). Compite con PAX4 en la unión a un elemento habitual en los promotores de glucagón, insulina y somatostatina (por similitud). La isoforma 5a parece funcionar como un interruptor molecular que especifica los genes objetivo. Los defectos en Pax6 dan como resultado varios defectos y malformaciones del ojo.
PHC2	similar a polihomeótica 2 (Drosophila)	desarrollo/ diferenciación	Componente del complejo PRC1 de multiproteínas del grupo Polycomb (PcG), un complejo necesario para mantener el estado represivo transcripcional de muchos genes, que incluyen los genes Hox, a lo largo del desarrollo. El complejo PRC1 pcG actúa por medio de la remodelación de la cromatina y la modificación de histonas; media en la monoubiquitinación de la histona H2A "Lys-119", lo que cambia de manera heredable el grado de expresión de la cromatina.
PKNOX2	PBX/Homeobox 2 anudado 1	desarrollo/ diferenciación	Se sabe que está implicado en el desarrollo y puede controlar, junto con MEIS, Pax6.
PRKCA	proteína quinasa C, alfa	señalización celular	Muy importante para las rutas de señalización celular, tales como las rutas de MAPK, Wnt, PI3, VEGF y Calcio.
PROX1	homeobox relacionado con prospero 1	desarrollo ocular	Puede desempeñar un papel fundamental en el desarrollo temprano del SNC. Puede regular la expresión génica y el desarrollo de neuronas jóvenes indiferenciadas posmitóticas. Sumamente expresado en el cristalino, la retina, y el páncreas.
PRRX1	homeobox de tipo emparejado 1	desarrollo/ diferenciación	Necesario para el desarrollo. Coactivador de la transcripción, que incrementa la actividad de unión al ADN del factor de respuesta del suero.
RAI1	ácido retinoico inducido 1	desarrollo/ diferenciación	Puede funcionar como un regulador transcripcional. Regula la transcripción por medio de la remodelación de la cromatina interaccionando con otras proteínas de la cromatina, así como proteínas de la maquinaria transcripcional básica. Puede ser importante para el desarrollo embrionario y posnatal. Puede estar implicado en la diferenciación neuronal.

RARA	receptor de ácido retinoico, alfa	desarrollo/ diferenciación	Es un receptor de ácido retinoico. Este metabolito tiene efectos profundos en el desarrollo de vertebrados. Este receptor controla la función celular regulando directamente la expresión génica.
RARB	receptor de ácido retinoico, beta	desarrollo/ diferenciación	Es un receptor de ácido retinoico. Este metabolito tiene efectos profundos en el desarrollo de vertebrados. Este receptor controla la función celular regulando directamente la expresión génica.
RARRES1	molécula de respuesta al receptor de ácido retinoico (inducido por tazaroteno) 1	desarrollo/ diferenciación	Asociado con la diferenciación y el control de la proliferación celular. Puede ser un regulador del crecimiento que media algunos de los efectos supresores del crecimiento de los retinoides.
RAX	homeobox de la retina y del pliegue neural anterior	desarrollo ocular	Desempeña un papel crucial en la formación del ojo regulando la especificación inicial de las células retinianas y/o su proliferación posterior. Se une al elemento conservado de fotorreceptores I (PCE-1/Ret 1) en el promotor de arrestina específico de células fotorreceptoras.
RB1	retinoblastoma 1 (que incluye osteosarcoma)	desarrollo/ diferenciación	Un regulador importante de otros genes y del crecimiento celular. Los defectos en RB1 son la causa del retinoblastoma infantil (RB). RB es un tumor maligno congénito que surge en las capas nucleares de la retina.
RDH5	retinol deshidrogenasa 5 (11-cis/9-cis)	desarrollo del RPE	retinol deshidrogenasa 5,11-cis, expresada en el epitelio pigmentado retiniano, anteriormente RDH1. 11-cis retinol deshidrogenasa estereoespecífica, que cataliza la etapa final en la biosíntesis de 11-cis retinaldehído, el cromóforo universal de los pigmentos visuales. Abundante en el epitelio pigmentado retiniano. Los defectos en RDH5 son una causa de fundus albipunctatus (FA). FA es una forma poco frecuente de ceguera nocturna estacionaria caracterizada por un retraso en la regeneración de los fotopigmentos de los conos y los bastones.
RGR	receptor acoplado a proteína G retiniana	desarrollo del RPE	Preferentemente expresado a niveles elevados en el epitelio pigmentado retiniano (RPE) y en las células de Mueller de la retina neural. Relacionado con la opsina retiniana, (homólogo de rodopsina) expresada en el epitelio pigmentado retiniano, que codifica un retinaldehído, preferentemente retinal todo-trans, proteína de unión, superfamilia de receptores acoplados a proteína G.
RLBP1/CRA LBP1	proteína de unión a retinaldehído 1	desarrollo del RPE	Porta 11-cis-retinol y 11-cis-retinaldehído como ligandos endógenos y puede ser un componente funcional del ciclo visual. Los defectos en RLBP1 son una causa de la retinosis pigmentaria autosómica recesiva (arRP). La retinosis pigmentaria (RP) conduce a la degeneración de las células fotorreceptoras retinianas. Los defectos en RLBP1 son la causa de distrofia retiniana de Bothnia, también conocida como distrofia de Vasterbotten. Es otra forma de retinosis pigmentaria autosómica recesiva. Los defectos en RLBP1 son la causa de distrofia de conos-bastones de Newfoundland (NFRCD). NFRCD es una distrofia retiniana reminiscente de la retinitis punctata albescens, pero con una edad sustancialmente inferior de inicio y una progresión más rápida y característica.
RPE65	proteína específica del epitelio pigmentado retiniano de 65 kDa	desarrollo del RPE	Específico del epitelio pigmentado retiniano. La proteína específica del epitelio pigmentado retiniano 65, principalmente microsomal, tiene un papel menor en la isomerización del retinal todo trans a 11-cis, asociada con el retículo endoplásmico, también expresada en las células tumorales renales. Desempeña papeles importantes en la producción de 11-cis retinal y en la regeneración pigmentaria visual.

