

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 625**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2015 PCT/JP2015/075164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16035874**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2015 E 15838545 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3190181**

54 Título: **Marcador de células endoteliales corneales**

30 Prioridad:

05.09.2014 JP 2014180985

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.02.2021

73 Titular/es:

**OSAKA UNIVERSITY (100.0%)
1-1, Yamadaoka Suita-shi
Osaka 565-0871, JP**

72 Inventor/es:

**NISHIDA, KOHJI;
TSUJIKAWA, MOTOKAZU;
HARA, SUSUMU;
KAWASAKI, SATOSHI;
YOSHIHARA, MASAHITO;
ITO, MASAYOSHI;
KAWAJI, HIDEYA y
OHMIYA, HIROKO**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 807 625 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcador de células endoteliales corneales

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un marcador molecular expresado específicamente en células endoteliales corneales, a un método para producir las células endoteliales corneales que utiliza el marcador y a un método para evaluar las células endoteliales corneales que utiliza el marcador.

10 Antecedentes de la técnica

La córnea es la parte frontal transparente del globo ocular. Desde la cara anterior, la córnea presenta un epitelio corneal, la membrana de Bowman, el estroma corneal, la membrana de Descemet y un endotelio corneal. El epitelio corneal se encuentra presenta en la parte más externa de la córnea y actúa como una barrera que protege la córnea frente a cuerpos extraños, tales como polvo y bacterias. La membrana de Bowman se cree que funciona como una base para el epitelio corneal. El estroma corneal es la capa más gruesa de las tres capas (es decir, epitelio corneal, estroma corneal y endotelio corneal) y mantiene la robustez de la córnea. La membrana de Descemet está situada bajo el estroma corneal y lo conecta con el endotelio corneal. El endotelio corneal es una monocapa en la que las células endoteliales corneales hexagonales están dispuestas regularmente como adoquines. Desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la transparencia de la córnea al evitar, mediante sus funciones de barrera y de bombeo, que la humedad en la cámara anterior penetre en el estroma corneal, manteniendo simultáneamente el equilibrio de líquidos mediante el drenaje de la humedad en la córnea hacia afuera hacia la cámara anterior.

La pérdida de un número significativo de células endoteliales corneales debido a daños celulares causados por factores genéticos o externos perjudica a las funciones indicadas anteriormente, conduciendo a edema corneal. Una disfunción endotelial corneal severa compromete el mantenimiento de la transparencia de la córnea. En el caso de que se desarrolle queratopatía bullosa, puede resultar una pérdida visual marcada.

Las células endoteliales corneales presentan una capacidad muy limitada de proliferación en el cuerpo humano. El método fundamental más eficaz de tratar la disfunción endotelial corneal severa actualmente es el trasplante de córnea. De hecho, la queratopatía bullosa es la enfermedad por la que con más frecuencia ha debido llevarse a cabo un trasplante de córnea. Aunque los trasplantes de córnea de grosor completo se han llevado a cabo en el pasado por la disfunción endotelial corneal, existen problemas tales como una escasez crónica de donantes y el rechazo del trasplante. Para minimizar el rechazo, se ha desarrollado una técnica en la que se trasplanta únicamente un tejido parcial que contiene un endotelio corneal en un ojo con un trastorno (queratoplastia endotelial automatizada con pelado de la membrana de Descemet: DSAEK). Sin embargo, DSAEK tampoco puede superar la escasez de donantes. Asimismo se han realizado intentos por cultivar células endoteliales corneales *in vitro* y utilizar las células en un tratamiento (literatura no de patentes nº 1 y literatura de patentes nº 1 a nº 3). Sin embargo, los pases repetidos causan transformación genética, conduciendo a la pérdida de sus funciones (literatura no de patentes nº 2).

