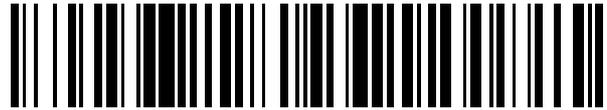


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 456**

15 Folleto corregido: T3

Texto afectado: Reivindicaciones

48 Fecha de publicación de la corrección: 05.11.2020

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA CORREGIDA

T9

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2015 PCT/IL2015/051269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108239**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2015 E 15832827 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3240892**

54 Título: **Poblaciones de células del RPE y métodos de generación de las mismas**

30 Prioridad:

30.12.2014 US 201462097753 P
17.02.2015 US 201562116972 P
22.07.2015 US 201562195309 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2020

73 Titular/es:

CELL CURE NEUROSCIENCES LTD. (100.0%)
P.O. Box 12247
9112102 Jerusalem, IL

72 Inventor/es:

BOHANA-KASHTAN, OSNAT;
ROSENBERG BELMAKER, LIOR ANN y
WISER, OFER

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 774 456 T9

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

Poblaciones de células del RPE y métodos de generación de las mismas

5 **Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células del epitelio pigmentario retiniano y, más particularmente, pero no exclusivamente, a la evaluación de tales células como agente terapéutico. La presente invención también se refiere a la generación de células del epitelio pigmentario retiniano a partir de células madre embrionarias.

El epitelio pigmentario retiniano (RPE, por sus siglas en inglés) es una monocapa de células pigmentadas, que se sitúa entre la retina neural y la coriocalpilar. Las células del RPE desempeñan papeles cruciales en el mantenimiento y la función de la retina y sus fotorreceptores. Estos incluyen la formación de la barrera hematorretiniana, la absorción de luz parásita, el suministro de nutrientes a la retina neural, la regeneración del pigmento visual y la captación y recirculación de segmentos exteriores liberados de fotorreceptores.

El tejido retiniano puede degenerarse por varios motivos. Entre ellos se encuentran: oclusión arterial o venosa, retinopatía diabética y retinopatía del prematuro, que son habitualmente hereditarias. Enfermedades tales como la retinosis pigmentaria, retinosquiasis, degeneración reticular, enfermedad de Best, y degeneración macular relacionada con la edad (AMD) se caracterizan por tipos progresivos de degeneración de la retina.

Las células del RPE pueden usarse potencialmente para terapia de reemplazo celular del RPE degenerante en las enfermedades retinianas mencionadas anteriormente. También puede usarse como vehículo para la introducción de genes para el tratamiento de enfermedades de degeneración de la retina. Estas células también pueden servir como modelo *in vitro* de enfermedades de degeneración de la retina, como herramienta para cribado analítico masivo para determinar un efecto terapéutico de moléculas pequeñas, y para el descubrimiento y las pruebas de nuevos fármacos para enfermedades de degeneración de la retina. También podrían usarse células del RPE para investigación básica de desarrollo, maduración, características, propiedades, metabolismo, inmunogenicidad, función e interacción del RPE con otros tipos celulares.

Se ha usado RPE fetal y de adulto humano como fuente donante alternativa para trasplante alogénico. Sin embargo, problemas prácticos en la obtención de suficiente suministro tisular y las preocupaciones éticas respecto al uso de tejidos de fetos abortados limitan el uso extendido de estas fuentes donantes. Dadas estas limitaciones en el suministro de injertos del RPE de adulto y fetal, se ha estudiado el potencial de fuentes donantes alternativas. Las células madre pluripotentes humanas proporcionan ventajas significativas como fuente de células del RPE para trasplante. Su potencial de desarrollo pluripotente puede permitir su diferenciación dando auténticas células del RPE funcionales, y dado su potencial de autorrenovación infinita, pueden servir como fuente donante ilimitada de células del RPE. De hecho, se ha demostrado que las células madre embrionarias humanas (hESC) y las células madre pluripotentes inducidas humanas (iPS) se diferencian dando células del RPE *in vitro*, atenúan la degeneración de la retina y mantienen la función visual después del trasplante subretiniano con respecto al modelo de rata de degeneración de la retina del Royal College of Surgeons (RCS) que se provoca por disfunción del RPE. Por tanto, las células madre pluripotentes pueden ser una fuente ilimitada para la producción de células del RPE.

Los protocolos actuales para la derivación de células del RPE a partir de células madre pluripotentes proporciona poblaciones mixtas de células pigmentadas y no pigmentadas. Sin embargo, se desean poblaciones puras de células pigmentadas para el uso de células del RPE en investigación básica, descubrimiento de fármacos y terapia celular.

La técnica anterior incluye los documentos WO 2013/114360, WO 2008/129554 y WO 2013/184809.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención se define por las reivindicaciones.

55 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una población de células del RPE poligonales humanas, en la que al menos el 95% de las células de la misma expresan conjuntamente proteína premelanosoma (PMEL17) y proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), en la que la resistencia eléctrica transepitelial de la población de células es mayor de 100 ohmios.

60 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una población de células del RPE humanas, en la que al menos el 80% de las células de la misma expresan conjuntamente proteína premelanosoma (PMEL17) y proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP) y en la que las células de la población secretan cada uno de angiogenina, inhibidor tisular de metaloproteína 2 (TIMP 2), glicoproteína soluble 130 (sgp130) y forma soluble del receptor de membrana ubioco 1 para el factor de necrosis tumoral α (sTNF-R1).

65 Según realizaciones de la invención, las células de la población secretan cada uno de angiogenina, inhibidor tisular

- de metaloproteinasas 2 (TIMP 2), glicoproteína soluble 130 (sgp130) y forma soluble del receptor de membrana ubicuo 1 para el factor de necrosis tumoral α (sTNF-R1).
- 5 Según realizaciones de la invención, las células secretan la angiogenina, el TIMP2, la sgp130 o el sTNF-R1 de manera polarizada.
- Según realizaciones de la invención, las células secretan cada uno de la angiogenina, el TIMP2, la sgp130 y el sTNF-R1 de manera polarizada.
- 10 Según realizaciones de la invención, la razón de secreción apical de sgp130:secreción basal de sgp130 es mayor de 1.
- Según realizaciones de la invención, la razón de secreción apical de sTNF-R1:secreción basal de sTNFR1 es mayor de 1.
- 15 Según realizaciones de la invención, la razón de secreción basal de angiogenina:secreción apical de angiogenina es mayor de 1.
- Según realizaciones de la invención, la razón de secreción apical de TIMP2:secreción basal de TIMP2 es mayor de 1.
- 20 Según realizaciones de la invención, el número de células Oct4⁺TRA-1-60⁺ en la población está por debajo de 1:250.000.
- Según realizaciones de la invención, al menos el 80% de las células expresan bestrofina 1, tal como se mide mediante inmunotinción.
- 25 Según realizaciones de la invención, al menos el 80% de las células expresan factor de la transcripción asociado a microftalmia (MITF), tal como se mide mediante inmunotinción.
- 30 Según realizaciones de la invención, más del 50% de las células expresan gen de caja apareada 6 (PAX-6) tal como se mide mediante FACS.
- Según realizaciones de la invención, las células secretan más de 750 ng de factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) por ml al día.
- 35 Según realizaciones de la invención, las células secretan PEDF y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de manera polarizada.
- Según realizaciones de la invención, la razón de secreción apical de PEDF:secreción basal de PEDF es mayor de 1.
- 40 Según realizaciones de la invención, la razón sigue siendo mayor de 1 tras la incubación durante 8 horas a 2-8°C.
- Según realizaciones de la invención, la resistencia eléctrica transepitelial de la población de células es mayor de 100 ohmios.
- 45 Según realizaciones de la invención, la resistencia eléctrica transepitelial de las células sigue siendo mayor de 100 ohmios tras la incubación durante 8 horas a 2-8°C.
- Según realizaciones de la invención, la razón de secreción basal de VEGF:secreción apical de VEGF es mayor de 1.
- 50 Según realizaciones de la invención, la razón sigue siendo mayor de 1 tras la incubación durante 8 horas a 2-8°C.
- Según realizaciones de la invención, la población celular es capaz de rescatar la agudeza visual en la rata del RCS tras la administración subretiniana.
- 55 Según realizaciones de la invención, la población celular es capaz de rescatar fotorreceptores durante al menos 180 días tras la administración subretiniana en la rata del RCS.
- Según realizaciones de la invención, la población celular se genera mediante diferenciación *ex vivo* de células madre embrionarias humanas.
- 60 Según realizaciones de la invención, la población celular se genera mediante:
- 65 (a) cultivar células madre embrionarias humanas en un medio que comprende nicotinamida para generar células en diferenciación, en la que el medio está desprovisto de activina A;

(b) cultivar las células en diferenciación en un medio que comprende nicotinamida y activina A para generar células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE; y

5 (c) cultivar las células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE en un medio que comprende nicotinamida, en la que el medio está desprovisto de activina A.

Según realizaciones de la invención, las células madre embrionarias se propagan en un medio que comprende bFGF y TGF β .

10 Según realizaciones de la invención, las células madre embrionarias se cultivan en fibroblastos del cordón umbilical humano.

Según realizaciones de la invención, las etapas (a)-(c) se efectúan en condiciones en las que el nivel de oxígeno atmosférico es de menos de aproximadamente el 10%.

15 Según realizaciones de la invención, el método comprende además cultivar las células diferenciadas en un medio en condiciones en las que el nivel de oxígeno atmosférico es mayor de aproximadamente el 10% en presencia de nicotinamida tras la etapa (c).

20 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la población celular descrita en el presente documento como agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un uso de la población celular descrita en el presente documento, para tratar una degeneración de la retina.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de generación de células del RPE que comprende:

30 (a) cultivar células madre pluripotentes en un medio que comprende un agente de diferenciación para generar células en diferenciación, en el que el medio está desprovisto de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β);

35 (b) cultivar las células en diferenciación en un medio que comprende el miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el agente de diferenciación para generar células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE;

40 (c) cultivar las células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE en un medio que comprende un agente de diferenciación para generar células del RPE, en el que el medio está desprovisto de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), en el que las etapas (a)-(c) se efectúan en condiciones en las que el nivel de oxígeno atmosférico es de menos de aproximadamente el 10%.

Según realizaciones de la invención, la etapa (a) se efectúa en condiciones no adherentes.

45 Según realizaciones de la invención, las condiciones no adherentes comprenden una placa de cultivo no adherente.

Según realizaciones de la invención, la etapa (a) comprende:

50 i) cultivar la población cultivada de células madre pluripotentes humanas en un medio que comprende nicotinamida, en ausencia de activina A; en condiciones no adherentes para generar una agrupación de células que comprende células en diferenciación; y posteriormente;

55 ii) cultivar las células en diferenciación de (i) en un medio que comprende nicotinamida, en ausencia de activina A en condiciones adherentes.

Según realizaciones de la invención, el método comprende además disociar la agrupación de células antes de la etapa (ii) para generar grupos de células o una suspensión celular individual de células.

60 Según realizaciones de la invención, el método comprende además cultivar las células diferenciadas en un medio en condiciones en las que el nivel de oxígeno atmosférico es mayor de aproximadamente el 10% en presencia de un agente de diferenciación tras la etapa (c).

Según realizaciones de la invención, el miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) se selecciona del grupo que consiste en TGF β 1, TGF β 3 y activina A.

65

Según realizaciones de la invención, el agente de diferenciación de la etapa (a) y el agente de diferenciación de la etapa (c) son idénticos.

5 Según realizaciones de la invención, el agente de diferenciación de la etapa (a) es nicotinamida (NA) o 3-aminobenzamida.

Según realizaciones de la invención, el método comprende además seleccionar células poligonales tras la etapa (c).

10 Según realizaciones de la invención, el método comprende además propagar las células poligonales.

Según realizaciones de la invención, la propagación se efectúa sobre una superficie adherente o una matriz extracelular.

15 Según realizaciones de la invención, las células madre pluripotentes comprenden células madre embrionarias.

Según realizaciones de la invención, las células madre embrionarias se propagan en un medio que comprende bFGF y TGF β .

20 Según realizaciones de la invención, las células madre embrionarias se cultivan en fibroblastos del cordón umbilical humano.

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales a modo de ejemplo. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean necesariamente limitativos.

30 **Breve descripción de las varias vistas de los dibujos**

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se recalca que los datos se muestran a modo de ejemplo y para fines de comentarios ilustrativos de realizaciones de la invención. En este aspecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica cómo pueden practicarse las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

40 La figura 1 es un gráfico que ilustra la linealidad de los datos.

La figura 2 es un análisis de FACS de células hESC de control negativo teñidas con anticuerpo anti-CRALBP y anticuerpo anti-PMEL 17.

45 La figura 3 es un análisis de FACS de control positivo de las células de la línea del RPE de referencia OpRegen® teñidas con anticuerpo anti-CRALBP y anticuerpo anti-PMEL 17.

50 La figura 4 es un análisis de FACS de OpRegen® 5C con adiciones conocidas al 25% en hESC teñidas con anticuerpo anti-CRALBP y anticuerpo anti-PMEL 17.

La figura 5 es un análisis de FACS de OpRegen® 5C con adiciones conocidas al 50% en hESC teñidas con anticuerpo anti-CRALBP y anticuerpo anti-PMEL17.

55 La figura 6 es un análisis de FACS de OpRegen® 5C con adiciones conocidas al 75% en hESC teñidas con anticuerpo anti-CRALBP y anticuerpo anti-PMEL17.

La figura 7 es un análisis de FACS de OpRegen® 5C con adiciones conocidas al 95% en hESC teñidas con anticuerpo anti-CRALBP y anticuerpo anti-PMEL 17.

60 La figura 8 es un análisis de FACS de hESC teñidas con controles de isotipo.

La figura 9 es un análisis de FACS de células OpRegen® 5C teñidas con los controles de isotipo.

65 Figura 10: la inmunotinción conjunta con PMEL17 diferencia células del RPE (CRALBP+PMEL17+) de células pigmentadas que no son del RPE (PMEL17+ CRALBP-; tal como melanocitos).

- Figura 11: resultados de morfología para producción simulada 4 y 5 en puntos de control en proceso (IPC) 5, y 8-10.
- Figura 12: procedimiento de fabricación, etapas 1-3: generación de banco de células de trabajo alimentadoras de fibroblastos de cordón umbilical humano.
- 5 Figura 13: procedimiento de fabricación, etapas 4-5: expansión de hESC.
- Figura 14: procedimiento de fabricación, etapas 6-13: diferenciación para dar células del RPE (OpRegen®).
- 10 Figura 15: procedimiento de fabricación, etapas 14-17: expansión de células pigmentadas.
- Figura 16: procedimiento de fabricación de OpRegen® detallado y puntos de control en proceso (estrellas amarillas, IPC 1-11). (NUTSPlus, medio Nutristem que contiene bFGF y TGFβ; NUTSMinus, medio Nutristem sin bFGF ni TGFβ; NIC, nicotinamida; SB, cuerpos esferoides).
- 15 Figura 17: nivel de células del RPE CRALBP+PMEL17+ en series de producción simulada 4 y 5 OpRegen®. Gráficos de densidad de los puntos de IPC 8 y 11 (*el punto de IPC 8 se sometió a prueba tras la crioconservación) y gráficos de densidad representativos de hESC de control positivo OpRegen® 5C y de control negativo HAD-C102 (el intervalo de % de CRALBP+PMEL17+ en el control negativo fue del 0,02-0,17%). Los números dentro de cada gráfico indican el porcentaje de células CRALBP+PMEL17+ fuera de la población activada de células individuales vivas. Se realizó el análisis usando el software FCS Express 4.
- 20 Figura 18: tinción de inmunofluorescencia de puntos de producción simulada 5 de IPC 7, 10 y 11 con anticuerpos específicos para los marcadores del RPE bestrofina 1, MITF, ZO-1 y CRALBP.
- 25 Figuras 19A-C: fotografía de fondo a color representativa del grupo 2 (BSS+; figura 19A), grupo 5 contra ojos no tratados laterales (OD; figura 19B) y grupo 5, ojos tratados (OS; figura 19C) a P60. Las áreas hiper e hipopigmentadas en los ojos tratados con dosis alta (OS) se supone que son indicativas de células trasplantadas.
- 30 Figura 20: umbrales de agudeza de seguimiento optocinético medidos a P60, P100, P150 y P200. Los grupos tratados con células (grupo 3-25.000, grupo 4-100.000 y grupo 5-200.000) superaron a todos los controles alcanzando la dosis del grupo 4 (100.000) y 5 (200.000) el mejor rescate. Los ojos no operados contralaterales fueron equivalentes al grupo 1 (no tratado) y al grupo 2 (control de vehículo/BSS+) (no mostrado).
- 35 Figuras 21A-B: gráficos que ilustran los resultados de campo focal (figura 21A) y completo (figura 21B) para una rata representativa.
- Figuras 22A-B: la figura 22A ilustra un fotomontaje de imágenes individuales de secciones teñidas con violeta de cresilo de un ojo tratado con células representativo. Entre las flechas se ilustra la ubicación de protección de fotorreceptor y la presunta ubicación de las células injertadas. La figura 22B ilustra la comparación entre ojos inyectados con BSS+ (grupo 2) y ojos inyectados con células representativos (múltiples grupos de dosificación representados) en el día 60, 100, 150 y 200 después del nacimiento. GCL: capa de células del ganglio nervioso; ONL: capa nuclear exterior; RPE: epitelio pigmentado retiniano.
- 40 Figuras 22A-B: la figura 22A ilustra un fotomontaje de imágenes individuales de secciones teñidas con violeta de cresilo de un ojo tratado con células representativo. Entre las flechas se ilustra la ubicación de protección de fotorreceptor y la presunta ubicación de las células injertadas. La figura 22B ilustra la comparación entre ojos inyectados con BSS+ (grupo 2) y ojos inyectados con células representativos (múltiples grupos de dosificación representados) en el día 60, 100, 150 y 200 después del nacimiento. GCL: capa de células del ganglio nervioso; ONL: capa nuclear exterior; RPE: epitelio pigmentado retiniano.
- 45 Figura 23: grosor de la capa nuclear exterior medido en número de núcleos. Cada punto representa el recuento de cada animal de cada grupo de dosis para todas la edades.
- Figura 24: imágenes inmunofluorescentes de tejido de control positivo y animales tratados con células experimentales representativos a P60, P100, P150 y P200 teñidos con marcador anti-núcleos humanos (H.N.M, verde), marcador anti-premelanosómico (PMEL17, rojo), marcador anti-proliferación humano (Ki67, rojo) y arrestina anti-cono de rata (rojo). Se usa Dapi (azul) para tinción de fondo para resaltar las capas nucleares. Se usó melanoma humano como tejido de control positivo para PMEL17, amígdala humana para Ki67 y retina de rata juvenil del RCS para arrestina de cono. Las flechas hacia abajo indican capa nuclear exterior; las flechas hacia arriba indican células del RPE humanas teñidas de manera positiva (OpRegen®), generadas tal como se describe en el presente documento.
- 50 La figura 25 es un gráfico que ilustra la cuantificación de conos tras el trasplante subretiniano de células OpRegen® en la rata del RCS. Los ojos tratados con células fueron significativamente mayores que los ojos de control en todas las edades.
- 55 Figuras 26A-J: tinción inmunofluorescente de células OpRegen® en el espacio subretiniano. La figura 26A representa un área de retina con varias células del RPE (rojo, flechas) zona central y sin residuo (vista usando anticuerpo anti-rodopsina de rata, verde; flecha), pero donde las células no son (periféricas), la zona de residuo se reconstituye. A mayor aumento (figura 26B), algunos segmentos exteriores teñidos con rodopsina descansan a lo largo de las células injertadas. Además, la zona de residuo se reconstituye a medida que aumenta la distancia de las células trasplantadas. Las figuras 26C-J son cortes individuales a través de la sección que muestran tejido positivo a rodopsina dentro de las células trasplantadas (flechas).
- 60
- 65

Las figuras 27A-C son fotografías que ilustran la biodistribución de las células tras inyección subretiniana en NOD-SCID. La figura 27A ilustra la capacidad de células OpRegen® de injertarse en el espacio subretiniano NOD-SCID 9 meses tras el trasplante. Las células pigmentadas dan una tinción positiva para núcleos humanos y PMEL17. La figura 27B es una fotografía que ilustra las células agrupadas en el lugar de la ampolla tras la inyección. La figura 27C es una fotografía que ilustra la posterior propagación de las células en una monocapa tras la inyección.

La figura 28 es una ilustración gráfica de un ensayo Transwell que puede usarse para someter a ensayo la potencia de células del RPE.

La figura 29 son los resultados del análisis de FACS que ilustra la expresión de PAX6 en células del RPE generadas tal como se describe en el presente documento (P2-DP, producto terminado: producción simulada IV, producción simulada V, lote OpRegen® 2A; HuRPE: RPE humano normal de ScienCell) y en la producción (P0).

La figura 30 es un gráfico que ilustra la expresión de PAX6 en células OpRegen®, tal como se evalúa mediante FACS (HES, células madre embrionarias humanas usadas como control negativo).

La figura 31 son los resultados del análisis de FACS que ilustra la doble tinción de PAX6 y CRALBP.

Las figuras 32A-C son gráficos que ilustran la evaluación de ELISA de secreción de angiogenina por células OpRegen®. A. Secreción aumentada de angiogenina en la producción simulada V. B. Secreción de angiogenina por tres lotes diferentes de células OpRegen® (paso 3) y en un Transwell durante 3 semanas (paso 4) durante el cual se evaluó la secreción apical y basal. C. Secreción de angiogenina por células del RPE 7 (paso 3).

Las figuras 33A-E ilustran la secreción de TIMP-1 y TIMP-2 por células OpRegen®. A. Niveles de proteína de TIMP-1 y TIMP-2 relativos detectados por matriz de proteína. B. Niveles de TIMP-2 de ELISA en los puntos de QC 3 y 4 de la producción simulada V. C-D. Niveles de secreción de TIMP-2 de ELISA mediante diferentes lotes de células OpRegen® (paso 3) y en un Transwell durante 3 semanas durante el cual se evaluó la secreción apical y basal (paso 4). E. Niveles de TIMP-2 secretados de células de control RPE 7 y HuRPE (paso 3, días 4 y 14).

Las figuras 34A-D ilustran la secreción de sgp130 por células OpRegen® tal como se mide mediante ELISA. A. Niveles de secreción de sgp130 en los puntos de QC 3 y 4 de la producción simulada V. B-C. Niveles de sgp130 secretada por diversos lotes de células OpRegen® (paso 3) y en un Transwell durante 3 semanas durante el cual se evaluó la secreción apical y basal (paso 4). D. Niveles de sgp130 secretados de células de control RPE 7 y HuRPE (paso 3, días 4 y 14).

Las figuras 35A-D ilustran los niveles de proteína de sTNF-R1 en sobrenadante de células OpRegen® tal como se mide mediante ELISA. A. Niveles de sTNF-R1 en el sobrenadante celular de los puntos de QC 3 y 4 de la producción simulada V. B-C. Niveles de sTNF-R1 en el sobrenadante de lotes de OpRegen® (paso 3) y en un Transwell durante 3 semanas durante el cual se evaluaron los niveles apicales y basales (paso 4). D. Niveles de sTNF-R1 de cultivos de células HuRPE de control y RPE7 en el día 4 y día 14 (paso 3).

La figura 36 ilustra la morfología de OpRegen® 5C (línea de referencia), RPE1 y RPE7 en Transwell. Se obtuvieron imágenes de OpRegen® 5C, RPE1 y RPE7 semanalmente (semana 1-4) tras su siembra en Transwell. OpRegen® 5C generó una monocapa poligonal homogénea a partir de la semana 1 mientras que RPE1 y RPE7 generaron una morfología no homogénea diferente una semana tras la siembra y empezaron a aparecer agujeros en la semana 2. Las células del RPE1 se separaron del Transwell después de 3 semanas en cultivo.

La figura 37 ilustra que las células del RPE1 y RPE7 expresan conjuntamente CRALBP y PMEL-17. El ensayo de pureza mediante FACS demostró que el 99,91% y el 96,29% de las células del RPE1 y RPE7, respectivamente, son doble positivas para los marcadores del RPE CRALBP y PMEL-17, similar a los niveles observados en las células OpRegen® de la producción simulada V (control positivo). Se usaron HAD-C 102 hESC como control negativo.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células del epitelio pigmentario retiniano y, más particularmente, pero no exclusivamente, a la evaluación de tales células como agente terapéutico. La presente invención también se refiere a la generación de células del epitelio pigmentario retiniano a partir de células madre embrionarias humanas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras.

La retina neural inicia la visión y está soportada por el epitelio pigmentario retiniano (RPE) subyacente. La disfunción, degeneración y pérdida de células del RPE son características prominentes de enfermedad de Best, subtipos de

retinosis pigmentaria (RP) y degeneración macular relacionada con la edad (AMD), que es la causa principal de discapacidad visual en los países occidentales. En estos estados, hay una pérdida visual progresiva que a menudo conduce a ceguera.

5 La retina y el RPE adyacente surgen ambos a partir del ectodermo neural. En especies inferiores, el RPE regenera la retina, pero en mamíferos, se inhibe la regeneración mediada por el RPE y se produce la regeneración hasta un grado muy limitado por medio de las células madre ubicadas en el margen retiniano periférico.

10 Algunas células madre embrionarias humanas (hESC) pueden servir como fuente donante ilimitada de células del RPE para trasplante. Se ha demostrado el potencial de ESC de ratón, primate y humano para diferenciarse dando células similares al RPE, para atenuar la degeneración de la retina y para mantener la función visual después del trasplante subretiniano.

15 Se han desarrollado diversos protocolos para la diferenciación de células madre embrionarias humanas para dar células del RPE (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/129554).

20 Los presentes inventores han descubierto ahora una manera única y sencilla de calificar poblaciones celulares que se han diferenciado con éxito dando células del RPE basándose en la expresión de polipéptidos particulares. De la mirada de posibles polipéptidos expresados en estas células diferenciadas, los presentes inventores han encontrado que puede usarse una combinación de dos marcadores particulares para sustentar una diferenciación exitosa.

25 Los presentes inventores también han descubierto que la secreción de factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) puede usarse como marcador para sustentar fases tempranas del proceso de diferenciación del RPE (véase la tabla 4).

30 Mientras se reducía además la presente invención a la práctica, los presentes inventores identificaron proteínas adicionales que se secretan por células del RPE que pueden usarse, en algunas realizaciones, como firma para definir las células.

35 Por tanto, según un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de calificación de si una población celular es un agente terapéutico adecuado para tratar un estado ocular, que comprende analizar la expresión conjunta de la proteína premelanosoma (PMEL 17) y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), lecitina-retinol aciltransferasa (LRAT) y caja 9 de región determinante del sexo Y (SOX 9) en la población de células, en el que cuando el número de células que expresan conjuntamente la PMEL17 y el al menos un polipéptido está por encima de un nivel predeterminado, la población celular se califica como agente terapéutico adecuado para tratar un trastorno retiniano.

40 Según otro aspecto, se proporciona un método de calificación de si una población celular es un agente terapéutico adecuado para tratar un estado ocular, que comprende analizar la expresión conjunta de la proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP) y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en proteína premelanosoma (PMEL17), lecitina-retinol aciltransferasa (LRAT) y caja 9 de región determinante del sexo Y (SOX 9) en la población de células, en el que cuando el número de células que expresan conjuntamente la CRALBP y el al menos un polipéptido está por encima de un nivel predeterminado, la población celular se califica como agente terapéutico adecuado para tratar un estado ocular.

45 Tal como se usa en el presente documento, la frase "agente terapéutico adecuado" se refiere a la idoneidad de la población celular para tratar estados oculares. Las células que son terapéuticas pueden ejercer su efecto a través de uno cualquiera de múltiples mecanismos. Un mecanismo a modo de ejemplo es el efecto de apoyo trófico que promueve la supervivencia de fotorreceptores degenerantes u otras células dentro de la retina. Las células terapéuticas del RPE también pueden ejercer su efecto a través de un mecanismo de regeneración que repone el mal funcionamiento y/o que degenera células huésped del RPE. Según una realización, las células del RPE son maduras y tienen la capacidad funcional de fagocitar segmentos liberados exteriores de fotorreceptores que incluyen rodopsina. Según otra realización, las células del RPE no son completamente maduras.

55 Los estados oculares para los que las poblaciones celulares sirven como agente terapéutico incluyen, pero no se limitan a, enfermedades o trastornos retinianos asociados generalmente con disfunción retiniana, lesión retiniana y/o pérdida de epitelio pigmentario retiniano. Una lista no limitativa de estados que pueden tratarse según la descripción comprende retinosis pigmentaria, amaurosis congénita de Leber, degeneración macular hereditaria o adquirida, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), enfermedad de Best, desprendimiento de retina, atrofia girata, coroideremia, distrofia en patrón así como otras distrofias del RPE, enfermedad de Stargardt, daño retiniano y del RPE debido a daño provocado por una cualquiera de lesión fótica, por láser, inflamatoria, infecciosa, por radiación, neovascular o traumática.

65 Tal como se mencionó, el método de este aspecto de la descripción se lleva a cabo midiendo la cantidad (por ejemplo, porcentaje de células) que expresa proteína premelanosoma (PMEL17; SwissProt n.º P40967) y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP; SwissProt n.º

P12271), lecitina-retinol aciltransferasa (LRAT; SwissProt n.º 095327) y caja 9 de región determinante del sexo Y (SOX 9; P48436).

5 Alternativamente, el método de este aspecto se lleva a cabo midiendo CRALBP (CRALBP; SwissProt n.º P12271) y al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en lecitina-retinol aciltransferasa (LRAT; SwissProt n.º 095327), caja 9 de región determinante del sexo Y (SOX 9; P48436) y PMEL17 (SwissProt n.º P40967).

10 Por tanto, por ejemplo, pueden medirse CRALBP y PMEL17; pueden medirse PMEL17 y LRAT, o pueden medirse PMEL17 y SOX9. Alternativamente, pueden medirse CRALBP y LRAT, o pueden medirse CRALBP y SOX9.

Se apreciará que pueden usarse más de dos de los polipéptidos mencionados en el presente documento, por ejemplo, tres de los polipéptidos mencionados anteriormente o incluso los cuatro polipéptidos mencionados anteriormente.

15 Los métodos para analizar la expresión de los polipéptidos mencionados anteriormente implican normalmente el uso de anticuerpos que reconocen específicamente el antígeno. Los anticuerpos disponibles comercialmente que reconocen CRALBP incluyen, por ejemplo, los fabricados por Abcam (por ejemplo, ab15051 y ab189329, clon B2). Los anticuerpos disponibles comercialmente que reconocen PMEL17 incluyen, por ejemplo, los fabricados por Abcam (por ejemplo, ab137062 y ab189330, clon EPR4864). Los anticuerpos disponibles comercialmente que reconocen LRAT incluyen, por ejemplo, los fabricados por Millipore (por ejemplo, MABN644). Los anticuerpos disponibles comercialmente que reconocen SOX9 incluyen, por ejemplo, los fabricados por Abcam (por ejemplo, ab185230). El análisis puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la técnica incluyendo citometría de flujo, inmunotransferencia de tipo Western, inmunocitoquímica, radioinmunoensayo, PCR, etc.

25 Para la citometría de flujo, el anticuerpo puede unirse a un resto fluorescente y analizarse usando una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Alternativamente, se prevé el uso de anticuerpos secundarios con restos fluorescentes.

30 Se apreciará que dado que los polipéptidos que se analizan son polipéptidos intracelulares, normalmente las células se permeabilizan de modo que los anticuerpos sean capaces de unirse a sus dianas. Las células pueden fijarse en primer lugar para garantizar la estabilidad de antígenos solubles o antígenos con una semivida corta. Esto debería conservar la proteína diana en la ubicación celular original. Pueden prepararse anticuerpos en tampón de permeabilización para garantizar que las células se mantengan permeables. Se apreciará que cuando se seleccione en poblaciones celulares, los perfiles de dispersión de luz de las células en el citómetro de flujo cambiarán considerablemente después de la permeabilización y fijación.

35 En la técnica se conocen métodos de permeabilización de la membrana celular e incluyen, por ejemplo:

40 1. Formaldehído seguido por detergente: fijación en formaldehído (por ejemplo, no más del 4,5% durante 10-15 min (esto estabilizará a las proteínas), seguido por alteración de la membrana por detergente tal como Triton o NP-40 (del 0,1 al 1% en PBS), Tween 20 (del 0,1 al 1% en PBS), saponina, digitonina y Leucoperm (por ejemplo, el 0,5% v/v en PBS);

2. Formaldehído (por ejemplo, no más del 4,5%) seguido por metanol;

45 3. Metanol seguido por detergente (por ejemplo, el 80% de metanol y luego el 0,1% de Tween 20);

4. Fijación con acetona y permeabilización.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "citometría de flujo" se refiere a un ensayo en el que la proporción de un material (por ejemplo, células del RPE que comprenden un marcador particular) en una muestra se determina marcando el material (por ejemplo, uniendo un anticuerpo marcado al material), provocando que una corriente de fluido que contiene el material pase a través de un haz de luz, separando la luz emitida de la muestra en longitudes de onda constituyentes mediante una serie de filtros y espejos, y detectando la luz.

55 Están disponibles comercialmente una multitud de citómetros de flujo incluyendo, por ejemplo, Becton Dickinson FACScan, citómetro de flujo Navios (Beckman Coulter, n.º de serie AT15119 RHE9266 y FACScalibur (BD Biosciences, Mountain Vista, CA). Los anticuerpos que pueden usarse para el análisis de FACS se enseñan en Schlossman S, Boumell L, *et al.*, [Leucocyte Typing V. Nueva York: Oxford University Press; 1995] y están disponibles ampliamente a nivel comercial.

60 Se apreciará que el nivel de expresión de los polipéptidos mencionados anteriormente puede efectuarse en el nivel de ARN así como el nivel de proteína. Los métodos a modo de ejemplo para determinar la expresión de un polipéptido basado en el nivel de ARN incluyen, pero no se limitan a, PCR, RT-PCR, transferencia de tipo Northern, etc.

65 Con el fin de calificar que las células son útiles como agente terapéutico, la cantidad de al menos dos de los polipéptidos expresados conjuntamente en las células debe aumentarse por encima de un nivel estadísticamente

significativo en comparación con células que no son del RPE (por ejemplo, células madre embrionarias no diferenciadas).

Según una realización particular, con el fin de calificar que las células son útiles como agente terapéutico, al menos el 80% de las células de la población debe expresar niveles detectables de PMEL17 y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, CRALBP), más preferiblemente al menos el 85% de las células de la población debe expresar niveles detectables de PMEL17 y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, CRALBP), más preferiblemente al menos el 90% de las células de la población debe expresar niveles detectables de PMEL17 y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, CRALBP), más preferiblemente al menos el 95% de las células de la población debe expresar niveles detectables de PMEL17 y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, CRALBP), más preferiblemente el 100% de las células de la población debe expresar niveles detectables de PMEL17 y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, CRALBP) tal como se sometió a ensayo mediante un método conocido para los expertos en la técnica (por ejemplo, FACS).

Según otra realización, con el fin de calificar que las células son útiles como agente terapéutico, el nivel de expresión conjunta de CRALBP y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, PMEL17) (por ejemplo, tal como se mide mediante la intensidad fluorescente media) debe aumentarse en al menos dos veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces e incluso más preferiblemente en al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 en comparación con ESC no diferenciadas.

Según una realización particular, con el fin de calificar que las células son útiles como agente terapéutico, al menos el 80% de las células de la población debe expresar niveles detectables de CRALBP y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, PMEL17), más preferiblemente al menos el 85% de las células de la población debe expresar niveles detectables de CRALBP y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, PMEL17), más preferiblemente al menos el 90% de las células de la población debe expresar niveles detectables de CRALBP y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, PMEL17), más preferiblemente al menos el 95% de las células de la población debe expresar niveles detectables de CRALBP y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, PMEL17), más preferiblemente el 100% de las células de la población debe expresar niveles detectables de CRALBP y uno de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, PMEL17) tal como se sometió a ensayo mediante un método conocido para los expertos en la técnica (por ejemplo FACS).

Además, la célula puede calificarse *in vivo* en modelos animales. Un modelo de este tipo es el modelo de rata del Royal College of Surgeons (RCS). Tras el trasplante, puede analizarse el efecto terapéutico de las células usando métodos que incluyen obtención de imágenes del fondo, umbrales de seguimiento optocinéticos (OKT), electroretinograma (ERG), histología, recuento de conos e ingestión de rodopsina. Estos métodos se describen adicionalmente en el ejemplo 5, a continuación en el presente documento.

Las células pueden calificarse o caracterizarse de maneras adicionales incluyendo, por ejemplo, análisis de cariotipos, morfología, número y viabilidad celular, potencia (función de barrera y secreción polarizada de PEDF y VEGF), nivel de hESC residuales, tinción de Gram y esterilidad. Ensayos a modo de ejemplo que pueden realizarse se describen en el ejemplo 4.

Además, las células pueden analizarse para determinar la función de barrera y su nivel de secreción de factor de crecimiento de manera polarizada (por ejemplo, factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) o VEGF, citocinas, interleucinas y/o quimiocinas).

Para el análisis de PEDF secretado, se recoge el sobrenadante de cultivos de las células, y las células se recogen y cuentan. La cantidad de PEDF en los sobrenadantes del cultivo celular puede cuantificarse usando un ensayo de ELISA de PEDF (tal como el kit de detección de antígeno de ELISA en sándwich de PEDF ELISAquant™, BioProductsMD, PED613) según el protocolo del fabricante.

Además, la dirección de secreción de PEDF y VEGF puede analizarse en las células. Esto puede efectuarse usando un ensayo Transwell tal como se ilustra en la figura 28. Antes de o tras la calificación, las células pueden conservarse según métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, congeladas o crioconservadas) o pueden administrarse directamente al sujeto.

La presente invención contempla analizar poblaciones celulares que comprenden células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) de cualquier fuente. Por tanto, las poblaciones celulares pueden comprender células del RPE obtenidas de un donante (es decir, células nativas del RPE de la capa pigmentada de la retina) o pueden comprender células del RPE que se diferenciaron *ex vivo* de una población de células madre (células del RPE derivadas de hSC, tales como células madre pluripotentes, por ejemplo, células madre embrionarias humanas). Según otra realización, las células del RPE se obtienen mediante transdiferenciación, véase, por ejemplo, Zhang *et al.*, Protein Cell 2014, 5(1):48-58.

Según una realización, las células del RPE que se analizan no expresan Pax6.

Según otra realización, las células del RPE que se analizan expresan Pax6.

“Células del epitelio pigmentario retiniano”, “células del RPE”, “RPE”, que pueden usarse indistintamente según lo permita el contexto, se refiere a células de un tipo celular funcionalmente similar al de células nativas del RPE que forman la capa de células del epitelio pigmentario de la retina (por ejemplo, tras el trasplante en el ojo, presentan actividades funcionales similares a las de células nativas del RPE).

Según una realización, la célula del RPE expresa al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco marcadores de células del RPE maduras. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a, CARLBP, RPE65, PEDF, PMEL17, bestrofina y tirosinasa. Opcionalmente, las células del RPE también pueden expresar un marcador de un progenitor del RPE, por ejemplo, MITF. En otra realización, las células del RPE expresan PAX-6. En otra realización, las células del RPE expresan al menos un marcador de una célula progenitora retiniana incluyendo, pero sin limitarse a, OTX2, SIX3, SIX6 y LHX2.

Según aún otra realización, las células del RPE son aquellas que se diferencian de células madre embrionarias según el método descrito en la sección de ejemplos a continuación en el presente documento, siendo el contenido de los ejemplos como si se incluyera en la propia memoria descriptiva.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “marcadores de células del RPE maduras” se refiere a antígenos (por ejemplo, proteínas) que están elevados (por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces) en células del RPE maduras con respecto a células que no son del RPE o células de RPE inmaduras.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “marcadores de las células progenitoras del RPE” se refiere a antígenos (por ejemplo, proteínas) que están elevados (por ejemplo al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces) en células progenitoras del RPE con respecto a células que no son del RPE.

Según otra realización, las células del RPE tienen una morfología similar a la de células nativas del RPE que forman la capa de células del epitelio pigmentario de la retina, es decir, pigmentadas y/o tienen una forma característica poligonal.

Según todavía otra realización, las células del RPE son capaces de tratar enfermedades tales como degeneración macular.

Según todavía otra realización, las células del RPE satisfacen al menos 1, 2, 3, 4 o todos los requisitos enumerados anteriormente en el presente documento.

El término “células del RPE derivadas de hSC” se usa en el presente documento para denotar células del RPE que se obtienen mediante diferenciación dirigida a partir de hSC. Según una realización preferida, las células del RPE derivadas de hSC son células del RPE funcionales tal como se presenta mediante parámetros definidos a continuación en el presente documento. El término “diferenciación dirigida” se usa indistintamente con el término “diferenciación inducida por RPE” y ha de entenderse que significa el procedimiento de manipulación de hSC en condiciones de cultivo que inducen/promueven la diferenciación para dar el tipo de células del RPE.

Según una realización particular, las células del RPE se obtienen mediante diferenciación dirigida de hSC en presencia de uno o más miembros de la superfamilia de TGFβ, y presentan al menos una de las siguientes características:

- durante la diferenciación, las células cultivadas responden a la señalización de TGFβ;
- las células del RPE expresan marcadores indicativos de diferenciación terminal, por ejemplo, bestrofina 1, CRALBP y/o RPE65;
- tras el trasplante (es decir, *in situ*), las células del RPE presentan un efecto trófico de apoyo de fotorreceptores adyacentes a células del RPE;
- además, las células del RPE *in situ* son capaces de funcionar con fagocitosis de segmentos exteriores de fotorreceptores liberados como parte del proceso de renovación normal de estos fotorreceptores;
- además, las células del RPE *in situ* son capaces de generar un funcionamiento y una barrera retiniana en el ciclo visual.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “células madre” se refiere a células que son capaces de permanecer en un estado indiferenciado (por ejemplo, células madre pluripotentes o multipotentes) durante periodos de tiempo prolongados en cultivo hasta que se inducen para diferenciarse dando otros tipos celulares que tienen una

función particular, especializada (por ejemplo, células completamente diferenciadas). Preferiblemente, la frase “células madre” abarca células madre embrionarias (ESC), células madre pluripotentes inducidas (iPS), células madre adultas, células madre mesenquimatosas y células madre hematopoyéticas.

- 5 Según una realización particular, las células del RPE se derivan de células madre pluripotentes incluyendo células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas.

La frase “células madre embrionarias” se refiere a células embrionarias que son capaces de diferenciarse dando células de las tres capas germinales embrionarias (es decir, endodermo, ectodermo y mesodermo), o que permanecen en un estado indiferenciado. Como referencia, la frase “células madre embrionarias” puede comprender células que se obtienen del tejido embrionario formado después de la gestación (por ejemplo, blastocistos) antes de la implantación del embrión (es decir, un blastocisto de preimplantación), células de blastocistos ampliadas (EBC) que se obtienen de un blastocisto de la fase posterior a la implantación/previa a la gastrulación (véase el documento WO2006/040763) y células germinales embrionarias (EG) que se obtienen del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferiblemente antes de las 10 semanas de gestación. Las células madre embrionarias de algunas realizaciones de la invención pueden obtenerse usando métodos de cultivo celular bien conocidos.