RRH	homólogo de rodopsina derivado del epitelio pigmentario retiniano	desarrollo del RPE	Hallado solamente en el ojo, donde se localiza en el epitelio pigmentario retiniano (RPE). En el RPE, se localiza en las microvellosidades que rodean los segmentos externos de los fotorreceptores. Puede desempeñar un papel en la fisiología del RPE detectando la luz directamente o monitorizando la concentración de retinoides u otros compuestos derivados de fotorreceptores.
RTN1	reticulon 1	desarrollo/ diferenciación	Expresado en los tejidos neuronales y neuroendocrinos y en los cultivos celulares derivados de ellos. La expresión de la isoforma RTN1-C se correlaciona claramente con la diferenciación neuronal.
RXRB	receptor de retinoide X, beta	desarrollo/ diferenciación	Receptor de hormonas nuclear. Implicado en la ruta de respuesta a ácido retinoico. Se une a ácido 9-cis retinoico (9C-RA), miembro obligado de los receptores nucleares heterodiméricos, superfamilia de receptores esteroides/tiroides/retinoicos.
RXRG	receptor de retinoide X, gamma	desarrollo/ diferenciación	Receptor de hormonas nuclear. Implicado en la ruta de respuesta a ácido retinoico. Se une a ácido 9-cis retinoico (9C-RA), miembro obligado de los receptores nucleares heterodiméricos, superfamilia de receptores esteroides/tiroides/retinoicos.
SERPINF1/ PEDF	inhibidor de serpina peptidasa, clado F (antiplasmina alfa-2, factor derivado de epitelio pigmentario), miembro 1	desarrollo del RPE	Expresión específica en las células epiteliales pigmentarias retinianas y el plasma sanguíneo. Proteína neurotrófica; induce una diferenciación neuronal exhaustiva en las células de retinoblastoma.
SIX3	sine oculis homeobox homólogo 3 (Drosophila)	desarrollo ocular	Expresado durante el desarrollo ocular en la línea media del prosencéfalo y en la región anterior de la placa neural, especialmente en la retina interna y más tarde en las células ganglionares y en las células de la capa nuclear interna, implicado en la regulación del desarrollo ocular.
SOX10	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 10	desarrollo/ diferenciación	Factor de transcripción que parece funcionar de manera sinérgica con otras proteínas asociadas al desarrollo. Podría conferir especificidad celular a la función de otros factores de transcripción en la glía en desarrollo y madura.
SOX5	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 5	desarrollo/ diferenciación	La expresión está asociada con el desarrollo craneofacial, esquelético y de cartílagos, y se expresa a alto nivel en cerebro, testículo y diversos tejidos.
SOX6	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 6	desarrollo/ diferenciación	La expresión está asociada con el desarrollo craneofacial, esquelético y de cartílagos, y se expresa a alto nivel en cerebro, testículo y diversos tejidos.
SOX8	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 8	desarrollo/ diferenciación	Puede desempeñar un papel en el desarrollo facial, del sistema nervioso central, y las extremidades.
SOX9	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)	desarrollo/ diferenciación	Desempeña un papel importante en el desarrollo normal. Puede regular la expresión de otros genes implicados en la formación esquelética y de cartílagos actuando como factor de transcripción para estos genes.

TIMP3	Inhibidor de TIMP metalopeptidasa 3 (distrofia del fondo de ojo de Sorsby, pseudoinflamatoria)	desarrollo del RPE	Metaloproteínasa de la matriz, inhibidor tisular 3, expresado en el epitelio pigmentario retiniano, placenta, localizado en la matriz extracelular. Se compleja con metaloproteínasas (tales como colagenasas) y las inactiva irreversiblemente. Puede formar parte de una respuesta aguda específica de tejido a estímulos de remodelación. Los defectos en TIMP3 son la causa de la distrofia de fondo de ojo de Sorsby (SFD). SFD es un trastorno macular autosómico dominante poco frecuente, con una edad de inicio en la cuarta década. Se caracteriza por la pérdida de la visión central por la neovascularización subretiniana y la atrofia de los tejidos oculares.
TTR	transtiretina (prealbúmina, amiloidosis tipo I)		Proteína de unión a hormona tiroidea. Probablemente transporta tiroxina del torrente sanguíneo al cerebro. Los defectos en TTR son la causa de la amiloidosis VII; también conocida como amiloidosis leptomeníngea o amiloidosis meningocerebrovascular. La amiloidosis leptomeníngea es diferente de otras formas de amiloidosis por transtiretina porque exhibe una implicación primaria del sistema nervioso central. El examen neuropatológico muestra amiloide en las paredes de los vasos leptomeníngeos, en depósitos en la pía aracnoide, y subpiales. Algunos pacientes también desarrollan depósitos amiloides vítreos que conducen a deterioro visual (amiloidosis oculoleptomeníngea).
TYR	tirosinasa (albinismo oculocutáneo IA)	células pigmentadas	Esta es una oxidasa que contiene cobre que funciona en la formación de pigmentos, tales como melaninas y otros compuestos polifenólicos. Los defectos en TYR son la causa del albinismo oculocutáneo tipo IA (OCA-IA). OCA-I, también conocido como albinismo oculocutáneo negativo para tirosinasa, es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por la ausencia de pigmento en pelo, piel y ojos. OCA-I se divide en 2 tipos: tipo IA, caracterizado por la carencia completa de actividad tirosinasa debido a la producción de una enzima inactiva, y tipo IB, caracterizado por una actividad reducida de tirosinasa. Los pacientes de OCA-IA presentan una ausencia durante toda su vida del pigmento melanina tras el parto, y manifiestan una sensibilidad incrementada a la radiación ultravioleta y una predisposición al cáncer de piel. Los defectos en TYR son la causa del albinismo oculocutáneo tipo IB (OCA-IB); también conocido como albinismo tipo mutante amarillo. Los pacientes de OCA-IB tienen pelo blanco en el parto, que rápidamente se vuelve amarillo o rubio.
TYRP1	proteína relacionada con tirosinasa 1	células pigmentadas	Expresión específica en células pigmentarias. Oxidación de ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) en ácido indol-5,6-quinona-2-carboxílico. Puede regular o influir en el tipo de melanina sintetizada. Los defectos en TYRP1 son la causa del albinismo oculocutáneo de Rufous (ROCA). ROCA se da en negros, y se caracteriza por una coloración roja cobriza brillante de la piel y del pelo y la dilución del color del iris. Los defectos en TYRP1 son la causa de albinismo oculocutáneo tipo III (OCA-III); también conocido como OCA3. OCA-III es una forma de albinismo con una reducción solamente moderada de pigmento. Los individuos con OCA-III se reconocen por su piel rojiza y el color del pelo.

Tabla 3. Genes inhibidos de interés informados en las micromatrices

Símbolo del Gen	Nombre del Gen	Asociado con	Descripción
ALPL	fosfatasa alcalina	células ES	La expresión elevada de esta enzima está asociada con la célula madre pluripotente indiferenciada.
CECR2	región del cromosoma del síndrome de ojo de gato, candidato 2		Parte del complejo CERF (factor de remodelación que contiene CECR2), que facilita la perturbación de la estructura de la cromatina de una manera dependiente de ATP. Puede estar implicado por medio de su interacción con LRPPRC en la integración de la red citoesquelética con el tráfico vesicular, el transporte nucleocitosólico, la transcripción, la remodelación cromosómica y la citocinesis. Los trastornos del desarrollo están asociados con la duplicación del gen.
DCAMKL1	doblecortina y CaM quinasa tipo 1	Desarrollo embrionario	Probable quinasa que puede estar implicada en un ruta de señalización de calcio que controla la migración neuronal en el cerebro en desarrollo.
DPPA2	proteína asociada a pluripotencia del desarrollo 2	células ES	Puede desempeñar un papel en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular.
DPPA3	proteína asociada a pluripotencia del desarrollo 3	células ES	Puede desempeñar un papel en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular.
DPPA4	proteína asociada a pluripotencia del desarrollo 4	células ES	Puede indicar la pluripotencialidad celular.
DPPA5/ Esg1	proteína asociada a pluripotencia del desarrollo 5/gen específico de células madre embrionarias 1	células ES	Marcador de células madre embrionarias.
FOXD3	caja Forkhead D3	Pluripotencia	Necesario para el mantenimiento de las células pluripotentes en las etapas de pre-implantación y peri-implantación de la embriogénesis.
L1TD1ECAT 11	Transcrito asociado a células 1/ES 11 que contiene un dominio transposasa tipo LINE-1	células ES	Marcador de células madre embrionarias.
NANOG	homeobox Nanog	células ES	Marcador de células madre embrionarias. Regulador de la transcripción implicado en la proliferación de la masa celular interna y las células madre embrionarias (ES) y la auto-renovación. Impone la pluripotencia en las células ES y previene su diferenciación hacia los linajes de endodermo y trofotodermo extraembrionario.
NCAM1	molécula de adhesión celular neuronal 1	Neuroprogenitores	Esta proteína es una molécula de adhesión celular implicada en la adhesión neurona-neurona, la fasciculación de neuritas, el brote de neuritas, etc.
NES/ Nestina	nestina	células ES	Células progenitoras neuronales.
NODAL	nodal	Desarrollo embrionario	Esencial para la formación del mesodermo y la formación del patrón axial durante el desarrollo embrionario.