Para resolver los problemas indicados anteriormente, se han llevado a cabo varios estudios sobre la inducción de células endoteliales corneales a partir de células troncales mesenquimales derivadas de sangre del cordón umbilical (literatura no de patentes nº 3), células derivadas de médula ósea (literatura no de patentes nº 4), células troncales derivadas de iris (literatura no de patentes nº 5), células troncales derivadas de estroma corneal (literatura no de patentes nº 6), células troncales embrionarias (literatura no de patentes nº 7), células troncales pluripotentes inducidas (literatura de patentes nº 4), etc., para el propósito del trasplante. Sin embargo, con independencia del origen de las células, las células en cultivo obtenidas de esta manera contienen diferentes tipos de células además de las células endoteliales corneales. Por lo tanto, en dichos estudios resulta indispensable un marcador específico de las células endoteliales corneales utilizable para aislar y evaluar las células endoteliales corneales (es decir, su producto diana).

Actualmente, se utilizan proteínas, tales como ZO-1 (literatura no de patentes nº 8), ATPasa-Na⁺-K⁺ (literatura no de patentes nº 9) y N-cadherina (literatura no de patentes nº 10) como marcadores de células endoteliales corneales. Sin embargo, estas proteínas se expresan no específicamente en muchos otros tipos de células (literaturas no de patente nº 11 a nº 13). De esta manera, no se espera que el aislamiento de células endoteliales corneales utilizando dichas proteínas proporcione un resultado satisfactorio, en particular dado el potencial multilinaje de las células troncales utilizado para inducir la diferenciación en células endoteliales corneales.

Listado de referencias

Literatura de patentes

- 5 Referencia nº 1 de la literatura de patentes: WO2006/092894A1
Referencia nº 2 de la literatura de patentes: WO2011/096593A1
Referencia nº 3 de la literatura de patentes: WO2013/012087A1
Referencia nº 4 de la literatura de patentes: WO2013/051722A1

Literatura no de patentes

- 10 Literatura no de patentes nº 1: Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, et al. (2006) Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* 27: 607-614.
- 15 Literatura no de patentes nº 2: Joyce NC (2003) Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 22: 359-389. I
- 20 Literatura no de patentes nº 3: Joyce NC, Harris DL, Markov V, Zhang Z, Saitta B (2012) Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Mol Vis* 18: 547-564.
- 25 Literatura no de patentes nº 4: Shao C, Fu Y, Lu W, Fan X (2011) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction. *Cells Tissues Organs* 193: 253-263.
- 30 Literatura no de patentes nº 5: Kikuchi M, Hayashi R, Kanakubo S, Ogasawara A, Yamato M, et al. (2011) Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells* 16: 273-281.
- 35 Literatura no de patentes nº 6: Hatou S, Yoshida S, Higa K, Miyashita H, Inagaki E, et al. (2013) Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/ β -catenin signaling. *Stem Cells Dev* 22: 828-839.
- 40 Literatura no de patentes nº 7: Zhang, K, Pang, K, Wu, X. (2014) Isolation and transplantation of corneal endothelial cell-like cells derived from in-vitro-differentiated human embryonic stem cells. *Stem cells and development* 23: 1340-1354.
- 45 Literatura no de patentes nº 8: Barry PA, Petroll WM, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester JV. (1995) The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1115-1124.
- 50 Literatura no de patentes nº 9: Zam ZS, Cerda J, Polack FM. (1980) Isolation of the plasma membrane from corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 648-652.
- 55 Literatura no de patentes nº 10: Vassilev VS, Mandai M, Yonemura S, Takeichi M (2012) Loss of N-cadherin from the endothelium causes stromal edema and epithelial dysgenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 7183-7193.
- Literatura no de patentes nº 11: Howarth AG, Hughes MR, Stevenson BR (1992) Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol* 262: C461-469.
- Literatura no de patentes nº 12: Mobasheri A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, et al. (2000) Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep* 20: 51-91.
- Literatura no de patentes nº 13: Tsuchiya B, Sato Y, Kameya T, Okayasu I, Mukai K (2006) Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Arch Histol Cytol.* 69: 135-145.

Sumario de la invención

Problema técnico

- 60 A partir de la situación actual de la técnica, un objetivo de la presente invención es proporcionar un marcador molecular expresado específicamente en las células endoteliales corneales, y tecnologías aplicadas, tales como un método para producir células endoteliales corneales que utiliza el marcador y un método para evaluar las células endoteliales corneales que utiliza el marcador.