Como ejemplo de referencia, pueden aislarse células madre embrionarias humanas de blastocistos humanos. Los blastocistos humanos se obtienen normalmente de embriones preimplantatorios *in vivo* humanos o de embriones fertilizados *in vitro* (IVF). Alternativamente, un embrión humano unicelular puede ampliarse a la fase de blastocisto. Para el aislamiento de células ES humanas, la zona pelúcida se retira del blastocisto y la masa celular interna (ICM) se aísla mediante cirugía, en la que las células de trofoblasto se lisan y se retiran de la ICM intacta mediante pipeteado suave. La ICM se siembra entonces en un matraz de cultivo tisular que contiene el medio apropiado que permite su sobrecrecimiento. Tras de 9 a 15 días, el sobrecrecimiento derivado de ICM se disocia en grupos o bien mediante una disociación mecánica o bien mediante una degradación enzimática y las células vuelven a sembrarse entonces sobre un medio de cultivo tisular nuevo. Las colonias que demuestran morfología indiferenciada se seleccionan individualmente mediante micropipeta/herramienta de células madre, se diseccionan mecánicamente dando fragmentos/grupos y vuelven a sembrarse. Las células ES resultantes se dividen entonces de manera rutinaria cada 4-7 días. Para detalles adicionales sobre los métodos de preparación de células ES humanas, véanse Reubinoff *et al.*, *Nat Biotechnol* 2000, mayo: 18(5): 559; Thomson *et al.*, [patente estadounidense n.º 5.843.780; *Science* 282: 1145, 1998; *Curr. Top. Dev. Biol.* 38: 133, 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7844, 1995]; Bongso *et al.*, [*Hum Reprod* 4: 706, 1989]; y Gardner *et al.*, [*Fertil. Steril.* 69: 84, 1998].

Se apreciará que también pueden usarse células madre disponibles comercialmente (únicamente como referencia). Pueden adquirirse células ES humanas del registro de células madre embrionarias humanas del NIH [protocolo de transferencia de hipertexto://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm] y otros registros europeos. Ejemplos de referencia no limitativos de líneas de células madre embrionarias disponibles comercialmente son HAD-C102, ESI, BG01, BG02, BG03, BG04, CY12, CY30, CY92, CY10, TE03, TE32, CHB-4, CHB-5, CHB-6, CHB-8, CHB-9, CHB-10, CHB-11, CHB-12, HUES 1, HUES 2, HUES 3, HUES 4, HUES 5, HUES 6, HUES 7, HUES 8, HUES 9, HUES 10, HUES 11, HUES 12, HUES 13, HUES 14, HUES 15, HUES 16, HUES 17, HUES 18, HUES 19, HUES 20, HUES 21, HUES 22, HUES 23, HUES 24, HUES 25, HUES 26, HUES 27, HUES 28, CyT49, RUES3, WA01, UCSF4, NYUES1, NYUES2, NYUES3, NYUES4, NYUES5, NYUES6, NYUES7, UCLA 1, UCLA 2, UCLA 3, WA077 (H7), WA09 (H9), WA13 (H13), WA14 (H14), HUES 62, HUES 63, HUES 64, CT1, CT2, CT3, CT4, MA135, Eneavour-2, WIBR1, WIBR2, WIBR3, WIBR4, WIBR5, WIBR6, HUES 45, Shef 3, Shef 6, BJNhem19, BJNhem20, SA001, SA001.

Además, también pueden obtenerse células ES de otras especies, incluyendo ratón (Mills y Bradley, 2001), hámster dorado [Doetschman *et al.*, 1988, *Dev Biol.* 127: 224-7], rata [Iannaccone *et al.*, 1994, *Dev Biol.* 163: 288-92], conejo [Giles *et al.* 1993, *Mol Reprod Dev.* 36: 130-8; Graves y Moreadith, 1993, *Mol Reprod Dev.* 1993, 36: 424-33], varias especies de animales domésticos [Notarianni *et al.*, 1991, *J Reprod Fertil Suppl.* 43: 255-60; Wheeler 1994, *Reprod Fertil Dev.* 6: 563-8; Mitalipova *et al.*, 2001, *Cloning.* 3: 59-67] y especies de primates no humanos (macaco de la India y tití) [Thomson *et al.*, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 7844-8; Thomson *et al.*, 1996, *Biol Reprod.* 55: 254-9].

Como referencia, pueden obtenerse células de blastocistos ampliadas (EBC) a partir de un blastocisto de al menos nueve días tras la fertilización en una fase previa a la gastrulación. Antes del cultivo del blastocisto, la zona pelúcida se digiere [por ejemplo, mediante disolución ácida de Tyrode (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.)] para exponer la masa celular interna. Los blastocistos se cultivan entonces como embriones completos durante al menos nueve y no más de catorce días tras la fertilización (es decir, antes del acontecimiento de gastrulación) *in vitro* usando métodos de cultivo convencionales de células madre embrionarias.

Otro método para preparar células ES se describe en Chung *et al.*, *Cell Stem Cell*, volumen 2, tomo 2, 113-117, 7 de febrero de 2008. Este método comprende retirar una única célula de un embrión durante un procedimiento de fertilización *in vitro*. El embrión no se destruye en este procedimiento.

Aún otro método para preparar células ES es mediante partenogénesis. El embrión tampoco se destruye en el procedimiento.

Los métodos de cultivo de ES practicados actualmente se basan principalmente en el uso de capas de células alimentadoras que secretan factores necesarios para la proliferación de células madre, mientras que al mismo tiempo, inhiben su diferenciación. Las capas alimentadoras a modo de ejemplo incluyen fibroblastos embrionarios humanos, células epiteliales de trompa de Falopio adultas, fibroblastos embrionarios de ratón primarios (PMEF), fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos fetales murinos (MFF), fibroblasto embrionario humano (HEF), fibroblastos humanos obtenidos de la diferenciación de células madre embrionarias humanas, células del músculo fetal humanas (HFM), células cutáneas fetales humanas (HFS), células cutáneas adultas humanas, fibroblastos de prepucio humanos (HFF), fibroblastos de cordón umbilical humanos, células humanas obtenidas del cordón umbilical o la placenta, y células estromales de médula ósea humanas (hMSC). Pueden añadirse factores de crecimiento al medio para mantener las ESC en un estado indiferenciado. Tales factores de crecimiento incluyen bFGF y/o TGF β . En otra realización, pueden añadirse agentes al medio para mantener las hESC en un estado indiferenciado inicial, véase, por ejemplo, Kalkan *et al.*, 2014, Phil. Trans. R. Soc. B, 369: 20130540.

También se han usado sistemas libres de células alimentadoras en el cultivo de células ES, tales sistemas utilizan matrices complementadas con reemplazo sérico, citocinas y factores de crecimiento (incluyendo IL6 y quimera de receptor soluble de IL6) como reemplazo para la capa de células alimentadoras. Pueden hacerse crecer células madre sobre una superficie sólida tal como una matriz extracelular (por ejemplo, Matrigel^{RTM} o laminina) en presencia de un medio de cultivo, por ejemplo, el sistema Lonza L7, mTeSR, StemPro, XFKSR, E8). Al contrario que los cultivos basados en alimentador que requieren el crecimiento simultáneo de células alimentadoras y células madre y que pueden dar como resultado poblaciones celulares mixtas, las células madre que han crecido sobre sistemas libres de alimentador se separan fácilmente de la superficie. El medio de cultivo usado para hacer crecer las células madre contiene factores que inhiben eficazmente la diferenciación y promueven su crecimiento tal como bFGF y medio acondicionado con MEF. Sin embargo, los sistemas de cultivo libres de alimentador usados comúnmente utilizan una matriz de base animal (por ejemplo, Matrigel^{RTM}) complementada con suero de ratón o bovino, o con medio acondicionado con MEF [Xu C, *et al.* (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 19: 971-4] que presentan el riesgo de transferencia cruzada de patógenos animales a las células ES humanas comprometiendo, por tanto, las futuras aplicaciones clínicas.

Se conocen numerosos métodos para diferenciar ESC hacia el linaje del RPE e incluyen tanto protocolos de diferenciación dirigida tales como los descritos en el documento WO 2008/129554, 2013/184809 como protocolos de diferenciación espontánea tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 8.268.303 y la solicitud de patente estadounidense 20130196369.

Según una realización particular, las células del RPE se generan a partir de células ESC usando un protocolo de diferenciación dirigida, por ejemplo, según lo divulgado en la sección de ejemplos.

En un protocolo de diferenciación a modo de ejemplo, las células madre embrionarias se diferencian hacia el linaje de células del RPE usando un primer agente de diferenciación y luego se diferencia además hacia células del RPE usando un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), (por ejemplo, subtipos TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3, así como ligandos homólogos incluyendo activina (por ejemplo, activina A, activina B y activina AB), nodal, hormona antimulleriana (AMH), algunas proteínas morfogenéticas óseas (BMP), por ejemplo BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 y BMP7, y factores de crecimiento y diferenciación (GDF)).

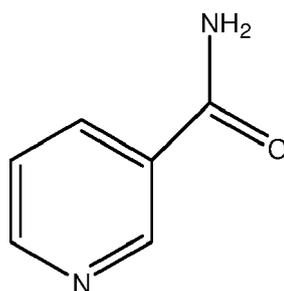
Según una realización particular, el miembro de la superfamilia de TGF β se selecciona del grupo que consiste en TGF β 1, activina A y TGF β 3.

Según una realización específica, el miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) es activina A, por ejemplo, entre 20-200 ng/ml, por ejemplo 100-180 ng/ml.

El primer agente de diferenciación promueve la diferenciación hacia el linaje del RPE. Por ejemplo, el primer agente de diferenciación puede promover la diferenciación de las células madre pluripotentes para dar progenitores neurales. Tales células pueden expresar marcadores de precursores neurales tales como PAX6.

Según una realización particular, el primer agente de diferenciación es nicotinamida (NA), por ejemplo, entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo, 10 mM.

La NA, también conocida como "niacinamida", es la forma de derivado amida de la vitamina B3 (niacina), que se piensa que conserva y mantiene la función de células beta. La NA tiene la fórmula química C₆H₆N₂O. La NA es esencial para el crecimiento y la conversión de alimentos en energía, y se ha usado en el tratamiento de la artritis y el tratamiento y la prevención de la diabetes.



Nicotinamida (NA)

Según una realización particular, la nicotinamida es un derivado de nicotinamida o un imitador de nicotinamida. El término “derivado de nicotinamida (NA)” tal como se usa en el presente documento denota un compuesto que es un derivado químicamente modificado de la NA natural. En una realización, la modificación química puede ser una sustitución del anillo de piridina de la estructura de NA básica (por medio del miembro de carbono o nitrógeno del anillo), por medio de los átomos de nitrógeno o los átomos de oxígeno del resto amida. Cuando se sustituye, pueden reemplazarse uno o más átomos de hidrógeno con un sustituyente y/o puede unirse un sustituyente a un átomo de N para formar un nitrógeno tetravalente cargado positivamente. Por tanto, la nicotinamida de la presente invención incluye una nicotinamida sustituida o no sustituida. En otra realización, la modificación química puede ser una delección o un reemplazo de un grupo individual, por ejemplo, para formar un análogo de tiobenzamida de NA, apreciándose todo esto por los expertos en química orgánica. El derivado en el contexto de la invención también incluye el derivado de nucleósido de NA (por ejemplo, nicotinamida adenina).

Se describe una variedad de derivados de NA, algunos también en relación con una actividad inhibidora de la enzima PDE4 (documentos WO03/068233; WO02/060875; GB2327675A), o como inhibidores de la tirosina cinasa del receptor VEGF (documento WO01/55114). Por ejemplo, el procedimiento de preparar derivados de 4-aryl-nicotinamida (documento WO05/014549). Otros derivados de nicotinamida a modo de ejemplo se divulgan en los documentos WO01/55114 y EP2128244.

Los imitadores de nicotinamida incluyen formas modificadas de nicotinamida, y análogos químicos de nicotinamida que recapitulan los efectos de nicotinamida en la diferenciación y maduración de células del RPE a partir de células pluripotentes. Los imitadores de nicotinamida a modo de ejemplo incluyen ácido benzoico, ácido 3-aminobenzoico y 6-aminonicotinamida. Otra clase de compuestos que pueden actuar como imitadores de nicotinamida son inhibidores de poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP). Los inhibidores de PARP a modo de ejemplo incluyen 3-aminobenzamida, iniparib (BSI 201), olaparib (AZD-2281), rucaparib (AG014699, PF-01367338), veliparib (ABT-888), CEP 9722, MK 4827 y BMN-673.

Según una realización particular, la diferenciación se efectúa de la siguiente manera:

a) cultivo de ESC en un medio que comprende un primer agente de diferenciación (por ejemplo, nicotinamida); y

b) cultivo de células obtenidas a partir de la etapa a) en un medio que comprende un miembro de la superfamilia de TGF β (por ejemplo, activina A) y el primer agente de diferenciación (por ejemplo, nicotinamida).

Preferiblemente, la etapa (a) se efectúa en ausencia del miembro de la superfamilia de TGF β .

El protocolo descrito anteriormente puede continuarse cultivando las células obtenidas en la etapa (b) en un medio que comprende el primer agente de diferenciación (por ejemplo, nicotinamida), pero desprovisto de un miembro de la superfamilia de TGF β (por ejemplo, activina A). Esta etapa se denomina en el presente documento etapa (c).

El protocolo descrito anteriormente se describe ahora con más detalle, con realizaciones adicionales.

El proceso de diferenciación se inicia una vez que se obtienen suficientes cantidades de ESC. Se retiran normalmente del cultivo celular adherente (por ejemplo, usando colagenasa A, dispasa, TrypLE select, EDTA) y se siembran sobre un sustrato no adherente (por ejemplo, placa de cultivo celular no adherente Hydrocell) en presencia de nicotinamida (y ausencia de activina A). Las concentraciones a modo de ejemplo de nicotinamida son de entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo, 10 mM. Una vez que las células se siembran sobre el sustrato no adherente, el cultivo celular puede denominarse suspensión celular, preferiblemente agrupaciones de flotación libre en un cultivo en suspensión, es decir, agregados de células derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC). Las agrupaciones celulares no se adhieren a ningún sustrato (por ejemplo, placa de cultivo, portador). Las fuentes de células madre de flotación libre se describieron previamente en el documento WO 06/070370. Esta fase puede efectuarse durante un mínimo de 1 día, más preferiblemente dos días, tres días, 1 semana o incluso 10 días. Preferiblemente, las células no se cultivan durante más de 2 semanas en suspensión junto con la nicotinamida (y en ausencia del miembro de la superfamilia de TGF β , por ejemplo, activina A).

Según una realización preferida, cuando las células se cultivan sobre el sustrato no adherente, las condiciones de oxígeno atmosférico se manipulan de modo que el porcentaje es igual o menor de aproximadamente el 20%, el 15%, el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 7%, menos de aproximadamente el 6% y más preferiblemente de aproximadamente el 5% (por ejemplo, entre el 1%-20%, el 1%-10% o el 0-5%).

Los ejemplos de placas de cultivo celular no adherentes incluyen las fabricadas por Hydrocell (por ejemplo, n.º de cat. 174912), Nunc, etc.

Normalmente, las agrupaciones comprenden al menos 50-500.000, 50-100.000, 50-50.000, 50-10.000, 50-5000, 50-1000 células. Según una realización, las células en las agrupaciones no se organizan en capas y forman conformaciones irregulares. En una realización, las agrupaciones están desprovistas de células madre embrionarias pluripotentes. En otra realización, las agrupaciones comprenden pequeñas cantidades de células madre embrionarias conjuntamente OCT4 y TRA 1-60 al nivel de proteína). Normalmente, las agrupaciones comprenden células que se han diferenciado parcialmente bajo la influencia de nicotinamida. Tales células pueden expresar marcadores de precursores neurales tales como PAX6. Las células también expresan marcadores de progenitores de otros linajes tales como, por ejemplo, alfa-feto proteína, MIXL1 y Brachyuri.

Las agrupaciones pueden disociarse usando métodos enzimáticos o no enzimáticos (por ejemplo, mecánicos) conocidos en la técnica. Según una realización, las células se disocian de modo que ya no están en agrupaciones, por ejemplo, agregadas o en grupos de 2-100.000 células, 2-50.000 células, 2-10.000 células, 2-5000 células, 2-1000 células, 2-500 células, 2-100 células, 2-50 células. Según una realización particular, las células están en una única suspensión celular.

Las células (por ejemplo, células disociadas) se siembran entonces sobre un sustrato adherente y se cultivan en presencia de nicotinamida, por ejemplo, entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo 10 mM (y ausencia de activina A). Esta fase puede efectuarse durante un mínimo de 1 día, más preferiblemente dos días, tres días, 1 semana o incluso 14 días. Preferiblemente, las células no se cultivan durante más de 1 semana en presencia de nicotinamida sobre el cultivo celular adherente (y en ausencia de activina).

En conjunto, las células se exponen normalmente a nicotinamida (a concentraciones de entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo 10 mM) durante aproximadamente 2-3 semanas, y preferiblemente no más de 4 semanas antes de la adición del segundo factor de diferenciación (por ejemplo, activina A).

Los ejemplos de sustratos adherentes incluyen, pero no se limitan a, colágeno, fibronectina, laminina (por ejemplo laminina 521).

Tras la primera fase de diferenciación dirigida (es decir, cultivo en presencia de nicotinamida (por ejemplo, 10 mM) en condiciones de cultivo no adherente en condiciones atmosféricas de oxígeno bajo seguido por cultivo sobre un sustrato adherente en presencia de nicotinamida en condiciones atmosféricas de oxígeno bajo), las células semidiferenciadas se someten entonces a una fase de diferenciación adicional sobre el sustrato adherente, cultivando en presencia de nicotinamida (por ejemplo, 10 mM) y activina A (por ejemplo, 20-200 ng/ml, 100-200 ng/ml, por ejemplo, 140 ng/ml, 150 ng/ml, 160 ng/ml o 180 ng/ml). Esta fase puede efectuarse durante de 1 día a 10 semanas, de 3 días a 10 semanas, de 1 semana a 10 semanas, de una semana a ocho semanas, de una semana a cuatro semanas, por ejemplo, durante al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas o incluso ocho semanas. Preferiblemente, esta fase se efectúa durante aproximadamente dos semanas. Según una realización, esta fase de diferenciación también se efectúa en condiciones de oxígeno atmosférico bajo, es decir, menos de aproximadamente el 20%, el 15%, el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 7%, menos de aproximadamente el 6% y más preferiblemente de aproximadamente el 5% (por ejemplo, entre el 1%-20%, el 1%-10% o el 0-5%).

Tras la segunda fase de diferenciación dirigida (es decir, cultivo en presencia de nicotinamida y activina A sobre un sustrato adherente), las células diferenciadas adicionales pueden someterse opcionalmente a una fase de diferenciación posterior sobre el sustrato adherente, cultivando en presencia de nicotinamida (por ejemplo, entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo 10 mM), en ausencia de activina A. Esta fase puede efectuarse durante al menos un día, 2 días, 3 días, 1 semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas o incluso cuatro semanas. Preferiblemente, esta fase se efectúa durante aproximadamente una semana. Esta fase de diferenciación puede efectuarse en condiciones de oxígeno atmosférico bajo (es decir, menos de aproximadamente el 20%, el 15%, el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 7%, menos de aproximadamente el 6% y más preferiblemente de aproximadamente el 5% (por ejemplo, entre el 1%-20%, el 1%-10% o el 0-5%) o normal o una combinación de ambas (es decir, inicialmente en condiciones de oxígeno atmosférico bajo y, posteriormente, cuando se observan células ligeramente pigmentadas, en condiciones de oxígeno normales).

Según una realización particular, cuando las condiciones de oxígeno atmosférico regresan a condiciones atmosféricas normales, las células se cultivan durante al menos un día más (por ejemplo, hasta dos semanas) en presencia de nicotinamida (por ejemplo, 10 mM) y en ausencia de activina A.

5 El medio básico según la descripción es cualquier medio de cultivo celular conocido en la técnica para soportar el crecimiento celular *in vitro*, normalmente, un medio que comprende una disolución base definida, que incluye sales, azúcares, aminoácidos y cualquier otro nutriente requerido para el mantenimiento de las células en el cultivo en un estado viable. Los ejemplos no limitativos de medios básicos disponibles comercialmente que pueden utilizarse según la descripción comprenden Nuristem (sin bFGF ni TGF β para diferenciación de ESC, con bFGF y TGF β para expansión de ESC) Neurobasal™, KO-DMEM, DMEM, DMEM/F12, sistema Lonza L7, mTeSR, StemPro, XF KSR, E8, medio de crecimiento de células madre Cellgro™, o XVivo™. El medio básico puede complementarse con una variedad de agentes tal como se conoce en la técnica que trata con cultivos celulares. Lo siguiente es una referencia no limitativa a diversos complementos que pueden incluirse en el sistema de cultivo que va a usarse según la presente divulgación:

15 - suero o con un medio que contiene reemplazo sérico, tal como, sin limitarse a, reemplazo sérico de inactivación (KOSR), Nutridoma-CS, TCH™, N2, derivado de N2, o B27 o una combinación;

20 - un componente de matriz extracelular (ECM), tal como, sin limitarse a, fibronectina, laminina, colágeno y gelatina. El ECM puede usarse entonces para portar el uno o más miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de TGF β ;

- un agente antibacteriano, tal como, sin limitarse a, penicilina y estreptomicina;

25 - aminoácidos no esenciales (NEAA), neurotrofinas que se conoce que desempeñan un papel en promover la supervivencia de SC en cultivo, tal como, sin limitarse a, BDNF, NT3, NT4.

Según una realización preferida, el medio usado para diferenciar las ESC es medio Nuristem (Biological Industries, 05-102-1A o 05-100-1A).

30 Según una realización particular, la diferenciación de ESC se efectúa en condiciones libres de componentes foráneos.

Según una realización, el medio de proliferación/crecimiento está desprovisto de contaminantes foráneos, es decir, libre de componentes derivados de animales tales como suero, factores de crecimiento derivados de animales y albúmina. Por tanto, según esta realización, el cultivo se realiza en ausencia de contaminantes foráneos.

35 Otros métodos para cultivar ESC en condiciones libres de componentes foráneos se proporcionan en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20130196369.

40 Durante las etapas de diferenciación, las células madre embrionarias pueden monitorizarse para determinar su estado de diferenciación. La diferenciación celular puede determinarse tras el examen de marcadores específicos celulares o tisulares que se conoce que son indicativos de diferenciación.

45 Pueden detectarse marcadores específicos tisulares/celulares usando técnicas inmunológicas bien conocidas en la técnica [Thomson JA *et al.*, (1998). Science 282: 1145-7]. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo para marcadores unidos a membrana o intracelulares, inmunohistoquímica para marcadores extracelulares e intracelulares, e inmunoensayo enzimático para marcadores moleculares secretados (por ejemplo, PEDF).

50 Por tanto, según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de generación de células epiteliales retinianas que comprende:

(a) cultivar células madre pluripotentes en un medio que comprende un agente de diferenciación para generar células en diferenciación, en el que el medio está desprovisto de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β);

55 (b) cultivar las células en diferenciación en un medio que comprende el miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el agente de diferenciación para generar células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE;

60 (c) analizar la secreción de factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) a partir de las células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE; y

(d) cultivar las células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE en un medio que comprende un agente de diferenciación para generar células del RPE, en el que el medio está desprovisto de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), en el que la etapa (d) se efectúa cuando la cantidad del PEDF está

por encima de un nivel predeterminado.

Preferiblemente, la etapa (d) se efectúa cuando el nivel de PEDF está por encima de 100 ng/ml/día, 200 ng/ml/día, 300 ng/ml/día, 400 ng/ml/día o 500 ng/ml/día.

5 Otro método para determinar la potencia de las células durante o tras el proceso de diferenciación es mediante el análisis de la función de barrera y secreción polarizada de PEDF y VEGF, tal como se ilustra en el ejemplo 4, a continuación en el presente documento.

10 Una vez que las células se promueven para dar células del RPE, pueden seleccionarse y/o expandirse.

Según una realización particular, la selección se basa en una selección negativa, es decir, retirada de células que no son del RPE. Esto puede realizarse mecánicamente mediante la retirada de células no pigmentadas o la retirada de células no poligonales o mediante el uso de marcadores de superficie.

15 Según otra realización, la selección se basa en una selección positiva, es decir, selección basada en la morfología (por ejemplo, células pigmentadas y/o células poligonales). Esto puede realizarse mediante análisis visual o el uso de marcadores de superficie.

20 Según todavía otra realización, la selección se basa en primer lugar en una selección negativa y luego en una selección positiva.

25 La expansión de células del RPE puede efectuarse en una matriz extracelular, por ejemplo gelatina, colágeno o poli-D-lisina y laminina. Para la expansión, las células pueden cultivarse en KOM libre de suero, medio que comprende suero (por ejemplo, DMEM + el 20%) o medio Nuristem (06-5102-01-1A de Biological Industries). Opcionalmente, las células pueden exponerse a nicotinamida durante la fase de expansión, a concentraciones de entre 1-100 mM, 5-50 mM, 5-20 mM, por ejemplo 10 mM. En estas condiciones de cultivo, las células pigmentadas reducen la pigmentación y adquieren una morfología de tipo fibroide. Tras el cultivo prolongado adicional y la proliferación en cultivos de alta densidad, las células vuelven a adquirir la morfología de conformación poligonal característica y preferiblemente también la pigmentación de células del RPE.

35 Las células del RPE pueden expandirse en suspensión o en una monocapa. La expansión de las células del RPE en cultivos de monocapa puede modificarse a expansión a gran escala en biorreactores mediante métodos bien conocidos para los expertos en la técnica.

La población de células del RPE generada según los métodos descritos en el presente documento puede caracterizarse según varios parámetros diferentes.

40 Por tanto, por ejemplo, las células del RPE obtenidas son de conformación poligonal y están pigmentadas.

Según una realización, al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o incluso el 100% de las células de las poblaciones de células del RPE obtenidas expresan conjuntamente tanto proteína premelanosoma (PMEL17) como proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP).

45 Tras la administración, las células descritas en el presente documento son capaces de formar una monocapa (tal como se ilustra en la figura 27C).

Según una realización, la resistencia eléctrica transepitelial de las células en una monocapa es mayor de 100 ohmios.

50 Preferiblemente, la resistencia eléctrica transepitelial de las células es mayor de 150, 200, 250, 300, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o incluso mayor de 900 ohmios.

55 Según una realización particular, la TEER es de entre 100-1000 ohmios, más preferiblemente entre 100-900 ohmios, por ejemplo, entre 200-900 ohmios, 300-800 ohmios, 300-700 ohmios, 400-800 ohmios o 400-700 ohmios.

Se conocen en la técnica dispositivos para medir la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Un sistema a modo de ejemplo para medir la TEER se ilustra en la figura 28.

60 Se apreciará que las poblaciones celulares divulgadas en el presente documento están desprovistas de células madre embrionarias humanas indiferenciadas. Según una realización, menos de 1:250.000 células son células Oct4⁺TRA-1-60⁺, tal como se mide, por ejemplo, mediante FACS. Las células tampoco expresan o regulan por disminución la expresión de GDF3 o TDGF en relación con hESC tal como se mide mediante PCR.

65 Otro modo de caracterizar las poblaciones celulares divulgadas en el presente documento es mediante expresión de marcador. Por tanto, por ejemplo, al menos el 80%, el 85% o el 90% de las células expresan bestrofina 1, tal como se

5 mide mediante inmunotinción. Según una realización, entre el 90-95% de las células expresan bestrofina.

Según otra realización, al menos el 80%, el 85%, el 87%, el 89% o el 90% de las células expresan factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), tal como se mide mediante inmunotinción. Por ejemplo, entre el 85-95% de las células expresan MITF.

Según otra realización, al menos el 50%, el 55%, el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 87%, el 89% o el 90% de las células expresan gen de caja apareada 6 (PAX-6) tal como se mide mediante FACS.

10 Las células descritas en el presente documento también pueden caracterizarse según la cantidad y/o el tipo de factores que secretan. Por tanto, según una realización, las células secretan preferiblemente más de 500, 750, 1000 o incluso 2000 ng de factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) por ml al día, (por ejemplo, tras 14 días en cultivo) tal como se mide mediante ELISA.

15 Se apreciará que las células del RPE generadas en el presente documento secretan PEDF y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de manera polarizada. Según realizaciones particulares, la razón de secreción apical de PEDF:secreción basal de PEDF es mayor de 1. Según realizaciones particulares, la razón de secreción apical de PEDF:secreción basal de PEDF es mayor de 2. Según realizaciones particulares, la razón de secreción apical de PEDF:secreción basal de PEDF es mayor de 3. Además, la razón de secreción basal de VEGF:secreción apical de VEGF es mayor de 1. Según realizaciones particulares, la razón de secreción basal de VEGF:secreción apical de VEGF es mayor de 1,5, 2 ó 2,5.

20 Las células de la presente descripción secretan factores adicionales incluyendo, por ejemplo, angiogenina, los factores inmunomoduladores IL-6, sgp130, MIF, sTNF-R1, sTRAIL-R3, MCP-1 y osteoprotegerina, los reguladores de la matriz extracelular TIMP-1 y TIMP-2 y la proteína Axl.

25 Según otro aspecto, al menos el 80% de las células de la población celular expresan conjuntamente proteína premelanosoma (PMEL17) y proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP) y además una porción (al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%) de las células secretan/liberan cada uno de angiogenina, inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP 2), glicoproteína soluble 130 (sgp130) y forma soluble del receptor de membrana ubicuo 1 para el factor de necrosis tumoral α (sTNF-R1).

30 Se apreciará que en algunos casos todas las células que expresan conjuntamente proteína premelanosoma (PMEL17) y proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP) también secretan/liberan angiogenina, inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP 2), glicoproteína soluble 130 (sgp130) y forma soluble del receptor de membrana ubicuo 1 para el factor de necrosis tumoral α (sTNF-R1).

35 En otros casos, la mayoría (más del 50%, el 60%, el 70%, el 80, el 90% de las células que expresan conjuntamente proteína premelanosoma (PMEL17) y proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP) también secretan/liberan angiogenina, inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP 2), glicoproteína soluble 130 (sgp130) y forma soluble del receptor de membrana ubicuo 1 para el factor de necrosis tumoral α (sTNF-R1).

40 Las células del RPE generadas en el presente documento secretan preferiblemente angiogenina, TIMP2, sgp130 y sTNF-R1 de manera polarizada.

45 Según realizaciones particulares, la razón de secreción apical de sgp130:secreción basal de sgp130 es mayor de 1. Según realizaciones particulares, la razón de secreción apical de sgp130:secreción basal de sgp130 es mayor de 2. Según realizaciones particulares, la razón de secreción apical de sgp130:secreción basal de sgp130 es mayor de 3.

50 Además, la razón apical de sTNF-R1:basal de sTNF-R1 es mayor de 1. Según realizaciones particulares, la razón apical de sTNF-R1:basal de sTNF-R1 es mayor de 2. Según realizaciones particulares, la razón apical de sTNF-R1:basal de sTNF-R1 es mayor de 3.

55 Además, la razón de secreción basal de angiogenina:secreción apical de angiogenina es mayor de 1. Según realizaciones particulares, la razón de secreción basal de angiogenina:secreción apical de angiogenina es mayor de 1,5, 2, 2,5 ó 3.

60 Además, la razón de secreción apical de TIMP2:secreción basal de TIMP2 es mayor de 1. Según realizaciones particulares, la razón de secreción apical de TIMP2:secreción basal de TIMP2 es mayor de 2. Según realizaciones particulares, la razón de secreción apical de TIMP2:secreción basal de TIMP2 es mayor de 3.

65 La estabilidad de las células es otro rasgo característico. Por tanto, por ejemplo, la cantidad de secreción de PEDF permanece estable en las células tras su incubación a 2-8°C durante 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas o incluso 24 horas. Además, la secreción polarizada de PEDF y VEGF permanece estable tras la incubación de las células a 2-8°C durante 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas o incluso 24 horas. Además, la TEER de las células permanece estable en las células tras su incubación a 2-8°C durante 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas o incluso 24 horas.

En otra realización, las células se caracterizan por su efecto terapéutico. Por tanto, por ejemplo, los presentes inventores han demostrado las poblaciones celulares son capaces de rescatar la agudeza visual en la rata del RCS tras la administración subretiniana. Además, las poblaciones celulares son capaces de rescatar fotorreceptores (por ejemplo, fotorreceptores de los conos) durante hasta 180 días (en algunas realizaciones al menos 180 días) tras la administración subretiniana en la rata del RCS.

Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que la derivación de células del RPE es de gran beneficio. Puede usarse un modelo *in vitro* para el desarrollo de nuevos fármacos para promover la supervivencia, regeneración y función de células del RPE. Las células del RPE pueden servir para cribado analítico masivo para compuestos que tienen un efecto tóxico o regenerativo sobre células del RPE. Pueden usarse para descubrir mecanismos, nuevos genes, factores solubles o unidos a membrana que son importantes para el desarrollo, diferenciación, mantenimiento, supervivencia y función de células fotorreceptoras.

Las células del RPE también pueden servir como una fuente ilimitada de células del RPE para trasplante, reposición y soporte de células del RPE con mal funcionamiento o degeneradas en degeneraciones retinianas. Además, las células del RPE modificadas genéticamente pueden servir como vector para portar y expresar genes en el ojo y la retina después del trasplante.

Las células del RPE producidas mediante el método de la presente divulgación pueden usarse para cultivo de tales células a gran escala y/o largo plazo. Para este fin, el método de la descripción va a realizarse en biorreactores y/o sistemas de cultivo celular adecuados para producción de células a gran escala, y en los que van a cultivarse hSC indiferenciadas según la descripción. Los requisitos generales para el cultivo de células en biorreactores y/o sistemas de cultivo celular se conocen bien por aquellos expertos en la técnica.

La recogida de las células puede realizarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos incluyen disección mecánica y disociación con papaína o tripsina (por ejemplo, TrypLE select). También son aplicables otros métodos conocidos en la técnica.

Las células del RPE generadas tal como se describe en el presente documento pueden trasplantarse a diversos sitios diana dentro del ojo de un sujeto. Según una realización, el trasplante de las células del RPE es al espacio subretiniano del ojo, que es la ubicación anatómica normal del RPE (entre los segmentos exteriores del fotorreceptor y la coroides). Además, según la capacidad migratoria y/o los efectos paracrinos positivos de las células, el trasplante en compartimentos oculares adicionales puede considerarse que incluye la retina interior o exterior, la periferia retiniana y dentro de la coroides.

Las enfermedades retinianas que pueden tratarse usando las células del RPE descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, retinosis pigmentaria, retinosquiasis, degeneración reticular, enfermedad de Best y degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

Además, el trasplante puede realizarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen métodos para realizar trasplantes de RPE en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.962.027, 6.045.791 y 5.941.250 y en Eye Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol marzo de 1997; 235(3):149-58; Biochem Biophys Res Commun 24 de febrero de 2000; 268(3): 842-6; Ophthalmic Surg febrero de 1991; 22(2): 102-8. Se describen métodos para realizar trasplantes corneales en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.755.785, y en Eye 1995; 9 (Pt 6 Su):6-12; Curr Opin Ophthalmol agosto de 1992; 3 (4): 473-81; Ophthalmic Surg Lasers abril de 1998; 29 (4): 305-8; Ophthalmology abril de 2000; 107 (4): 719-24; y Jpn J Ophthalmol noviembre - diciembre de 1999; 43(6): 502-8. Si van a utilizarse principalmente efectos paracrinos, las células también pueden administrarse y mantenerse en el ojo encapsuladas dentro de un recipiente semipermeable, que también reducirá la exposición de las células al sistema inmunitario del huésped (sistema de administración de CNTF de Neurotech USA; PNAS 7 de marzo de 2006 vol. 103(10) 3896-3901).

Según una realización, el trasplante se realiza por medio de cirugía de vitrectomía a través de la parte plana seguido por administración de las células a través de una pequeña abertura retiniana en el espacio subretiniano o mediante inyección directa. Alternativamente, las células pueden administrarse en el espacio subretiniano por medio de un enfoque transescleral, transcoroidal. Además, puede realizarse inyección transescleral directa en el espacio vítreo o administración a la periferia retiniana anterior en proximidad con el cuerpo ciliar.

Las células del RPE pueden trasplantarse de diversas formas. Por ejemplo, las células del RPE pueden introducirse en el sitio diana en forma de suspensión celular, o adherirse sobre una matriz, matriz extracelular o sustrato tal como un polímero biodegradable o una combinación. Las células del RPE también pueden trasplantarse (trasplante conjunto) con otras células retinianas, tales como con fotorreceptores.

Por tanto, la descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas de células del RPE descritas en el presente documento. La composición es preferiblemente una adecuada para trasplante en el ojo. Por tanto, por ejemplo, las células del RPE pueden formularse en una disolución de irrigación intraocular tal como BSS plus™.

Se espera que, durante la vida de una patente que madura a partir de esta solicitud, se desarrollarán muchas tecnologías relevantes para la generación de células del RPE, y el término células del RPE se pretende que incluya todas estas nuevas tecnologías *a priori*.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a \pm el 10%.

Los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye pero no se limita a”.

10 El término “que consiste en” significa “que incluye y se limita a”.

El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, el método o la estructura puede incluir componentes, etapas y/o partes adicionales, pero sólo si los componentes, las etapas y/o partes adicionales no alteran sustancialmente las características básicas y nuevas de la composición, el método o la estructura reivindicada.

15 Tal como se usa en el presente documento, la forma singular “un”, “una” y “el/la” incluye referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos uno compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

20 En toda esta solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por comodidad y concisión y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un intervalo debe considerarse que tiene específicamente divulgados todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como desde 1 hasta 6 debe
25 considerarse que tiene específicamente divulgados intervalos tales como desde 1 hasta 3, desde 1 hasta 4, desde 1 hasta 5, desde 2 hasta 4, desde 2 hasta 6, desde 3 hasta 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea dada incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos o bien conocidos o bien fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la evolución de un estado, mejorar sustancialmente síntomas clínicos o estéticos de un estado o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de un estado.

40 Se aprecia que determinadas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de diferentes realizaciones, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. En cambio, diversas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no se consideran características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea
45 inoperante sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se definieron anteriormente en el presente documento y tal como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

50

Ejemplos

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de manera no limitativa.

55

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook *et al.*, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel
60 *et al.*, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tal como se establecen en las patentes estadounidenses n.ºs 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique” por Freshney, Wiley-
65 Liss, N. Y. (1994), tercera edición; “Current Protocols in Immunology” volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites

et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); se describen extensamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan en todo este documento. Los procedimientos en este respecto se cree que se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

15 Ejemplo de referencia 1

Calificación del método de FACS de doble tinción de CRALBP/PMEL 17

El objetivo de este estudio era calificar el método de FACS de doble tinción de CRALBP/PMEL 17 demostrando la exactitud y precisión del método en un mínimo de 6 ensayos de adiciones conocidas independientes durante al menos 3 días de prueba. La calificación del ensayo se realizó usando el lote OpRegen® 5C como células de control positivo y HAD-C 102-hESC como células de control negativo. Se usó una curva de calibración de cantidades conocidas del RPE (OpRegen® 5C) con adiciones conocidas hESC para someter a prueba la exactitud y precisión en diferentes puntos de adiciones conocidas. La exactitud y precisión esperadas fueron de hasta el 25% en todos los puntos.

Protocolo de tinción: se descongelaron células hESC de control negativo tomadas de un banco de hESC crioconservadas (HAD-C 102 p48 4.5.2014) en Nutristem (que contenían HSA) según protocolos del patrocinador. Reserva de células del RPE de control positivo: se descongelaron células del lote OpRegen® 5C (línea de referencia) en DMEM-HS al 20% según protocolos del patrocinador. Se centrifugaron hESC OpRegen® 5C y HAD-C102 descongeladas, se resuspendieron en 1 ml de PBS (-), se filtraron a través de un filtro celular de 35 µm y se contaron con azul de tripano. Se ajustó la concentración celular a $0,73 \times 10^6 - 10^6$ células/ml en PBS (-). Se añadió 1 µl/ml de FVS450 a cada suspensión celular seguido por agitación con vórtex e incubación durante 6 minutos a 37°C. Se lavó FVS450 con BSA al 0,1% y se resuspendió en BSA al 0,1%-Fc-block (5 min a TA) para bloquear todos los epítomos de Fc en las células. Se lavaron entonces las células con PBS (-) y se fijaron en metanol al 80% (5 min a 4°C). Se lavaron las células fijadas una vez con PBS (-), una vez con PBS-T al 0,1%, y se permeabilizaron con PBS-T al 0,1% (20 minutos a TA). Se reemplazó la disolución de permeabilización con disolución de bloqueo de suero normal de cabra al 10% (NGS) (200.000 células/50 µl) durante al menos 30 minutos (máx. una hora) a TA. Durante el tiempo de incubación, se prepararon tubos de muestra de calidad (QS) y, al final del bloqueo, se dividieron las células y se inmunotifieron. Se incubaron las células con anticuerpos primarios durante 30 minutos seguido por 3 lavados con PBS-T al 0,1% y 30 min de incubación con anticuerpos secundarios y 3 lavados con PBS-T al 0,1%.

Se tiñeron células de control negativo y control positivo con la tinción de viabilidad FVS450, se fijaron, se bloquearon y se permeabilizaron. Se generó entonces una curva de calibración de cantidades conocidas de células del RPE de control positivo (OpRegen® 5C) en hESC de control negativo, a 4 concentraciones (el 25%, el 50%, el 75% y el 95% de RPE en hESC), basándose en el recuento celular de viabilidad con azul de tripano de cada población. Se inmunotifieron células de control negativo y control positivo y las poblaciones mixtas con anticuerpos primarios monoclonales específicos para los marcadores de RPE CRALBP y PMEL 17, seguido por tinción con anticuerpos secundarios emparejados (anticuerpo anti-FITC de ratón y anticuerpo anti-Alexa Fluor 647 de conejo, respectivamente). Las células teñidas se analizaron mediante FACS para medir el porcentaje de células CRALBP+PMEL17+ activadas de células individuales viables.

RESULTADOS

Exactitud: se determinó la exactitud del ensayo a partir de los resultados de prueba de 4 niveles de RPE con adiciones conocidas (el 25%, el 50%, el 75% y el 95%). La exactitud de la reserva de RPE (OpRegen® 5C) se determinó con respecto a la misma siendo potencialmente el 100% de células del RPE. Se analizaron cada uno de los valores de nivel mediante seis series/determinaciones independientes.