ES 2 764 473 T3

NR5A2/FTF	subfamilia de receptores nucleares 5, grupo A, miembro 2	Desarrollo embrionario	Puede contribuir al desarrollo y la regulación de genes específicos del hígado y del páncreas y desempeñar papeles importantes en el desarrollo embrionario.
POU5F1/Oct-3/4	dominio POU, clase 5, factor de transcripción 1	células ES	Marcador de células madre embrionarias. Indicador de "troncalidad". Factor de transcripción que se une al motivo octamérico (5'-ATTTGCAT-3'). Candidato principal para un gen de control del desarrollo temprano.
SOX17	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 17	Inhibidor de la diferenciación	Regulador negativo de la ruta de señalización de Wnt.
SOX2	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 2	células ES	Indicador de "rigurosidad". Expresado en la masa celular interna, el ectodermo primitivo y el SNC en desarrollo.
TBX3	T-box 3 (síndrome ulnar mamario)	Desarrollo embrionario	Represor transcripcional implicado en procesos del desarrollo. Homólogo del gen T-box murino Tbx3 (T, braquiuria), supuesto factor de transcripción, emparejado con TBX5, homólogo al gen optomotor-ceguera (omb) de Drosophila, implicado en el desarrollo del lóbulo óptico y las alas, implicado en la regulación del desarrollo, expresado en las extremidades anteriores y posteriores de embriones de ratón, expresado de manera generalizada en los adultos
TDGF1/Cripto-1	factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma 1	células ES	Indicador de "rigurosidad". Podría desempeñar un papel en la determinación de las células epiblasticas que dan lugar posteriormente al mesodermo.
TEK/VMCM	TEK tirosina quinasa, endotelial (malformaciones venosas, múltiples cutáneas y mucosas)	Progenitores endoteliales tempranos	Esta proteína es una proteína receptor transmembrana con tirosina quinasa para angiopoyetina 1. Puede constituir el marcador de linaje celular endotelial mamífero más temprano. Probablemente regula la proliferación celular endotelial, la diferenciación y guía la formación del patrón adecuado de células endoteliales durante la formación de vasos sanguíneos
TUBB2A, TUBB2B	tubulina, beta 2A, tubulina, beta 2B	neuroprogenitores	La tubulina es el constituyente principal de los microtúbulos. Se une a dos moles de GTP, uno en un sitio intercambiable en la cadena beta y uno en un sitio no intercambiable en la cadena alfa. A menudo asociado con la formación de uniones en hendidura en las células neuronales.
TUBB2A, TUBB2B, TUBB2C, TUBB3, TUBB4	tubulina, beta 2A, tubulina, beta 2B, tubulina, beta 2C, tubulina, beta 3, tubulina, beta 4	neuroprogenitores	La tubulina es el constituyente principal de los microtúbulos. Se une a dos moles de GTP, uno en un sitio intercambiable en la cadena beta y uno en un sitio no intercambiable en la cadena alfa. A menudo asociado con la formación de uniones en hendidura en las células neuronales.
TUBB3	tubulina, beta 3	neuroprogenitores	La tubulina es el constituyente principal de los microtúbulos. Se une a dos moles de GTP, uno en un sitio intercambiable en la cadena beta y uno en un sitio no intercambiable en la cadena alfa. A menudo asociado con la formación de uniones en hendidura en las células neuronales.
TWIST1	homólogo Twist 1	Inhibidor de la diferenciación	Probable factor de transcripción, que regula negativamente la determinación y diferenciación celular.

UTF1	factor de transcripción de células embrionarias indiferenciadas 1	células ES	Marcador de células madre embrionarias. Actúa como un coactivador transcripcional de ATF2.
VSNL1	visinina tipo 1	Inhibidor de rodopsina	Regula la inhibición de la fosforilación de rodopsina.
ZFP42/Rex-1	proteína de dedo de zinc 42	células ES	Marcador de células madre embrionarias.

La presente descripción demuestra que las células RPE humanas se pueden diferenciar y expandir de manera fiable a partir de células ES humanas en condiciones bien definidas y reproducibles, que representan una fuente inagotable de células para los pacientes con trastornos degenerativos retinianos. La concentración de estas células no estaría limitada por la disponibilidad, sino que se podría titular para las necesidades clínicas precisas del individuo. También sería posible la infusión o trasplante repetido de la misma población de células a lo largo de la vida del paciente si el médico lo considerase necesario. Además, la capacidad de crear bancos de líneas de hES de HLA coincidente o de complejidad de HLA reducida a partir de las cuales se pudieran producir células RPE potencialmente podría reducir o eliminar totalmente la necesidad de fármacos inmunosupresores y/o protocolos inmunomoduladores.

Esta descripción también demuestra que las células RPE diferenciadas mediante los métodos descritos en la presente memoria expresan múltiples genes que no se expresan en las células hES, las células RPE fetales, o las células ARPE-19. La huella molecular exclusiva de mRNA y la expresión de proteínas en las células RPE derivadas de células ES de la invención constituye un grupo de marcadores, tales como RPE-65, Bestrofina, PEDF, CRABLP, Otx2, Mit-F, PAX6 y PAX2, que hacen que estas células RPE sean diferentes de las células de la técnica, tales como las células hES, las células ARPE-19, y las células RPE fetales.

Ejemplo de Referencia 6: Restablecimiento de la función visual mediante el uso de células RPE de derivadas de células madre embrionarias

Ciertas enfermedades retinianas se caracterizan por la degeneración del epitelio pigmentario retiniano (RPE), lo que a su vez da como resultado la pérdida de fotorreceptores. Los ejemplos incluyen la distrofia macular de Stargardt en los seres humanos y la distrofia determinada genéticamente en la rata del Royal College of Surgeons (RCS). Tal proceso también puede desempeñar un papel en la degeneración macular, que afecta a más de 10 millones de personas solamente en los EE.UU.

Se investigaron las condiciones en las que las células RPE humanas sumamente caracterizadas derivadas de líneas de células madre embrionarias y fabricadas en condiciones que cumplieran las BPF pudieron rescatar de manera óptima la función visual en la rata RCS. Se inyectaron células RPE derivadas de MA01 y MA09 en el espacio subretiniano de ratas RCS de 23 días de vida (P23), mantenidas postoperatoriamente con inmunosupresión con ciclosporina A oral. La eficacia funcional se analizó mediante la agudeza optomotora umbral y los umbrales de luminancia registrados en el colículo superior. Todos los ojos tratados se compararon con ojos con simulación de inyección y sin tratar. El examen histológico se llevó a cabo tras estos estudios funcionales.

Los resultados experimentales mostraron una dosis-respuesta clara en ratas RCS. La administración de una preparación que comprendió 5×10^4 células RPE solamente proporcionó umbrales optomotores ligeramente mejores que los tratamientos simulados, mientras una preparación que comprendió 2×10^5 células RPE proporcionó un rendimiento mejorado frente a los controles. Las preparaciones que comprendieron 5×10^5 células RPE produjeron un rendimiento superior que se mantuvo a lo largo del tiempo. Los animales mostraron un umbral de 0,48 c/d a P60, significativamente mejor ($p < 0,001$) que los tratamientos simulados (0,26 c/d), y algunos ojos tratados mostraron umbrales normales (0,6 c/d) y por encima de 0,5 c/d en los mejores casos a P90 (los animales con tratamiento simulado y sin tratar proporcionaron una cantidad de 0,16 c/d, un nivel que indicó un deterioro visual sustancial).