Solución al problema

En el contexto de la presente invención se llevaron a cabo amplias investigaciones para conseguir el objetivo. En el contexto de la presente invención se seleccionaron, a partir de una base de datos que dispone de una cobertura exhaustiva de los genes expresados en las células endoteliales corneales, genes que se expresaban a un nivel elevado en las células endoteliales corneales, que codificaban proteínas de la membrana celular y que mostraban un nivel de expresión bajo en otros tejidos. En el contexto de la presente invención se examinó la expresión de los genes en las células endoteliales corneales y en otros tejidos a fin de encontrar genes que se expresasen específicamente en las células endoteliales corneales. Además, se inmunotifieron secciones de córnea humana para detectar proteínas codificadas por dichos genes y confirmaron su expresión específica en el endotelio corneal. La invención representada por la materia siguiente se proporciona a partir de estos resultados.

Punto 1.

Un método para producir una o más células endoteliales corneales, en el que el método comprende la etapa de clasificar ("sorting"), a partir de una población celular que comprende una o más células endoteliales corneales, una o más células en las que se expresa por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1.

Punto 2.

El método según el punto 1, en el que la población celular que comprende una o más células endoteliales corneales se obtiene mediante inducción de la diferenciación de células troncales.

Punto 3.

El método según el punto 1, en el que la población celular que comprende una o más células endoteliales corneales se obtiene mediante cultivo de células endoteliales corneales.

Punto 4.

El método según cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que la etapa de clasificación comprende la unión de uno o más anticuerpos que reconocen específicamente por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1 a la población celular que comprende una o más células endoteliales corneales.

Punto 5.

Un método para evaluar una o más células endoteliales corneales utilizando la expresión de por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1 como indicación.

Punto 6.

Utilización de un marcador para detectar una o más células endoteliales corneales, en la que el marcador comprende por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1.

Punto 7.

Utilización de un kit para detectar una o más células endoteliales corneales, en la que el kit comprende una o más sustancias que reconocen específicamente por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1.

Efectos ventajosos de la invención

Se proporciona un marcador molecular que se expresa específicamente en las células endoteliales corneales, y este marcador puede detectar específicamente las células endoteliales corneales. El producto de expresión del marcador molecular es una proteína de superficie celular. De esta manera, se identifican y/o clasifican células en un estado viable. Específicamente, el marcador puede proporcionar eficientemente células endoteliales corneales en un estado viable. Debido a que las células endoteliales corneales obtenidas utilizando dicho marcador resultan adecuadas para el trasplante, la utilización del marcador no sólo permite el tratamiento de enfermedades que requieren el trasplante de células endoteliales corneales, sino que además alivia la escasez de donantes en el trasplante de córnea. El marcador molecular asimismo es utilizable para evaluar con precisión las células endoteliales corneales en cultivo para su idoneidad para el trasplante. Por lo tanto, la presente invención resulta

útil en el tratamiento de diversas enfermedades causadas por un trastorno funcional de las células endoteliales corneales.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa los resultados de la medición de los niveles de expresión de genes codificantes de 13 moléculas candidatas en células endoteliales corneales y en otros 22 tejidos diferentes. En cada gráfico, se utilizan las abreviaturas siguientes: CEC: células endoteliales corneales, cerebro-A: cerebro adulto, cerebro-F: cerebro fetal, SC: médula espinal, SG: glándula salival, BM: médula ósea, SM: músculo esquelético, hígado-A: hígado adulto, hígado-F: hígado fetal, SI: intestino delgado. El eje vertical de cada gráfico indica el nivel de expresión génica respecto al nivel de expresión de un control.