El nivel de concentración del 50% se consideró que era el límite inferior de cuantificación con una exactitud esperada de hasta el 25% (el nivel del 50% osciló desde -8,41 hasta 20,14; los niveles del 75% y el 99,5% oscilaron desde -5,32 hasta 6,88).

Estos resultados cumplen los desenlaces esperados para el sesgo relativo de hasta el 25%, e indican que el ensayo es exacto para la determinación de células CRALBP+PMEL17+ de doble positivo en concentraciones que oscilan desde el 50-99,5%. Dado que OpRegen® 5C produce el 99,5% de células del RPE CRALBP+PMEL17+ de doble positivo, no puede garantizarse un sesgo relativo de menos del 25% para un resultado >99,5%.

Tabla 1

Serie	Concentración asignada (%)	Concentración medida (%)	Sesgo relativo (%)
1	25	20,88	-16,48
2		31,61	26,44
3		32,20	28,80
4		32,01	28,04
5		25,71	2,84
6		26,87	7,48
1	50%	45,93	-8,14
2		60,08	20,16
3		56,87	13,74
4		58,51	17,02
5		50,56	1,12
6		49,52	-0,96
1	75%	71,01	-5,32
2		79,64	6,19
3		78,41	4,55
4		80,16	6,88
5		73,85	-1,53
6		72,94	-2,75
1	95%	93,94	-1,12
2		96,14	1,20
3		95,11	0,12
4		95,59	1,01
5		93,81	-1,25
6		93,70	-1,37
1	100%	98,79	-1,21
2		99,69	-0,31
3		99,62	-0,38
4		99,59	-0,41
5		99,60	-0,40
6		99,48	-0,52

5 *Precisión intermedia:* se determinó la precisión intermedia del ensayo a partir de los resultados de 6 ensayos llevados a cabo por un operario. En cada ensayo se determinó el porcentaje de RPE viables individuales y a partir de eso se calculó el % de CY. La tabla 2 resume los resultados de prueba. Tal como se muestra, el % de CY para todos los niveles de concentración estaba por debajo del 20% y puede medirse con precisión adecuada. Los % de CY para los niveles de concentración del 25%, el 50%, el 75%, el 95% y el 100% de RPE, fueron el 16,14%, el 10,61%, el 5,10%, el 1,17% y el 0,34%, respectivamente. Estos resultados cumplen los valores esperados para la precisión. El porcentaje de RPE medido está dentro del 20% del valor esperado a todas las concentraciones. Estos resultados indican que el ensayo es preciso para la determinación de los RPE en concentraciones que oscilan desde el 25-99,5%.

Tabla 2

Concentración asignada (%)	Serie	Concentración medida (% de RPE)
25	1	20,88

15

	2	31,61
	3	32,20
	4	32,01
	5	25,71
	6	26,87
	% de RPE medio	28,21
	DE	4,55
	% de CV	16,14
50	1	45,93
	2	60,08
	3	56,87
	4	58,51
	5	50,56
	6	49,52
	% de RPE medio	53,58
	DE	5,68
% de CV	10,61	
75	1	71,01
	2	79,64
	3	78,41
	4	80,16
	5	73,85
	6	72,94
	% de RPE medio	76,00
	DE	3,88
% de CV	5,10	
95	1	93,94
	2	96,14
	3	95,11
	4	95,96
	5	93,81
	6	93,70
	% de RPE medio	94,78
	DE	1,11
% de CV	1,17	
100	1	98,79
	2	99,69
	3	99,62
	4	99,59
	5	99,60
	6	99,48
	% de RPE medio	99,46
	DE	0,34

	% de CV	0,34
--	---------	------

Repetibilidad: se sometió a prueba la repetibilidad de la muestra en 3 series (n.º 2, n.º 3 y n.º 4) en las que se tiñeron muestra duplicadas de SC OpRegen® y se adquirieron lado a lado. Los resultados confirmaron que la identidad de muestra obtenida dentro de un experimento es repetible y uniforme a lo largo de las muestras.

5 *Linealidad/intervalo:* tal como se muestra en la figura 1, se midió la linealidad usando datos que se encontró que eran tanto exactos como precisos. El coeficiente de regresión entre los resultados objetivo (con adiciones conocidas) y medidos a lo largo del intervalo de ensayo sometido a prueba (50%-100%) se encontró que era de 0,99. Por tanto, el intervalo del método que demuestra exactitud y precisión y linealidad aceptables es el intervalo entre el 50% y el 99,5% de células del RPE, que cubre el intervalo esperado de muestras sometidas a prueba.

10 *Células de control positivo:* el nivel provisional de células CRALBP/PMEL17 de doble positivo se estableció a igual a o mayor del 95%.

15 *Células de control negativo:* el nivel provisional de células CRALBP/PMEL17 de doble positivo para hESC se estableció a igual o menor del 2%.

20 *Estabilidad:* los resultados muestran que las muestras teñidas también son estables a 4°C después de uno y 4 días, y se mantiene la exactitud dentro de los criterios de aceptación esperados, por tanto la adquisición de datos puede realizarse en el plazo de 96 horas de la preparación de muestra.

Conclusión

25 Los resultados presentados en el presente documento indican que el método divulgado está calificado y es adecuado para su uso previsto de determinación *in vitro* de la pureza de RPE en el producto final OpRegen® y en diferentes fases en el procedimiento de producción de OpRegen®, con exactitud de sesgo relativo de < 25% y precisión del % de CV < 20% en el intervalo del 50%-99,5% de células del RPE.

Ejemplo de referencia 2

30 *Evaluación del nivel de pureza de OpRegen®*

35 Se desarrolló un método basado en FACS para evaluar el nivel de pureza de células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) humano así como impurezas de células que no son del RPE en células del RPE. Se identificó de manera bioinformática la proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), uno de los componentes del ciclo visual, como marcador único para células del RPE maduras. Los estudios preliminares que usan anticuerpo monoclonal específico de CRALBP han demostrado una pureza de por encima del 98% en células del RPE generadas según métodos descritos en el presente documento. Estos resultados se respaldaron adicionalmente mediante inmunotinción para PMEL17, un marcador de melanosoma encontrado en el RPE. Además, a diferencia de algunos marcadores específicos del RPE, CRALBP no se expresa en melanocitos, una posible contaminación celular de la cresta neural.

40 *Muestra de prueba y controles:* se usaron melanocitos primarios humanos (ATCC, PCS-200-013) como células de control negativo para CRALBP y como células de control positivo para PMEL17, glicoproteína transmembrana tipo I enriquecida en melanosomas (gránulos de melanina). Se usaron HADC102-hESC en P29 (línea parental de OpRegen®), como células de control negativo para tanto CRALBP como PMEL17. Se usaron células OpRegen® (lote 2A) de calidad clínica y OpRegen® de calidad para investigación (producidas en BPF como producción simulada; producción simulada IV D16) como muestras sometidas a prueba. Las células se generaron tal como se describe en el ejemplo 3.

50 *Inmunotinción y análisis de FACS:* se descongelaron células y se tiñeron usando la tinción de viabilidad fijable (FVS450) (BD 562247), se fijaron con metanol al 80%, se inmunotiñeron con el anticuerpo primario anti-CRALBP de ratón (clon B2, Abcam ab15051), o su control de isotipo para IgG2a de ratón (Abcam ab170191) y anticuerpo de conejo anti-PMEL17 humano (clon EPR4864, Abcam ab137062) seguido por anticuerpos secundarios anti-ratón de cabra (Dako F0479) y anti-conejo de cabra (Jackson 111-606-144), respectivamente.

55 La adquisición de datos de FACS se realizó usando un citómetro de flujo Navios validado (Beckman Coulter) y se realizó el análisis usando FlowJo 7.6.

RESULTADOS

60 Los datos de FACS iniciales usando anticuerpo monoclonal anti-CRALBP mostraron que el nivel de pureza de OpRegen® está por encima del 98%. Se encontró que los melanocitos, que son un posible contaminante de la cresta neural, eran negativos para el marcador específico del RPE único CRALBP (1,7%). La línea parental HADC102-hESC fue negativa a CRALBP (0,2%), tal como se esperaba.

El nivel de pureza de OpRegen® permaneció por encima del 98% tras la doble tinción con CRALBP y PMEL17 (figura 10). Los melanocitos dieron tinción positiva para PMEL17, tal como se esperaba, pero negativa para la población marcada doblemente (~1%). Las HADC102-hESC dieron tinción negativa para CRALBP y PMEL17 (0,07%).

5

Ejemplo de referencia 3

Descripción del procedimiento de fabricación y controles del procedimiento

10 Se fabrica OpRegen® a partir de la línea de hESC HAD-C 102 de calidad para BPM libre de componentes foráneos hecha crecer en alimentadores de fibroblastos del cordón umbilical humano de calidad para BPF libre de componentes foráneos irradiados. Se produjeron línea celular alimentadora de fibroblastos humanos de calidad clínica (CRD008; MCB) y bancos de células de trabajo (WCB) en condiciones de buenas prácticas de fabricación (BPF) y libres de componentes foráneos, se sometieron a prueba, se caracterizaron y se depositaron en bancos de manera apropiada.

15 Estas se usaron entonces en la derivación de la línea de hESC de calidad clínica HAD-C 102 a partir del excedente de blastocistos humanos en condiciones de BPF y libres de componentes foráneos.

En la fase inicial de producción se expanden hESC en alimentadores irradiados como colonias. Se transfieren entonces a un cultivo en suspensión para iniciar la diferenciación de manera dirigida. Se forman cuerpos esféricos (SB) y luego se siembran en placa como cultivo adherente en condiciones de diferenciación dirigida continuadas hacia un destino neural y posteriormente hacia células del RPE. Al final de la fase de diferenciación se extirpan físicamente áreas no pigmentadas y las células pigmentadas se recogen, se siembran y se expanden enzimáticamente. Se recogen células del RPE derivadas de hESC purificadas (DS) en el paso 2 e inmediatamente se procesan al DP. La duración del procedimiento de fabricación depende de la tasa de crecimiento de hESC (~2 meses desde la descongelación) y en total abarca habitualmente más de 4-5 meses.

20

25

Cada etapa del procedimiento de fabricación, incluyendo las pruebas de control de calidad en proceso (QC) se describe brevemente a continuación.

30 *Etapas 1-3: Generación de banco de células de trabajo alimentadoras de fibroblastos de cordón umbilical humano (WCB).* Se descongeló un vial de banco de células maestro alimentador de cordón umbilical humano (MCB) (CRD008-MCB) en el paso 3-4, se expandió en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, SH30081.01, Hyclone) complementado con suero humano al 20% (14-498E, Lonza), se irradió (célula gamma, 220 Exel, MDS Nordion 3.500 rads) y se criconservó en los pasos 7-8 para generar los bancos de células de trabajo (WCB). Antes de la crioconservación, se sometieron a prueba muestras de los cultivos celulares alimentadores para determinar la esterilidad, micoplasma y lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), la morfología, el cariotipo, el número celular y la viabilidad. Además, tras la descongelación, se confirmó su identidad para el MCB, su incapacidad para proliferar y su capacidad para soportar el crecimiento de HAD-C102-hESC indiferencia. Si el WCB pasó todas las pruebas de QC, el banco se liberó para la expansión de hESC.

35

40

Se representan las etapas de producción 1-3 en la figura 12.

45 *Etapas 4-5: expansión de hESCs.* Se descongeló un único vial del WCB de fibroblastos de cordón umbilical humano (o bien CRD008-WCB8 o bien CRD008-WCB9) y se sembró en placas de pocillos centrales cubiertas con gelatina humana recombinante (RhG100-001, Fibrogen) a una concentración de 70.000-100.000 células/ml/placa en DMEM (SH30081.01, Hyclone) complementadas con suero humano al 20% (14-498E, Lonza). Las células se incubaron durante la noche a 37°C, el 5% de CO₂ para permitir que los fibroblastos se unieran. 1-4 días después, se descongeló una muestra del MCB de HAD-C102-hESC y se sembró durante 6-7 días a 37°C, el 5% de CO₂ en la parte superior de las células alimentadoras en medio Nutristem "Plus" (que es de calidad para BPF y libre de componentes foráneos) que contiene los factores de crecimiento bFGF y TGF-β (05-102-1A, Biological Industries, Israel). El día 6-7, el cultivo de hESC se alteró mecánicamente (usando una punta estéril o una herramienta de células madre estéril desechable; 14602 Swemed) y se hizo pasar a placas adicionales recién preparadas que contenían células alimentadoras a una concentración de 70.000-100.000 células/placa. Esto se repitió semanalmente durante varios pasos para alcanzar la cantidad necesaria de hESC para iniciar la diferenciación (figura 13, etapas 4-5). Antes de su uso, las HAD-C102-hESC expandidas se sometieron a prueba para determinar la esterilidad, micoplasma, LAL, el cariotipo y la identidad para el MCB. Además, se confirmaron su aspecto morfológico pluripotente así como su expresión unificada de marcadores de pluripotencia (TRA-1-60, Oct4 y fosfatasa alcalina) (figura 2, etapa 5). Se representan las etapas de producción 4-5 en la figura 13.

50

55

60 *Etapas 6-13: Diferenciación para dar células del RPE.* Se trataron enzimáticamente HAD-C102-hESC expandidas con colagenasa (4152, Worthington) para expansión adicional en placas de cultivo celular de 6 cm (figura 14, etapa 6). Se usaron entonces HADC102-hESC expandidas en la derivación de las DS OpRegen®.

Se inició la diferenciación de cada lote de OpRegen® mediante transferencia mecánica de agrupaciones recogidas de colagenasa A de HAD-C102-hESC a partir del cultivo de la etapa 6 a placas de cultivo Hydrocell de 6 cm no adherentes libres de alimentador en presencia de medio Nutristem "Minus" (que no contiene los factores de crecimiento bFGF ni

65

TGF- β ; 06-5102-01-1A Biological Industries, orden especial) complementado con nicotinamida 10 mM (N-5535, Sigma) (figura 14, etapa 7). Las placas se cultivaron entonces durante hasta una semana en condiciones de atmósfera de oxígeno bajo (5%) (37°C, el 5% de CO₂) para permitir la generación de cuerpos esféricos. Se recogieron entonces cuerpos esféricos en suspensión de una semana de edad, se disociaron suavemente mediante pipeteado y se transfirieron a placas de 6 pocillos recubiertas con laminina humana (511, Biolamina) durante una semana de crecimiento adicional en una atmósfera de oxígeno bajo (5%) en presencia de medio Nutristem "Minus" complementado con nicotinamida 10 mM (figura 14, etapa 8). Las células continuaron creciendo en una atmósfera de oxígeno bajo (5%) durante hasta 4 semanas adicionales; dos semanas en presencia de medio Nutristem "Minus" complementado con nicotinamida 10 mM y activina A 140 ng/ml (G-120-14E, Peprotech) (figura 14, etapa 9), seguido por hasta 2 semanas en presencia de medio Nutristem "Minus" complementado sólo con nicotinamida 10 mM (figura 14, etapa 10). Cuando las áreas de pigmentación ligera se hicieron evidentes en parches de células poligonales, las placas se transfirieron de nuevo a una atmósfera de oxígeno normal (20%) (37°C, el 5% de CO₂) y se hicieron crecer durante hasta 2 semanas en presencia de medio Nutristem "Minus" con nicotinamida 10 mM (figura 14, etapa 11). Después de hasta 2 semanas, fueron evidentes parches poligonales expandidos con pigmentación distintiva dentro de áreas de células no pigmentadas (figura 14, etapa 12) y se desprendieron y se recogieron manualmente las células pigmentadas restantes tras 15 minutos de tratamiento con TrypLE Select (12563-011, Invitrogen) a 37°C (figura 14, etapa 13). Se representan las etapas de producción 6-13 en la figura 14.

Etapas 14-17: expansión de células OpRegen®. Las células pigmentadas se transfirieron entonces a placas de 6 pocillos recubiertas con gelatina (0,5-1x10⁶ células/placa; P0) durante 2-3 días de crecimiento en presencia de DMEM (SH30081.01, Hyclone) complementado con suero humano al 20% (14-498E, Lonza) (figura 15, etapa 14). DMEM se reemplazó entonces con medio Nutristem "Minus" y las células se hicieron crecer durante 2-3 semanas hasta que la placa se cubrió con células poligonales ligeramente pigmentadas (figura 15, etapa 14). Estas células de P0 se expandieron entonces en matraces cubiertos con gelatina durante dos pasos adicionales (P1, P2). Las células en P0 y en P1 se recogieron tras el tratamiento con TrypLE Select a 37°C, se lavaron y se cultivaron durante 2-3 días en matraces recubiertos con gelatina en presencia de DMEM complementado con suero humano al 20%. DMEM se reemplazó con medio Nutristem "Minus" y las células se hicieron crecer durante 2-3 semanas hasta que la placa se cubrió con células poligonales ligeramente pigmentadas (figura 15, etapas 15-16). Las células en P2 que se hicieron crecer en matraces T175 se recogieron entonces tras el tratamiento con TrypLE Select a 37°C, se resuspendieron en DMEM complementado con suero humano al 20%, se agruparon y se contaron.

Se tomó una muestra del medio de crecimiento de cada lote para determinar la esterilidad, micoplasma y pruebas de LAL. Se observó la morfología de las células y se documentó (figura 15, etapa 17). Se representan las etapas de producción 14-17 en la figura 15.

Ejemplo de referencia 4

Puntos de control del proceso

Se representan los puntos de IPC en la figura 16. Se describen los puntos de muestreo escogidos para evaluar la impureza de hESC y la pureza del RPE en el procedimiento de producción a continuación:

Punto de IPC 1: hESC HAD-C102 expandidas mecánicamente antes de su diferenciación que tienen cariotipo normal. Este es el material de partida en el que se espera el nivel más alto de hESC. Este punto se añadió para evaluar el nivel de hESC máximo antes de la diferenciación.

Punto de IPC 2: hESC HAD-C 102 expandidas con colagenasa antes de su diferenciación. En esta fase, se espera alguna diferenciación y, por tanto, una reducción en el nivel de células que expresan Oct4 y TRA-1-60 así como en el nivel de expresión de GDF3 y TDGF. Este punto se añadió para evaluar una impureza de hESC durante la fase de diferenciación no dirigida.

Punto de IPC 3: cuerpos esféricos producidos una semana tras la inducción de la diferenciación de hESC en condiciones libres de alimentador en presencia de nicotinamida. En esta fase más temprana de diferenciación, se espera una impureza de hESC durante la diferenciación al nivel máximo y, por tanto, se espera que esta evaluación proporcione una indicación del nivel más alto de preocupación de seguridad.

Punto de IPC 4: células al final del tratamiento con activina A. La activina A dirige la diferenciación hacia células del RPE. En este punto, se esperan una gran disminución en la impureza de hESC y un gran aumento en la expresión de los marcadores del RPE. Este punto se añadió para monitorizar la diferenciación de hESC a RPE.

Puntos de IPC 5-7: células al final del proceso de diferenciación antes y después de la separación de las áreas no pigmentadas (punto de IPC 6) de las áreas pigmentadas (punto de IPC 7). Se espera que los puntos de IPC 5 y 6 contengan impurezas celulares, mientras que la muestra 7 representa el producto al final del proceso de diferenciación antes de su expansión. Las contaminaciones celulares halladas en la muestra 6 pueden encontrarse en pequeñas cantidades en la muestra 7, y en cantidades más pequeñas en el producto.

Punto de IPC 8: células pigmentadas en P0. Células pigmentadas al final del proceso de diferenciación que se expandieron durante 2-3 semanas. Estas células representan las dos fases del producto antes del final del procedimiento de producción.

5 *Punto de IPC 9:* células pigmentadas en P1. Células de P0 que se expandieron durante 2-3 semanas. Estas células representan el producto una fase antes del final del procedimiento de producción.

10 *Punto de IPC 10:* células pigmentadas en P2 antes de la crioconservación. Se recogen y se agrupan células de P1 que se expandieron durante 2-3 semanas. Estas células representan el principio activo (DS) antes de la crioconservación.

15 *Punto de IPC 11:* células pigmentadas crioconservadas en P2. Estas células representan el producto terminado (DP). En todas la producción, en todos los puntos de muestreo, se recogió medio de cultivo celular para la evaluación de la secreción del factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF), que se conoce que se secreta a partir de células del RPE.

RESULTADOS

20 *Cuantificación de TRA-1-60+Oct4+hESC:* se determinó el nivel de hESC en las diversas muestras recogidas en el procedimiento de producción usando un método de FACS de doble tinción de Oct4/TRA-1-60 robusto y muy sensible. Una semana tras la retirada de alimentadores y factores de crecimiento que soportan el crecimiento de células pluripotentes (TGFβ y bFGF), en condiciones de crecimiento que soportan la diferenciación temprana de campo neural/ocular, hubo sólo el 0,0106-2,7% de células TRA-1-60+Oct4+ (punto de IPC 3, cuerpos esferoides). Tras la adición de activina A que promueve la diferenciación del RPE, el nivel de células TRA-1-60+Oct4+ se redujo adicionalmente hasta el 0,00048-0,0168% (punto de IPC 4, final de activina), y al final de la diferenciación tras la escisión de células no pigmentadas, el nivel de células TRA-1-60+Oct4+ fue del 0,00033-0,03754% (punto de IPC 7, células pigmentadas). En P0, dos fases antes del final del procedimiento de producción, se detectaron células TRA-1-60+Oct4+ en niveles del 0,00009-0,00108% (por debajo del LOD-cercano al LLOQ) (punto de IPC 8). Los niveles de células TRA-1-60+Oct4+ en P1 (punto de IPC 9), P2 antes de la crioconservación (principio activo; punto de IPC 10) y P2 tras la crioconservación (DP; punto de IPC 11) estuvieron por debajo del LLOQ del ensayo (es decir, el 0,00004-0,00047%, el 0,00000-0,00016% y el 0,00000-0,00020%, respectivamente).

35 *Expresión relativa de los marcadores de pluripotencia de hESC GDF3 y TDGF:* se analizó la expresión relativa de los genes de pluripotencia GDF3 y TDGF en los diversos puntos de IPC en el procedimiento de producción. Hubo una reducción gradual en el nivel de expresión de GDF3 y TDGF, que se correlacionó con la reducción gradual en los números de células TRA-1-60+Oct4+, en el proceso de diferenciación. Al final de P0, dos fases antes del final del procedimiento de producción, P1, y P2 antes (principio activo) y después (producto terminado) de la crioconservación, los niveles de expresión de GDF3 y TDGF fueron similares al nivel de expresión observado en las células OpRegen® 5C de control negativo.

40 *Cuantificación de células CRALBP+PMEL17+:* se efectuó la evaluación de células CRALBP+PMEL17+ para la medición de la pureza del RPE al final de la fase de diferenciación, se evaluaron en P0 y P2 (puntos de IPC 8 y 11, respectivamente). Tal como puede observarse en la tabla 3 y en la figura 17, el nivel de pureza de CRALBP+PMEL17+ del RPE en P0 (punto de IPC 8), dos fases antes del final del procedimiento de producción, estaba en el intervalo del 98,53-98,83%. Se detectó un nivel de pureza del RPE similar en P2 tras la crioconservación (99,61-99,76%; punto de IPC 11) (tabla 3).

Tabla 3

Tiempo y fase de muestreo del punto de IPC			% de células CRALBP+PMEL17+		
			Producción simulada 4	Producción simulada 5	Intervalo
IPC	Semana	Etapas			
8	12	Células pigmentadas en P0*	98,53	98,83	98,53-98,83
11	18	OpRegen® (P2); DP	99,61	99,76	99,61-99,76

DP, producto terminado. *El punto de IPC 8 se sometió a prueba después de la crioconservación. Los controles de análisis internos de células del RPE (OpRegen® 5C, control positivo) con adiciones conocidas en hESC (HAD-C 102, control negativo) demostraron un error de precisión de ≤25%.

50 *Obtención de imágenes confocales de células inmunotñidas con bestrofina 1, MITF y CRALBP en las series de producción simulada 4 y 5:* las células se inmunotñieron para los marcadores del RPE bestrofina 1, MITF, ZO-1 y

CRALBP al final de la fase de diferenciación (punto de IPC 7), al final de la fase de expansión (punto de IPC 10, DS) y tras la crioconservación (punto de IPC 11, DP). Se sembraron células no pigmentadas aisladas manualmente (punto de IPC 6) para inmunotinción, pero durante la fijación se desprendieron de la placa y, por tanto, no pudieron teñirse. Las células pigmentadas seleccionadas (punto de IPC 7) sembradas durante 12 días (en producción simulada 5 únicamente, en paralelo a células en P0 de la producción en curso) y durante 28 días dieron tinción positiva para todos los marcadores del RPE sometidos a prueba y el porcentaje de células que expresan bestrofina 1 y MITF fue del 93% y el 93,3-96,5%, respectivamente. Se detectaron niveles similares de células positivas para bestrofina 1 y MITF en P0 (el 94,9% y el 95,9%, respectivamente; sometidos a prueba sólo en la producción simulada 4), P2 antes de la crioconservación, principio activo (el 92,2-92,75% y el 93,7-95,5%, respectivamente) y P2 tras la crioconservación, producto terminado (el 91,1-95,7% y el 83,8-94,9%, respectivamente; inmunotinción con MITF reducida en la producción simulada 5 demuestra un resultado atípico del área seleccionada al azar para el análisis). Se detectó expresión de CRALBP (así como ZO-1) en todas las muestras de IPC 7, 10 y 11 (figura 18).

Expresión relativa de los marcadores del RPE bestrofina 1, CRALBP y RPE65 en las producciones simuladas 2, 4 y 5: se midió la expresión relativa de los genes del RPE bestrofina 1, CRALBP y RPE65 en los diversos puntos de IPC en el procedimiento de producción. Hubo un aumento gradual en el nivel de expresión relativa de bestrofina 1, CRALBP y RPE65 en el procedimiento de producción. Al final del tratamiento con activina A (punto de IPC 4), que dirige la diferenciación hacia células del RPE, los niveles relativos de bestrofina 1, CRALBP y RPE65 fueron de 685, 36 y 325, respectivamente, veces mayores en comparación con sus niveles relativos en hESC que se pasaron mecánicamente antes de la diferenciación (punto de IPC 1; producción simulada 4). Los niveles de expresión relativa de bestrofina 1, CRALBP y RPE65 alcanzaron un pico desde el final de la fase de diferenciación (puntos de IPC 5) hasta la fase P1 (punto de IPC 9). En estas fases los respectivos niveles de expresión fueron 5.838-11.841, 211-299 y 5.708-8.687 veces mayores en comparación con los niveles en hESC que se pasaron mecánicamente antes de la diferenciación (punto de IPC 1).

Evaluación de la morfología en las producciones simuladas 4 y 5: las células se analizaron para determinar la morfología al final de la fase de diferenciación (punto de IPC 5) para la estimación de las áreas relativas de células pigmentadas y, en las fases de expansión P0-P2 (puntos de IPC 8-10), para verificar la morfología poligonal confluyente. El área celular pigmentada relativa estimada al final de la fase de diferenciación antes de la escisión de las áreas no pigmentadas (punto de IPC 5) fue del 32,5% \pm 13,5% (promedio \pm DE, n=7 pocillos de una placa de 6 pocillos) en la producción simulada 4 y el 60% \pm 13% en la producción simulada 5 (promedio \pm DE, n=7 pocillos de una placa de 6 pocillos) (véanse las imágenes representativas en la figura 11). Se seleccionaron y se expandieron áreas de células pigmentadas. La morfología al final de las fases de expansión P0 (punto de IPC 8), P1 (punto de IPC 9) y P2 (punto de IPC 10) demostró un cultivo densamente concentrado con una morfología de monocapa epitelial con conformación poligonal típica (figura 11).

Secreción de PEDF y medición de potencia en las producciones simuladas 4 y 5: se midió el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), que se conoce que se secreta a partir de células del RPE, en el medio de cultivo celular en diversos puntos de IPC en las producciones simuladas 4 y 5. Tal como puede observarse en la tabla 4, se secretaron niveles muy bajos de PEDF, en el intervalo de 4-79 ng/ml/día, por hESC (puntos de IPC 1 y 2) y por cuerpos esféricos (punto de IPC 3; fin de la primera semana con nicotinamida). Al final del tratamiento con activina A (punto de IPC 4), que dirige la diferenciación hacia células del RPE, el nivel de PEDF secretado estaba en el intervalo de 682-1.038 ng/ml/día, 31-37 veces mayor en comparación con el nivel secretado por cuerpos esféricos. Tras la incubación de células en condiciones de oxígeno normales con nicotinamida (punto de IPC 5), se observó un aumento adicional (2,2-4,6 veces) en la secreción de PEDF hasta 1.482-4.746 ng/ml/día. Durante la fase de expansión (P0-P2, IPC 8-10, respectivamente), los niveles de PEDF secretado estaban en el intervalo de 2.187-8.681 ng/ml/día, alcanzando el máximo en P0-P1.

Tabla 4: Secreción de PEDF en las producciones simuladas 4 y 5.

Tiempo y fase de muestreo de IPC			Secreción de PEDF (ng/ml/día)			Intervalo
IPC	Semana	Fase		Producción simulada 4	Producción simulada 5	
1	0	hESC pasadas mecánicamente				
	1	hESC pasadas mecánicamente		ND	ND	N/A
	2	hESC pasadas mecánicamente		4	ND	N/A
2	3	hESC pasadas con colagenasa		21	79	21-79
3	4	Cuerpos esferoides		22	28	22-28
4	7	Células al final del tratamiento con activina A		682	1.038	682-1.038
5	10	Células al final de la diferenciación		1.482	4.746	1.482-4.746
8	12	Células pigmentadas en P0		7.523	7.951	7.523-7.951
9	14	Células pigmentadas en P1		8.681	7.287	7.287-8.681
10	16	OpRegen® (P2); DS		2.187	5.147	2.187-5.147
11	18	OpRegen® (P2); DP		2.462	3.936	2.462-3.936

ND, no realizado; N/A, no aplicable; DS, principio activo; DP, producto terminado.

Las estrechas uniones generadas entre células del RPE permiten la generación de la barrera hematorretiniana y una secreción polarizada de PEDF y VEGF. PEDF se secreta al lado apical donde actúa como factor de crecimiento neurotrópico y antiangiogénico. VEGF se secreta principalmente al lado basal, donde actúa como factor de crecimiento proangiogénico en el endotelio coroidal. Se midió la polarización del RPE (función de barrera y secreción polarizada de PEDF y VEGF) en un sistema Transwell al final de P0 (punto de IPC 8), final de P2 antes de la crioconservación (punto de IPC 10) y final de P2 tras la crioconservación (punto de IPC 11). Tal como puede observarse en la tabla 5, se demostraron la función de barrera/resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y la secreción polarizada de PEDF y VEGF en todos los puntos de IPC.

10 Tabla 5

Tiempo y fase de muestreo del punto IPC			Polarización								
			PEDF día 14 (ng/ml/día)		Transwell-TEER (Ω) en la semana 3		Razón Transwell-PEDF en la semana 3 (Apical/Basal)		Razón Transwell-VEGF en la semana 3 (Basal/Apical)		Intervalo
IPC	Semana	Fase	M4	M5	M4	M5	M4	M5	M4	M5	
8	12	Células pigmentadas en P0	1,985	3,292	768	933	6,01	6,72	3,01	3,09	PEDF D14: 1,985-3,292 TEER: 768-933 razón de PEDF: 6,01-6,72 razón de VEGF: 3,01-3,09
10	16	OpRegen® (P2); DS	1,754	4,250	819	941	5,72	4,72	2,54	2,73	PEDF D14: 1,754-4,250 TEER: 819-941 razón de PEDF: 4,72-5,72 razón de VEGF: 2,54-2,73
11	18	OpRegen® (P2); DP	2,462	3,936	688	616	6,78	3,93	2,57	2,74	PEDF D14: 2,462-3,936 TEER: 616-688 razón de PEDF: 3,93-6,78 razón de VEGF: 2,57-2,74

ND, no realizado; DS, principio activo; DP, producto terminado. PEDF y VEGF se midieron mediante ELISA. PEDF día 14 se recogió de las células durante su cultivo en una placa de 12 pocillos. Luego se pasaron las células a un Transwell y se cultivaron durante 6 semanas, durante las cuales se midieron la TEER y la secreción de VEGF y PEDF desde los lados basales y apicales del Transwell.

Prueba de liberación de lotes de células del RPE producidas en las series de producción simulada 4 y 5: para verificar que OpRegen® producidas en las series de producción simulada 4 y 5 es comparable con OpRegen® producidas por BPF, abreviado como OpRegen®, se llevó a cabo una prueba de liberación de lotes que incluía pruebas de morfología al final de P2 antes de la crioconservación (punto de IPC 10, DS), y viabilidad, número de células totales/crivial, identidad (expresión de bestrofina 1 y MITF), impureza de hESC y cariotipado al final de P2 tras la crioconservación (punto de IPC 11, DP). OpRegen® producidas en las series de producción simulada 4 y 5 pasaron los criterios de liberación de lotes. OpRegen® producidas en la serie de producción simulada 2 no se crioconservaron y, por tanto, no pudo someterse a prueba.

CONCLUSIÓN

Se llevaron a cabo tres series de producción simulada (series de producción simulada 2, 4 y 5) en condiciones de calidad para investigación usando los mismos métodos de producción de BPF, células de calidad para BPF libres de componentes foráneos (hESC HAD-C 102 que se hicieron crecer sobre alimentadores CRD008 irradiados), reactivos de calidad para BPF libres de componentes foráneos y material de laboratorio de calidad para BPF que se usaron en la producción de BPF de los lotes clínicos. Las producciones simuladas 2, 4 y 5 tenían como objetivo evaluar el nivel de impureza de hESC en la producción y las producciones simuladas 4 y 5, también tenían como objetivo identificar controles de calidad en proceso importantes.

Usando un método de FACS de doble tinción de TRA-1-60/Oct4 calificado (LOD del 0,0004%, 1/250.000 y LLOQ de 0,001%, 1/100.000) y un citómetro de flujo calificado, se observó impureza de hESC en el nivel por debajo del LOD del ensayo al final de la fase de diferenciación, en las células pigmentadas seleccionadas negativamente, tres fases antes del final del procedimiento de producción simulada 5. En las series de producción simulada 2 y 4, realizadas antes de la calificación del ensayo usando un citómetro de flujo de la instalación principal, el nivel de impureza de hESC estaba por debajo del LOD del ensayo dos fases antes del final del procedimiento de producción. En apoyo a estos datos, el análisis de RT-PCR cuantitativo demostró expresión regulada por disminución de los genes de hESC pluripotentes GDF3 y TDGF hasta niveles similares a los del control negativo (células OpRegen® 5C) dos fases antes del final del procedimiento de producción.

Las pruebas de identidad realizadas tres fases antes del final de producción (aislamiento de células pigmentadas) demostraron expresión de bestrofina 1 y MITF en el 93% y el 96,5% de las células inmunoteñidas, respectivamente, así como expresión de CRALBP y ZO-1 (no cuantificada). Las pruebas de pureza del RPE realizadas una fase posterior (es decir, P0, 2 fases antes del final del procedimiento de producción), tras un ciclo de expansión de las células pigmentadas seleccionadas negativamente, mostraron que >98,5% de las células eran CRALBP+PMEL17+ de doble positivo mediante FACS. También se detectó un nivel similar de la pureza del RPE (es decir, > 99,6%) en el producto terminado. Estos resultados se respaldaron por las pruebas de morfología que demuestran morfología de monocapa epitelial con conformación poligonal típica y mediante análisis de RT-PCR cuantitativo que demuestra la expresión regulada por incremento de los genes del RPE bestrofina 1, CRALBP y RPE65 hasta niveles similares a los del control positivo (células OpRegen® 5C).

PEDF, que se conoce que se secreta de células del RPE, se midió en el medio de cultivo celular en diversas fases en el procedimiento de las series de producción simulada 4 y 5. Al final del tratamiento con activina A (punto de IPC 4, mostrado previamente por Idelson *et al.* 2009), para dirigir la diferenciación hacia células del RPE, el nivel de PEDF secretado se aumentó mucho (31 veces en la producción simulada 4 y 37 veces en la producción simulada 5) en relación con la etapa de producción previa (inducción de cuerpos esferoides). Los niveles de secreción de PEDF continuaron aumentando y alcanzaron un máximo en P0-P1 (aumento de 1,7-5,8 veces en relación con los niveles después de activina A). Se identificó la evaluación de las áreas relativas de células pigmentadas al final del proceso de diferenciación (punto de IPC 5) como otra medida de control de calidad importante para la evaluación de la diferenciación del RPE. Usando esta medida, se observó una diferencia de 2 veces en el rendimiento de células pigmentadas en las series de producción simulada 4 y 5 (el 32,5% en la producción simulada 4 y el 60% en la producción simulada 5), que se correlacionó con una diferencia similar observada en la secreción de PEDF en esta fase (1.482 ng/ml/día en la producción simulada 4 y 4.746 ng/ml/día en la producción simulada 5).

En conclusión, no se observó ninguna impureza de TRA-1-60+Oct4+hESC tan pronto como 3 fases antes del final del procedimiento de producción. Esto se correlacionó con niveles de baja expresión de GDF3 y TDGF, niveles de alta expresión de bestrofina 1, CRALBP y RPE65, y altos niveles de bestrofina 1 y células positivas individuales de MITF, así como alto contenido de células CRALBP+PMEL17+ de doble positivo (sometidas a prueba una fase después). Se identificaron IPC importantes de seguridad y eficacia en fases de producción críticas.

Ejemplo de referencia 5

Evaluación de la eficacia

5 *Sistema experimental:* los presentes inventores examinaron si el trasplante subretiniano de las células del RPE generadas tal como se describe en el ejemplo 4 podría retrasar la evolución de RDD en el modelo de rata del Royal College of Surgeons (RCS).

10 Se trasplantaron 25.000, 100.000 ó 200.000 células del RPE al espacio subretiniano de un ojo de ratas del RCS en el día después del nacimiento (P)21-23 (antes del inicio de muerte de los fotorreceptores); animales tratados con BSS+(Alcon) y no tratados sirvieron como controles. Los grupos se separaron en 4 edades de supervivencia: día después del nacimiento P60, P100, P150 y P200. Se usó fotografía de fondo para identificar la formación de ampolla y monitorizar la calidad de inyección. También se realizó oftalmoscopia en P60, P100, P150 y P200. Se usó seguimiento optomotor para medir la agudeza visual de todos los animales en todos los puntos de tiempo (P60, P100, P150, P200).

15 Se evaluaron ERG de campo focal y completo en todos los grupos de estudio en P60 y P100. En la fecha de sacrificio asignada para cada animal, se extirparon los dos ojos, se fijaron en paraformaldehído al 4%, se crioconservaron, se incrustaron en compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) y se crioccionaron. Se usó tinción con violeta de cresilo para identificar y enumerar el rescate estructural de fotorreceptores. Se usó tinción inmunofluorescente (IF) para identificar células trasplantadas, evaluar su destino, su estado de proliferación y su capacidad de fagocitar segmentos exteriores de fotorreceptores. Además se usó inmunofluorescencia en la medición de rescate de conos del huésped.

20 El diseño del estudio se resume en la tabla 6 a continuación en el presente documento.

25 Tabla 6

GRP n.º	GRUPOS DE TRATAMIENTO		TIEMPO DE SACRIFICIO TRAS LA INYECCIÓN			
	Artículo	N.º total de células	Número de ratones (machos y hembras) al inicio del estudio			
			P60	P100	P150	P200
1	Sin tratamiento	Ninguna	13	11	13	10
2	Control de vehículo	Ninguna	15	13	16	17
3	RPE Dosis baja	25.000	15	15	16	14
4	RPE Dosis media	100.000	15	15	18	13
5	RPE Dosis alta (MFD)	200.000	15	16	15	13

30 MATERIALES Y MÉTODOS

30 *Recuentos celulares:* se contaron las células antes de tomarse alícuotas en concentraciones de dosificación apropiadas. La viabilidad celular antes de la inyección para todos los puntos de tiempo de inyección dio un promedio del 94,0%±0,03. La viabilidad celular tras la inyección dio un promedio del 92,4%±0,02.

35 *Cirugía:* se realizó una pequeña incisión a través de la conjuntiva y la esclerótica usando agujas de calibre gradualmente más pequeño: 18, 22, 25 y 30. Se usó una punción en el margen lateral de la córnea para reducir la presión intraocular, para reducir la salida de las células inyectadas. Luego se insertó la pipeta de vidrio en el espacio subretiniano y se inyectaron 2 µl de suspensión. Luego se suturó la esclerotomía. La inyección exitosa de las células o el tampón solo (BSS+) se confirmó en primer lugar mediante visualización manual de una ampolla subretiniana, que posteriormente se fotografió mediante el uso de una cámara de fondo (Micron III).

40 *Umbral de seguimiento optocinéticos:* los umbrales de seguimiento optocinéticos se midieron y registraron a ciegas. Se usaron medidas repetidas de ANOVA o ANOVA de una vía con análisis *post hoc* de LSD de Fisher para analizar los datos de OKT.

45 *Electrorretinograma (ERG):* se midieron dos formas de ERG: una forma exploratoria de ERG focal en la que se usa un pequeño punto de luz para estimular un área localizada de retina, y un estilo convencional de ERG de campo completo en el que se estimula todo el campo visual.

50 *Histología e inmunohistoquímica:* los dos ojos de cada animal se recogieron, se fijaron, se crioprotegieron, se incrustaron y se congelaron. Los bloques congelados se crioccionaron a 12 µm. Se obtuvieron aproximadamente 60 portaobjetos que contenían 4 secciones por portaobjetos.

Violeta de cresilo: se examinaron secciones teñidas con violeta de cresilo para: 1) sitio de inyección y sutura, 2)

evidencia de rescate de fotorreceptores, 3) evidencia de células trasplantadas, 4) patología adversa. Para cada portaobjetos, también se registró el grosor máximo de la capa nuclear exterior para la cuantificación del rescate.

5 *Inmunofluorescencia (IF)*: los portaobjetos oculares tratados con células del RPE seleccionados para IF se eligieron de secciones teñidas con violeta de cresilo que contenían células en el espacio subretiniano según el tamaño y la morfología de las células humanas trasplantadas. Además, la protección de la ONL del huésped se usó como criterio secundario. Toda la tinción de IF se realizó como tinciones duales con DAPI que servía como tinción nuclear de fondo. Se usó al menos un portaobjetos de cada animal tratado con células para cada serie.

10 La serie n.º 1 se realizó usando anticuerpo monoclonal de conejo anti-gp100 de melanoma (PMEL17, clon EPR4864; específico humano, Abcam n.º de cat. ab137062) teñido conjuntamente con marcador monoclonal de ratón anti-núcleos (HuNu, clon 3E1.3, Millipore, n.º de cat. MAB4383) para detectar células humanas del RPE y que no son del RPE.