Los registros en el colículo superior a P94 también mostraron respuestas de umbrales de luminancia mucho menores en los ojos a los que se inyectaron células RPE, con ciertos registros individuales en el intervalo normal. Los estudios histológicos mostraron las células donantes dispuestas en forma de una capa semi-continua de células pigmentadas, en posición inmediatamente interna respecto del RPE endógeno del hospedador. Las células RPE donantes fueron positivas para RPE65 y bestrofina, lo que indica que las células trasplantadas fueron células RPE, y que las células mantienen su destino celular tras el trasplante.

Además, los animales trasplantados mantuvieron el grosor de fotorreceptores en comparación con los animales de control. Los fotorreceptores en los animales con tratamiento con RPE tuvieron un grosor de 4-5 células en el área rescatada, comparado con solamente una única capa en los controles simulados y sin tratar.

Los resultados indican que las células RPE bien caracterizadas derivadas de células madre embrionarias y fabricadas

en condiciones de BPF sobreviven tras el trasplante al espacio subretiniano de ratas RCS, no migran a la retina y continúan expresando moléculas características de RPE. De manera más importante, alcanzan un restablecimiento significativo de la función visual de una manera dependiente de la dosis en un modelo animal de degeneración de fotorreceptores. Los datos sugieren además que estas células pueden ser eficaces para limitar y/o revertir el deterioro de la visión que acompaña a la degeneración de los fotorreceptores mediada por RPE en una enfermedad humana.

Referencias

- Strauss, O., Stumpff, F., Mergler, S., Wienrich, M. y Wiederholt, M. The Royal College of Surgeons, rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect. *Acta anatomica* 162, 101-111 (1998).
- McLaren, M.J., An, W., Brown, M.E. y Inana, G. Analysis of basic fibroblast growth factor in rats with inherited retinal degeneration. *FEBS letters* 387, 63-70 (1996).
- McHenry, C.L., *et al.* MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 45, 1456-1463 (2004).
- Duncan, J.L., *et al.* An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 44, 826-838 (2003).
- Vollrath, D., *et al.* Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of MerTK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12584-12589 (2001).
- Gal, A., *et al.* Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature genetics* 26, 270-271 (2000).
- D'Cruz, P.M., *et al.* Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MerTK in the retinal dystrophic RCS rat. *Human molecular genetics* 9, 645-651 (2000).
- Piesse, C., *et al.* Expression of aminopeptidase B in the developing and adult rat retina. *Exp Eye Res* 79, 639-648 (2004).
- Craitoiu, S. y Florescu, M. [The development of the pigment epithelium and its interrelation with uveal pigment cells]. *Oftalmologia* 41, 12-14 (1997).
- Mitashov, V.I. [Cell sources, regulatory factors and gene expression in the regeneration of the crystalline lens and retina in vertebrate animals]. *Izvestiia Akademii nauk*, 298-318 (1996).
- Grefenstette, J., Kim, S. y Kauffman, S. An analysis of the class of gene regulatory functions implied by a biochemical model. *Biosystems* 84, 81-90 (2006).
- Melnick, M., Chen, H., Min Zhou, Y. y Jaskoll, T. The functional genomic response of developing embryonic submandibular glands to NF-kappa B inhibition. *BMC developmental biology* 1, 15 (2001).
- Palumbo, M.C., Colosimo, A., Giuliani, A. y Farina, L. Essentiality is an emergent property of metabolic network wiring. *FEBS letters* 581, 2485-2489 (2007).
- Papin, J.A., Price, N.D., Edwards, J.S. y Palsson, B.B. The genome-scale metabolic extreme pathway structure in *Haemophilus influenzae* shows significant network redundancy. *J Theor Biol* 215, 67-82 (2002).
- Price, N.D., Papin, J.A. y Palsson, B.O. Determination of redundancy and systems properties of the metabolic network of *Helicobacter pylori* using genome-scale extreme pathway analysis. *Genome research* 12, 760-769 (2002).
- Yun, A.J., Lee, P.Y. y Doux, J.D. Efficient inefficiency: biochemical "junk" may represent molecular bridesmaids awaiting emergent function as a buffer against environmental fluctuation. *Medical hypotheses* 67, 914-921 (2006).
- Federici, D. y Downing, K. Evolution and development of a multicellular organism: scalability, resilience, and neutral complexification. *Artificial life* 12, 381-409 (2006).
- Csermely, P., Soti, C. y Blatch, G.L. Chaperones as parts of cellular networks. *Advances in experimental medicine and biology* 594, 55-63 (2007).
- Gillies, R.J. y Gatenby, R.A. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr* (2007).
- Henshall, D.C. y Murphy, B.M. Modulators of neuronal cell death in epilepsy. *Curr Opin Pharmacol* (2007).
- Mekel-Bobrov, N., *et al.* The ongoing adaptive evolution of ASPM and Microcephalin is not explained by increased intelligence. *Human molecular genetics* 16, 600-608 (2007).

- Moudy, R.M., Meola, M.A., Morin, L.L., Ebel, G.D. y Kramer, L.D. A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by *Culex* mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77, 365-370 (2007).
- 5 Sánchez, J.A., Aguilar, C., Dorado, D. y Manrique, N. Phenotypic plasticity and morphological integration in a marine modular invertebrate. *BMC Evol Biol* 7, 122 (2007).
- Marc, R.E., Jones, B.W., Watt, C.B. y Strettoi, E. Neural remodeling in retinal degeneration. *Progress in retinal and eye research* 22, 607-655 (2003).
- Yeo, S., *et al.* Characterization of DNA methylation change in stem cell marker genes during differentiation of human embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 359, 536-542 (2007).
- 10 Wang, Z.X., *et al.* Zfp206 is a transcription factor that controls pluripotency of embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 2173-2182 (2007).
- Ulloa-Montoya, F., *et al.* Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol* 8, R163 (2007).
- 15 Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N. y Suemori, H. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene* 26, 5564-5576 (2007).
- Lavial, F., *et al.* The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development (Cambridge, Inglaterra)* 134, 3549-3563 (2007).
- Greco, S.J., Liu, K. y Rameshwar, P. Functional Similarities among Genes Regulated by OCT4 in Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* (2007).
- 20 Babaie, Y., *et al.* Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 500-510 (2007).
- Zhang, X., *et al.* Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 2669-2676 (2006).
- 25 Xiao, L., Yuan, X. y Sharkis, S.J. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 1476-1486 (2006).
- Player, A., *et al.* Comparisons between transcriptional regulation and RNA expression in human embryonic stem cell lines. *Stem cells and development* 15, 315-323 (2006).
- Pereira, L., Yi, F. y Merrill, B.J. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol* 26, 7479-7491 (2006).
- 30 O'Neill, L.P., VerMilyea, M.D. y Turner, B.M. Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nature genetics* 38, 835-841 (2006).
- Lagarkova, M.A., Volchkov, P.Y., Lyakisheva, A.V., Philonenko, E.S. y Kiselev, S.L. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5, 416-420 (2006).
- 35 He, S., *et al.* Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. *Molecular reproduction and development* 73, 1512-1522 (2006).
- De Jong, J., Weeda, S., Gillis, A.J., Oosterhuis, J.W. y Looijenga, L.H. Differential methylation of the OCT3/4 upstream region in primary human testicular germ cell tumors. *Oncol Rep* 18, 127-132 (2007).
- Hattori, N., *et al.* Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells* 12, 387-396 (2007).
- 40 Hellman, A. y Chess, A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science (Nueva York, N. Y.)* 315, 1141-1143 (2007).
- Ohm, J.E., *et al.* A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nature genetics* 39, 237-242 (2007).
- 45 Mitalipov, S., Clepper, L., Sritanaudomchai, H., Fujimoto, A. y Wolf, D. Methylation status of imprinting centers for H19/IGF2 and SNURF/SNRPN in primate embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 581-588 (2007).
- Mitalipov, S.M. Genomic imprinting in primate embryos and embryonic stem cells. *Reproduction, fertility, and development* 18, 817-821 (2006).