La figura 2 representa los resultados de la medición de los niveles de expresión de genes codificantes de las moléculas candidatas en tejidos oculares. La medición se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa. En cada gráfico, se utilizan las abreviaturas siguientes: CEC: células endoteliales corneales, CC: células endoteliales corneales en cultivo, estroma C.: estroma corneal, epi. C.: epitelio corneal, limbo: limbo corneal, epi. pig. iris: células epiteliales pigmentarias del iris, TM: red trabecular, CB: cuerpo ciliar, RPE/coroide: epitelio pigmentario retiniano/coroide y ON: nervio óptico. El eje vertical de cada gráfico indica el nivel de expresión génica respecto al nivel de expresión de un control.

La figura 3 representa los resultados de la inmunotinción de secciones corneales humanas para detectar 6 proteínas (GRIP1, CLRN1, MRGPRX3, ZP4, GLP1R y HTR1D).

La figura 4 representa los niveles de expresión de ZP4 antes y después de la inducción de células iPS humanas en células endoteliales corneales.

Descripción de formas de realización

1. Método para producir células endoteliales corneales.

1-1. Población celular que contiene células endoteliales corneales.

Una "población celular que contiene una o más células endoteliales corneales", que es un material de partida para producir una o más células endoteliales corneales, es un ensamblaje de células que incluye una o más células endoteliales corneales. No hay limitación del origen y constituyentes de la población celular, con la condición de que la población contenga una o más células endoteliales corneales. Por ejemplo, la población celular que contiene una o más células endoteliales corneales comprende una población celular obtenida mediante diferenciación artificial de una o más células troncales y una población celular obtenida mediante el cultivo de células endoteliales corneales aisladas a partir de una córnea. Aunque, en la mayoría de casos, la población celular que contiene una o más células endoteliales corneales contiene células diferentes de las células endoteliales corneales, la población puede contener únicamente una o más células endoteliales corneales. El origen de la población celular que contiene una o más células endoteliales corneales no se encuentra particularmente limitado, aunque es preferentemente humano.

Por ejemplo, el porcentaje de células endoteliales corneales presente en la población celular que contiene una o más células endoteliales corneales es de 1% o superior, de 5% o superior, de 10% o superior, de 20% o superior, de 30% o superior, de 40% o superior, de 50% o superior, de 60% o superior, de 70% o superior o de 80% o superior, respecto al número total de células.

Las células troncales para la utilización en la preparación de la población celular que contiene una o más células endoteliales corneales no se encuentran particularmente limitadas, con la condición de que las células troncales puedan cultivarse *in vitro* y puedan diferenciarse en células endoteliales corneales. Las células troncales para la utilización pueden seleccionarse convenientemente de entre cualesquiera células troncales conocidas y posteriormente desarrolladas en la técnica. Entre los ejemplos de dichas células troncales se incluyen células troncales pluripotentes artificiales (células troncales pluripotentes inducidas: células iPS), células troncales embrionarias (células ES), células troncales pluripotentes derivadas de células germinales primordiales fetales (células EG), células troncales pluripotentes derivadas de testículo (células GS) y células troncales somáticas humanas capaces de diferenciarse en células endoteliales corneales (células troncales tisulares).

Las células iPS pueden obtenerse mediante cualquier técnica disponible, por ejemplo mediante la introducción de factores de reprogramación específicos de forma ADN o forma proteína en células somáticas. Entre los ejemplos de factores de reprogramación se incluyen Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tcl1, beta-catenina, Lin28b, Sall1, Sall4, Esrrb, Nr5a2, Tbx3 y Glis1. Estos factores de reprogramación pueden utilizarse individualmente o en cualquier combinación. Se dan a conocer ejemplos de combinaciones de factores de reprogramación en, por ejemplo, los documentos nº WO2007/069666, nº WO2008/118820, nº WO2009/007852, nº WO2009/032194, nº WO2009/058413 y

nº WO2009/057831. El tipo de las células somáticas no se encuentra particularmente limitado, y entre las células somáticas para la utilización se incluyen cualesquiera células que se ha confirmado que producen células iPS y cualesquiera células que posteriormente se haya informado de que producen células iPS. En una forma de realización, entre los ejemplos de células somáticas preferidas se incluyen fibroblastos y glóbulos blancos. Las células somáticas preferentemente derivan de seres humanos.