15 La serie n.º 2 se realizó usando anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 (Ki67; clon EPR3610, específico humano, Abcam, n.º de cat. ab92742) y marcador anti-núcleos para detectar células humanas en proliferación.

20 La serie n.º 3 se realizó usando anticuerpo policlonal de conejo anti-arrestina de conos de rata (Millipore n.º de cat. ab15282) para evaluar las secciones para el recuento de conos (véase la sección 6.8.3). Además, los portaobjetos seleccionados se tiñeron usando anticuerpo monoclonal de ratón anti-rodopsina (clon Rho 1D4, Millipore, MAB5356) en combinación con PMEL17 para identificar células humanas trasplantadas que contienen rodopsina/segmentos exteriores del huésped como una medida de su actividad fagocítica.

25 *Recuento de conos*: se adquirieron imágenes confocales del apilamiento z de secciones de retina obtenidas de todos los ojos trasplantados con células y de controles inyectados con solución salina de la misma edad. Las secciones de los ojos inyectados con células se eligieron en el área de rescate de fotorreceptores tal como se define usando las secciones teñidas con violeta de cresilo previamente evaluadas. 3 observadores contaron los conos a ciegas. Luego obtuvieron el promedio de los tres recuentos y se compararon los recuentos entre los grupos de dosificación y edad.

30 *Ingestión de rodopsina*: un posible mecanismo de rescate empleado por las células trasplantadas es ingerir segmentos exteriores de fotorreceptores y liberar residuos. La retirada de la zona de residuos reduce el estrés tóxico en los fotorreceptores y, por tanto, ayuda a mantener la supervivencia de los fotorreceptores. En este caso, los presentes inventores seleccionaron animales específicos para la evaluación de la ingestión de rodopsina por las células del RPE basándose en los índices de supervivencia celular y protección de fotorreceptores. Esta evaluación se realizó mediante
35 inmunofluorescencia.

RESULTADOS

40 *Obtención de imágenes de fondo*: las imágenes de fondo recogidas en la necropsia de los ojos tratados con células revelaron áreas hiper e hipopigmentadas de la retina que correspondían a la ubicación en la que se formaron las ampollas subretinianas durante la cirugía; la ubicación en la que se depositaron las células en el espacio subretiniano (figuras 19A-C). Estas áreas irregulares no eran evidentes en los ojos inyectados o no inyectados con BSS+.

45 *Umbral de seguimiento optocinéticos*: los umbrales OKT se rescataron en todos los grupos tratados con células en todas las edades (figura 20). Los grupos tratados con células superaron a los ojos inyectados con solución salina o no operados en todas las edades. Hubo un efecto significativo dependiente de la dosis entre la dosis baja (25K) y las dos dosis más grandes (100K ($p < 0,0001$) y 200K ($p < 0,0001$)), especialmente en las edades posteriores, pero no se observó ningún beneficio evidente para el OKT de la dosis alta (200K) con respecto a la dosis intermedia (100K) ($p = 0,5646$). Aunque los umbrales OKT se rescataron en todos los grupos tratados con células, los valores absolutos de agudeza visual disminuyeron lentamente con el tiempo. Los umbrales OKT de los animales no tratados e inyectados
50 con solución salina continúan disminuyendo en el transcurso del estudio. Los ojos inyectados con BSS+ no fueron diferentes del grupo no tratado ($p = 0,6068$) y los otros ojos no tratados.

55 *ERG focal*: se midieron los ERG focales en todas ($n = 252$) las ratas experimentales en ~P60. Los animales individuales tratados con células del RPE se desempeñaron bien y superaron significativamente los controles, tal como se ilustra en la figura 21A.

60 *ERG de campo completo*: se midieron los ERG de campo completo de 125 ratas del RCS en P60 y de 63 ratas del RCS en P100. Los animales individuales tratados con células del RPE se desempeñaron bien y superaron significativamente los controles, tal como se ilustra en la figura 21B.

65 *Tinción con violeta de cresilo*: en la figura 22A se presenta un fotomontaje a modo de ejemplo de una sección teñida con violeta de cresilo. En la figura 22B se presentan imágenes representativas de ojos inyectados con BSS+ y tratados con células (imágenes de múltiples grupos).

El grosor de la capa nuclear exterior (ONL) se midió como indicador primario del rescate de fotorreceptores. Los datos

se registraron como el número máximo de núcleos fotorreceptores presentes en cada grupo de dosis a lo largo de las edades (figura 23). Los grupos tratados con células tenían un grosor de la ONL significativamente mayor en P60, P100 y P150 (todos $p < 0,0001$) que los ojos tratados con BSS+. En cuanto a porcentaje de animales con evidencia de rescate de fotorreceptores, el 76-92% de los animales en P60, el 80-90% en P100, el 72-86% en P150 y el 0-18% en P200 tenían evidencia de fotorreceptor.

Inmunofluorescencia: las células del RPE trasplantadas se identificaron positivamente mediante inmunofluorescencia en animales de cada edad de supervivencia (figura 24), sin embargo, el número de animales con células identificadas disminuyó a medida que aumentaba la edad. La repetición de la tinción de portaobjetos adicionales en animales que originalmente no revelaron células trasplantadas dio como resultado animales adicionales identificados con células positivas, pero no en todos los casos.

A pesar de no encontrar células trasplantadas en todos los animales mediante análisis de IF, los resultados de la medición del grosor de la ONL indicaron que el 70-90% de los animales tratados con células tuvieron un rescate de fotorreceptores significativo, confirmado con el rescate de OKT, lo que sugiere que la mayoría de los ojos tratados contenían células trasplantadas en algún momento. El marcador de proliferación Ki67 se usó para identificar células humanas en proliferación. No se observaron células humanas positivas para Ki67 (figura 24).

Recuento de conos: los recuentos de conos en animales que recibieron trasplantes de células fueron significativamente mejores que los ojos de control (figura 25; $p < 0,0001$ para cada comparación). En general, no hubo diferencia entre los recuentos de conos en la dosis baja, media y alta de células. Una imagen representativa de cada edad se presenta en la figura 24.

Ingestión de rodopsina: en cada caso sometido a prueba ($n=6$), se observó rodopsina marcada de manera fluorescente dentro de las células del RPE trasplantadas (figuras 26A-J). Esto confirma que las células trasplantadas ingieren residuos del segmento externo después del trasplante.

Conclusión

Cuando se trasplantaron al espacio subretiniano de ratas del RCS, las células del RPE rescataron la agudeza visual en la rata del RCS con respecto a la de los controles en todas las edades sometidas a prueba. Las respuestas del ERG estaban protegidas cuando el injerto era lo suficientemente grande o estaba en un área de retina accesible para la evaluación. Los fotorreceptores de bastones y conos se rescataron en el área de los injertos durante hasta 180 días tras el trasplante. En conjunto, estos datos demuestran que OpRegen® mantiene la integridad funcional y estructural de la retina del huésped durante periodos prolongados. Por tanto, OpRegen® tiene un potencial significativo para el tratamiento de trastornos de células del RPE humanas tales como RP y AMD.

Ejemplo de referencia 6

Estabilidad de células del RPE

Estabilidad a corto plazo

Las células del RPE formuladas (generadas tal como se describe en el ejemplo 4) en BSS plus se prepararon a un volumen final de 600-1000 μl por vial. La estabilidad a corto plazo se sometió a prueba en los puntos de tiempo 0, 4, 8 y 24 horas. Las células se encontraron estables en todos los puntos de tiempo.

La viabilidad celular y la concentración celular del RPE fueron estables en el punto de tiempo de incubación de 8 horas para todas las formulaciones de dosis; porcentaje de viabilidad promedio (\pm DE) para las siguientes concentraciones:

- Baja concentración (70×10^3 por 100 μl de BSS plus) cambió desde el $93\% \pm 5$ en el punto de tiempo 0 horas hasta el $91\% \pm 1$ en el punto de tiempo 8 horas, una disminución no significativa.
- Alta concentración (70×10^3 por 100 μl de BSS plus) cambió desde el $92\% \pm 3$ en el punto de tiempo 0 horas hasta el $91\% \pm 2$ en el punto de tiempo 8 horas, una disminución no significativa.

Para la concentración media (250×10^3 por 100 μl de BSS plus) que se sometió a prueba no hubo cambios significativos a lo largo de los puntos de tiempo.

El intervalo global para todos los puntos de tiempo y las dosis formuladas fue de entre el 88% - 97% desde el punto de tiempo 0 horas hasta 8 horas, al obtener el promedio de todos los resultados para el punto de tiempo 0 horas ($93\% \pm 3$) y el punto de tiempo 8 horas ($91\% \pm 1$) se encontró una disminución del 2%.

No se observaron cambios significativos en la concentración celular, ni en los puntos de tiempo ni en las dosis formuladas. La concentración celular no cambió en los 3 estudios aparte de una pequeña disminución observada en

un lote en la dosis alta (2%).

El aspecto de las diferentes formulaciones de dosis no cambió a lo largo de los puntos de tiempo sometidos a prueba; la suspensión celular estaba libre de partículas foráneas y agregados no disociados.

La identidad y la pureza de cada dosis de células del RPE formuladas en todos los puntos de tiempo sometidos a prueba fueron estables hasta 24 horas y estuvieron dentro de los criterios de liberación de lotes. A las 8 horas (para todas las dosis de células del RPE formuladas), el nivel de células positivas para MITF y bestrofina estaba en el intervalo del 86-97% y el 90-94%, respectivamente, y el nivel de células CRALBP+PMEL17+ de doble positivo estaba en el intervalo del 98,35-99,64%.

Las dosis de células del RPE formuladas mantuvieron su potencia en todos los puntos de tiempo sometidos a prueba (4, 8, 24 horas), tanto secretando altos niveles de PEDF como formando una monocapa del RPE polarizada con una secreción polarizada de PEDF predominantemente en el lado apical y VEGF en el lado basal. Resultados para los puntos de tiempo sometidos a prueba 8 horas: TEER estuvo en el intervalo de 376 - 724 ohmios, razón de PEDF apical con respecto a basal en el intervalo de 2,77 - 5,70 y razón de VEGF basal con respecto a apical en el intervalo de 2,04 - 3,88.

La esterilidad se mantuvo en todos los puntos de tiempo de incubación para todas las formulaciones de dosis de células.

Estos resultados respaldan la estabilidad celular de OpRegen® en la formulación final en todas las dosis clínicas durante al menos 8 horas cuando se mantienen a 2-8°C. Existe un margen de seguridad de hasta 24 horas basado en los datos parciales recogidos (identidad, esterilidad y potencia de dosis media).

Los resultados del ensayo de estabilidad a corto plazo se resumen en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7

PRUEBA	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	DOSIS BAJA 70.000 células/100 ml	DOSIS MEDIA 250.000 células/100 ml	DOSIS ALTA 700.000 células/100 ml
Viabilidad celular	≥ 70%	91 ± 1 (n=3)	92 (n=1)	91 ± 1,5 (n=3)
Dosis celular	± 40% de la dosis inicial	91,3 ± 30 (n=3)	103 (n=1)	104 ± 5,7 (n=3)
Células positivas para MITF	≥ 80%	90 (n=2)	93 (n=1)	96 (n=2)
Células positivas para bestrofina 1	≥ 80%	94 (n=2)	92 (n=1)	92 (n=2)
Células CRALBP+PMEL17+	≥ 95%	99,3 ± 0,15 (n=3)	99,5 (n=1)	99 ± 0,65 (n=3)
Función de barrera, TEER (Ω)		605 (n=2)	724 (n=1)	410 (n=2)
Secreción polarizada de PEDF (apical/basal)	Sólo para información	3,4 (n=2)	3,5 (n=1)	4,5 (n=2)
Secreción polarizada de VEGF (basal/apical)		3,3 (n=2)	2,2 (n=1)	2,3 (n=2)
Esterilidad USP <71>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Aspecto	Sin partículas foráneas y/o agregados no disociados	Pasa	Pasa	Pasa

Estabilidad a largo plazo: se congelaron tres lotes de células del RPE en nitrógeno líquido en fase de vapor. Las pruebas de estabilidad a largo plazo en la crioconservación comenzaron después de la fecha de congelación. Los resultados proporcionados son tras tres años de congelación. Se están sometiendo a prueba los siguientes parámetros: viabilidad, número de células, identidad del RPE (% de células positivas para bestrofina 1 y % para MITF), pureza del RPE (% de FACS, células del RPE CRALBP+PMEL17+), potencia (polarización y secreción de PEDF), análisis de cariotipo y esterilidad. En cada punto de tiempo, se descongela el número requerido de viales y las células se preparan para los ensayos tal como se describe en el presente documento.

Los resultados del ensayo de estabilidad a largo plazo se resumen en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8

5

PRUEBA	0-3 meses	19-21 meses	34-36 meses
Viabilidad celular	86 ± 2 (n=3)	87 ± 4 (n=5)	89 ± 2 (n=6)
Células totales/vial	1,44 ± 0,13 (n=3)	1,13 ± 0,2 (n=5)	1,13 ± 0,2 (n=6)
Identidad: células positivas para MITF	84	95	86 (n=2)
Células positivas para bestrofina 1	91	90	93 (n=2)
Pureza: células CRALBP ⁺ PMEL17 ⁺	99,8	N/A	99,4
Potencia: Función de barrera, TEER Ω	616	368	396 ± 200 (n=3)
Secreción polarizada de PEDF (apical/basal)	3,93	3,86	3,05 ± 0,04 (n=3)
Secreción polarizada de VEGF (basal/apical)	2,74	1,86	2,90 ± 0,50 (n=3)
Seguridad: Cariotipado	Normal	Normal	N/A
Esterilidad USP <71>	Negativo	N/A	N/A

RESULTADOS

10 La viabilidad, el número total de células/vial y la identidad del RPE se mantuvieron durante el periodo de tres años. Además, tal como se indicó, los datos demostraron potencia y pureza a niveles similares a los recogidos antes de la conservación.

15 Se observó un cariotipo normal 4 años tras la crioconservación. Esto indica que el almacenamiento a largo plazo en fase de vapor hasta el momento no tuvo ningún efecto perjudicial sobre la estabilidad genómica del RPE.

20 La esterilidad de la muestra se demostró mediante pruebas de ausencia de crecimiento bacteriano/húngico en todos los lotes clínicos a los 3 meses. Otro lote resultó negativo 4 años tras la crioconservación. Basándose en estos resultados de estabilidad uniformemente aceptables, que cubren un periodo de tres años de pruebas de estabilidad hasta el momento, se concluye que el producto celular del RPE es estable durante al menos tres años cuando se almacena a una temperatura ≤ -180°C en la fase de vapor de nitrógeno líquido.

Ejemplo de referencia 7

Seguridad y biodistribución

25 Los objetivos del estudio fueron evaluar la supervivencia, la biodistribución y la seguridad de las células del RPE (generadas tal como se describe en el ejemplo 4) tras la administración subretiniana en ratones NOD-SCID machos y hembras durante un periodo de estudio de 6 meses.

30 A los ratones NOD-SCID (NOD.CB17-Prkdcscid), de 5-6 semanas de edad en el momento de la inyección, se les inyectó o bien BSS Plus (control de vehículo) o bien dos dosis de células del RPE: 50x10³ células o 100x10³ células (dosis máxima factible), suspendidas en 1 µl de BSS Plus. El RPE se administró a la subretina a través de la vía transvítrea (la vía de administración clínica propuesta) usando una aguja Hamilton 33G. Una dosis única de 50x10³ células o 100x10³ células se inyectó en un ojo, mientras que el otro ojo sirvió como control interno. Cada sesión de dosificación contenía ratones (machos y hembras) de cada grupo. Los ratones incluidos en el estudio después de la prueba preliminar se asignaron aleatoriamente a los diversos grupos de prueba. Se realizaron dos aleatorizaciones. Se usó un procedimiento de aleatorización de valor medido, en peso, para la colocación en grupos de tratamiento antes de la administración del vehículo/artículo de prueba. Tras la administración, los animales adecuados para su uso en el estudio se transfirieron al estudio objetivo usando una aleatorización secuencial para su colocación en los grupos de tratamiento final. Los ratones con anomalías oculares, observaciones clínicas anómalas o que pesaban menos de 16 gramos en la prueba preliminar y los ratones que se sometieron a una inyección subretiniana de RPE no exitosa se excluyeron del estudio.

45 *Mediciones de estudio:* la evaluación de la seguridad del RPE en este estudio se basó en mortalidad, observaciones clínicas, peso corporal, exámenes oftalmológicos, patología clínica (hematología y química sanguínea), evaluaciones macroscópicas de anatomía patológica general, pesos de órganos (absolutos y relativos con respecto al peso corporal y cerebral), evaluación histopatológica de ojos y diversos órganos de los animales. La evaluación de la supervivencia

y la biodistribución del RPE se realizó mediante evaluaciones de inmunotinción histopatológica y de fluorescencia de ojos y diversos órganos y análisis de qPCR. Se realizaron las siguientes mediciones:

- 5
 - observación clínica;
 - peso corporal;
 - exámenes oftalmológicos (incluyendo exámenes macroscópicos y biomicroscópicos);
- 10
 - examen microscópico quirúrgico de calidad de la inyección subretiniana usando el microscopio LEICA M80 Stereo (oftalmoscopia);
 - recuento sanguíneo completo y química sanguínea;
- 15
 - necropsia y anatomía patológica general;
 - peso del órgano (absoluto y relativo con respecto a los pesos corporal y cerebral);
- 20
 - recogida, fijación y bloqueo en parafina de ojos contralaterales tratados y no tratados, incluyendo el nervio óptico;
 - histopatología con H&E ciega de ojos y tejidos (hueso esternón con médula ósea, cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmón, ganglios linfáticos mandibulares, médula espinal, bazo, timo, masas y lesiones generales);
- 25
 - semicuantificación ciega de células pigmentadas en portaobjetos teñidos con H&E;
 - inmunotinción ciega de portaobjetos seleccionados adyacentes a un portaobjetos con H&E representativo que demuestra injerto de células pigmentadas en el ojo para un marcador humano (núcleos humanos) más un marcador del RPE (PMEL17 humano) y evaluación de células humanas del RPE y que no son del RPE,
- 30
 - marcador humano (núcleos humanos) más un marcador de proliferación (Ki67 humano) y evaluación de células proliferativas humanas y no humanas, y marcador del RPE (RPE65) más marcador de proliferación (Ki67 humano) y evaluación de células proliferativas humanas del RPE y que no son del RPE;
 - inmunotinción ciega de portaobjetos seleccionados adyacentes a un portaobjetos con H&E representativo que demuestra teratoma, tumor, células anómalas y lesiones para un marcador humano (núcleos humanos) para excluir el origen humano;
- 35
 - recogida y extracción de ADN genómico de sangre, médula ósea (recogida de fémures), cerebro, ojos izquierdo y derecho con nervios ópticos, corazón, riñones izquierdo y derecho, hígado, pulmón, ganglios linfáticos mandibulares, ovarios, músculo bíceps crural esquelético, médula espinal, bazo, testículos y timo y análisis de qPCR de beta-globina humana;
 - histopatología con H&E en tejidos (distintos de los anteriores) resultó positiva para beta-globina humana en animales del mismo grupo y punto de tiempo.

45 RESULTADOS

50 No hubo hallazgos toxicológicos relacionados con el RPE en los exámenes en vida que incluyeron observación clínica detallada, peso corporal, examen oftalmológico y patología clínica compuesta por hematología y química clínica sérica. La observación de "ojo descolorido, oscuro" en el ojo izquierdo con un fondo albino se encontró en ratones tratados con células del RPE pigmentadas a ambos niveles de dosis en la observación clínica detallada y el examen oftalmológico. El examen oftalmológico de los animales supervivientes indicó que esta observación consistía en focos medio-vítreos, de pigmentación oscura. Los focos pigmentados se distribuyeron aleatoriamente a lo largo de una línea que se extendía desde la cápsula del cristalino posterior temporal hasta la superficie retiniana nasal. Se interpretó que estos focos eran células del RPE que escapaban de la cánula de inyección tras su retirada del ojo tras la inyección, tal como lo respalda el reflujo vítreo observado durante la inyección o las células del RPE que se filtran en el humor vítreo después del implante subretiniano.

60 Se consideró que todas las lesiones oculares observadas en este estudio surgieron como consecuencia de la anestesia, el procedimiento de inyección quirúrgica o, incidentalmente, como cambios relacionados con la edad. El hallazgo de múltiples focos pigmentados dentro del humor vítreo sugiere que las células del RPE pueden ser viables dentro del cuerpo vítreo. La presencia de células pigmentadas en el cuerpo vítreo en algunos de los animales tratados con RPE se confirmó a nivel microscópico.

En cuanto a la biodistribución tal como se evalúa mediante qPCR usando un conjunto de sondas/cebadores de genes de beta-globina humana, a intervalos de 2 semanas, 2 meses y 6 meses, los ojos izquierdos tratados con 100×10^3 células OpRegen® fueron positivos para el ADN del RPE en 8/12, 11/12 y 16/16 animales con niveles medios grupales a 38, 47 y 249 copias/ μg de ADN ocular total, respectivamente, lo que indica una tendencia de aumento con el tiempo. No hubo diferencia significativa entre machos y hembras. En estos animales, no se detectó ADN del RPE en los ojos derechos no tratados y en todos los tejidos no oculares, que incluían sangre, médula ósea femoral, cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmón, ganglios linfáticos mandibulares, ovarios, músculo bíceps crural esquelético, médula espinal, bazo, testículos y timo, excepto la médula espinal (27 copias/ μg de ADN) de un animal macho de 2 semanas y el músculo esquelético (16 copias/ μg de ADN) y la médula espinal (por debajo del nivel de calificación) de un animal hembra de 2 semanas (probablemente debido a la contaminación inadvertida por ADN humano exógeno durante la extracción de ADN de estos tejidos).

Los cambios macroscópicos relacionados con RPE se limitaron a decoloración negra o focos negros en el ojo izquierdo de algunos animales a intervalos de 2 y 6 meses, de acuerdo con la observación clínica y/o el examen oftalmológico en vida. Estos cambios se correlacionaron con las células pigmentadas y no se consideraron adversos según lo determinado por el examen microscópico de los animales supervivientes en el grupo de dosis alta y de los animales sacrificados *in extremis* y encontrados muertos en ambos grupos de dosis. Las células pigmentadas estaban presentes en el ojo izquierdo tratado en casi todos los ratones supervivientes examinados en cada punto de tiempo en el grupo de dosis alta (en el espacio subretiniano en 11/12, 12/12 y 16/16 en intervalos de 2 semanas, 2 meses y 6 meses), así como los animales sacrificados *in extremis* o encontrados muertos en ambos grupos de dosis baja y alta. Las ubicaciones más comunes de las células pigmentadas fueron el espacio subretiniano y el cuerpo vítreo según lo confirmado por inmunotinción de biomarcadores específicos de células humanas y del RPE. En el espacio subretiniano, las células pigmentadas tendían a estar restringidas al sitio de inyección en los puntos de tiempo anteriores, mientras que en los puntos de tiempo posteriores estaban presentes en lugares distantes de los sitios de inyección, lo que sugiere la propagación celular local. Hubo un ligero aumento en el número total promedio de células pigmentadas por ojo en el punto de tiempo de 6 meses en comparación con los puntos de tiempo de 2 semanas o 2 meses en los machos. Este aumento en el número de células pigmentadas de origen humano fue respaldado por el análisis de qPCR.

El injerto a largo plazo de las células del RPE se ilustra en la figura 27A. Las células pigmentadas dieron tinción positiva para núcleos humanos y PMEL17 en el espacio subretiniano de NOD-SCID 9 meses tras el trasplante.

La figura 27B es una fotografía que ilustra el agrupamiento en el lugar de la ampolla tras la inyección. La figura 27C es una fotografía que ilustra la propagación posterior de las células en una monocapa después de la inyección.

El RPE no se asoció con ningún cambio en el peso de los órganos. No hubo cambios macroscópicos ni microscópicos en los ojos derechos no tratados y los órganos no oculares examinados en este estudio, que incluyeron cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmón, ganglios linfáticos mandibulares, médula espinal, bazo y timo. Se observó tinción de anticuerpos de biomarcadores anti-núcleos humanos (núcleos humanos) en el 64%, el 36% y el 73% de los ojos izquierdos sometidos a prueba en los puntos de tiempo de 2 semanas, 2 meses y 6 meses, respectivamente, en los animales examinados en el grupo de dosis alta.

El nivel de detección más alto para los núcleos humanos se observó en poblaciones de células pigmentadas dentro del espacio subretiniano seguido por el cuerpo vítreo. Se observó tinción con PMEL17 de anticuerpo de biomarcador anti-humano específico del RPE en la mayoría de los animales sometidos a prueba, mientras que otro biomarcador específico del RPE, RPE65, tenía diversos niveles de detección en los diferentes puntos de tiempo. Estos biomarcadores específicos del RPE se detectaron principalmente en el espacio subretiniano y menos en el cuerpo vítreo. El biomarcador de proliferación celular humano Ki67 se detectó sólo en unas pocas células en un pequeño número de animales, principalmente en células pigmentadas dentro del cuerpo vítreo y menos dentro del espacio subretiniano. La incidencia de positividad para Ki67 disminuyó a lo largo el tiempo con sólo un animal a los 6 meses. Las células positivas para Ki67 no se asociaron con ninguna morfología anómala.

Se observaron varios cambios microscópicos en el sitio de inyección en todos los puntos de tiempo y todos los grupos de estudio, y se consideraron relacionados con el procedimiento de inyección quirúrgica. Algunos de estos cambios fueron ligeramente más prominentes en los animales examinados en el grupo de dosis alta a los 6 meses. Por ejemplo, se observó desprendimiento de retina en un animal y la incidencia o gravedad de la degeneración/atrofia o fibroplasia de la retina aumentó ligeramente en comparación con el grupo de control de vehículo.

No hubo efectos dependientes del RPE sobre la tasa de mortalidad y supervivencia de los animales.

Conclusión

No se observaron efectos toxicológicos, letales o tumorigénicos locales o sistémicos en el modelo animal NOD/SCID durante el periodo de estudio de 6 meses tras la inyección única de RPE a niveles de dosis de hasta 100.000 células/ μl /ojo. La biodistribución de las células del RPE se restringió al ojo izquierdo tratado con la propagación local de células subretinianas desde el sitio de inyección subretiniana en función del tiempo. Las células del RPE estuvieron

presentes predominantemente en el espacio subretiniano seguido del cuerpo vítreo en la mayoría de los animales examinados en el grupo de dosis alta a intervalos de 2 semanas, 2 meses y 6 meses, con positividad variable en la inmunotinción por anticuerpos contra los núcleos humanos y/o biomarcadores humanos específicos del RPE. Se estimó que la persistencia de las células del RPE en el ojo era de al menos 6 meses con una proliferación celular muy limitada. La proliferación limitada tuvo lugar principalmente en el cuerpo vítreo y no tuvo efectos adversos. Hubo evidencia de que el número de células del RPE aumentó en el ojo tratado a lo largo del tiempo, aunque esto se acompañó de una disminución de la incidencia de proliferación en la población subretiniana examinada. La expresión de ambos marcadores específicos del RPE, RPE65 y PMEL17, fue predominantemente en células del RPE dentro del espacio subretiniano en comparación con las del cuerpo vítreo, donde se encontraron la mayoría de las incidencias de células positivas para Ki67. Esto último sugiere que el aumento de células del RPE a lo largo del tiempo se limita al espacio vítreo y que la expresión de marcadores específicos del RPE, RPE65 y PMEL17, puede estar regulada por el microambiente. En conclusión, basándose en los datos presentados anteriormente, no existen problemas de seguridad graves relacionados con la inyección de las células del RPE descritas actualmente en comparación con el grupo de control de vehículo.

Ejemplo de referencia 8

Expresión de Pax-6 en las células del RPE

Objetivo: desarrollo de un método basado en FACS para evaluar el nivel de PAX-6 en células del epitelio pigmentario retiniano humano (RPE).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se descongelaron células del RPE congeladas (generadas tal como se describe en el ejemplo 4), se centrifugaron, se resuspendieron en 1 ml de PBS minus, se filtraron a través de un filtro de células de 35 μ M y se contaron con el contador de células NC-200. La concentración celular se ajustó a $\sim 1 \times 10^6$ células/ml en PBS minus. Se añadió 1 μ l/ml de FVS450 a cada ml de suspensión celular seguido de agitación con vórtex e incubación durante 6 minutos a 37°C. Se extinguió la FVS450 con BSA al 0,1%(-Ig)-PBS minus, y se resuspendió en BSA al 0,1%(-Ig)-Fc-block (5 min a TA) para bloquear todos los epítomos de Fc en las células. Entonces se fijaron las células y se tiñeron con anticuerpo anti-Pax-6 (AF647, n.º de cat. 562249).

RESULTADOS

Tal como puede observarse en la figura 29, las células en P0 y P2 son positivas para PAX6 (el 81,5%-82,5% en P0 y el 91,3%-96,1% en P2). P2 es el paso al final del procedimiento de producción y P0 es dos fases de expansión anteriores. Se demostró que los datos eran uniformes entre lotes, tal como se muestra en las figuras 29 y 30. Además, los presentes inventores mostraron mediante análisis de FACS que las células del RPE dieron doble tinción para PAX-6 y CRALBP (figura 31).

Ejemplo de referencia 9

Identificación de proteínas secretadas por las células del RPE

Objetivo: identificar una firma de proteínas (conocidas y nuevas) secretadas por OpRegen® (células del RPE) que pueden usarse como un ensayo de potencia de liberación de lotes, así como un ensayo de control del procedimiento.

Los sobrenadantes se recogieron de células del RPE (generadas tal como se describe en el ejemplo 3) que se cultivaron en diferentes condiciones de cultivo indicadas a continuación. Luego se seleccionaron los sobrenadantes usando las matrices G6 y G7 de RayBiotech según las instrucciones del fabricante después de una incubación durante la noche de los sobrenadantes con la matriz relacionada.

1. Células del RPE de producto terminado tras la descongelación cultivadas durante 4 y 14 días en una placa de 12 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/pocillo en el paso 3) (denominadas en el presente documento OpRegen®).

2. Células del RPE de producto terminado tras la descongelación cultivadas durante 14 días en una placa de 12 pocillos y luego cultivadas durante 3 semanas en un Transwell (según AM-RPE-15) y demostraron una TEER $>500 \Omega$. Los sobrenadantes se tomaron de las cámaras apicales y basales.

3. Células generadas según el protocolo descrito en el ejemplo 3, antes (QC3) y después (QC4) del tratamiento con activina A.

4. Medio Nutristem (Nut-) sin adición de TGF β ni FGF.

Los sobrenadantes también se recogieron de los siguientes cultivos celulares y se sometieron a prueba mediante ELISA:

- 5 1. Células OpRegen® de producto terminado tras la descongelación que se cultivaron cada una durante 14 días en una placa de 12 pocillos y luego se cultivaron durante 3 semanas en un Transwell (según AM-RPE-15) y demostraron una TEER de 355 Ω y 505 Ω , respectivamente. Los sobrenadantes se tomaron del día 14 (paso 3) y de las cámaras apical y basal.
2. Células del RPE 7 tras la descongelación que se cultivaron durante 14 días en una placa de 12 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/pocillo en el paso 3).
- 10 3. Células de producción simulada VI al final del paso 1 del procedimiento de producción que se cultivaron en Laminin-521 tras aislamiento enzimático o mecánico (tal como se describe en el ejemplo 3). Se sometió a prueba la potencia de estas células según AM-RPE-15 y se recogieron los sobrenadantes de las células en el día 14 en una placa de 12 pocillos (paso 2) y las células después de 3 semanas en un Transwell de las cámaras apicales y basales.
- 15 4. Células del HuRPE fetales en el paso 3, días 4 y 14 ($0,5 \times 10^6$ células/pocillo).

Se realizó validación de la prueba mediante ELISA según las instrucciones del fabricante relacionadas con cada kit de ELISA. En cada protocolo, la incubación con los sobrenadantes fue durante la noche.

- 20 *Diseño del estudio:* se recogieron los sobrenadantes de las células que se cultivaron en diferentes condiciones de cultivo y se mantuvieron a -80°C . Tras el análisis de la matriz de proteínas, la validación de los aciertos se midió mediante ELISA.

RESULTADOS

25

Los resultados de la matriz G7 se proporcionan en la tabla 9 a continuación.

Tabla 9

G7	Nut (-)	Día 4	Día 14	TW apical	TW basal	QC3	QC4
POS	18.132	18.132	18.132	18.132	18.132	18.132	18.132
NEG	69	65	15	41	79	23	45
Acrp30	18	4.739	46	22	114	102	4
AgRP	56	61	62	72	75	57	94
Angiopoyetina-2	15	35	13	22	32	373	306
Anfiregulina	28	24	32	36	30	27	32
Axl	15	30	100	365	29	41	103
bFGF	15	22	23	95	20	211	28
b-NGF	11	29	31	24	31	61	30
BTC	41	58	46	47	54	127	59
CCL-28	37	42	40	36	34	88	60
CTACK	57	58	80	71	79	68	73
Dtk	16	17	17	21	21	23	24
EGF-R	11	61	174	227	156	138	77
ENA-78	23	34	27	31	34	36	36
Fas/TNFRSF6	19	22	25	24	33	21	23
FGF-4	16	19	19	20	25	14	22
FGF-9	19	17	27	21	27	21	26
GCSF	200	246	235	233	246	245	262
Ligando de GITR	47	54	52	50	53	46	56
GITR	24	26	26	29	29	28	24
GRO	121	367	224	952	400	549	472
GRO-alfa	65	61	79	64	77	65	85

HCC-4	50	72	40	38	43	40	85
HGF	19	20	20	31	18	239	35
ICAM-1	13	20	24	27	17	106	56
ICAM-3	9	14	14	8	12	2	9
IGFBP-3	18	22	25	84	24	25	601
IGFBP-6	13	172	39	167	59	107	66
IGF-I SR	27	26	27	27	29	23	33
IL-1 R4/ST2	43	36	44	41	45	34	111
IL-1 RI	61	56	50	54	59	48	65
IL-11	54	58	51	60	89	55	64
IL-12 p40	10	16	13	12	17	18	12
IL-12 p70	15	18	27	19	18	18	20
IL-17	47	57	67	51	52	50	55
IL-2 Rapha	57	67	115	62	66	64	69
IL-6 R	12	25	42	15	15	81	18
IL-8	107	119	113	237	135	993	226
I-TAC	14	20	23	18	25	26	24
Linfotactina	20	26	27	23	24	19	23
MIF	27	261	2.712	3.463	515	4.300	3.736
MIP-1alfa	26	24	25	29	27	23	25
MIP-1beta	18	22	20	17	23	28	1.056
MIP-3beta	19	21	17	19	23	15	17
MSP-alfa	21	34	26	25	25	37	33
NT-4	10	14	11	12	13	9	15
Osteoprotegerina	16	48	4.622	191	33	830	593
Oncostatina M	40	46	44	52	61	53	39
PIGF	46	111	110	89	75	284	336
sgp130	16	93	199	393	40	222	564
sTNF RII	13	15	12	13	18	40	10
sTNF-RI	123	449	675	1.703	163	293	203
TECK	50	61	60	52	54	75	59
TIMP-1	130	1.223	1.909	1.674	1.948	2.006	1.798
TIMP-2	15	571	621	1.937	753	483	776
Trombopoyetina	48	48	47	47	48	54	39
TRAIL R3	39	100	100	310	56	572	314
TRAIL R4	23	22	21	18	21	46	20
uPAR	68	161	67	148	65	276	87
VEGF	14	508	689	559	554	546	592
VEGF-D	20	21	23	20	22	25	19

Los resultados de la matriz G6 se proporcionan en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10

ES 2 774 456 T9

G6	Nut (-)	Día 4	Día 14	TW apical	TW basal	QC3	QC4
POS	12.843	12.843	12.843	12.843	12.843	12.843	12.843
NEG	18	5	20	8	10	2	12
Angiogenina	4	3.006	3.152	423	1.749	2.838	3.574
BDNF	12	8	12	9	9	8	9
BLC	14	17	18	11	17	10	12
BMP-4	9	38	9	9	6	6	6
BMP-6	6	3	4	2	4	3	1
CK beta 8-1	9	7	8	9	10	6	8
CNTF	79	72	68	68	68	75	78
EGF	5	8	6	8	7	10	1
Eotaxina	9	13	11	11	12	11	12
Eotaxina-2	9	11	8	4	7	7	8
Eotaxina-3	58	53	62	42	59	47	59
FGF-6	7	4	7	1	9	0	7
FGF-7	9	9	16	14	13	9	14
Ligando de Flt-3	49	51	50	46	54	49	46
Fractalquina	6	3	6	4	4	5	5
GCP-2	8	8	9	8	13	16	7
GDNF	10	11	12	12	9	10	11
GM-CSF	63	52	58	50	52	51	60
I-309	5	7	9	6	6	5	7
IFN-gamma	96	77	72	71	89	80	79
IGFBP-1	7	19	21	25	9	7	10
IGFBP-2	10	274	432	490	257	602	442
IGFBP-4	9	11	10	8	7	6	4
IGF-I	9	13	13	14	13	14	16
IL-10	59	59	54	43	57	60	66
IL-13	81	77	66	62	70	69	75
IL-15	56	55	62	46	58	57	55
IL-16	3	3	1	6	3	3	4
IL-1alfa	77	76	63	72	78	77	71
IL-1beta	8	12	16	12	8	8	14
IL-1ra	65	58	68	58	60	55	59
IL-2	54	53	62	51	54	51	190
IL-3	56	49	52	50	52	51	177
IL-4	7	6	7	7	6	6	10
IL-5	81	79	82	67	87	76	80
IL-6	309	429	280	1.053	386	2.704	377
IL-7	64	56	62	59	63	57	63
Leptina	15	19	14	17	15	23	17
LIGHT	8	12	10	5	11	7	8
MCP-1	67	3.046	1.460	4.269	3.963	5.061	2.876

MCP-2	16	19	22	22	22	21	21
MCP-3	8	10	10	9	8	62	8
MCP-4	9	11	10	7	8	11	7
M-CSF	19	18	13	14	17	21	19
MDC	9	8	8	7	7	8	7
MIG	34	28	31	29	31	29	52
MIP-1-delta	8	8	8	6	6	6	0
MIP-3-alfa	8	8	8	7	7	33	72
NAP-2	7	11	12	8	7	6	10
NT-3	12	11	10	12	12	11	9
PARC	60	60	56	53	60	57	57
PDGF-BB	13	17	20	15	20	23	21
RANTES	6	63	15	8	13	35	11
SCF	5	14	4	3	11	17	6
SDF-1	20	25	26	20	22	22	22
TARC	11	14	12	12	12	12	10
TGF-beta 1	82	79	83	81	75	85	77
TGF-beta 3	6	11	5	6	4	8	4
TNF-alfa	86	89	84	78	81	86	81
TNF-beta	82	78	84	80	86	83	77

Las proteínas secretadas por el RPE pueden dividirse en 3 grupos funcionales: 1) proteínas angiogénicas tales como VEGF y angiogenina, 2) reguladores de la matriz extracelular tales como TIMP-1 y TIMP-2 y 3) proteínas inmunomoduladoras tales como IL-6, MIF, sgp130, sTNF-R1, sTRAIL-R3, MCP-1 y osteoprotegerina. También se encontró que el receptor tirosina cinasa Axl era secretado por las células del RPE. 6 proteínas que demostraron altos niveles de secreción y/o demostraron un patrón de secreción polarizada (apical/basal) se seleccionaron para validación mediante ELISA (angiogenina, TIMP-2, MIF, sgp130, sTNF-R1 y sTRAIL-R3). Los datos de la matriz también demostraron la secreción de VEGF tal como se observa en el ensayo de polarización.

Angiogenina: los datos de la matriz de proteínas demostraron una secreción aumentada de angiogenina a lo largo del procedimiento de producción (tablas 9 y 10). Estos resultados se confirmaron mediante ELISA demostrando que el nivel de angiogenina secretada por las células en diferenciación que se trataron con nicotinamida antes de la adición de activina A fue de 0,52 ng/ml, mientras que después de las 2 semanas de tratamiento con nicotinamida y activina A, el nivel de secreción de angiogenina aumentó hasta 0,91 ng/ml (figura 32A). Las células del RPE que se cultivaron durante 2 semanas en una placa de 12 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/pocillo; paso 3) tras la descongelación secretaron angiogenina (figura 32B). Las células del RPE polarizadas (semana 3 en Transwell; TEER > 350Ω, razones de PEDF apical/basal y VEGF basal/apical > 1) secretaron angiogenina de manera polarizada al lado basal con baja o ninguna secreción al lado apical (los niveles de angiogenina basales estaban en el intervalo de 0,1-0,25 ng/ml y los niveles de angiogenina apicales en el intervalo de 0,05-0,12 ng/ml; figura 32B). Las células del RPE 7 generadas según Idelson *et al.*, 2009 no pudieron generar la función de barrera en el sistema Transwell (TEER por debajo de 100 Ω), aunque podían secretar VEGF y PEDF. La capacidad de las células del RPE7 para secretar angiogenina se sometió a prueba cuando se colocaron en una placa de 12 pocillos durante 14 días. RPE7 secretó angiogenina en el día 14 de cultivo en un nivel que está dentro del intervalo de las células del RPE generadas tal como se describe en el presente documento (figura 32C).

Secreción de TIMP-1 y TIMP-2: la detección de la matriz de proteínas demostró la secreción de TIMP-1 y TIMP-2 de células del RPE polarizadas y no polarizadas (figura 33A-E). Curiosamente, los datos de la matriz mostraron la secreción polarizada de TIMP-2 hacia el lado apical y de TIMP-1 hacia el lado basal (figura 33A). Los datos de ELISA confirmaron que TIMP-2 se secreta principalmente en el lado apical por todos los lotes de RPE sometidos a prueba hasta ahora (figuras 33C-D, intervalo apical de 69,9 - 113,3 ng/ml e intervalo basal de 11,9 - 43,7 ng/ml). TIMP-2 también se secretó por las células OpRegen® no polarizadas en niveles similares a los niveles secretados por las células del RPE fetales humanas normales (HuRPE, ScienCell) (figuras 33C-E). Las células del RPE 7 también secretaron TIMP-2 en niveles similares a las células OpRegen® (figuras 33C-E). Curiosamente, se detectaron niveles muy bajos de TIMP-2 a lo largo del procedimiento de producción en los puntos de control QC3 y QC4 (figura 33B).

Secreción de sgp130 por células OpRegen®: los datos de la matriz de proteínas demostraron una secreción aumentada de sgp130 a lo largo del procedimiento de producción de OpRegen® tal como se observa en los puntos de verificación de IPC/QC 3 y 4 (tablas 9 y 10). Los datos de ELISA confirmaron niveles mayores de secreción de sgp130 tras 2 semanas de tratamiento con activina A (IPC/QC4; 1,64 ng/ml) en comparación con los niveles secretados por las células tras el tratamiento con nicotinamida antes de la adición de activina A (IPC/QC3; 0,68 ng/ml) (figura 34A). Las células OpRegen® que se cultivaron durante 2 semanas en una placa de 12 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/pocillo; paso 3) tras la descongelación secretaron sgp130 (figuras 34B-C). Las células del RPE 7 cultivadas en condiciones similares secretaron sgp130 en niveles que estaban dentro del intervalo de las células OpRegen® (1,0 ng/ml en el día 14; figura 34D). Las células del HuRPE fetales secretaron niveles bajos de sgp130 tanto en el día 4 como en el día 14.