- Greber, B., Lehrach, H. y Adjaye, J. Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal. *BMC developmental biology* 7, 46 (2007).
- McEwen, B.S. Mood disorders and allostatic load. *Biological psychiatry* 54, 200-207 (2003).
- Koob, G.F. Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcoholism, clinical and experimental research* 27, 232-243 (2003).
- 5 Goldstein, D.S. y McEwen, B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress (Amsterdam, Países Bajos)* 5, 55-58 (2002).
- Wei, Q., *et al.* Overexpressing the glucocorticoid receptor in forebrain causes an aging-like neuroendocrine phenotype and mild cognitive dysfunction. *J Neurosci* 27, 8836-8844 (2007).
- 10 McEwen, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews* 87, 873-904 (2007).
- Kim, Y., Laposky, A.D., Bergmann, B.M. y Turek, F.W. Repeated sleep restriction in rats leads to homeostatic and allostatic responses during recovery sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10697-10702 (2007).
- 15 Pinilla, I., Lund, R.D. y Sauve, Y. Cone function studied with flicker electroretinogram during progressive retinal degeneration in RCS rats. *Exp Eye Res* 80, 51-59 (2005).
- Crafoord, S., Geng, L., Seregard, S. y Algvare, P.V. Experimental transplantation of autologous iris pigment epithelial cells to the subretinal space. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 79, 509-514 (2001).
- Chuang, E.L. y Bird, A.C. Repair after tears of the retinal pigment epithelium. *Eye (Londres, Inglaterra)* 2 (Pt 1), 106-113 (1988).
- 20 Ricci, F., *et al.* Modulation of Ku70/80, clusterin/ApoJ isoforms and Bax expression in indocyanine-green-mediated photo-oxidative cell damage. *Ophthalmic research* 39, 164-173 (2007).
- Gregerson, D.S., Lew, K.L., McPherson, S.W., Heuss, N.D. y Ferrington, D.A. RPE cells resist bystander killing by CTLs, but are highly susceptible to antigen-dependent CTL killing. *Investigative ophthalmology & visual science* 47, 5385-5394 (2006).
- 25 Kim, S.J., *et al.* Differential expression of vitreous proteins in proliferative diabetic retinopathy. *Current eye research* 31, 231-240 (2006).
- Linberg, K.A., Fariss, R.N., Heckenlively, J.R., Farber, D.B. y Fisher, S.K. Morphological characterization of the retinal degeneration in three strains of mice carrying the rd-3 mutation. *Visual neuroscience* 22, 721-734 (2005).
- Qin, Y., *et al.* Long-range activation of Sox9 in Odd Sex (Ods) mice. *Human molecular genetics* 13, 1213-1218 (2004).
- 30 Nishiwaki, A., Ueda, T., Ugawa, S., Shimada, S. y Ogura, Y. Upregulation of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 after retinal ischemia-reperfusion injury. *Investigative ophthalmology & visual science* 44, 4931-4935 (2003).
- Ida, H., Boylan, S.A., Weigel, A.L. y Hjelmeland, L.M. Age-related changes in the transcriptional profile of mouse RPE/choroid. *Physiological genomics* 15, 258-262 (2003).
- 35 Weigel, A.L., Ida, H., Boylan, S.A. y Hjelmeland, L.M. Acute hyperoxia-induced transcriptional response in the mouse RPE/choroid. *Free radical biology & medicine* 35, 465-474 (2003).
- Sauka-Spengler, T., Baratte, B., Shi, L. y Mazan, S. Structure and expression of an Otx5-related gene in the dogfish *Scyliorhinus canicula*: evidence for a conserved role of Otx5 and Crx genes in the specification of photoreceptors. *Development genes and evolution* 211, 533-544 (2001).
- 40 Lovicu, F.J., Kolle, G., Yamada, T., Little, M.H. y McAvoy, J.W. Expression of Crim1 during murine ocular development. *Mechanisms of development* 94, 261-265 (2000).
- Otani, A., *et al.* Expressions of angiopoietins and Tie2 in human choroidal neovascular membranes. *Investigative ophthalmology & visual science* 40, 1912-1920 (1999).
- 45 Faure, V., Courtois, Y. y Goureau, O. Differential regulation of nitric oxide synthase-II mRNA by growth factors in rat, bovine, and human retinal pigmented epithelial cells. *Ocular immunology and inflammation* 7, 27-34 (1999).
- Mousa, S.A., Lorelli, W. y Campochiaro, P.A. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *Journal of cellular biochemistry* 74, 135-143 (1999).

- Collinge, J.E., Simirskii, V.N. y Duncan, M.K. Expression of tissue plasminogen activator during eye development. *Exp Eye Res* 81, 90-96 (2005).
- Fisher, S.K., Lewis, G.P., Linberg, K.A. y Verardo, M.R. Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment. *Progress in retinal and eye research* 24, 395-431 (2005).
- 5 Francis, M.K., *et al.* Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging in vivo. *The Journal of investigative dermatology* 122, 1096-1105 (2004).
- Marc, R.E. y Jones, B.W. Retinal remodeling in inherited photoreceptor degenerations. *Molecular neurobiology* 28, 139-147 (2003).
- 10 Jones, B.W., *et al.* Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations. *The Journal of comparative neurology* 464, 1-16 (2003).
- MacLaren, R.E., *et al.* Autologous transplantation of the retinal pigment epithelium and choroid in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 114, 561-570 (2007).
- Rezai, K.A., Farrokh-Siar, L., Godowski, K., Patel, S.C. y Ernest, J.T. A model for xenogenic immune response. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238, 352-358 (2000).
- 15 Sauve, Y., Klassen, H., Whiteley, S.J. y Lund, R.D. Visual field loss in RCS rats and the effect of RPE cell transplantation. *Experimental neurology* 152, 243-250 (1998).
- Oganesian, A., *et al.* Scanning and transmission electron microscopic findings during RPE wound healing in vivo. *International ophthalmology* 21, 165-175 (1997).
- 20 Kohen, L., Enzmann, V., Faude, F. y Wiedemann, P. Mechanisms of graft rejection in the transplantation of retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic research* 29, 298-304 (1997).
- Tamai, M. [Retinal pigment epithelial cell transplantation: perspective]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 100, 982-1006 (1996).
- Gregerson, D.S., Heuss, N.D., Lew, K.L., McPherson, S.W. y Ferrington, D.A. Interaction of retinal pigmented epithelial cells and CD4 T cells leads to T-cell anergy. *Investigative ophthalmology & visual science* 48, 4654-4663 (2007).
- 25 Sarks, S., Cherepanoff, S., Killingsworth, M. y Sarks, J. Relationship of Basal laminar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 48, 968-977 (2007).
- Aisenbrey, S., *et al.* Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins. *Investigative ophthalmology & visual science* 47, 5537-5544 (2006).
- 30 Espinosa-Heidmann, D.G., *et al.* Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. *Investigative ophthalmology & visual science* 47, 729-737 (2006).
- Uno, K., Bhutto, I.A., McLeod, D.S., Merges, C. y Lutty, G.A. Impaired expression of thrombospondin-1 in eyes with age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 90, 48-54 (2006).
- 35 Wang, Z., Paik, D.C., Del Priore, L.V., Burch, R.L. y Gaillard, E.R. Nitrite-modified extracellular matrix proteins deleteriously affect retinal pigment epithelial cell function and viability: a comparison study with nonenzymatic glycation mechanisms. *Current eye research* 30, 691-702 (2005).
- Gullapalli, V.K., Sugino, I.K., Van Patten, Y., Shah, S. y Zarbin, M.A. Retinal pigment epithelium resurfacing of aged submacular human Bruch's membrane. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 102, 123-137; discusión 137-128 (2004).
- 40 Gullapalli, V.K., Sugino, I.K., Van Patten, Y., Shah, S. y Zarbin, M.A. Impaired RPE survival on aged submacular human Bruch's membrane. *Exp Eye Res* 80, 235-248 (2005).
- Itaya, H., Gullapalli, V., Sugino, I.K., Tamai, M. y Zarbin, M.A. Iris pigment epithelium attachment to aged submacular human Bruch's membrane. *Investigative ophthalmology & visual science* 45, 4520-4528 (2004).
- 45 Tezel, T.H., Del Priore, L.V. y Kaplan, H.J. Reengineering of aged Bruch's membrane to enhance retinal pigment epithelium repopulation. *Investigative ophthalmology & visual science* 45, 3337-3348 (2004).
- Roth, F., Bindewald, A. y Holz, F.G. Key pathophysiologic pathways in age-related macular disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242, 710-716 (2004).
- Zarbin, M.A. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*