Las células OpRegen® polarizadas secretaron sgp130 de manera polarizada hacia el lado apical con baja o nula secreción hacia el lado basal (los niveles de secreción de sgp130 apicales estaban entre 0,93-2,06 ng/ml y los niveles de sgp130 basales estaban en el intervalo de 0-0,2 ng/ml; figuras 34B-C).

sTNF-R1 liberado: se detectaron niveles muy bajos de sTNF-R1 liberado mediante ELISA en el sobrenadante de las células en diferenciación antes (IPC/QC3 0,01 ng/ml) y después de dos semanas de tratamiento con nicotinamida y activina A (IPC/QC4 0,02 ng/ml) (figura 35A). Las células OpRegen® que se cultivaron durante 2 semanas en una placa de 12 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/pocillo; paso 3) tras la descongelación contenían sTNF-R1 en el sobrenadante del día 14 de cultivo (figuras 35B-C). Las células del HuRPE cultivadas en condiciones similares tenían niveles de sTNF-R1 similares en su sobrenadante de cultivo, mientras que las células del RPE 7 demostraron niveles de sTNF-R1 relativamente bajos (figura 35D).

Las células OpRegen® polarizadas secretaron sTNF-R1 liberado en niveles mayores al lado apical (los niveles de sTNF-R1 apicales y basales estaban en el intervalo de 0,22-1,83 ng/ml y 0,01-0,11 ng/ml, respectivamente; figuras 35C-D).

sTRAIL-R3: los datos de la matriz de proteínas detectaron sTRAIL-R3 en el sobrenadante de las células OpRegen® (tablas 9 y 10). El ELISA confirmó la presencia de sTRAIL-R3 a lo largo del procedimiento de producción de OpRegen® (493 pg/ml en QC3 y 238 pg/ml en QC4). En el cultivo de HuRPE fetal no hubo sTRAIL-R3 y en el cultivo de RPE 7, niveles muy bajos de sTRAIL-R3 (4 pg/ml).

Detección de MIF: los datos de la matriz de proteínas detectaron MIF en el sobrenadante de células OpRegen® (tablas 9 y 10). El ELISA confirmó la presencia de MIF a lo largo del procedimiento de producción de OpRegen® (100,3 ng/ml en QC3 y 44,7 ng/ml en QC4). Las células OpRegen® polarizadas demostraron niveles mayores de MIF en el lado apical (niveles de MIF apicales en el intervalo de 26,6-138,3 ng/ml y basales en el intervalo de 1,9-30,5 ng/ml).

Ejemplo de referencia 10

Comparación de OpRegen® con RPE1 y RPE7

Objetivo: comparar OpRegen® (células del RPE) con células del RPE generadas según el protocolo de Idelson *et al*, 2009.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se generaron OpRegen® (células del RPE) tal como se describe en el ejemplo 3.

Se generaron células del RPE según el protocolo de Idelson *et al*, 2009 y se denominaron RPE1 y RPE7.

Se usó un sistema Transwell (tal como se ilustra en la figura 28) para permitir el desarrollo de una monocapa de RPE polarizada con propiedades de barrera estables y secreción polarizada de PEDF y VEGF. Las mediciones de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) se usaron para evaluar la función de barrera de la monocapa de RPE, y se usó ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para evaluar la secreción polarizada de PEDF y VEGF. Las células se descongelaron y se cultivaron durante 14 días en presencia de nicotinamida. La secreción de PEDF se sometió a prueba los días 7 y 14. Luego se transfirieron las células a un Transwell (Costar 3460, $0,4 \mu\text{m}$) durante 4 semanas adicionales durante las cuales se midió la TEER y se recogió el medio (para la evaluación de la secreción de citocinas) de las cámaras de Transwell superior e inferior semanalmente hasta 4 semanas. Cuando las células están polarizadas, la TEER debe estar por encima de 100Ω y la razón entre la secreción de PEDF apical con respecto a basal y la secreción de VEGF basal con respecto a apical debe estar por encima de 1.

Todos los lotes de OpRegen® que se sometieron a prueba demostraron la capacidad de generar una función de barrera (intervalo de TEER de 368-688 Ω) y secretar PEDF y VEGF de manera polarizada (la razón de PEDF apical/basal osciló desde 3,47-8,75 y la razón de VEGF basal/apical de 1,39-2,74) (véase la tabla 11).

Tabla 11

Prueba	Método de prueba	Criterios para la liberación	Lotes de OpRegen® de calidad clínica			Lotes de OpRegen® de calidad para investigación producidos con BPF				Producción simulada sin BPF de lotes de OpRegen®		RPE producido con BPF según Idelson <i>et al.</i> , 2009		
			2A	2B	6	5A	5B	5C	5D	n.º 4	n.º 5	RPE 1	RPE 7	
Pureza del RPE % de CRLBP ⁺ PMEL17 ⁺	AM-RPE-04	≥95%	98,8 5%	98,2 6%	99,08	98,9 1%	99,0 1%	99,2 4%	99,2 9%	99,6 1%	99,7 6%	99,9 1%	96,2 9%	
Potencia	Polarización - TEER en la semana 3	AM-RPE-15	Sólo para información	532 Ω	458 Ω	411 Ω	451 Ω	468 Ω	368 Ω	543 Ω	688 Ω	616 Ω	<100 Ω	<100 Ω
	Razón de PEDF apical/basal en la semana 3			8,75	6,12	5,77	3,47	4,46	3,86	4,16	6,78	3,98	ND	ND
	Razón de VEGF basal/apical en la semana 3			2,27	2,35	2,51	1,86	1,39	1,86	1,97	2,57	2,74	ND	ND
	Secreción de PEDF en el día 14 (ng/ml/día)			3033	2158	2881	1562	1255	1551	1370	2462	3936	2279	2556

ND: no determinado dado que la TEER estaba por debajo de 100 Ω y se observaron grandes agujeros en el cultivo.

- 5 RPE1 y RP7, que se produjeron en condiciones de BPF según Idelson *et al* (2009) no pudieron generar la función de barrera (TEER <100 Ω) en 3 estudios independientes. Las células sembradas en el Transwell no pudieron generar una monocapa poligonal cerrada homogénea y se observaron grandes agujeros (figura 36). Aunque las células no pudieron generar la función de barrera, RPE1 y RPE7 pudieron secretar PEDF (véase la tabla 11) y VEGF (no mostrado) en niveles similares a OpRegen® y su nivel de pureza de CRALBP⁺PMEL17⁺ fue del 99,91% y el 96,29%, respectivamente, similar a OpRegen® (figura 37).

Basándose en estos datos, puede concluirse que RPE1 y RPE7 son defectuosos en su capacidad para generar uniones estrechas.

- 15 Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que se usan encabezados de sección, no deben interpretarse como necesariamente limitativos.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Población de células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) poligonales humanas, en la que al menos el 95% de las células de la misma expresan conjuntamente proteína premelanosoma (PMEL17) y proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), en la que la resistencia eléctrica transepitelial de la población de células es mayor de 100 ohmios.
- 10 2. Población de células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) humanas, en la que al menos el 80% de las células de la misma expresan conjuntamente proteína premelanosoma (PMEL17) y proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP) y en la que las células de la población secretan cada uno de angiogenina, inhibidor tisular de metaloproteinasa 2 (TIMP 2), glicoproteína soluble 130 (sgpl30) y forma soluble del receptor de membrana ubicuo 1 para el factor de necrosis tumoral α (sTNF-R1).
- 15 3. Población celular según la reivindicación 1, en la que las células de la población secretan cada uno de angiogenina, inhibidor tisular de metaloproteinasa 2 (TIMP 2), glicoproteína soluble 130 (sgpl30) y forma soluble del receptor de membrana ubicuo 1 para el factor de necrosis tumoral α (sTNF-R1).
- 20 4. Población celular según la reivindicación 2, en la que las células secretan dicha angiogenina, dicho TIMP2, dicha sgpl30 o dicha sTNF-R1 de manera polarizada.
- 25 5. Población celular según la reivindicación 4, en la que la razón de secreción apical de sgpl30:secreción basal de sgpl30 es mayor de 1.
- 30 6. Población celular según la reivindicación 4, en la que la razón de secreción basal de angiogenina:secreción apical de angiogenina es mayor de 1.
- 35 7. Población celular según la reivindicación 4, en la que la razón de secreción apical de TIMP2:secreción basal de TIMP2 es mayor de 1.
- 40 8. Población celular según la reivindicación 1, en la que el número de células Oct4⁺TRA-1-60⁺ en la población está por debajo de 1:250.000.
- 45 9. Población celular según la reivindicación 1, en la que
 - (i) al menos el 80% de las células expresan bestrofina 1, tal como se mide mediante inmunotinción;
 - (ii) al menos el 80% de las células expresan factor de la transcripción asociado a microftalmia (MITF), tal como se mide mediante inmunotinción;
 - 40 (iii) más del 50% de las células expresan gen de caja apareada 6 (PAX-6) tal como se mide mediante FACS;
 - (iv) las células secretan más de 750 ng de factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) por ml al día, y/o
 - 45 (v) la razón de secreción apical de PEDF:secreción basal de PEDF es mayor de 1.
- 50 10. Población celular según la reivindicación 2, en la que la resistencia eléctrica transepitelial de la población de células es mayor de 100 ohmios.
- 55 11. Población celular según la reivindicación 1, que se genera mediante:
 - (a) cultivar células madre embrionarias humanas en un medio que comprende nicotinamida para generar células en diferenciación, en la que dicho medio está desprovisto de activina A;
 - (b) cultivar dichas células en diferenciación en un medio que comprende nicotinamida y activina A para generar células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE; y
 - (c) cultivar dichas células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE en un medio que comprende nicotinamida, en la que dicho medio está desprovisto de activina A.
- 60 12. Población celular según la reivindicación 11, en la que las etapas (a)-(c) se efectúan en condiciones en las que el nivel de oxígeno atmosférico es de menos de aproximadamente el 10%.
- 65 13. Composición farmacéutica que comprende la población celular según la reivindicación 1 como agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Población celular según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una degeneración de la retina.

15. Método de generación de células del epitelio pigmentario retiniano (REP), que comprende:
- 5 (a) cultivar células madre pluripotentes en un medio que comprende un agente de diferenciación para generar células en diferenciación, en el que dicho medio está desprovisto de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β);
- 10 (b) cultivar dichas células en diferenciación en un medio que comprende dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) y dicho agente de diferenciación para generar células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE;
- 15 (c) cultivar dichas células que se diferencian adicionalmente hacia el linaje del RPE en un medio que comprende un agente de diferenciación para generar células del RPE, en el que dicho medio está desprovisto de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), en el que las etapas (a)-(c) se efectúan en condiciones en las que el nivel de oxígeno atmosférico es de menos de aproximadamente el 10%; y
- (d) expandir dichas células del RPE.
- 20 16. Método según la reivindicación 15, en el que dichas células del RPE se expanden en la etapa (d) en suspensión o en una monocapa.
- 25 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que la expansión de dichas células del RPE en la etapa (d) se efectúa en una matriz extracelular.
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el agente de diferenciación se selecciona del grupo que consiste en nicotinamida (NA) y 3-aminobenzamida.
- 30 19. Método según la reivindicación 15, en el que la etapa (a) comprende:
- i) cultivar dicha población cultivada de células madre pluripotentes humanas en un medio que comprende nicotinamida, en ausencia de activina A; en condiciones no adherentes para generar una agrupación de células que comprende células en diferenciación; y posteriormente
- 35 ii) cultivar dichas células en diferenciación de (i) en un medio que comprende nicotinamida, en ausencia de activina A en condiciones adherentes.
- 40 20. Método según la reivindicación 19, que comprende además cultivar dichas células diferenciadas en un medio en condiciones en las que el nivel de oxígeno atmosférico es mayor de aproximadamente el 10% en presencia de un agente de diferenciación tras la etapa (c).
- 45 21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) se selecciona del grupo que consiste en TGF β 1, TGF β 3 y activina A.
22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, que comprende además seleccionar células poligonales tras la etapa (c).
- 50 23. Método según la reivindicación 19, en el que dichas células madre pluripotentes comprenden células madre embrionarias, y dichas células madre embrionarias se propagan en un medio que comprende bFGF y TGF β .

FIG. 1

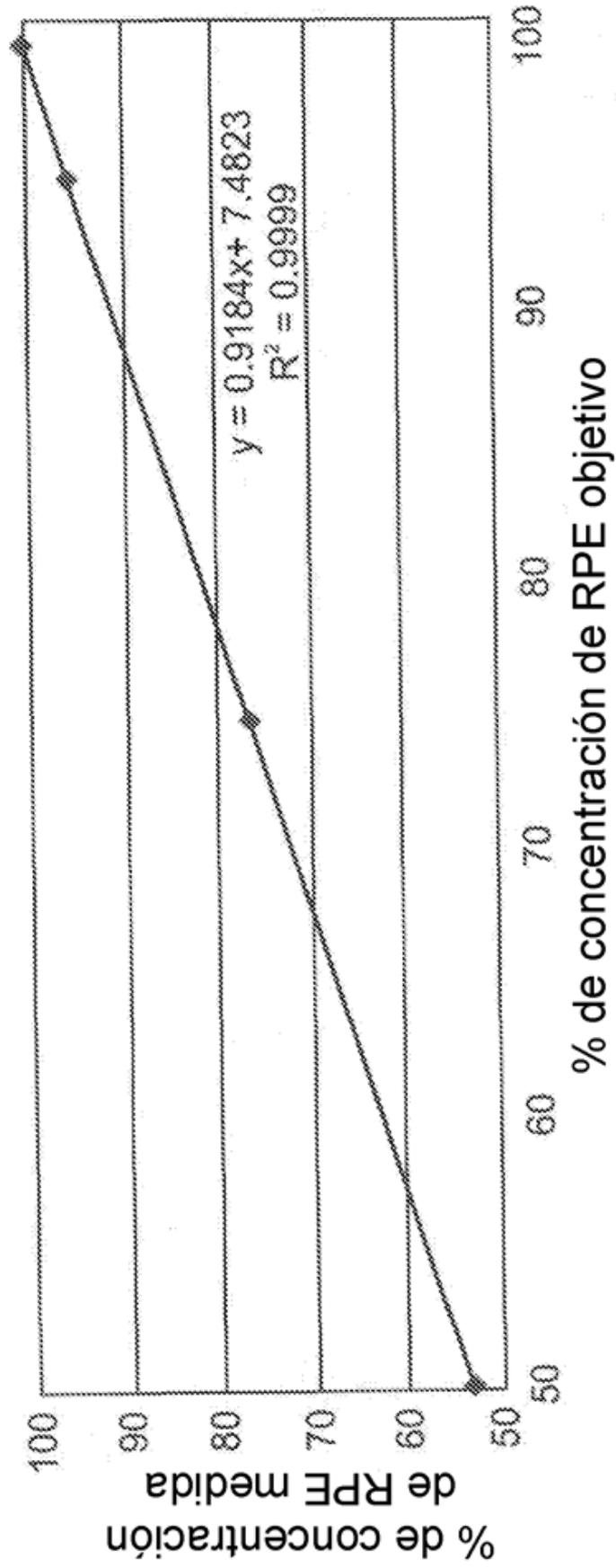
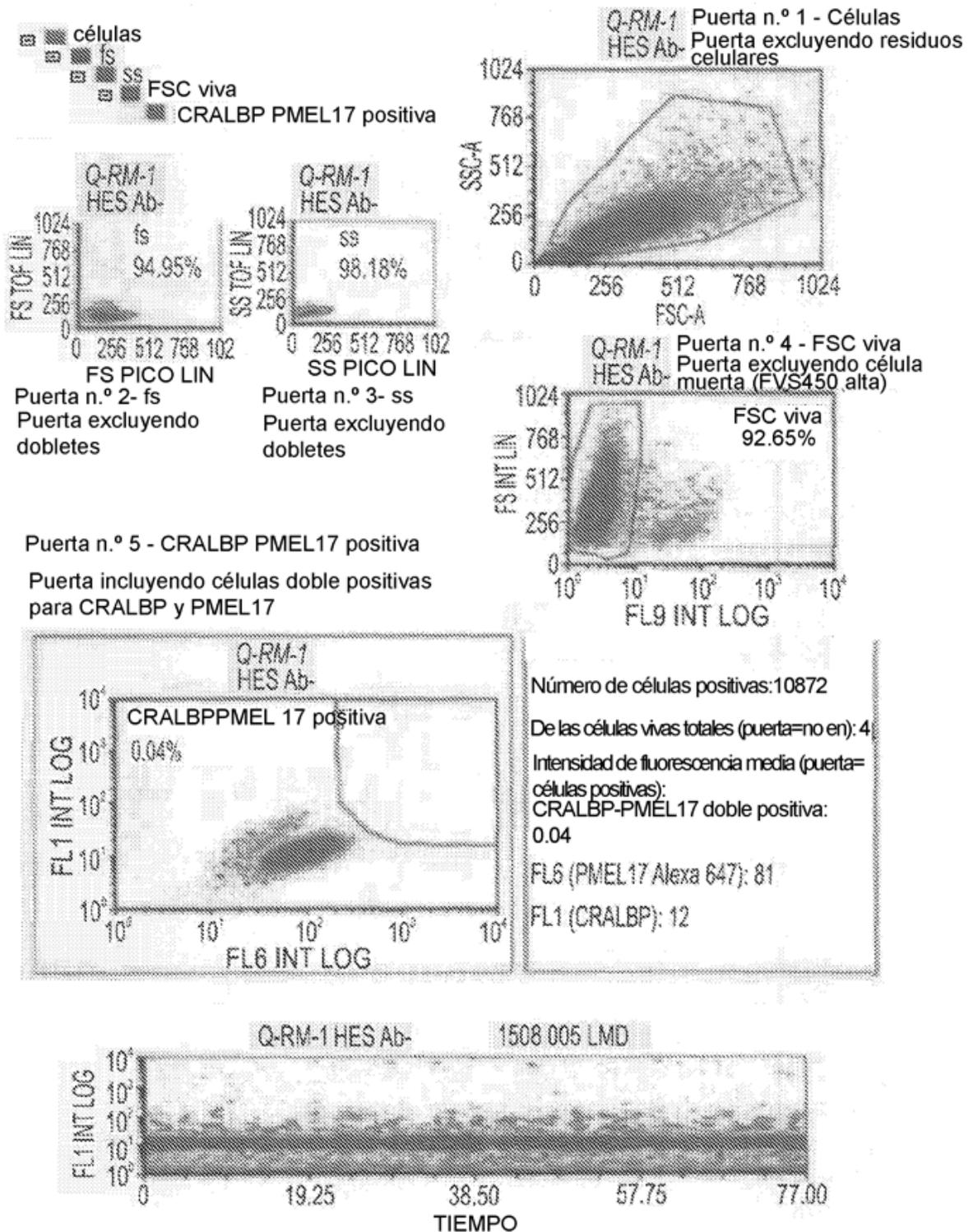
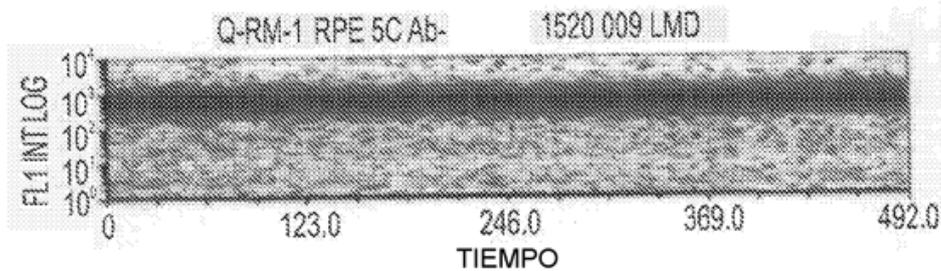
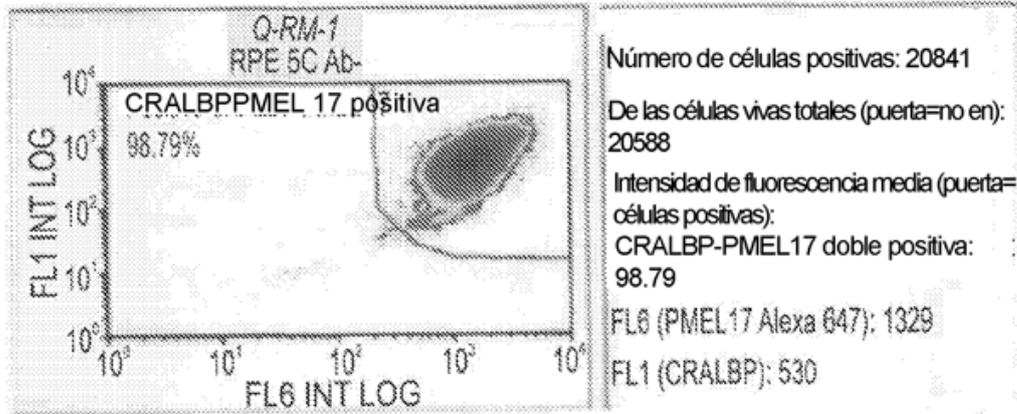
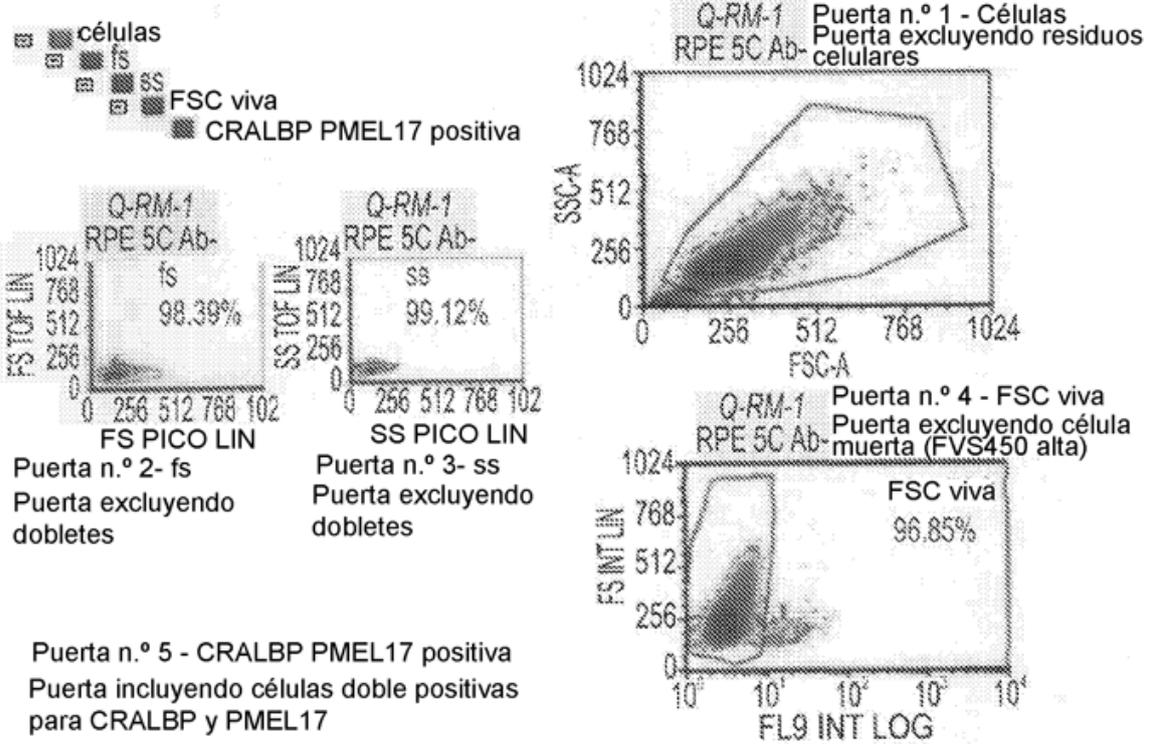


FIG. 2



La representación tiempo/FL1 demuestra el flujo celular durante el tiempo de adquisición. Permite la detección de errores de flujo

FIG. 3



La representación tiempo/FL1 demuestra el flujo celular durante el tiempo de adquisición. Permite la detección de errores de flujo

FIG. 4

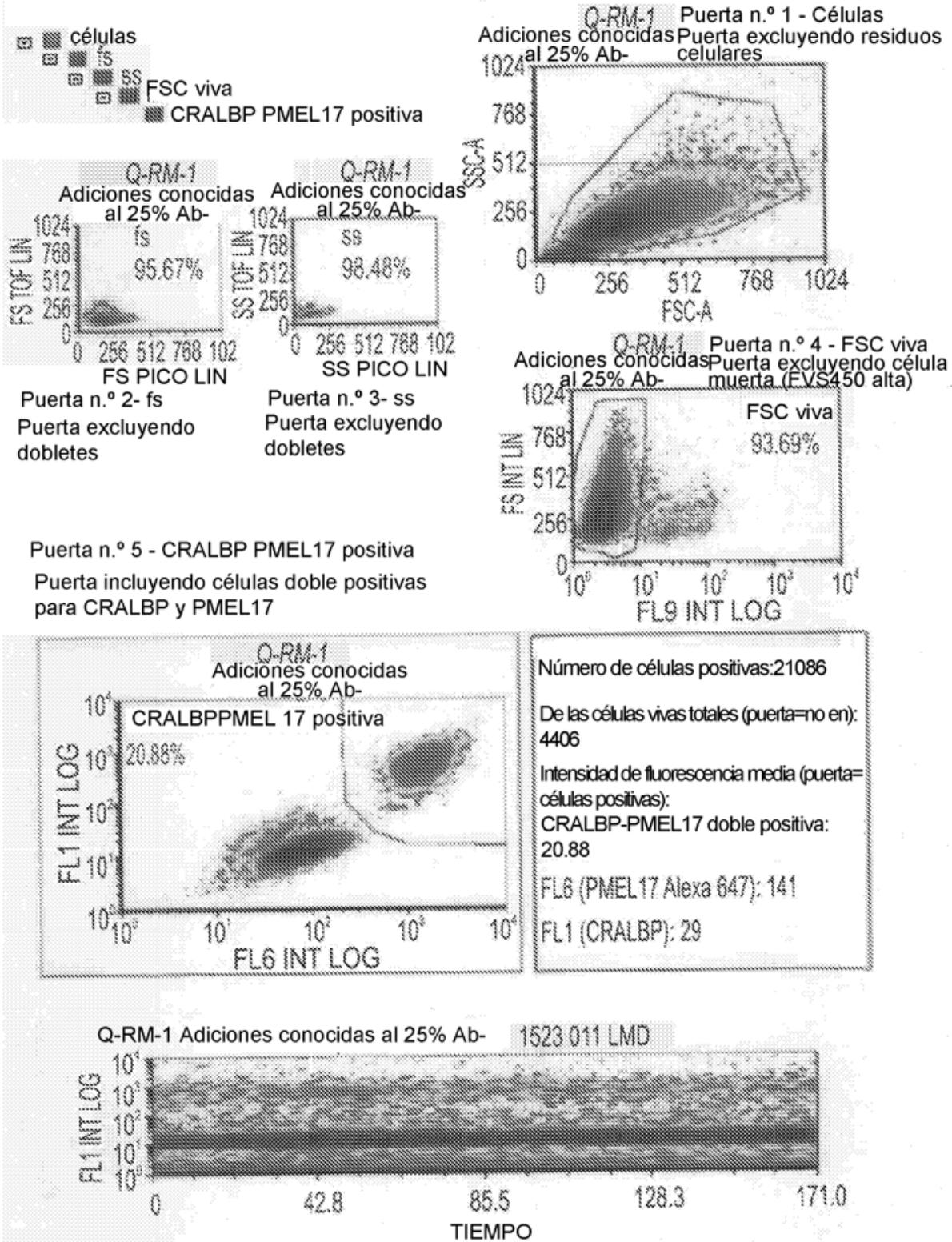


FIG. 5

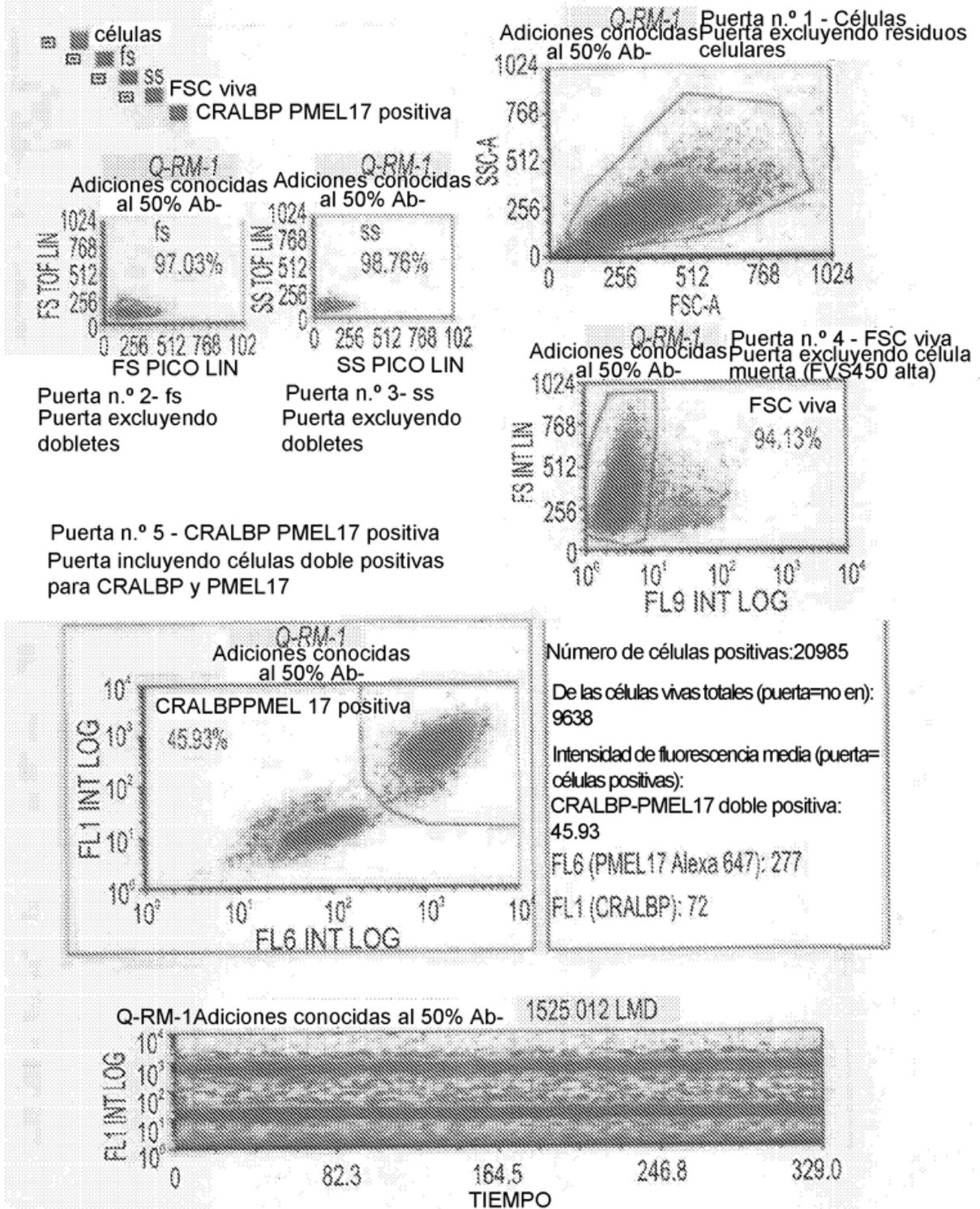


FIG. 6

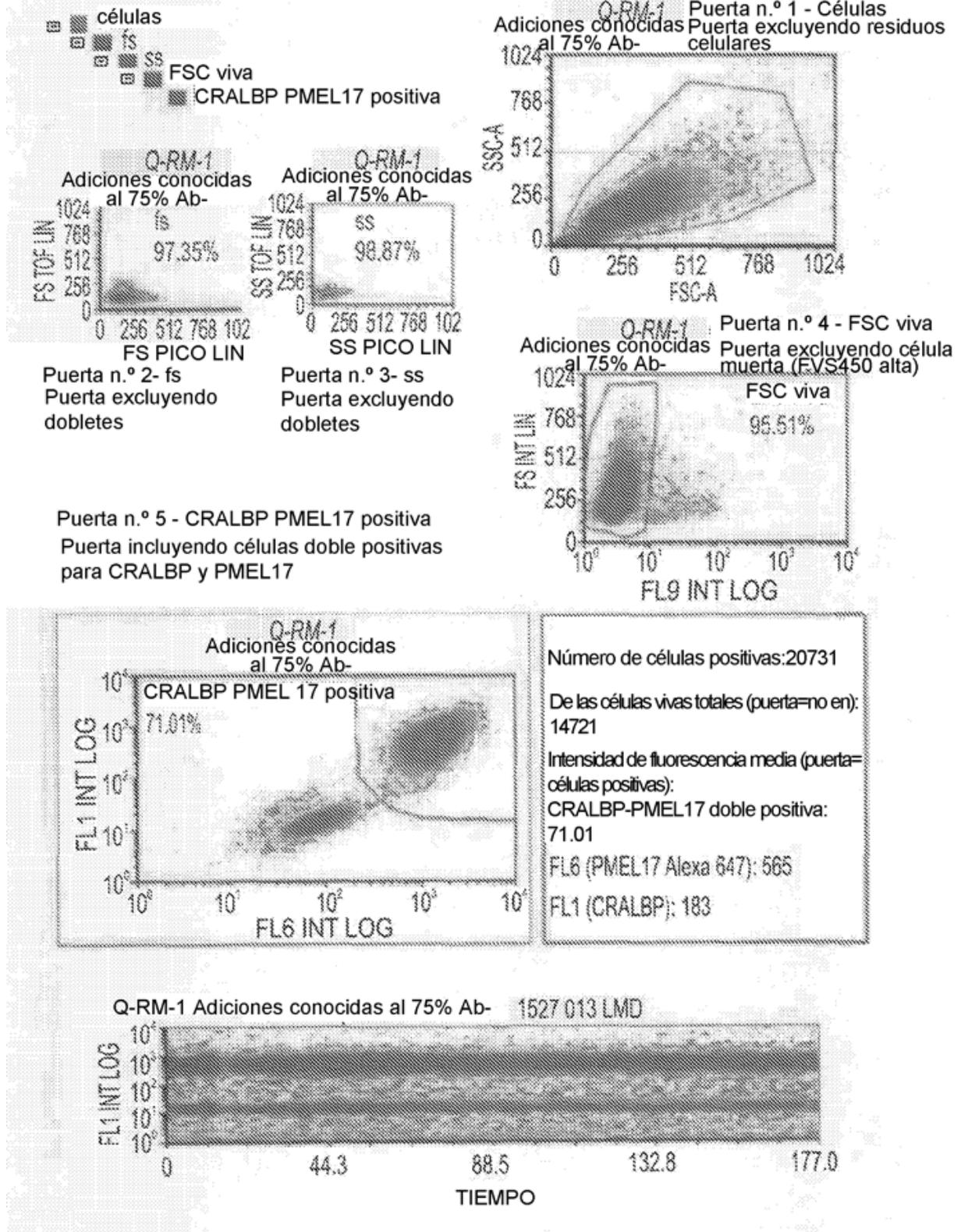
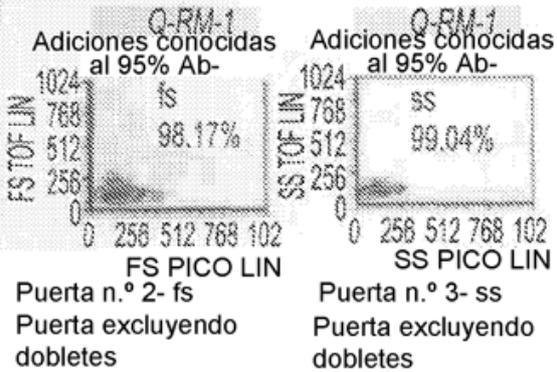
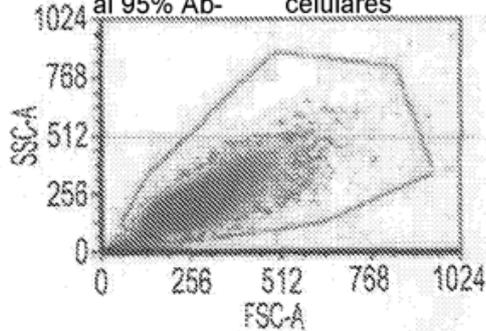


FIG. 7

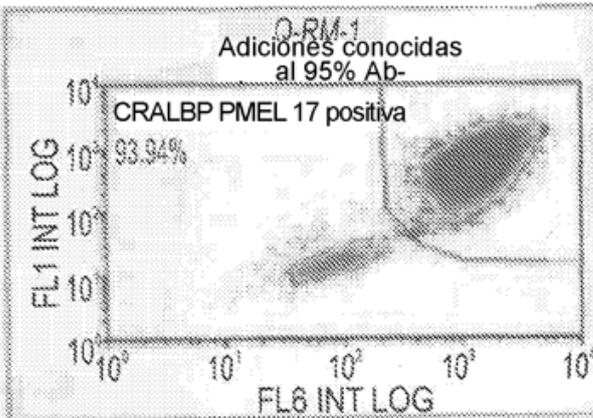
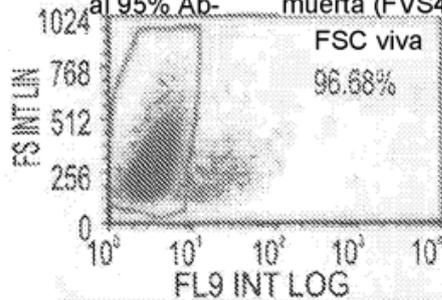


Puerta n.º 5 - CRALBP PMEL17 positiva
 Puerta incluyendo células doble positivas para CRALBP y PMEL17

Q-RM-1 Puerta n.º 1 - Células
 Adiciones conocidas al 95% Ab- Puerta excluyendo residuos celulares



Q-RM-1 Puerta n.º 4 - FSC viva
 Adiciones conocidas al 95% Ab- Puerta excluyendo célula muerta (FVS450 alta)



Número de células positivas: 20500

De las células vivas totales (puerta=no en): 19257

Intensidad de fluorescencia media (puerta=células positivas):

CRALBP-PMEL17 doble positiva: 93.94

FL6 (PMEL17 Alexa 647): 1051

FL1 (CRALBP): 407

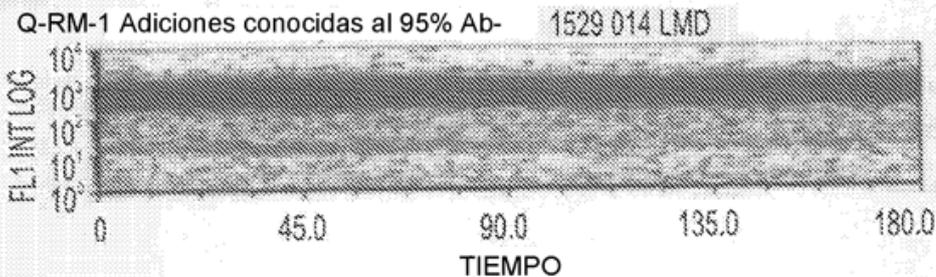
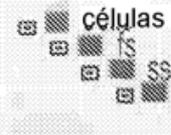
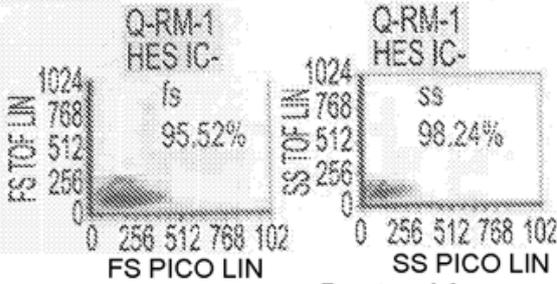


FIG. 8



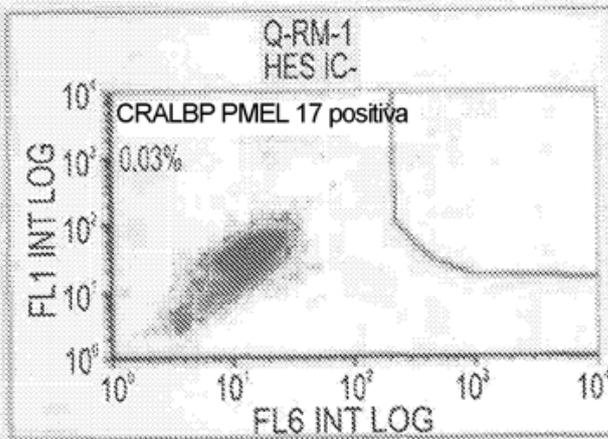
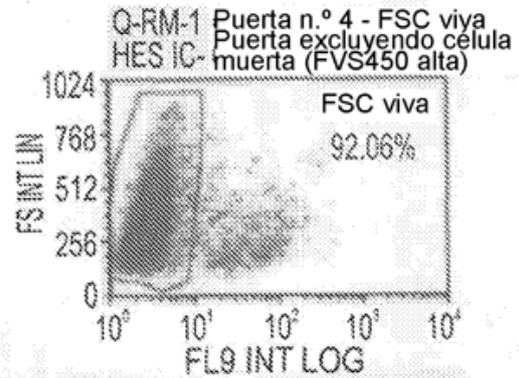
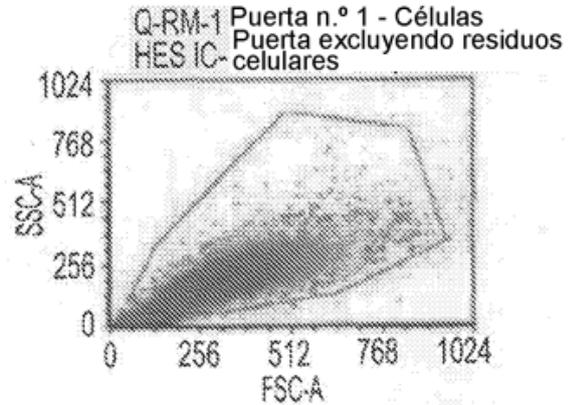
 c elulas
 fs
 ss
 FSC viva
 CRALBP PMEL17 positiva



Puerta n.  2 - fs
 Puerta excluyendo
 dobletes

Puerta n.  3 - ss
 Puerta excluyendo
 dobletes

Puerta n.  5 - CRALBP PMEL17 positiva
 Puerta incluyendo c elulas doble positivas
 para CRALBP y PMEL17



N mero de c elulas positivas: 9178
 De las c elulas vivas totales (puerta=no en): 3
 Intensidad de fluorescencia media (puerta=
 c elulas positivas):
 CRALBP-PMEL17 doble positiva:
 0.03
 FL6 (PMEL17 Alexa 647): 13
 FL1 (CRALBP): 36

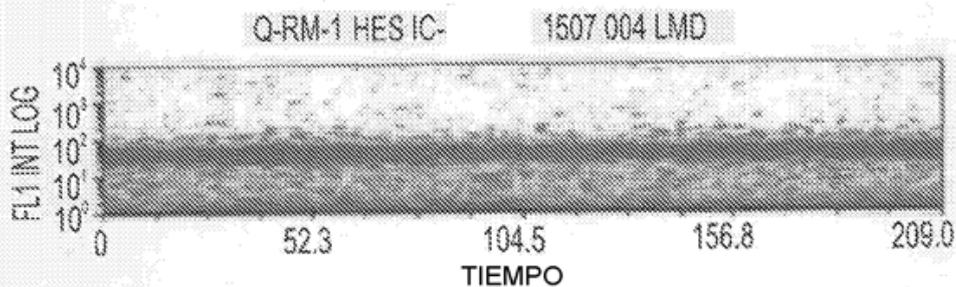
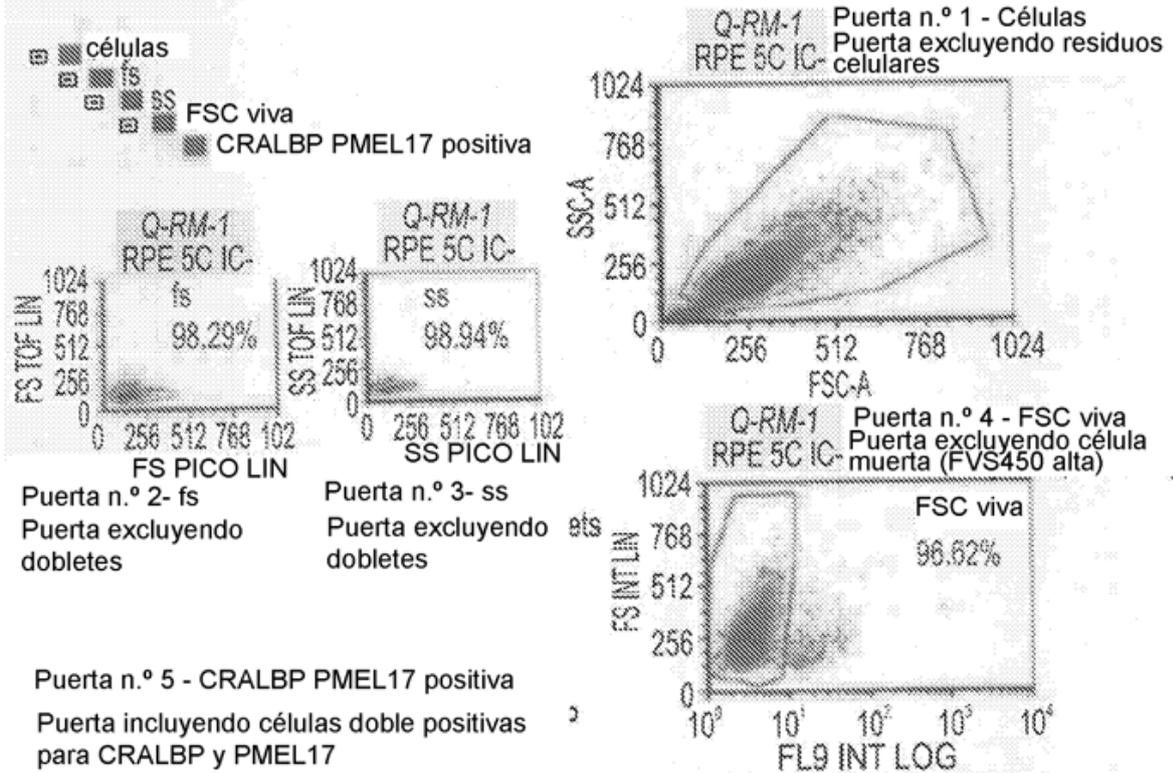


FIG. 9



Puerta n.º 5 - CRALBP PMEL17 positiva
Puerta incluyendo células doble positivas para CRALBP y PMEL17

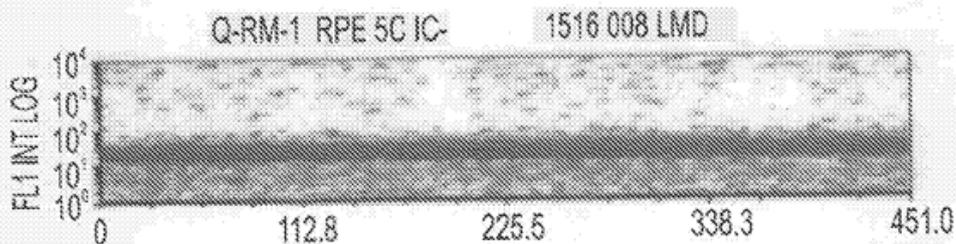
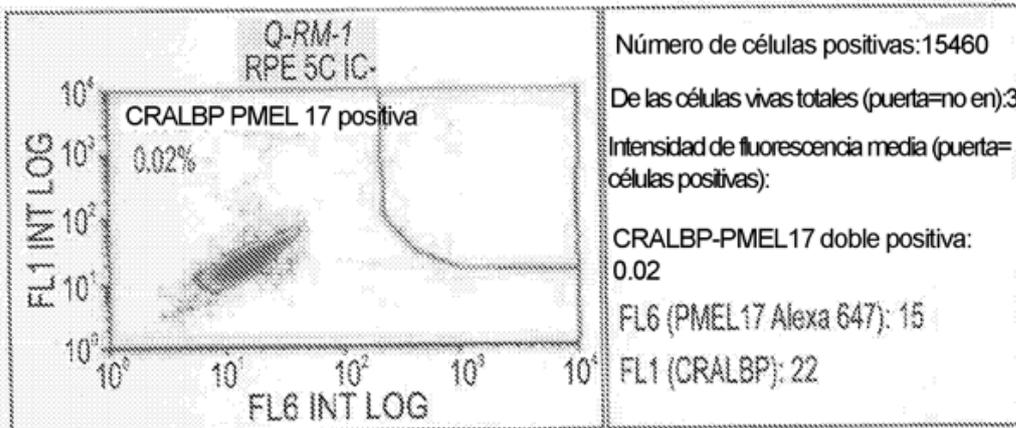


FIG. 10

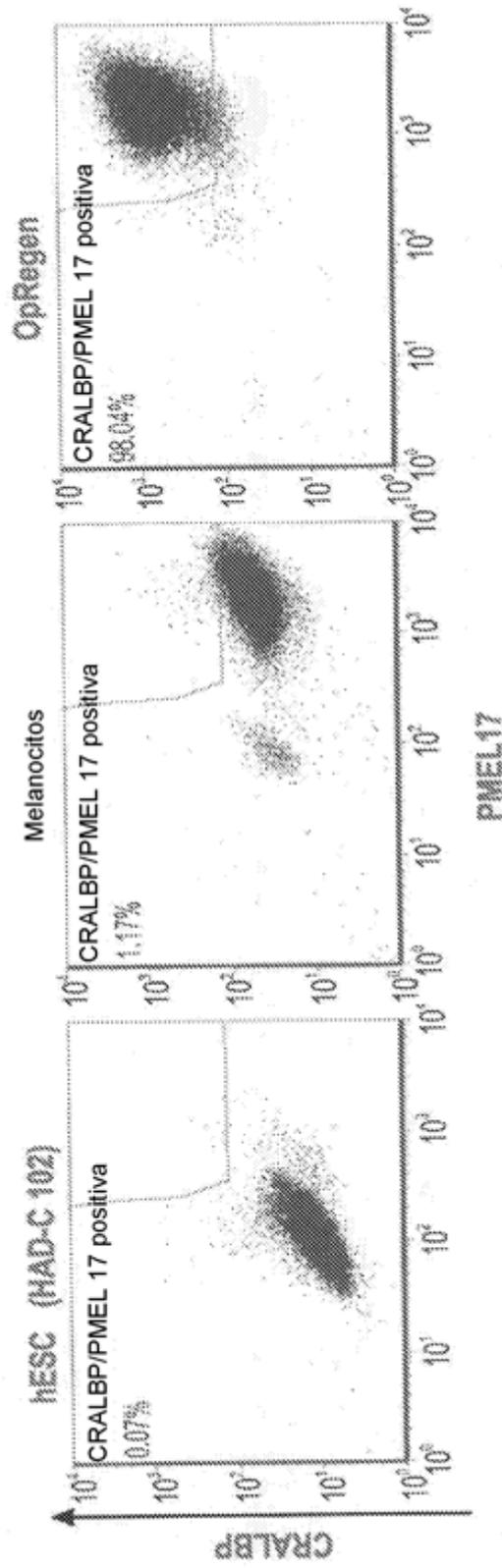


FIG. 11

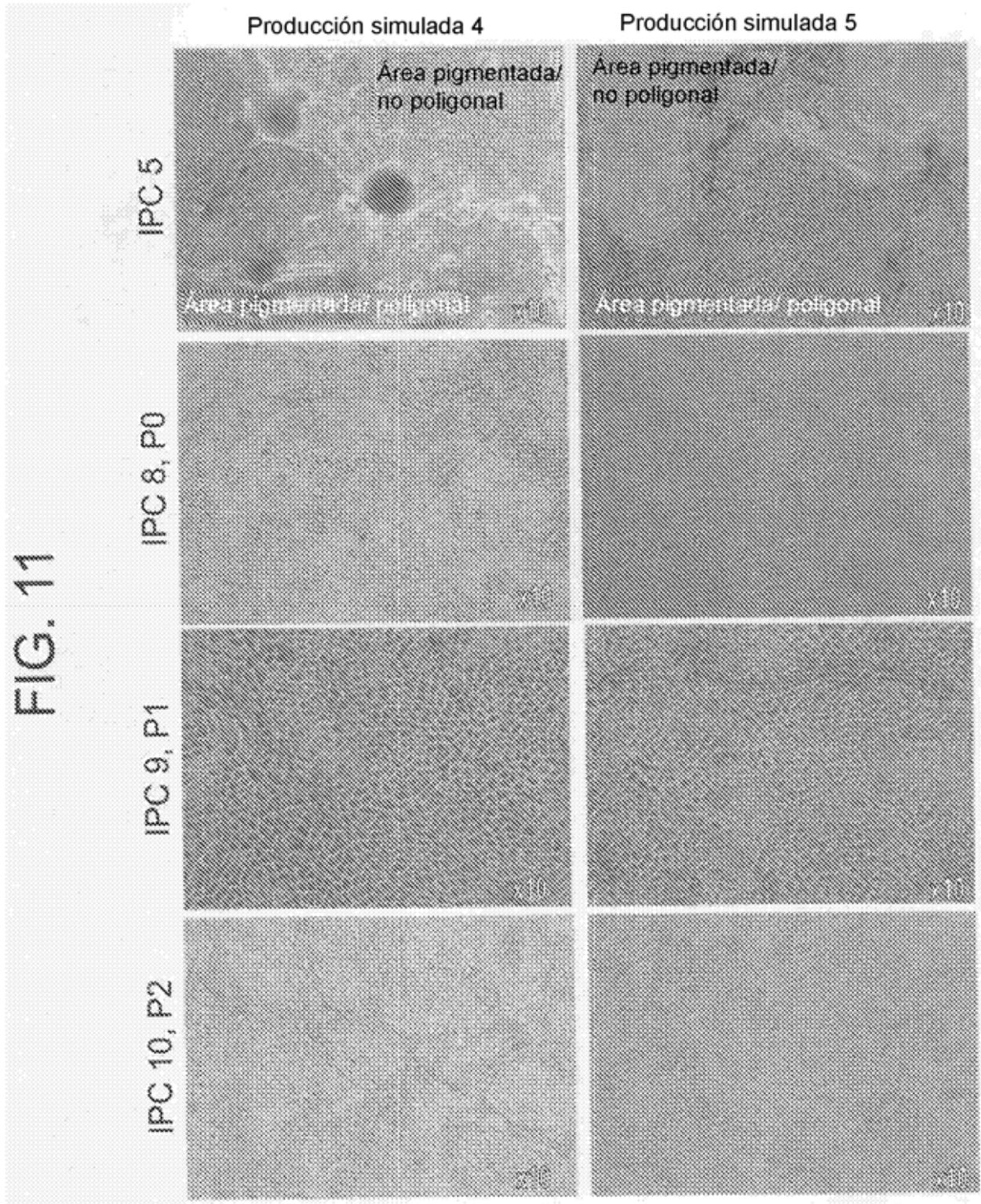


FIG. 12

Procedimiento de fabricación, etapas 1-3: Generación de WCB alimentador de fibroblastos de cordón umbilical humano

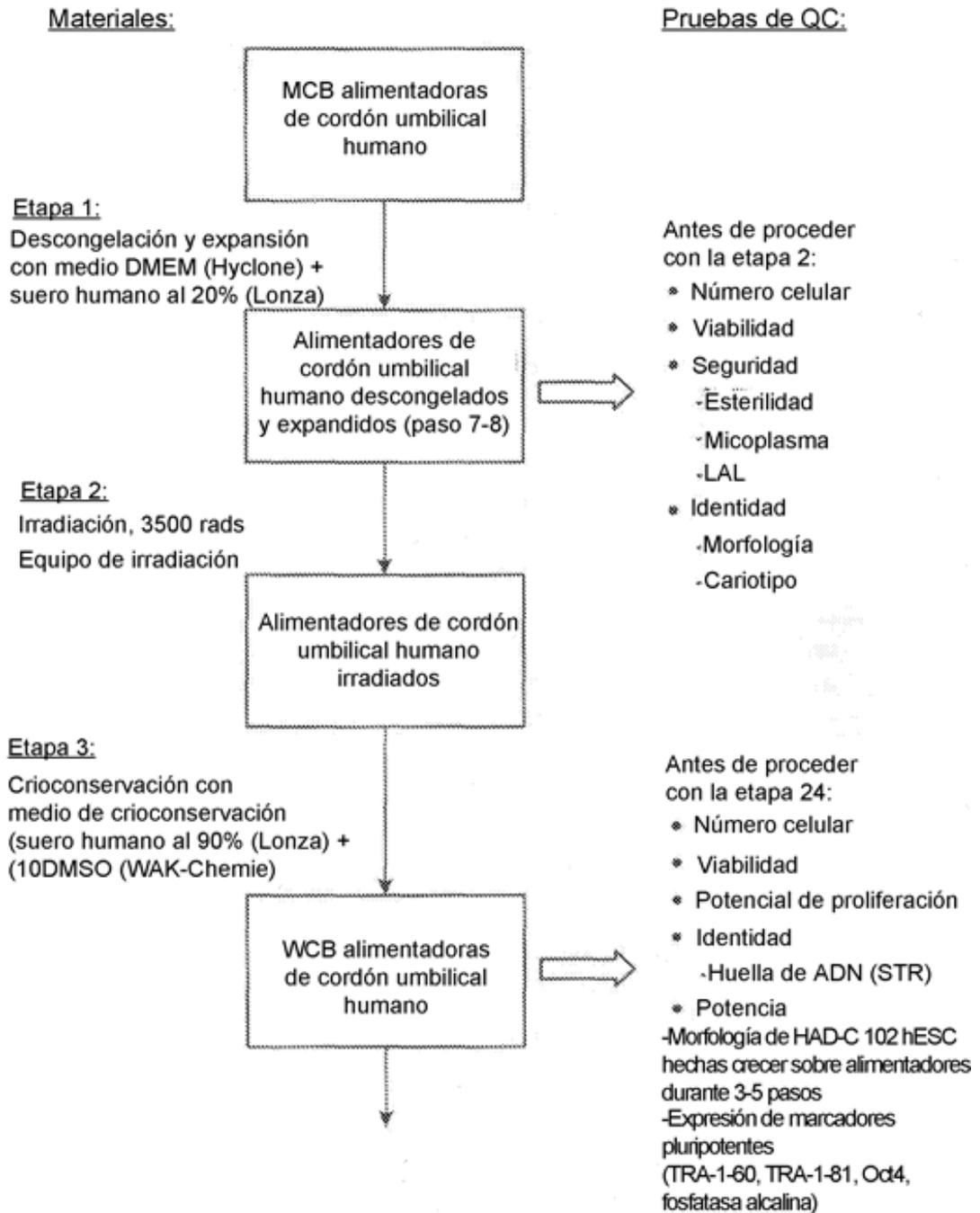


FIG. 13

Procedimiento de fabricación, etapas 4-5: Expansión de hESC

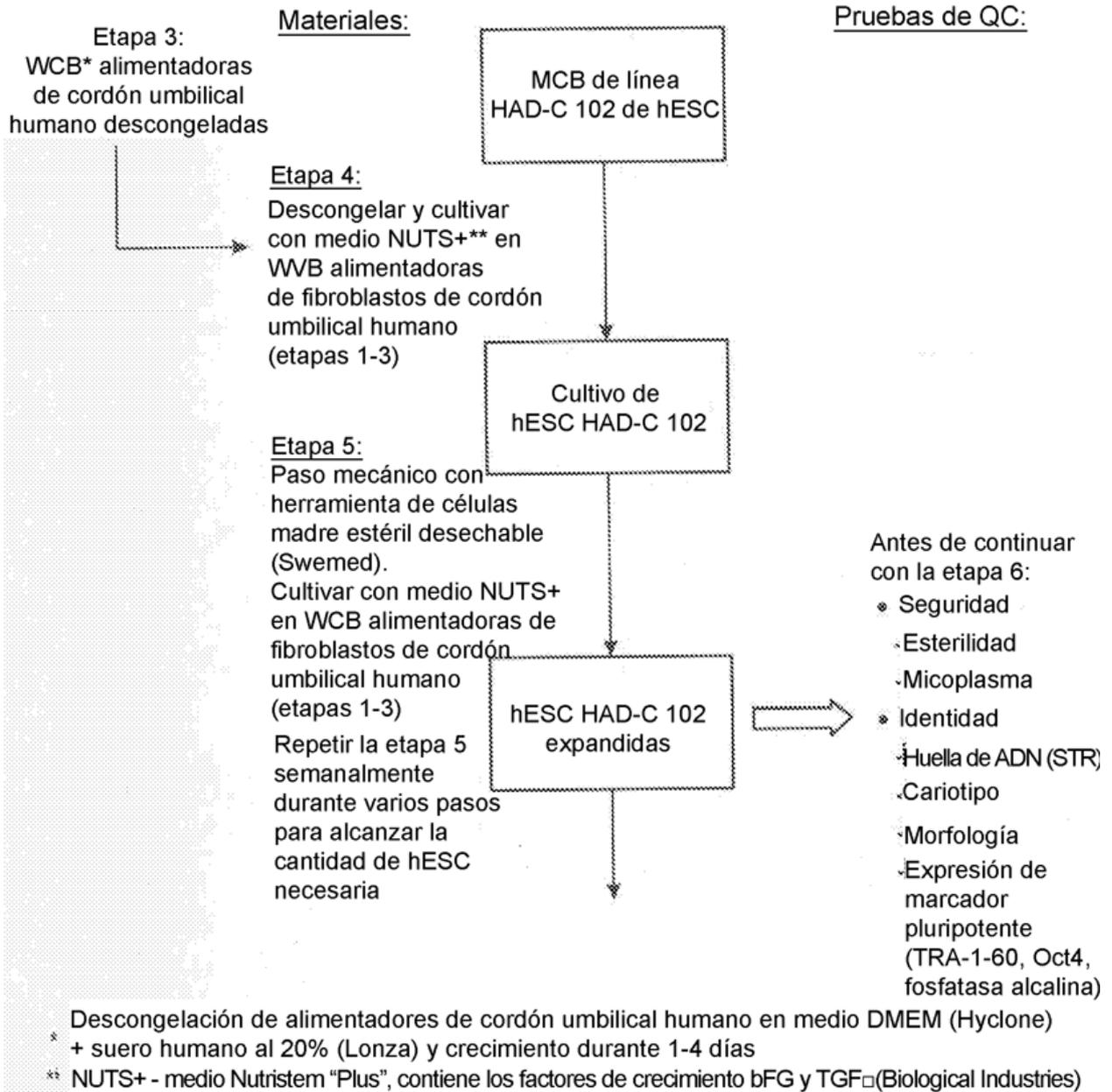
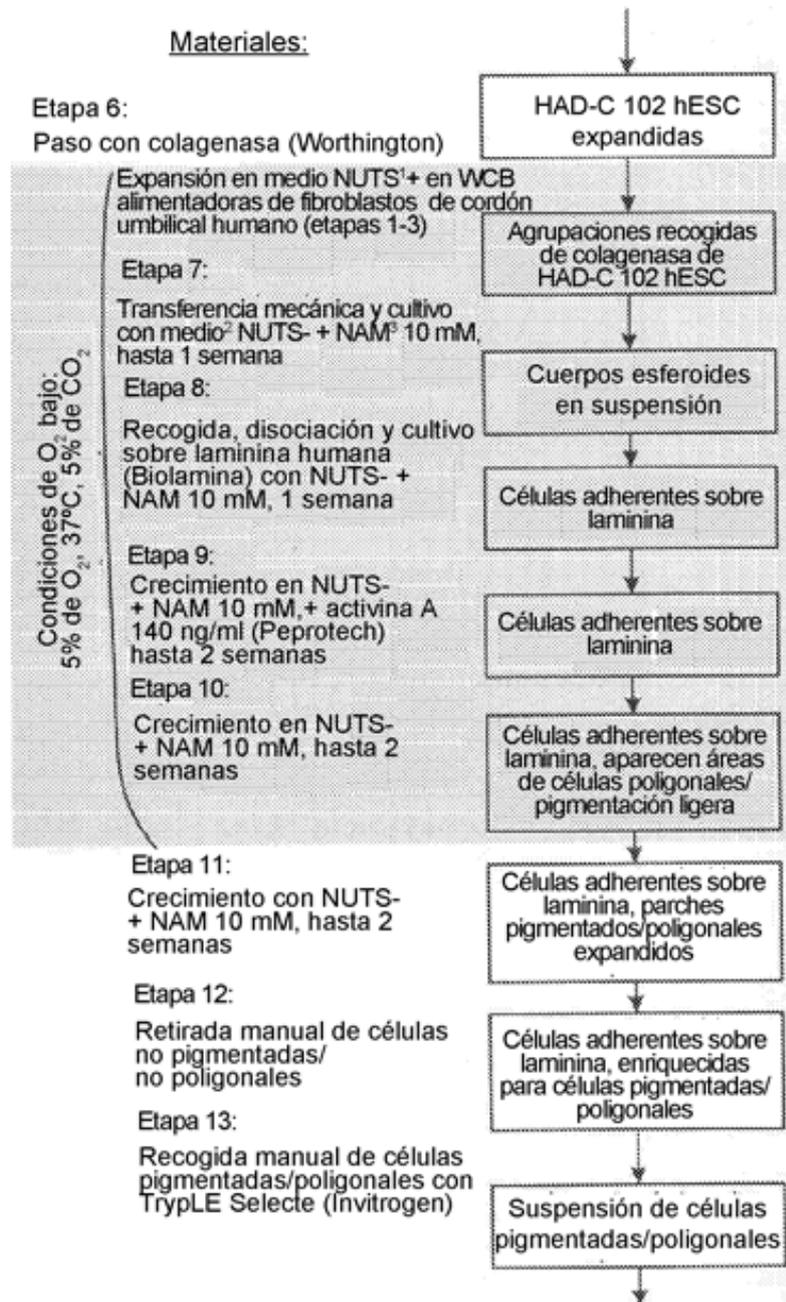


FIG. 14

Procedimiento de fabricación, etapas 6-13: Diferenciación para dar células del RPE

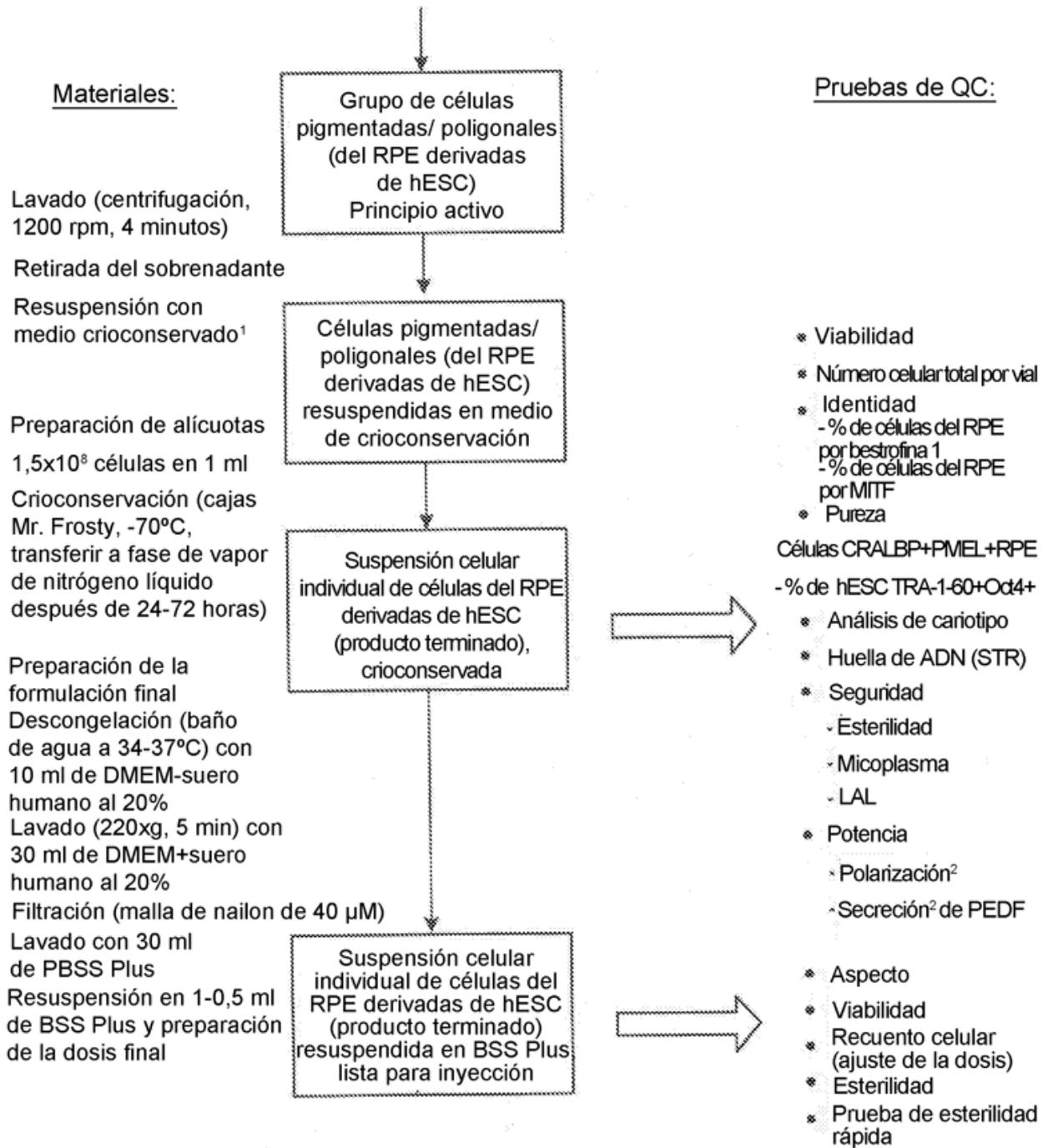


¹: NUTS+ -medio Nutristem "Plus" contiene los factores de crecimiento bFGF y TGFβ (Biological Industries)

²: NUTS- -medio Nutristem "Minus" no contiene los factores de crecimiento bFGF y TGFβ (Biological Industries)

³: NAM - Nicotinamida (Sigma)

FIG. 15



¹ Medio de crioconservación - suero humano al 90% + DMSO al 10% (WAK-DMSO-10, WAK-Chemie)

² El ensayo se realiza sólo para información, no se establecen criterios de liberación

FIG. 17

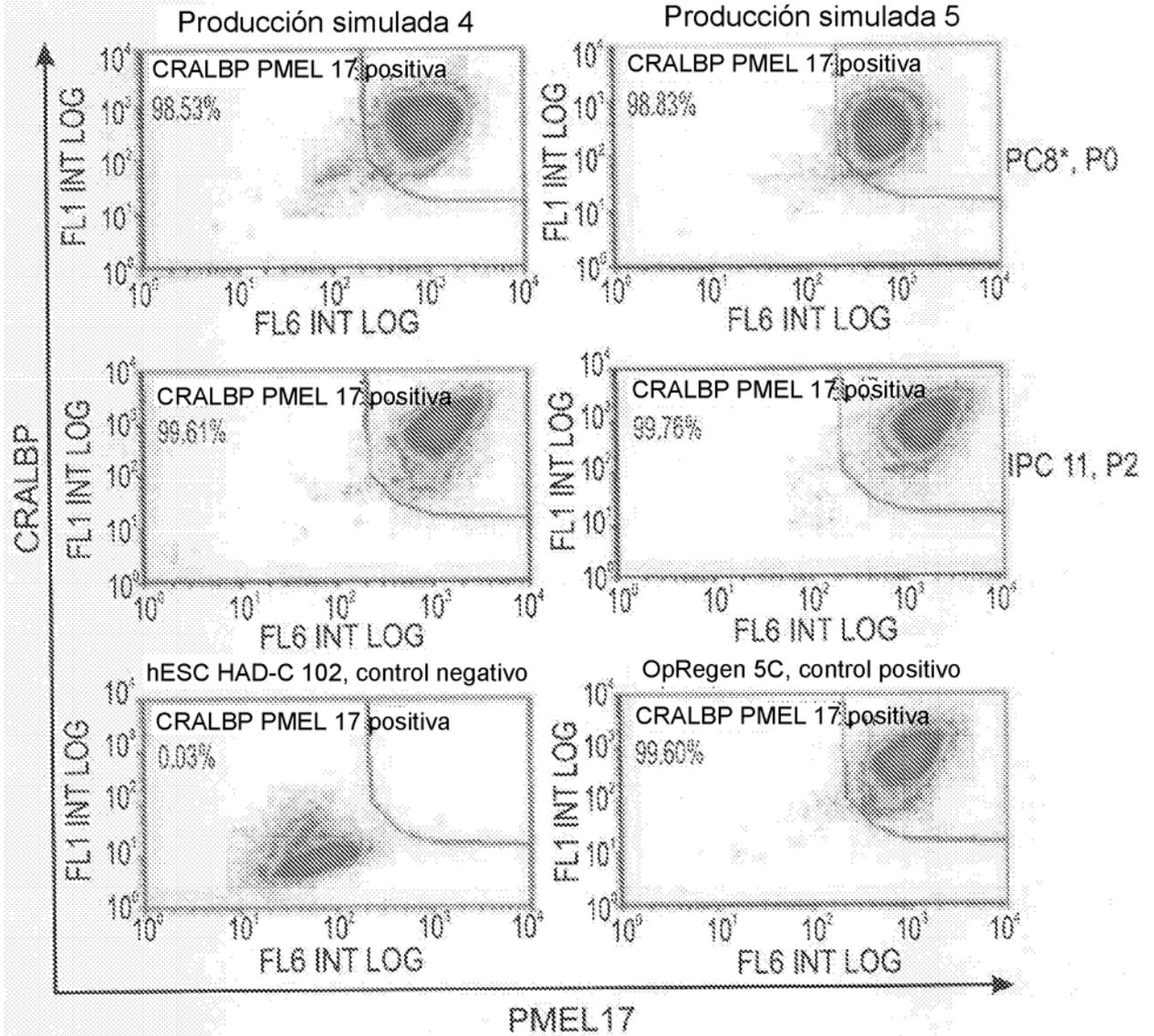


FIG. 18

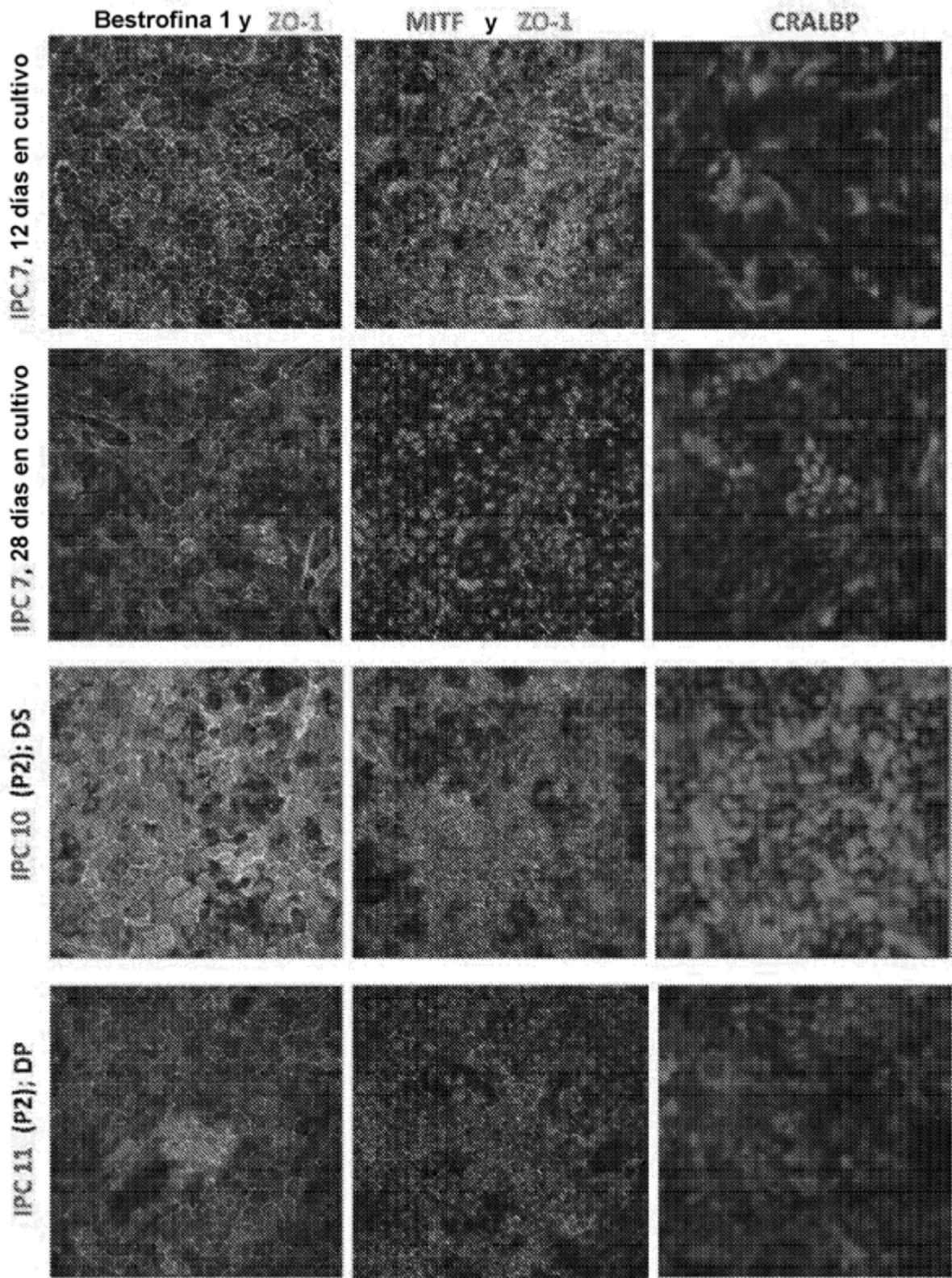


FIG. 19A

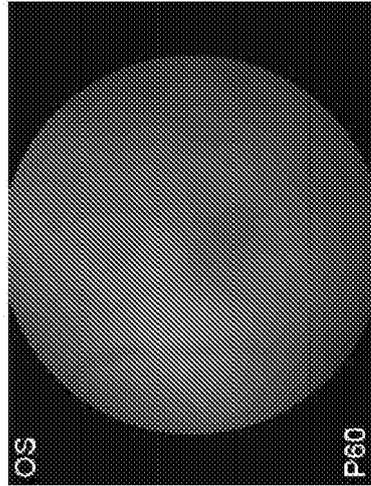


FIG. 19B

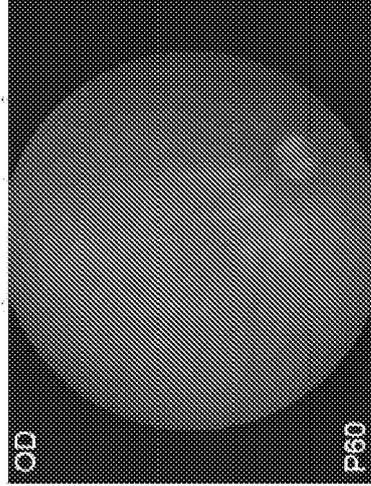


FIG. 19C

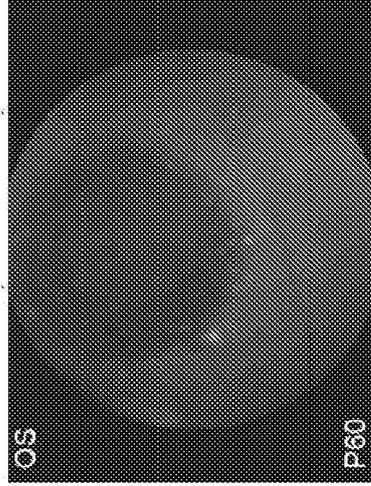
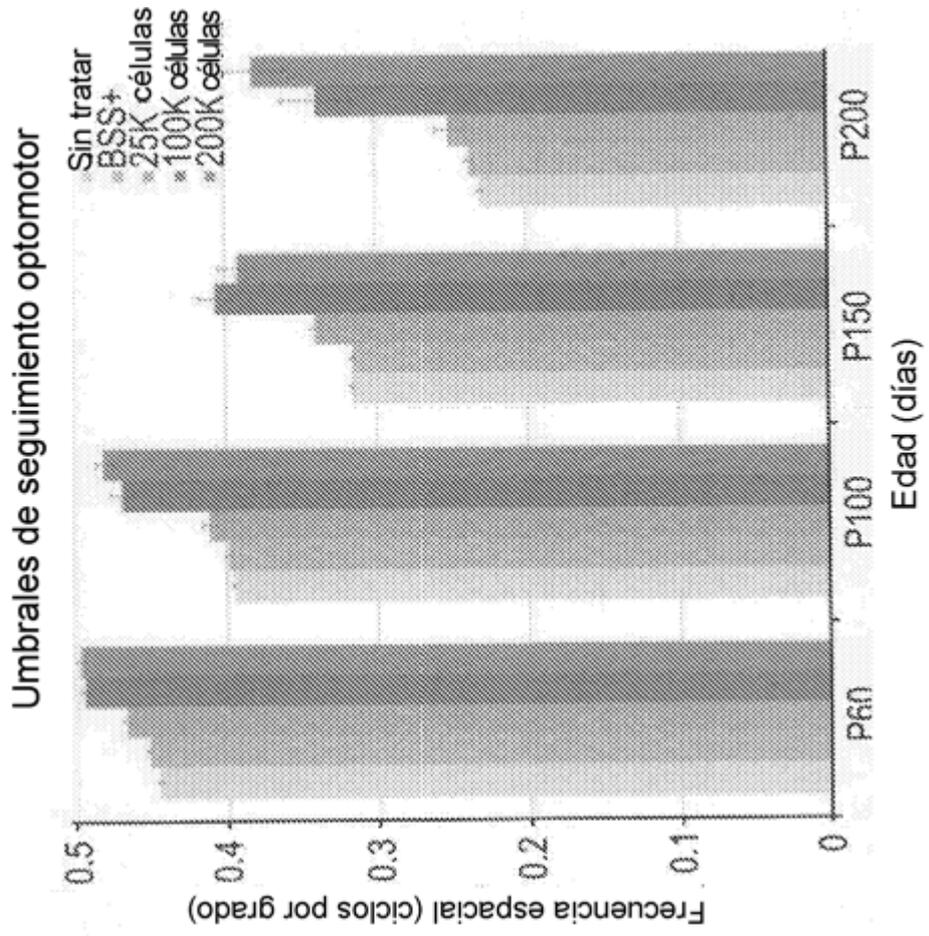


FIG. 20



Respuesta optomotora (movimiento)

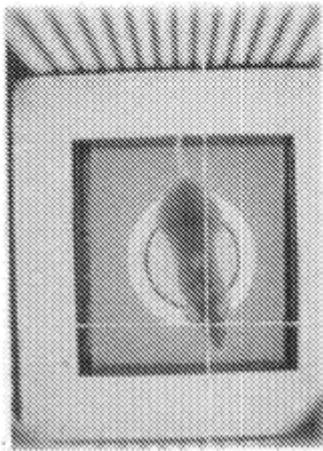


FIG. 21B

ERG de campo completo

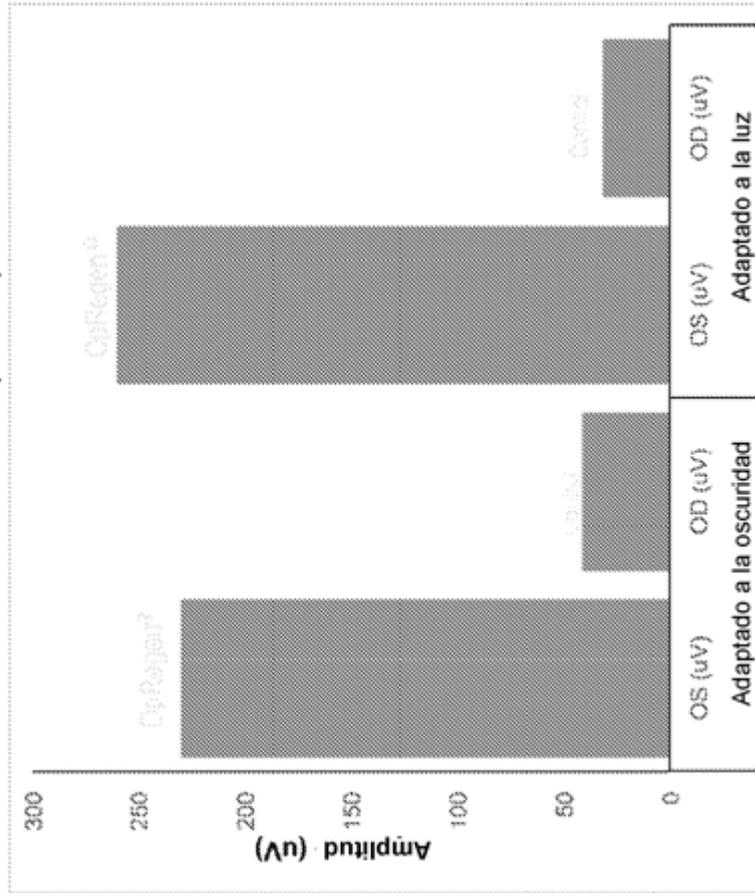
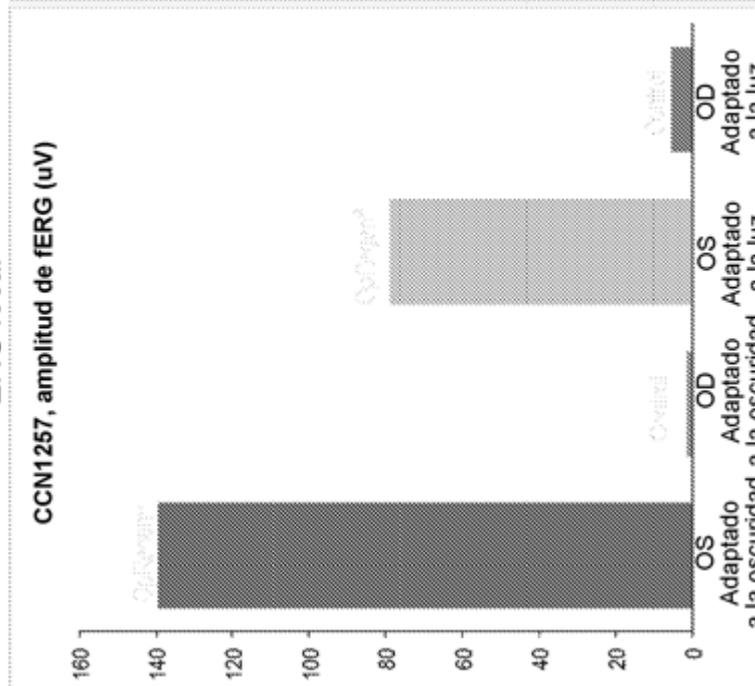