- 122, 598-614 (2004).
- Tian, J., Ishibashi, K. y Handa, J.T. The expression of native and cultured RPE grown on different matrices. *Physiological genomics* 17, 170-182 (2004).
- 5 Koenekoop, R.K. Choroideremia is Caused by a Defective Phagocytosis by the RPE of Photoreceptor Disc Membranes, not by an Intrinsic Photoreceptor Defect. *Ophthalmic genetics* 28, 185-186 (2007).
- Chang, Y. y Finnemann, S.C. Tetraspanin CD81 is required for the {alpha} vbeta5-integrin-dependent particle-binding step of RPE phagocytosis. *Journal of cell science* 120, 3053-3063 (2007).
- 10 Mukherjee, P.K., *et al.* Photoreceptor outer segment phagocytosis attenuates oxidative stress-induced apoptosis with concomitant neuroprotectin D1 synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13158-13163 (2007).
- Schutt, F., Volcker, H.E. y Dithmar, S. [N-acetylcysteine improves lysosomal function and enhances the degradation of photoreceptor outer segments in cultured RPE cells]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 224, 580-584 (2007).
- Martínez-Navarrete, G.C., Martín-Nieto, J., Esteve-Rudd, J., Angulo, A. y Cuenca, N. Alpha synuclein gene expression profile in the retina of vertebrates. *Molecular vision* 13, 949-961 (2007).
- 15 Nandrot, E.F., *et al.* Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12005-12010 (2007).
- Warburton, S., *et al.* Proteomic and phototoxic characterization of melanolipofuscin: correlation to disease and model for its origin. *Molecular vision* 13, 318-329 (2007).
- 20 Kolko, M., *et al.* Identification of intracellular phospholipases A2 in the human eye: involvement in phagocytosis of photoreceptor outer segments. *Investigative ophthalmology & visual science* 48, 1401-1409 (2007).
- Kaemmerer, E., Schutt, F., Krohne, T.U., Holz, F.G. y Kopitz, J. Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. *Investigative ophthalmology & visual science* 48, 1342-1347 (2007).
- 25 Lee, C.J., Fishman, H.A. y Bent, S.F. Spatial cues for the enhancement of retinal pigment epithelial cell function in potential transplants. *Biomaterials* 28, 2192-2201 (2007).
- Finnemann, S.C. y Nandrot, E.F. MerTK activation during RPE phagocytosis in vivo requires alphaVbeta5 integrin. *Advances in experimental medicine and biology* 572, 499-503 (2006).
- Takahashi *et al.* (2007) *Nat Protoc.* 2(12): 3081-9.
- Maherali *et al.* (2007) *Cell Stem Cell* 1: 55-70.
- 30 Hanna *et al.* (2007) *Science*, 6 de diciembre de 2007, 10.1126/science.1152092 (véase también www.sciencexpress.org).
- Meissner *et al.* (2007) *Nature Biotechnology* 25: 1177-1181.
- Mikkelsen *et al.* (2007) *Nature*, vol. 448, 2 de agosto de 2007, doi:10.1038/nature06008.
- Wernig *et al.* (2007) *Nature*, vol. 448, 19 de julio de 2007, doi:10.1038/nature05944.
- 35 Yu *et al.* (2007) *Science*, 20 de noviembre de 2007, 10.1126/science.1151526 (véase también www.sciencexpress.org).
- Vogel y Holden (2007) *Science* 318: 1224-1225.
- Takahashi *et al.* (2007) *Cell* 131: 861-872.
- Li *et al.* (2005) *Reproduction Research* 130: 53-59.
- 40 *Equivalentes*
- Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando nada más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes para las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Las siguientes reivindicaciones pretenden abarcar tales equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de células epiteliales pigmentarias retinianas (RPE) a partir de células pluripotentes humanas, caracterizado por que el método comprende:
- 5 a) cultivar células pluripotentes humanas durante 7-14 días para formar cuerpos embrioides en un cultivo en suspensión en un medio que comprende menos del 5% de proteínas de origen animal;
- b) cultivar los cuerpos embrioides en forma de un cultivo adherente en un medio que comprende menos del 5% de proteínas de origen animal, por lo que las células RPE aparecen en 14-28 días de cultivo adherente;
- c) seleccionar las células RPE del cultivo de la etapa (b);
- 10 d) cultivar las células RPE seleccionadas en la etapa (c) en un medio que comprende uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en EGF, bFGF, VEGF y factor de crecimiento similar a insulina recombinante; y
- e) cultivar las células RPE de la etapa (d) para estimular su maduración, y de ese modo producir un cultivo que comprende células RPE.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además cultivar las células RPE de la etapa (e) para producir un cultivo de células RPE maduras.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el medio de la etapa (a) contiene un suplemento B-27 sin suero y el medio de la etapa (b) no contiene un suplemento B-27 sin suero.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de la etapa (d) comprende además uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en: heparina, hidrocortisona, y ácido ascórbico.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que los cuerpos embrioides de la etapa (b) se cultivan durante 28 días o más.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la etapa (c) comprende poner en contacto el cultivo de la etapa (b) con una enzima que provoca que las células RPE se desprendan del cultivo adherente, y seleccionar las células pigmentadas desprendidas o los agrupamientos celulares desprendidos que contienen células pigmentadas.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en colagenasa IV y dispasa.
8. El método de la reivindicación 1, en el que las células madre pluripotentes humanas se seleccionan del grupo que consiste en células madre pluripotentes inducidas (iPS) y células madre embrionarias.
- 30 9. El método de la reivindicación 7, en el que la etapa (c) comprende además disociar los agrupamientos celulares seleccionados que contienen células pigmentadas, y de ese modo se forma una suspensión de células individuales que comprende células RPE.