FIG. 21A

ERG focal



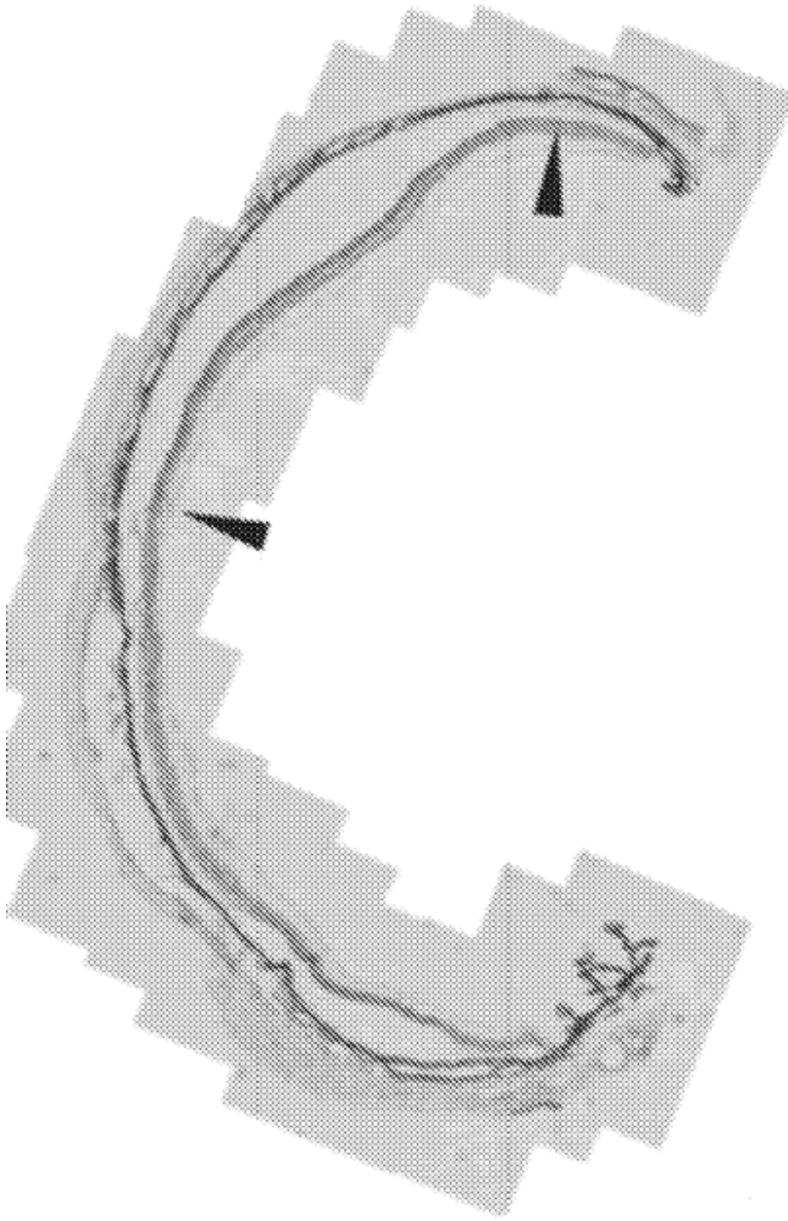


FIG. 22A

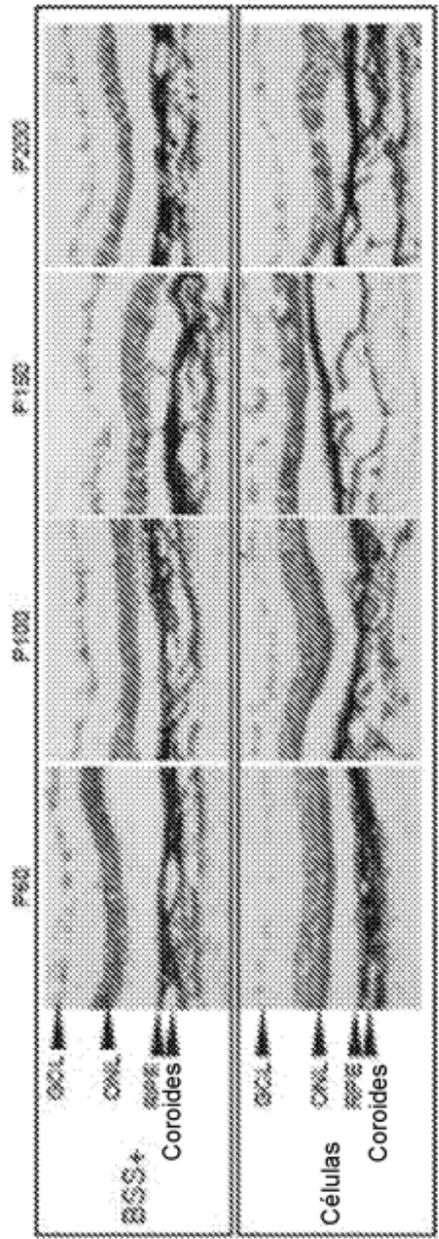


FIG. 22B

FIG. 23

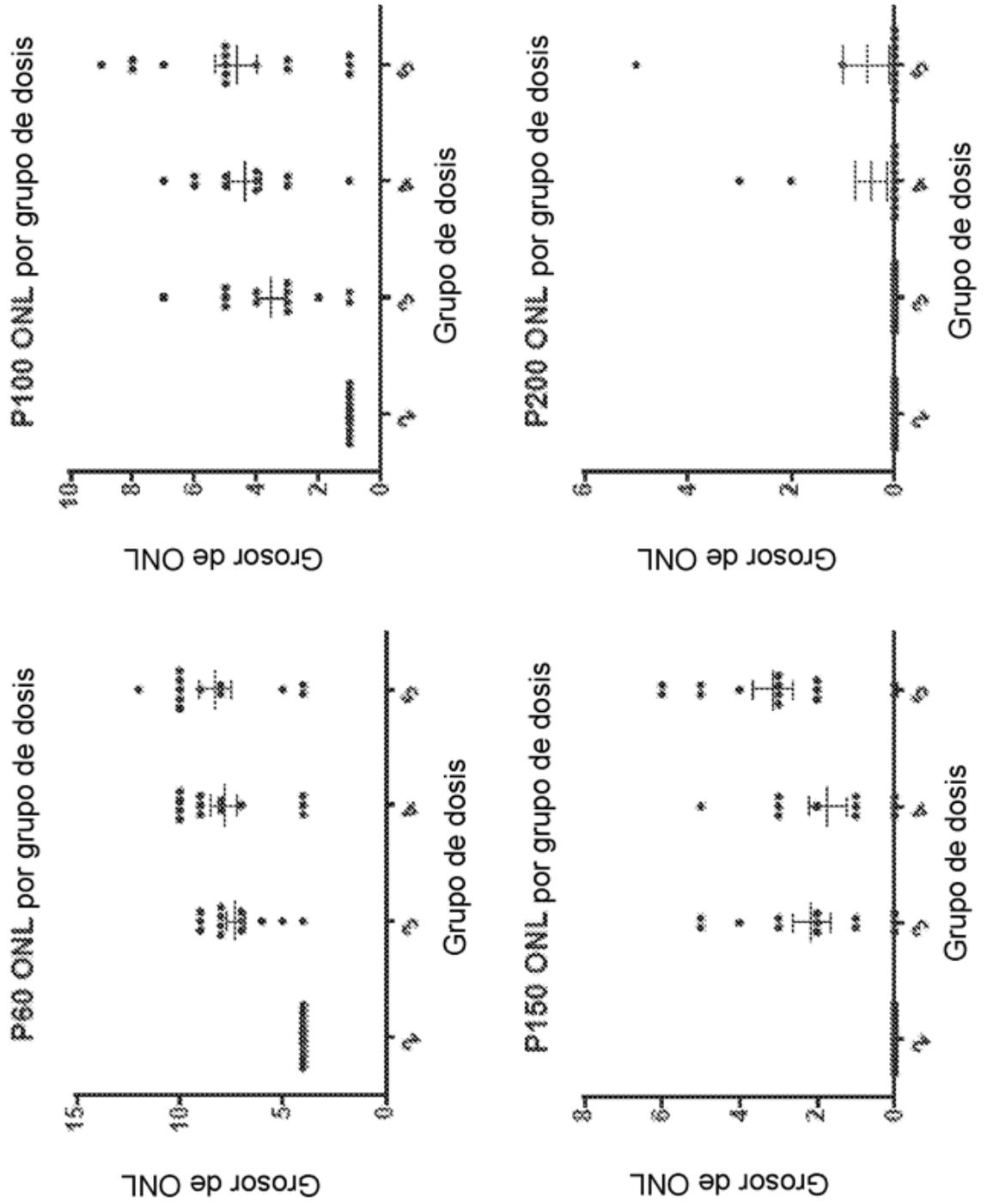


FIG. 24

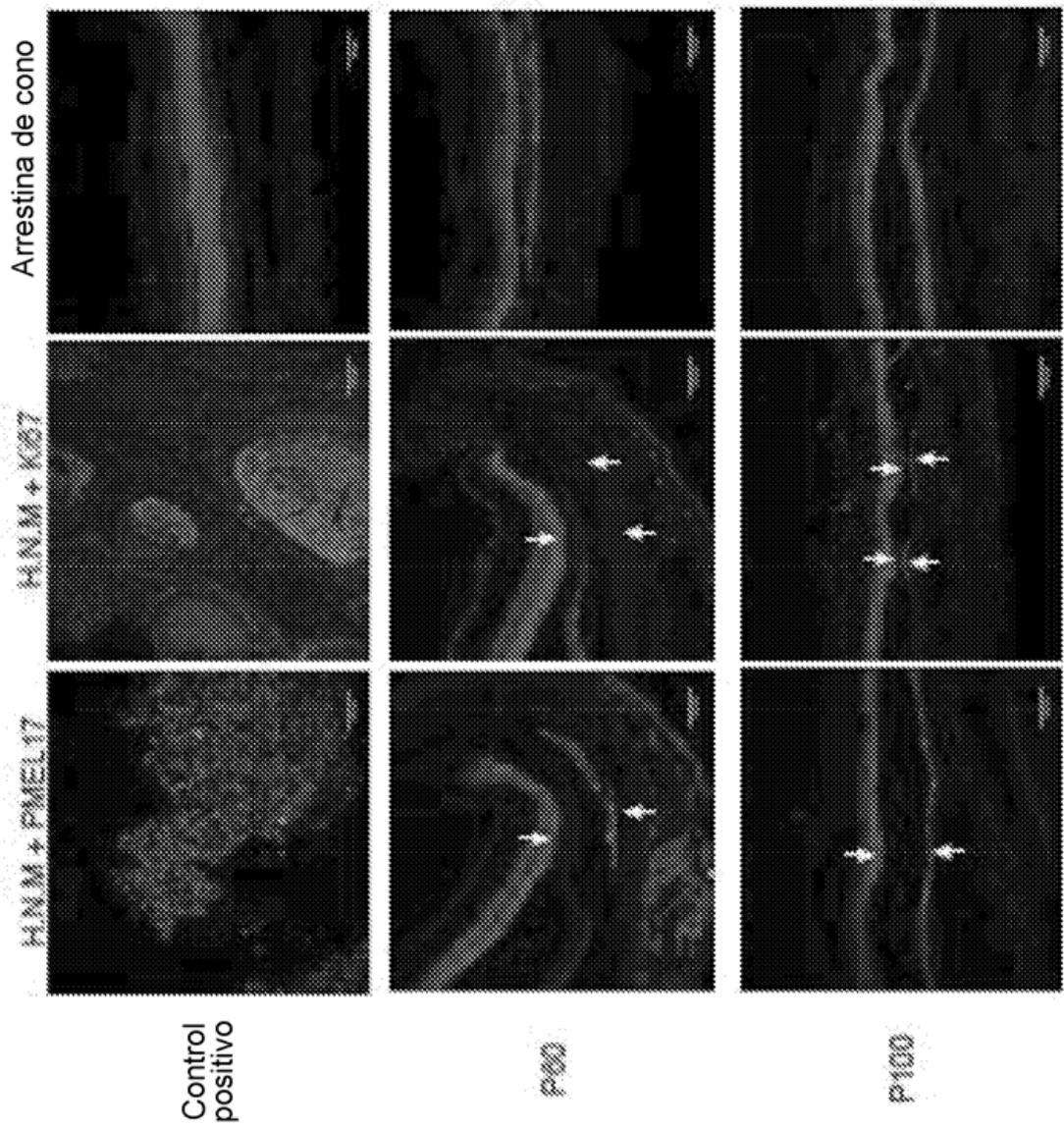


FIG. 24 continuación

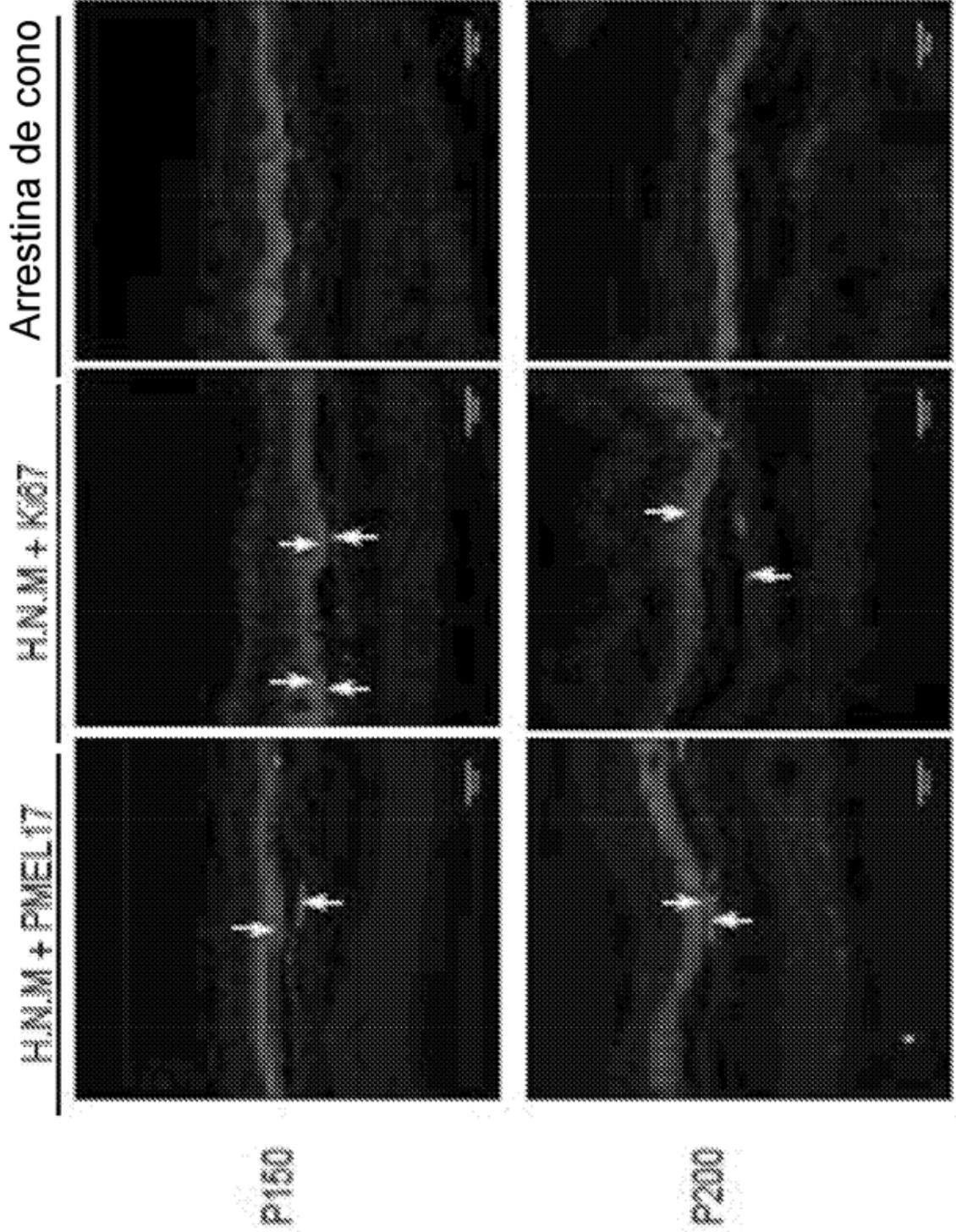


FIG. 25

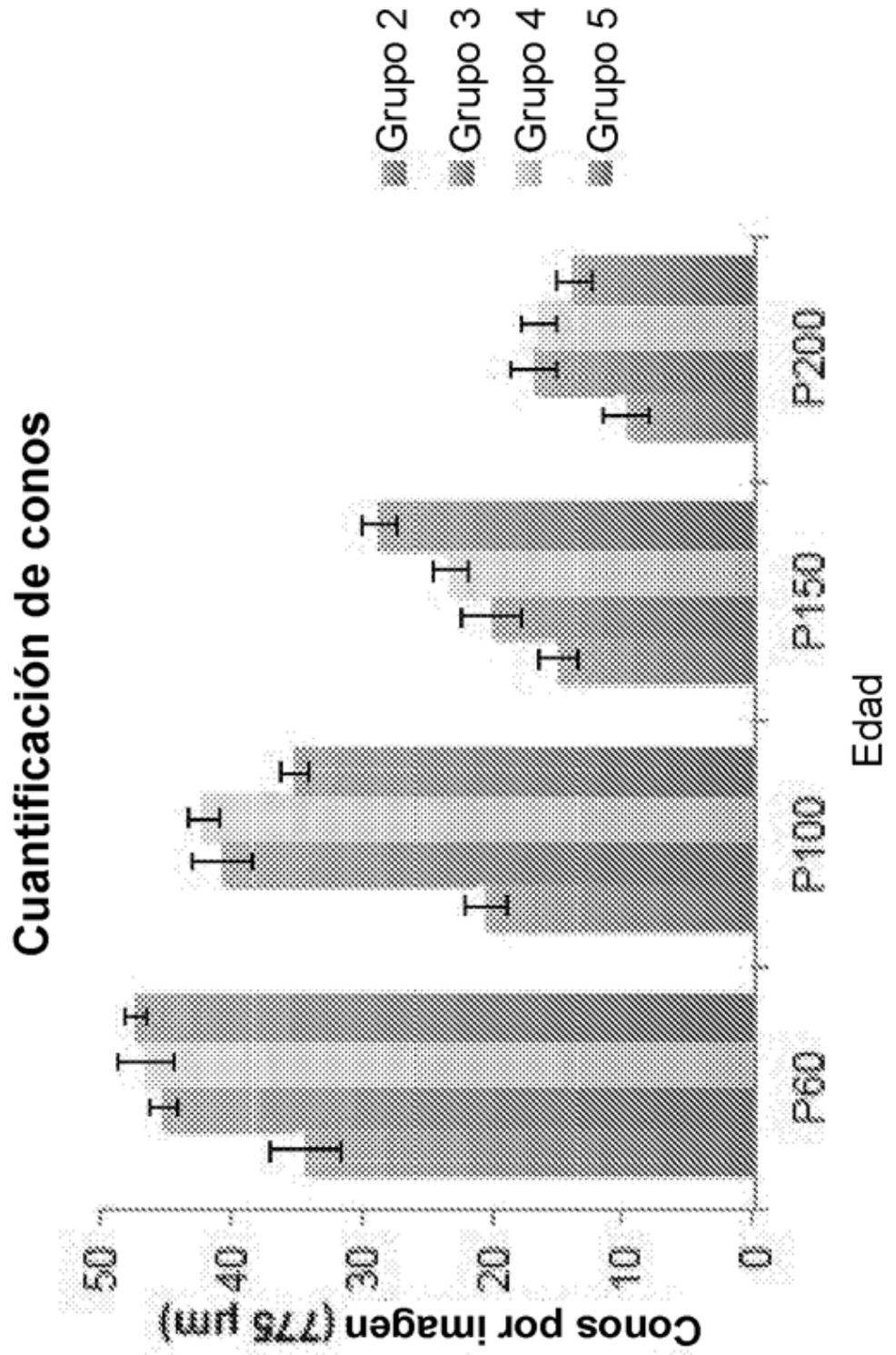


FIG.26A

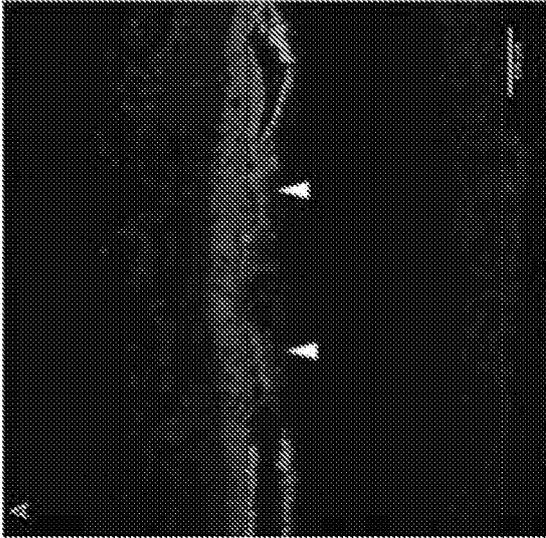


FIG. 26B

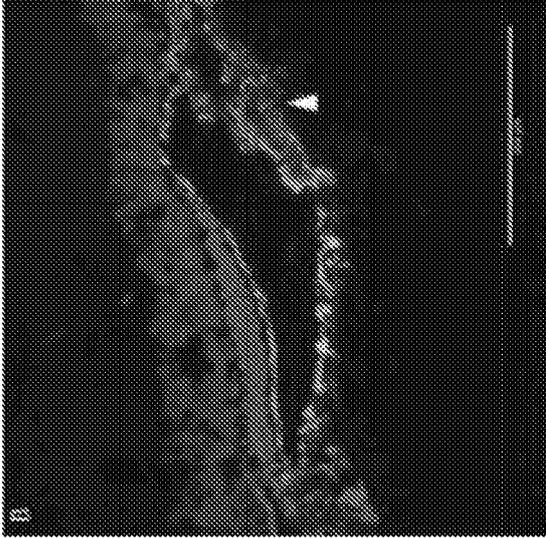


FIG.26C

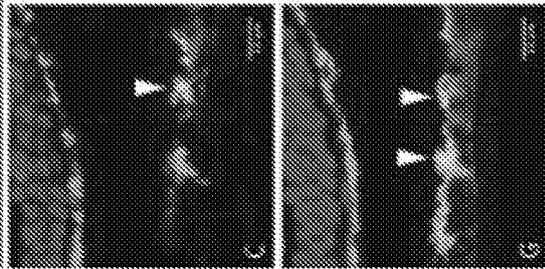


FIG. 26F

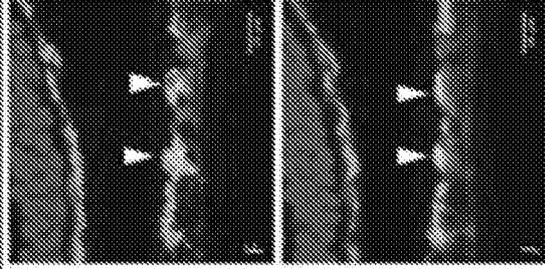


FIG. 26D

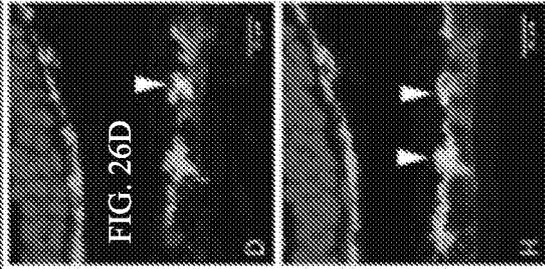


FIG.26E

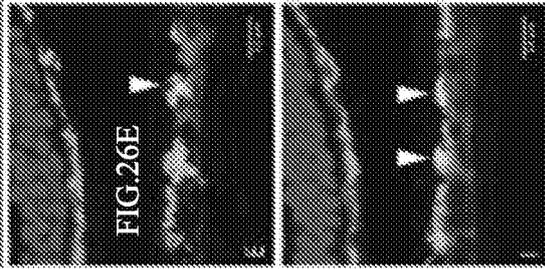


FIG.26G

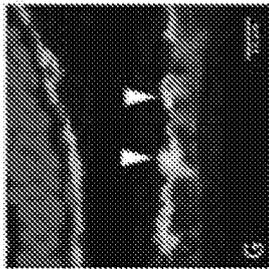


FIG. 26H

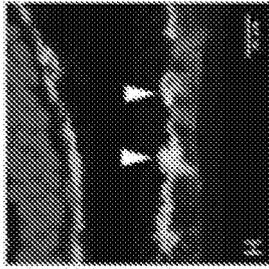


FIG. 26I

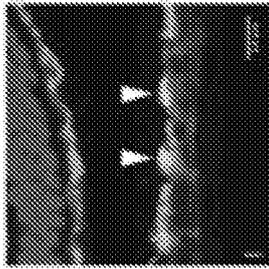


FIG.26J

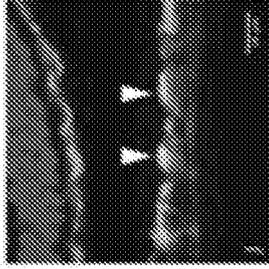


FIG. 27A

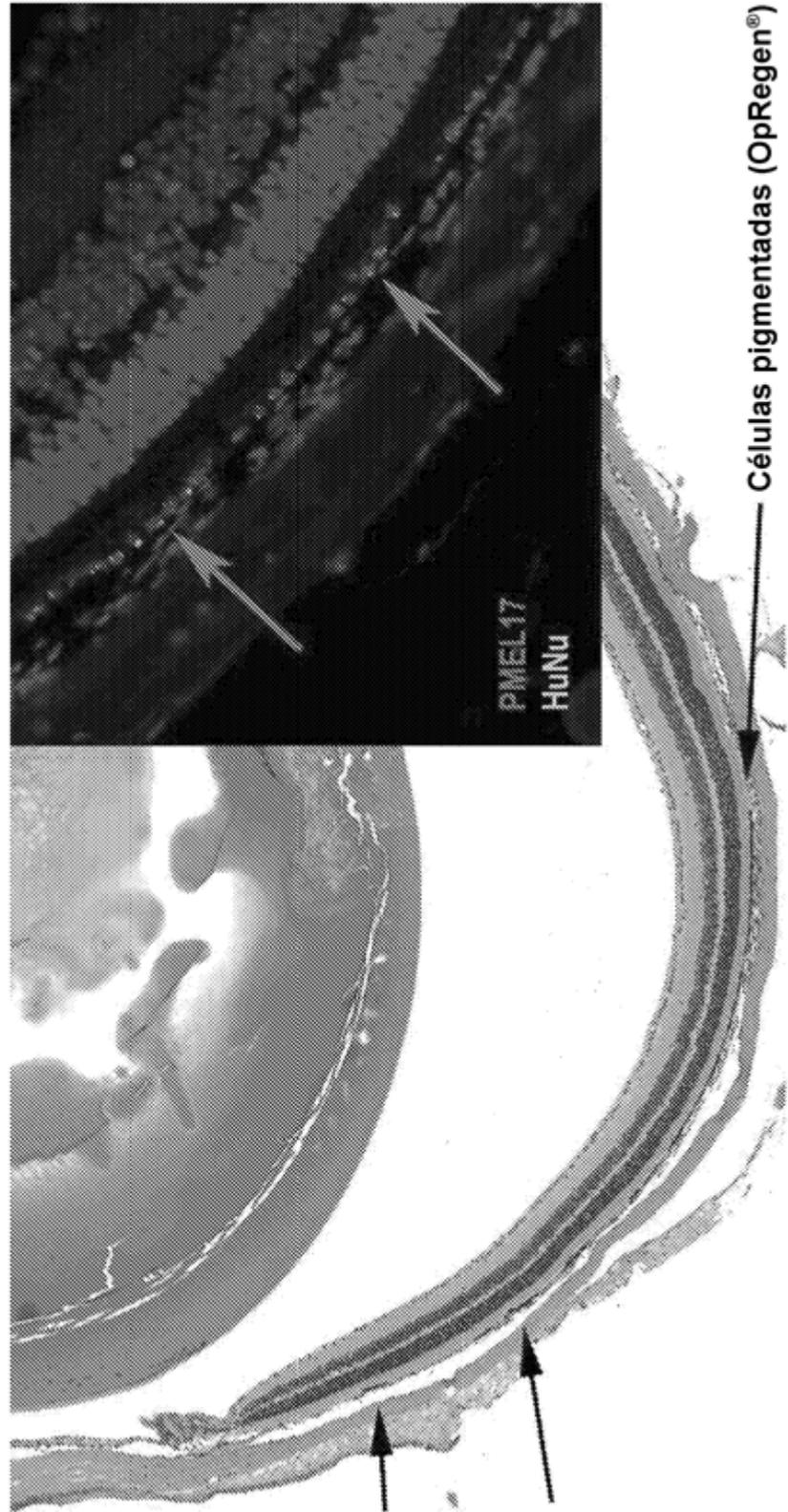


FIG. 27C

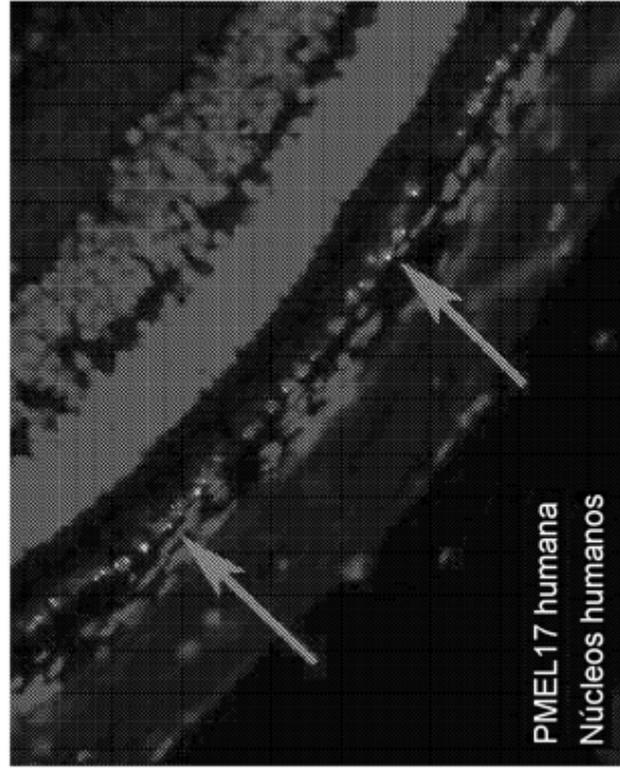


FIG. 27B

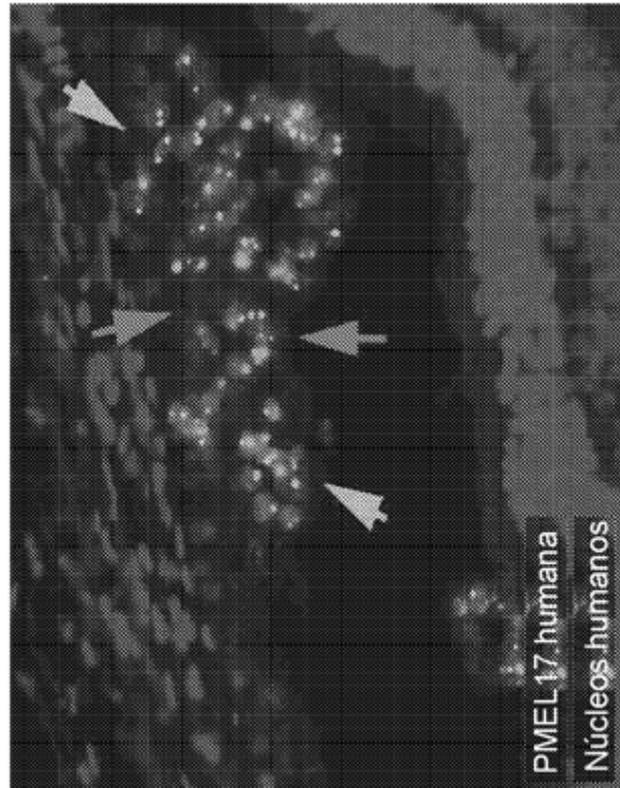
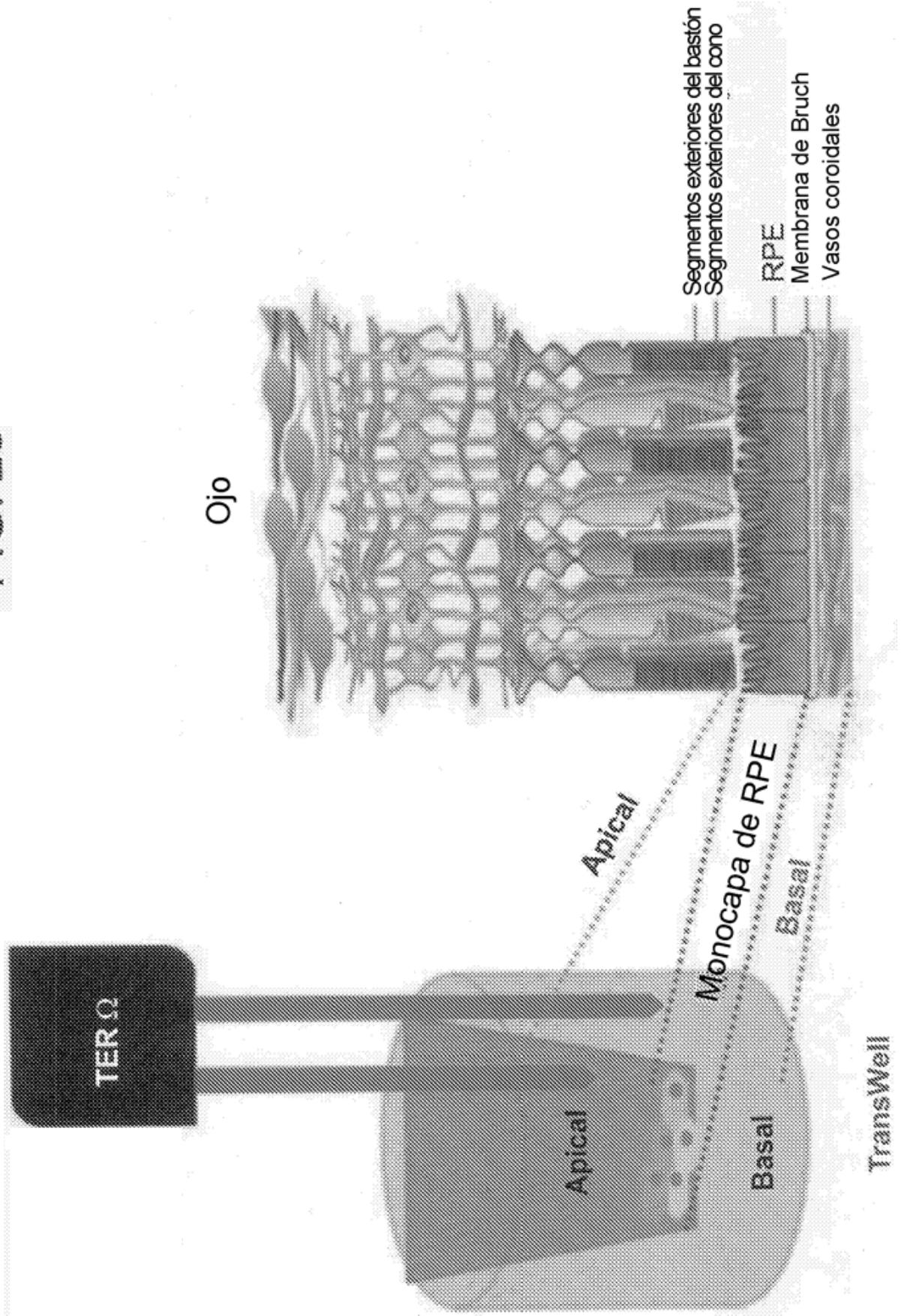
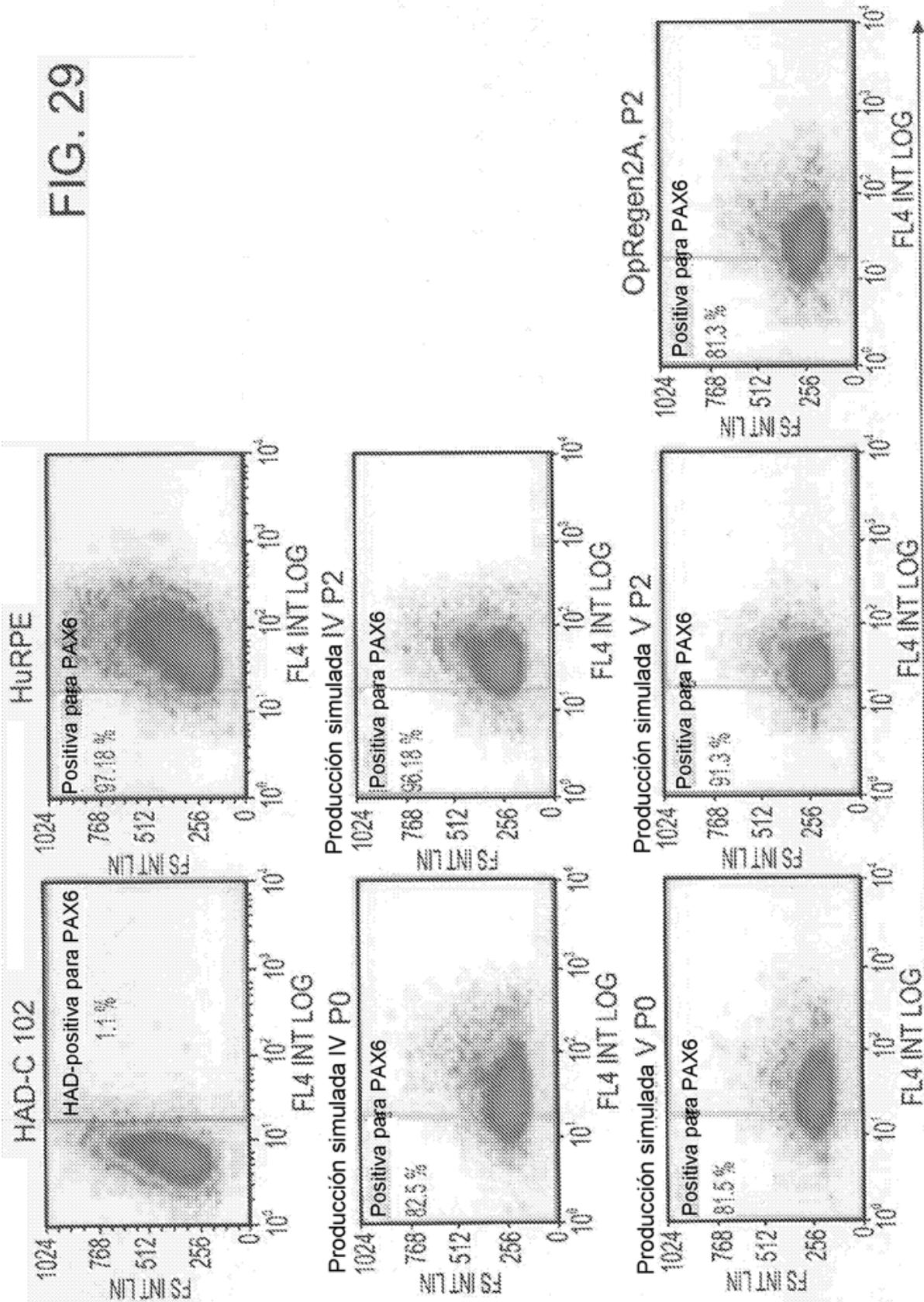