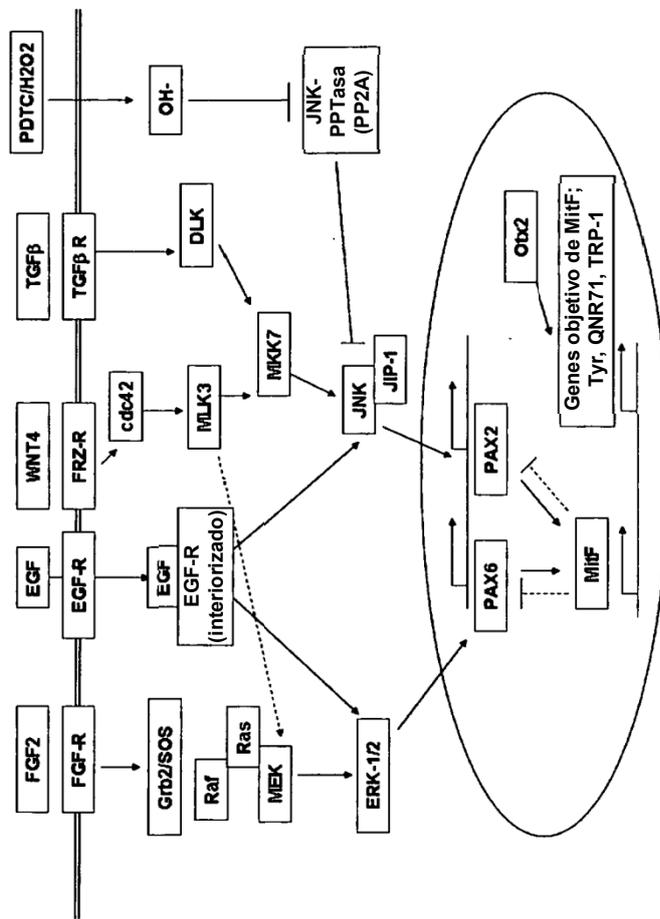


Figura 1

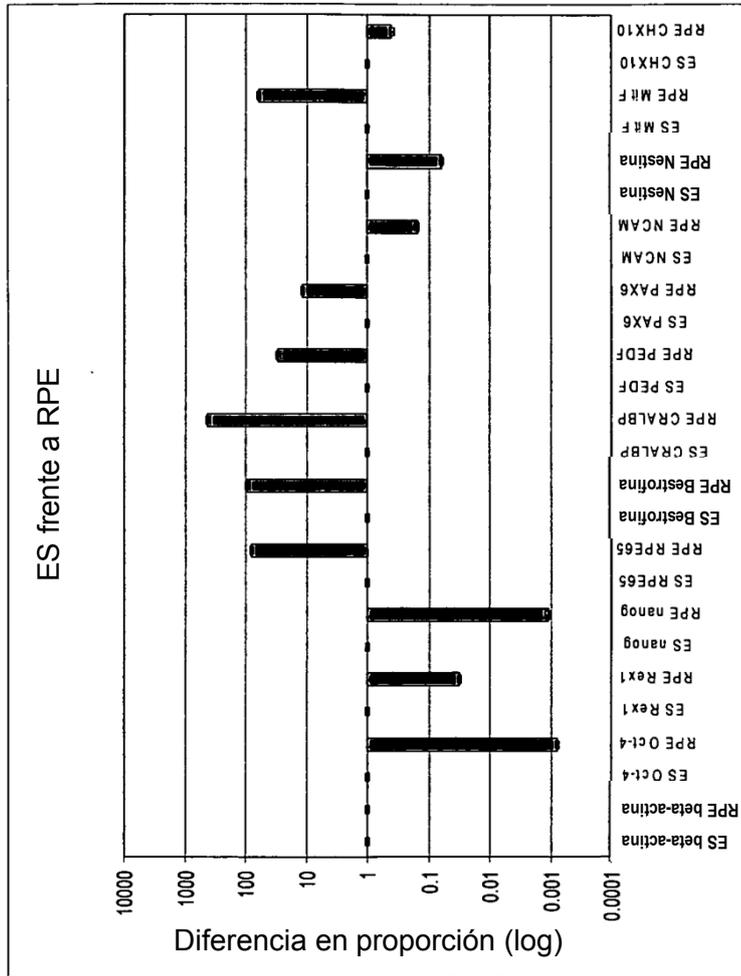


Figura 2

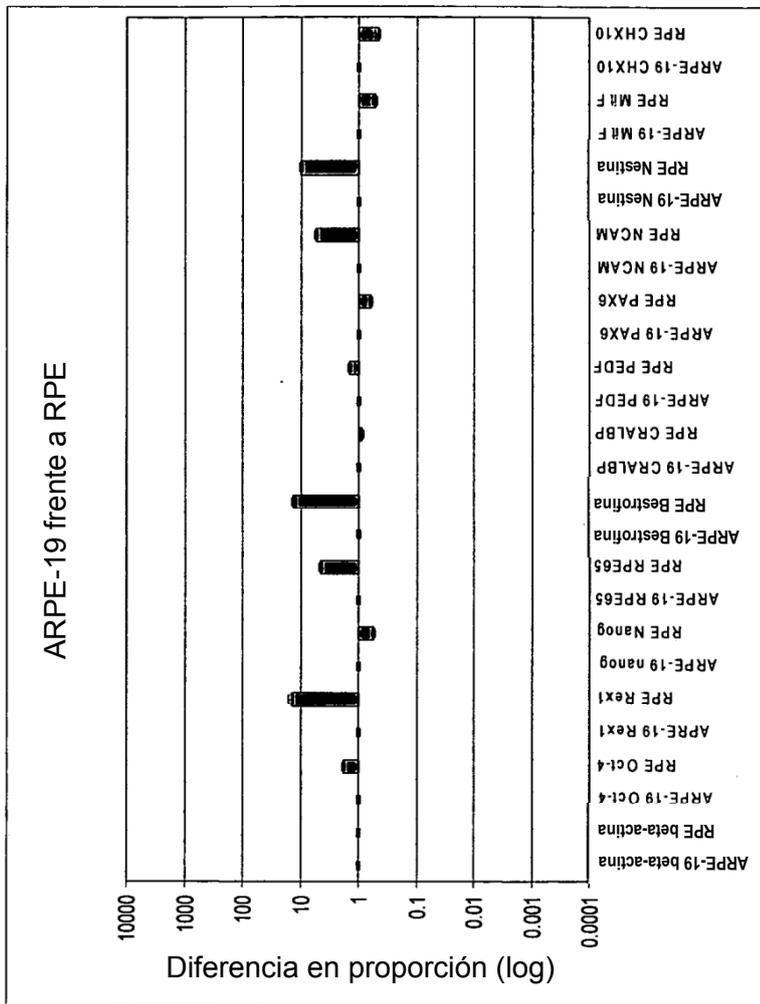


Figura 3

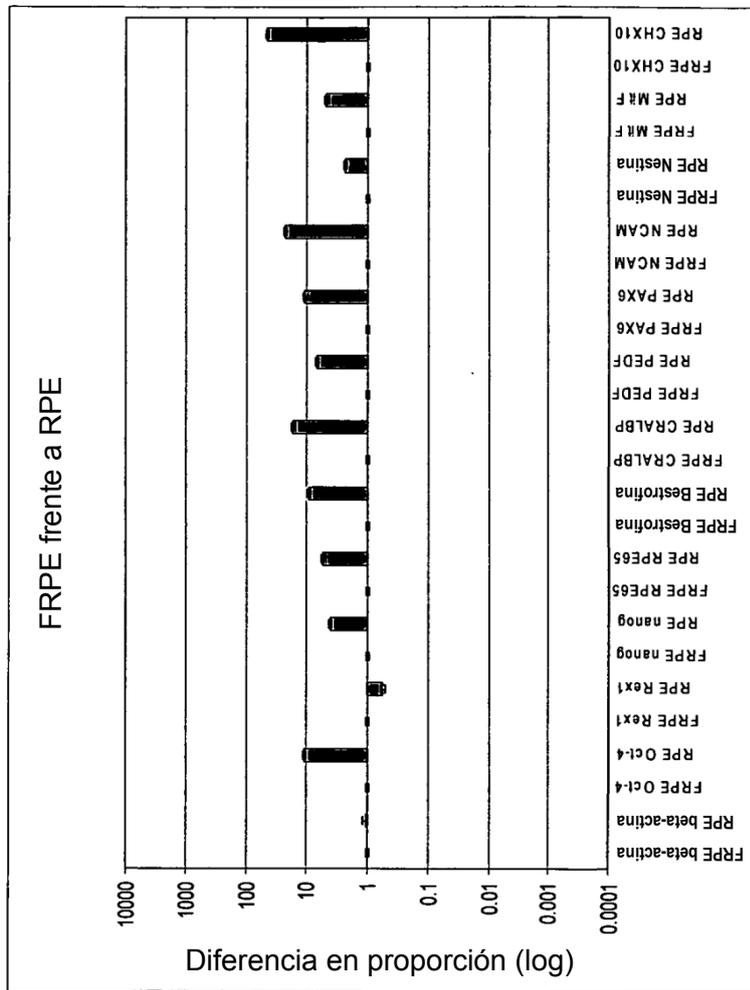