FIG. 28





PAX6 - Alexa647

FIG. 30

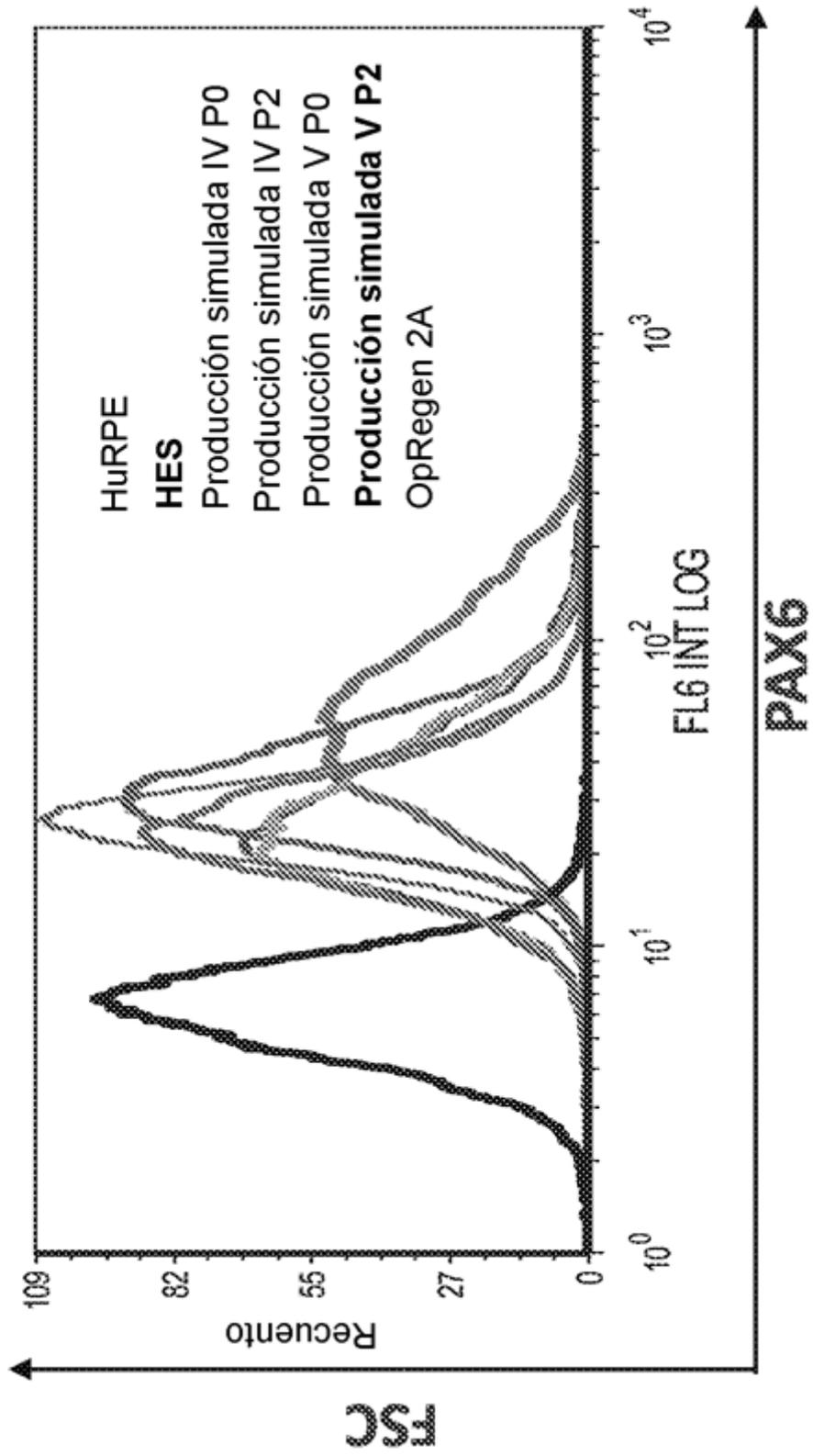


FIG. 31

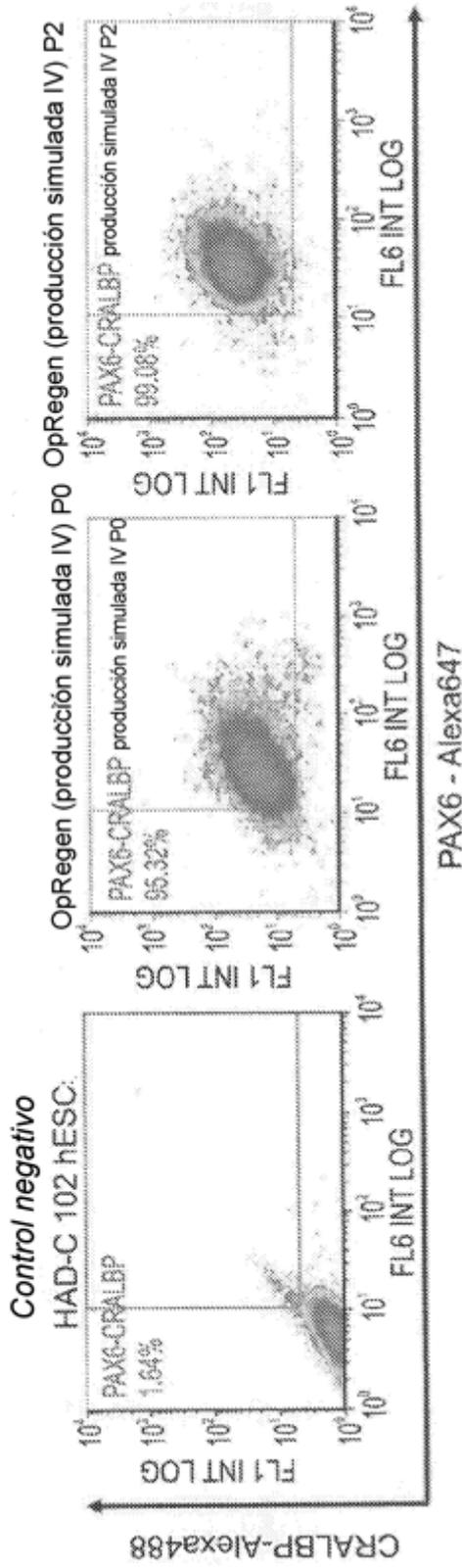


FIG. 32A

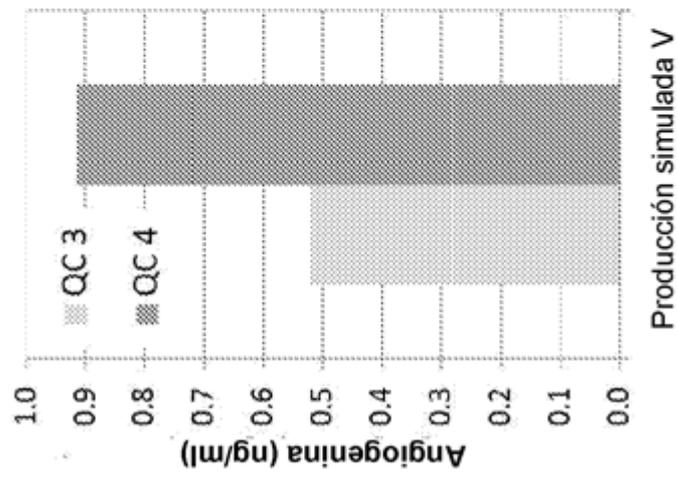


FIG. 32B

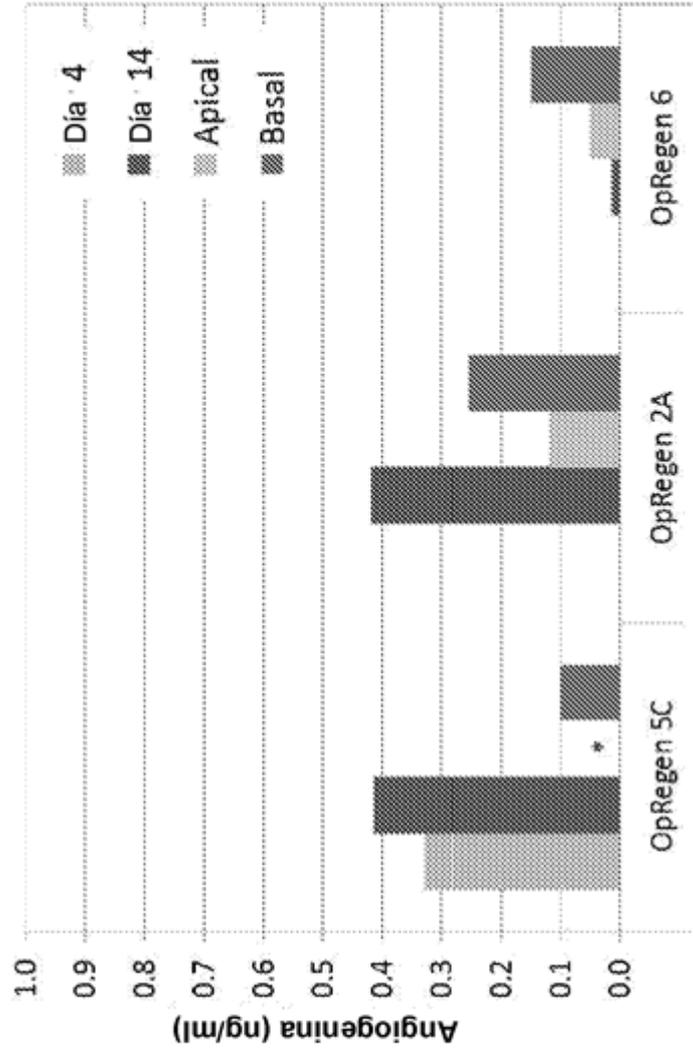


FIG. 32C

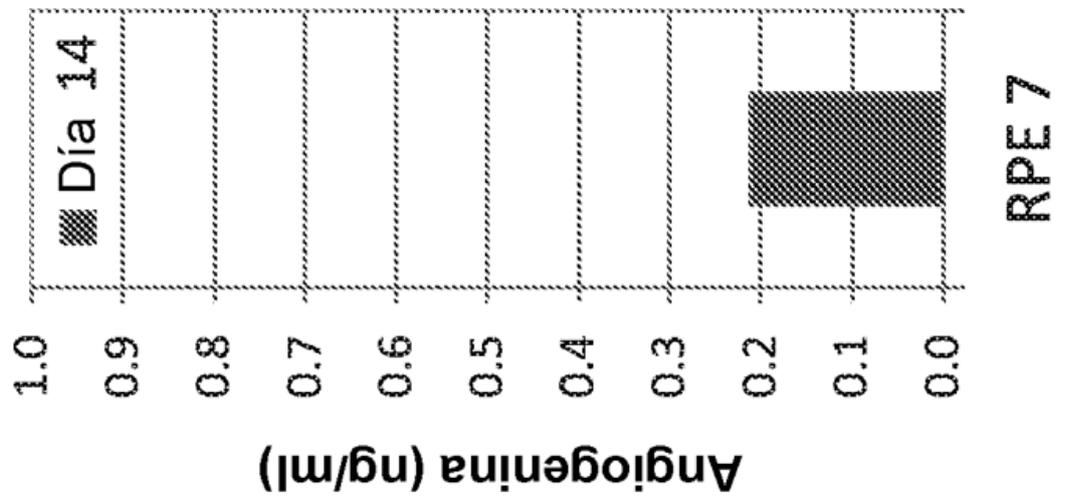


FIG. 33A

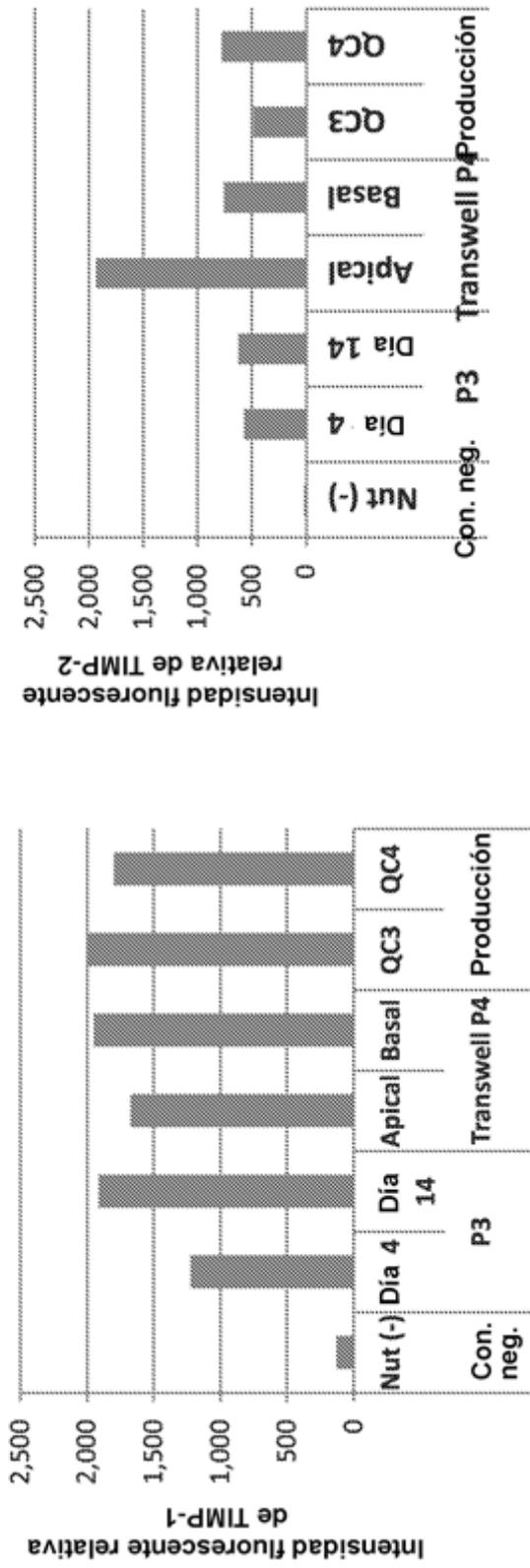


FIG. 33B

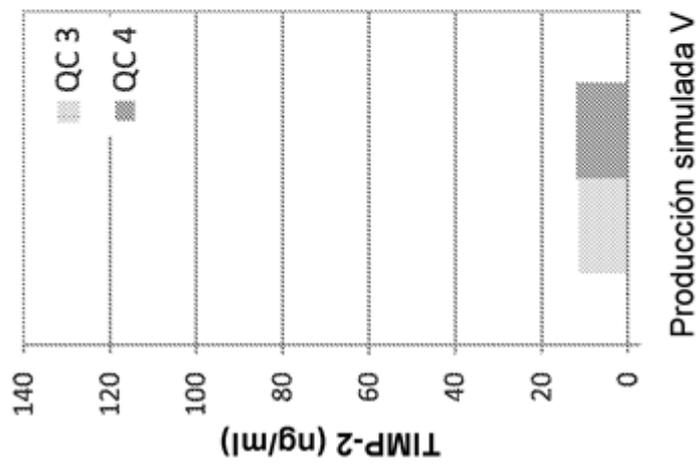


FIG. 33C

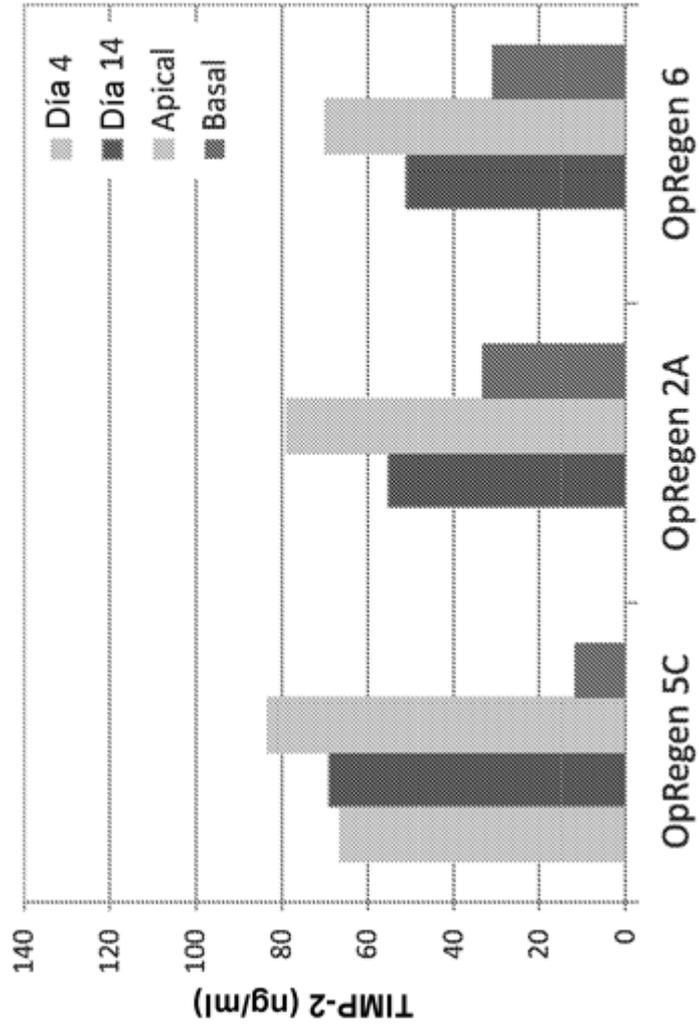


FIG. 33E

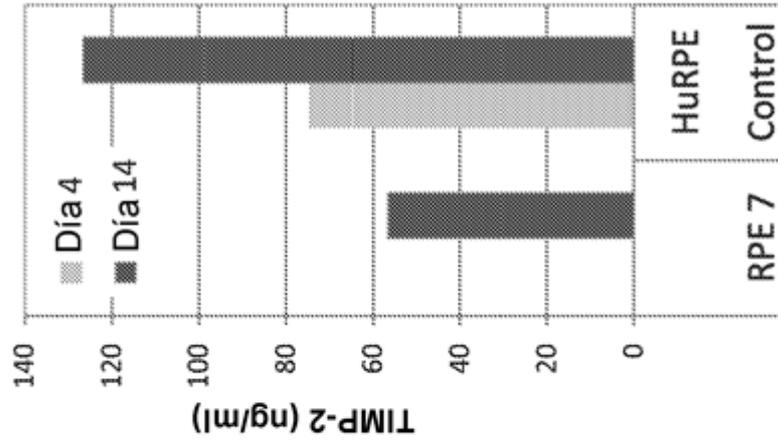


FIG. 33D

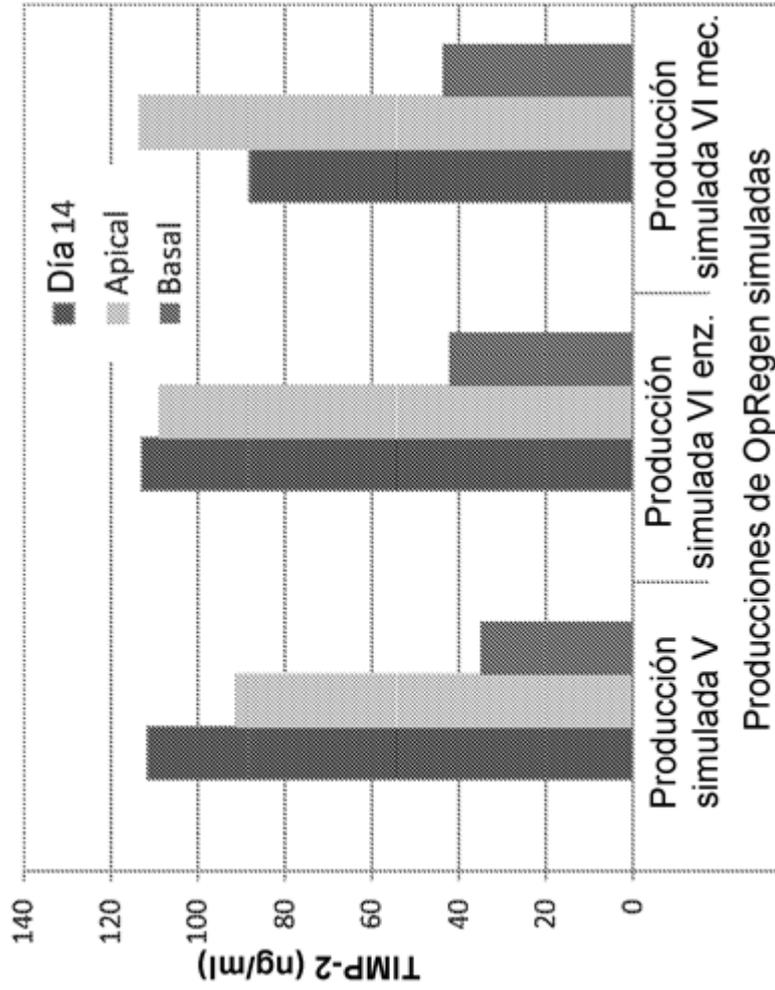


FIG. 34A

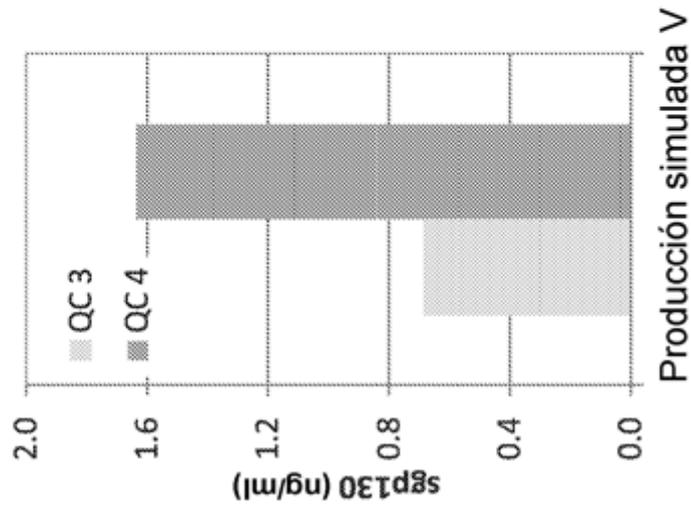


FIG. 34B

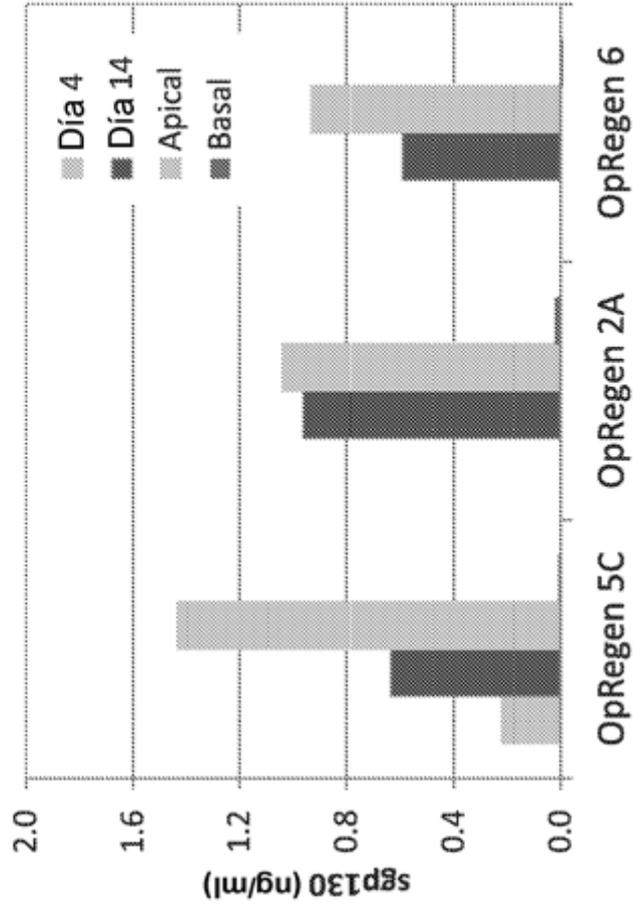


FIG. 34C

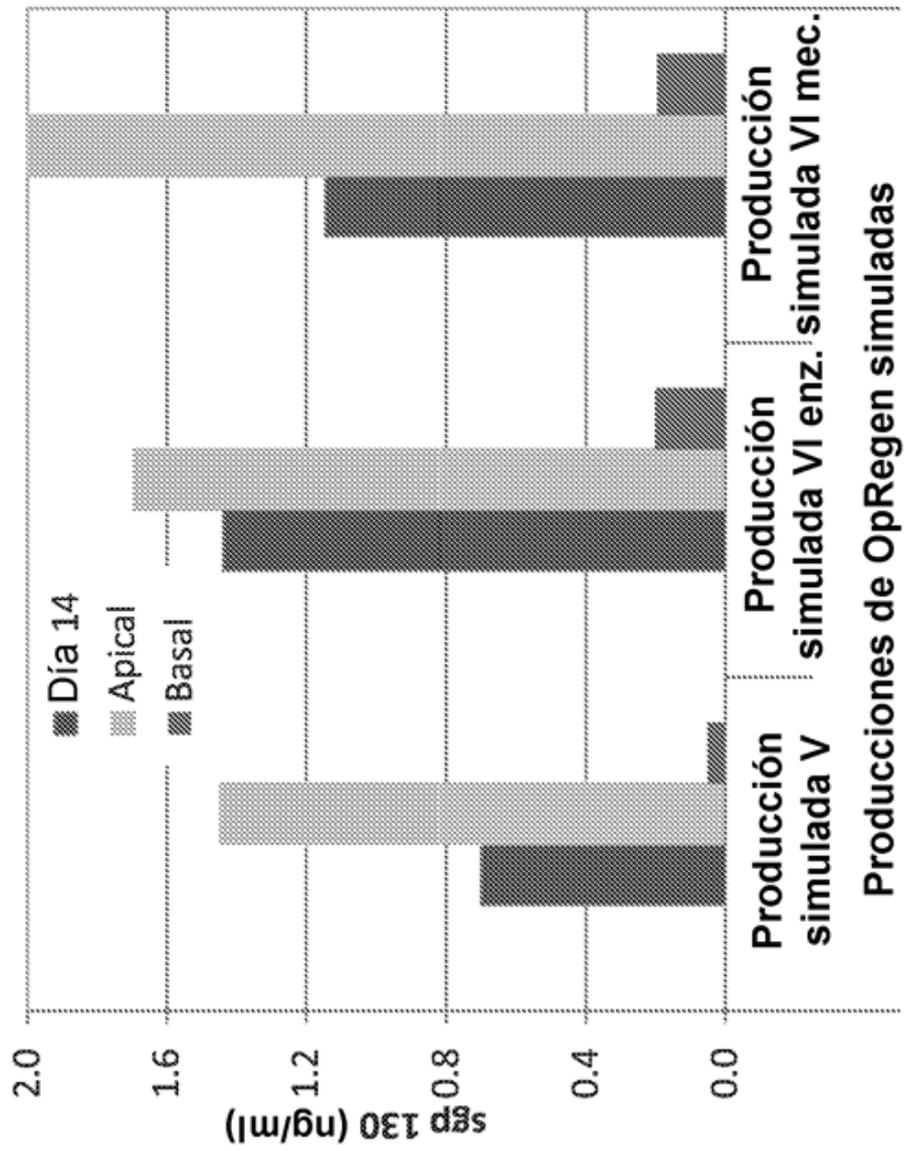


FIG. 34D

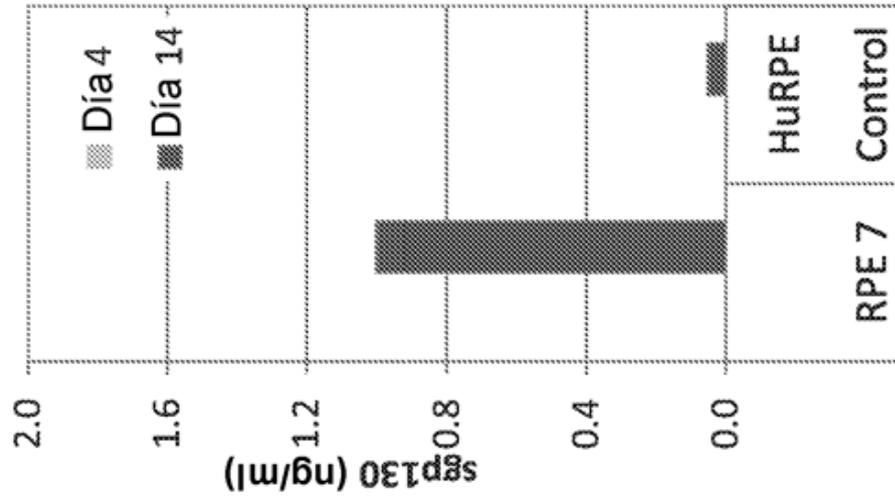


FIG. 35A

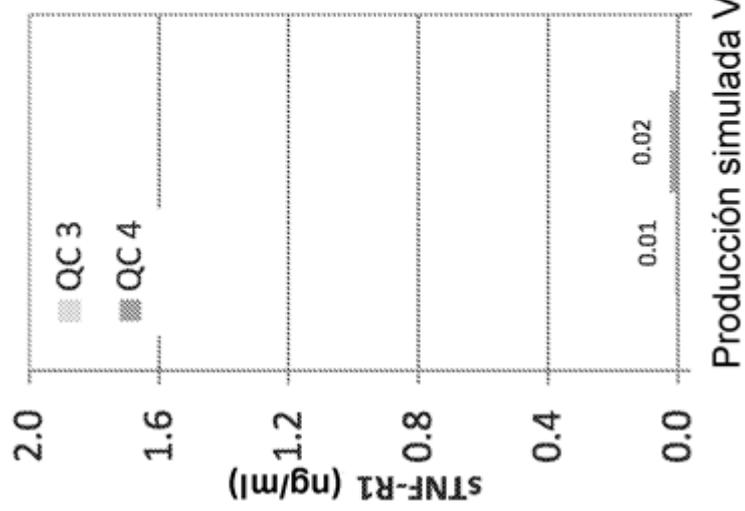


FIG. 35B

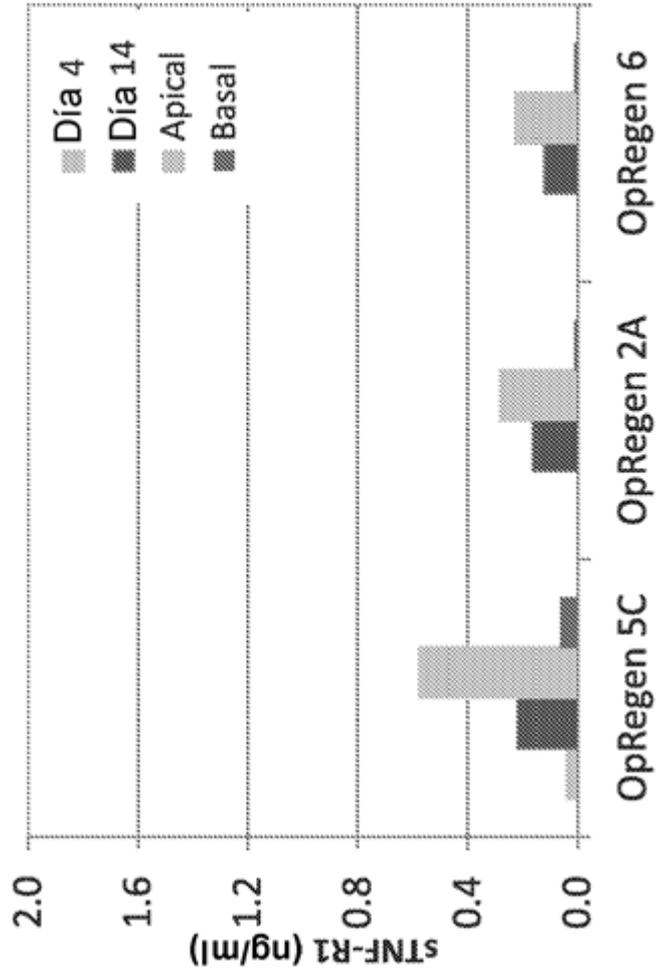


FIG. 35D

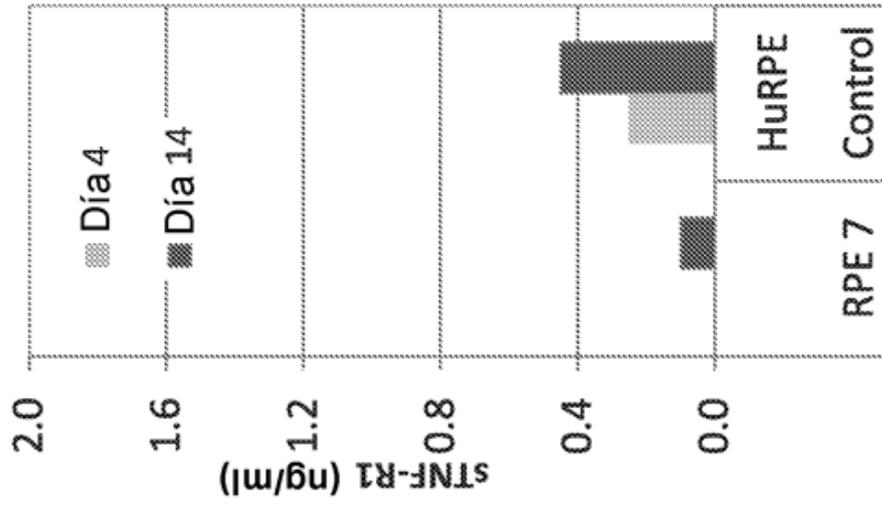


FIG. 35C

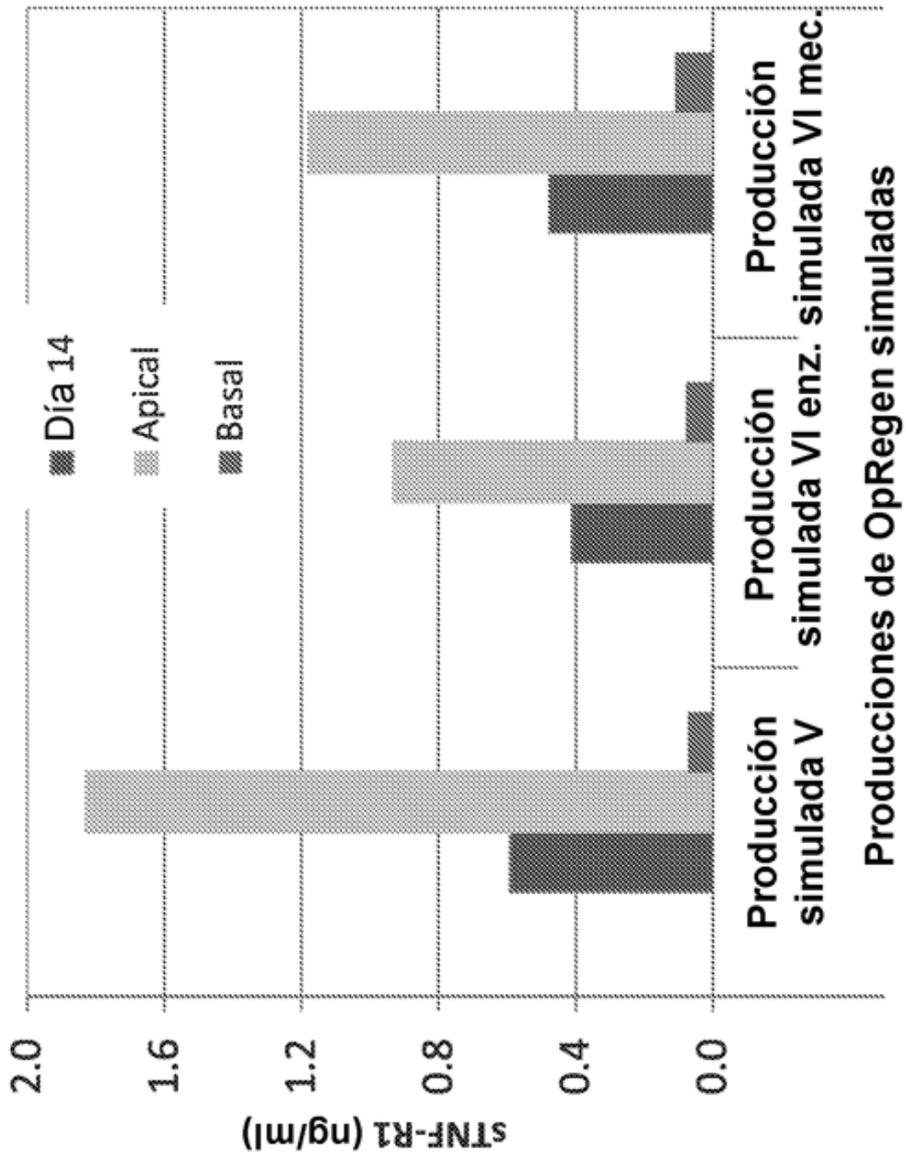
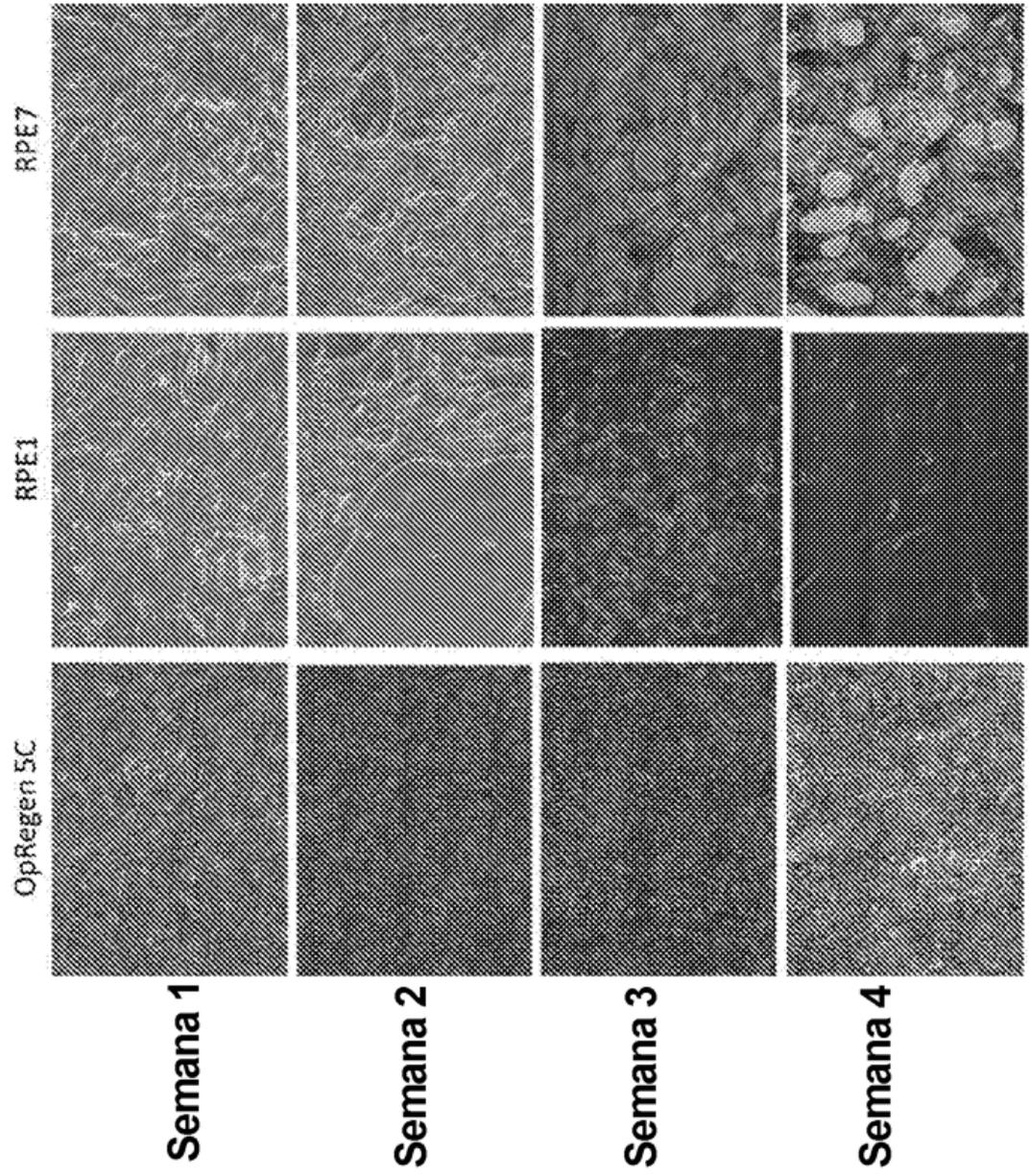
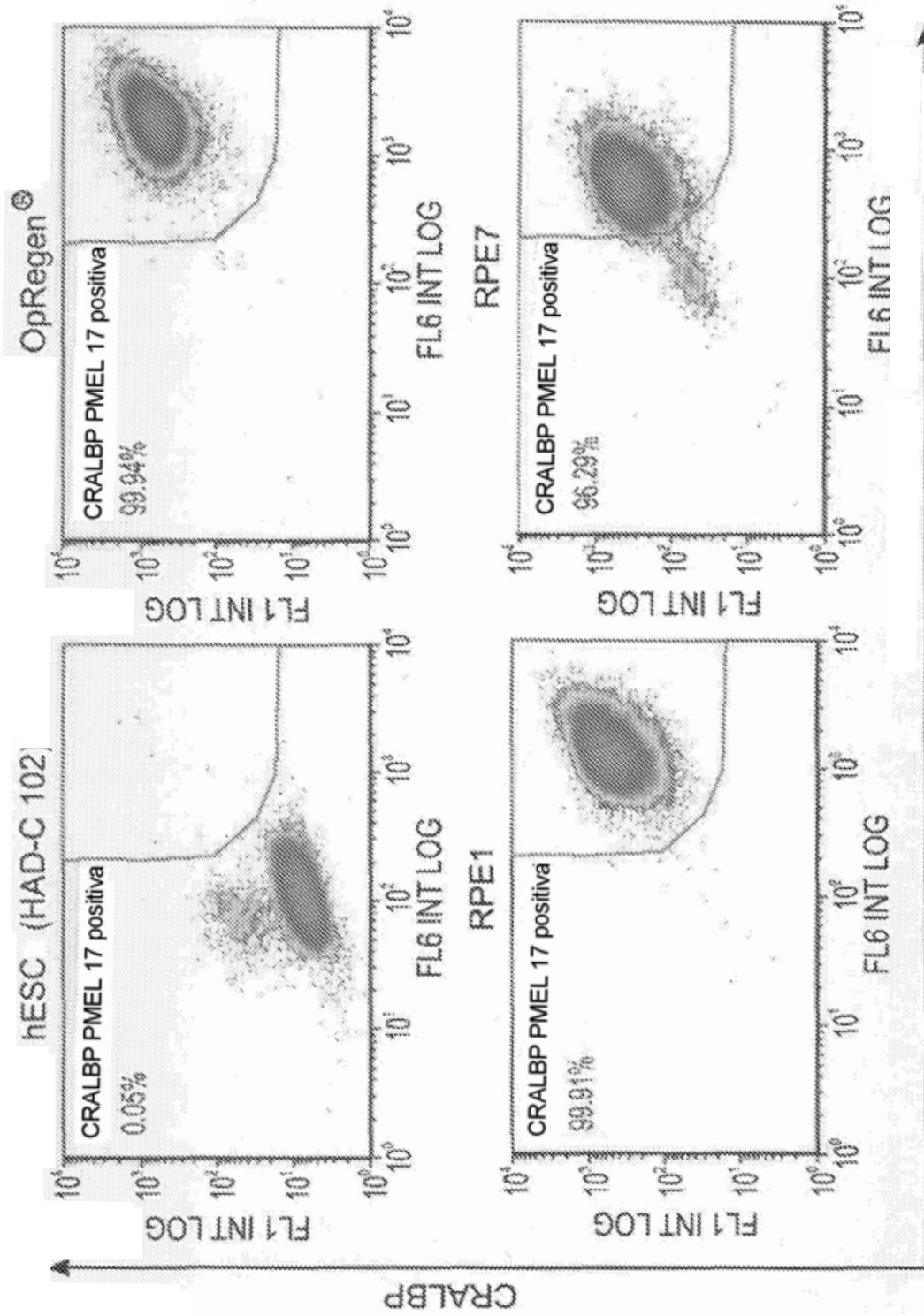


FIG. 36





PMEL-17

FIG. 37