Figura 4

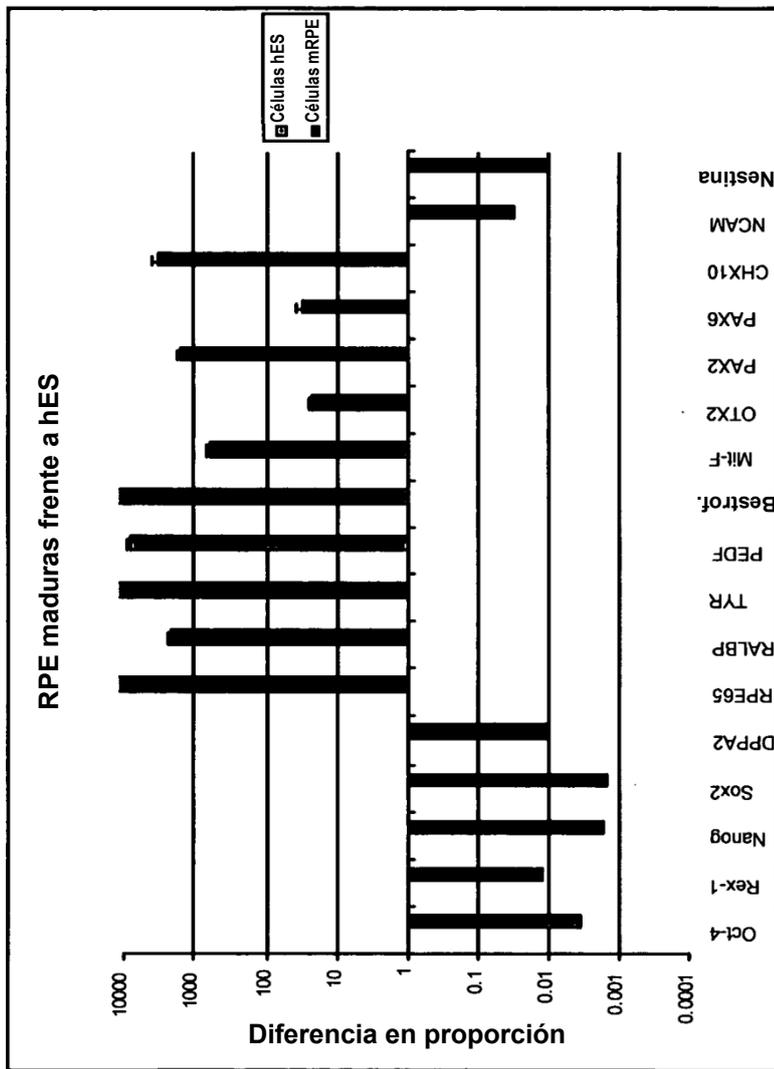


Figura 5

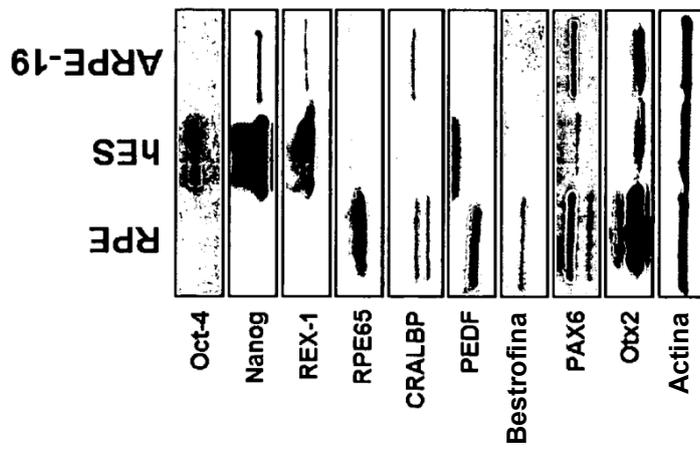


Figura 6

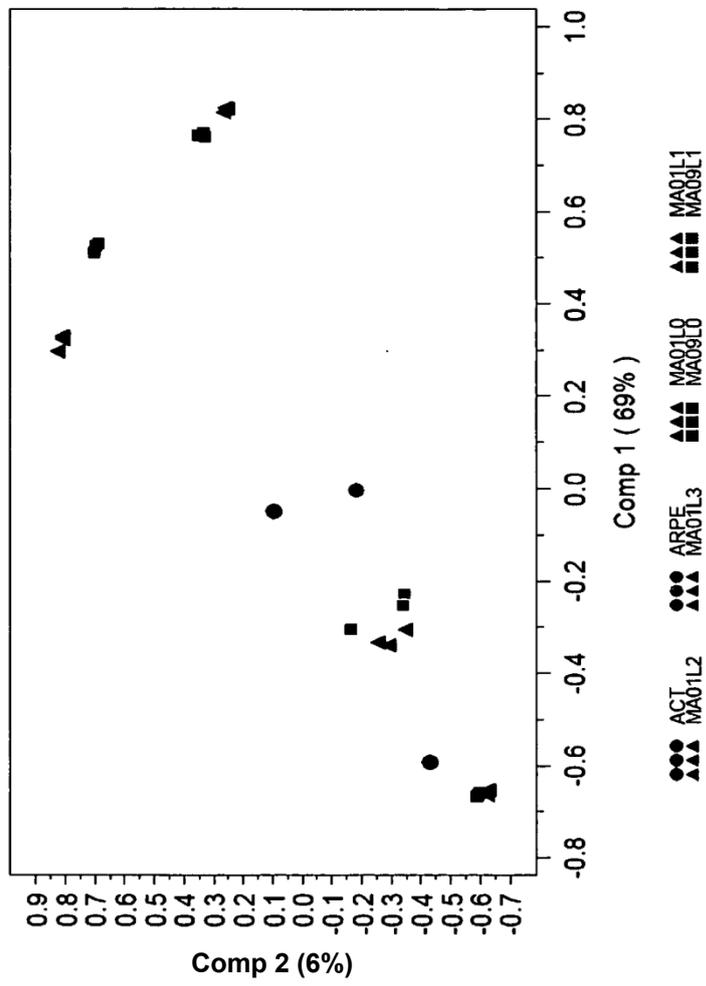


Figura 7