Las células ES se obtienen mediante cualquier técnica disponible. Por ejemplo, las células ES pueden establecerse extrayendo la masa celular interna del blastocisto de un huevo fertilizado de un mamífero, en el que el mamífero no es un ser humano y cultivar la masa celular interna sobre una capa de células nodriza de fibroblastos. El mamífero no se encuentra particularmente limitado, aunque no es un ser humano. Las células ES en subcultivo pueden mantenerse utilizando una solución de cultivo que contiene sustancias, tales como el factor inhibidor de leucemia (FIL) y/o un factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Las células ES pueden seleccionarse, por ejemplo, utilizando la expresión de genes marcadores, tales como OCT-3/4, NANOg y ECAD como una indicación.

Las células EG son células pluripotentes, al igual que las células ES, y se establecen a partir de células germinales primordiales en el estadio fetal. Las células EG se establecen mediante cultivo de las células germinales primordiales en presencia de sustancias, tales como FIL, bFGF y factores de células troncales (Y. Matsui et al., Cell 70: 841-847, 1992; J.L. Resnick et al. Nature, 359: 550-551, 1992).

Las células de GS son células troncales pluripotentes derivadas de testículo y son el origen de la formación del esperma. Estas células pueden inducirse para diferenciarse en una diversidad de linajes celulares, tales como las células ES. Las células de GS pueden autorrenovarse en una solución de cultivo que contiene un factor neurotrófico derivado de líneas gliales (GDNF). El subcultivo repetido bajo las mismas condiciones que para las células ES produce células troncales espermáticas (M. Kanatsu-Shinohara et al. Biol. Reprod., 69: 612-616, 2003).

Entre los ejemplos de células troncales somáticas que pueden diferenciarse en células endoteliales corneales se incluyen las células troncales de la cresta neural derivadas del estroma corneal (COP), las células troncales mesenquimales y las células precursoras pluripotentes derivadas de la piel (precursores derivados de la piel: SKP), siendo preferentes los COP y los SKP. Los COP pueden prepararse, por ejemplo, retirando el epitelio y el endotelio de una córnea, tratando el estroma corneal con una collagenasa y cultivando las células separadas en un medio DMEM/F12 que contiene complementos EGF, FGF2, B27 y FIL. Los SKP pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento indicado en Nat. Cell Biol., vol. 3, 778-784, 2001.

En una forma de realización, las células troncales preferidas son las células iPS. En otra forma de realización, las células troncales preferidas son las células troncales de la cresta neural y más preferentemente las células troncales son células de la cresta neural derivadas de células iPS y células troncales de la cresta neural derivadas del estroma corneal. Las células troncales de la cresta neural, que son células troncales pluripotentes que presentan un potencial de autorrenovación y potencial multilíneaje, es conocido que migran hacia el exterior desde la parte posterior del tubo neural por el cuerpo durante el desarrollo de las vértebras y contribuyen a la formación de diversos tejidos. Las células iPS pueden inducirse para formar células troncales de la cresta neural mediante un método conocido en la técnica o un método de acuerdo con el mismo (por ejemplo, el método indicado en Nature Protocols, vol. 5, nº 4, 688-701, 2010). La utilización de células troncales de la cresta neural permite una inducción eficiente de la diferenciación en células endoteliales corneales.

El método para inducir la diferenciación de las células troncales indicado anteriormente en células endoteliales corneales no se encuentra particularmente limitado y puede utilizarse cualquier método conocido o desarrollado posteriormente en la técnica. Por ejemplo, la inducción de la diferenciación puede llevarse a cabo mediante el método dado a conocer en la literatura de patentes nº 4. Específicamente, las células troncales pueden diferenciarse en células endoteliales corneales mediante el cultivo de las células troncales en un medio que resulte adecuado para cultivar células troncales (por ejemplo, medio MEM) y que contenga por lo menos un factor inductor de diferenciación seleccionado de entre el grupo que consiste en un inhibidor de GSK3, ácido retinoico, TGFb2, insulina y un inhibidor de ROCK a 30°C a 40°C en 1% a 10% de CO₂ durante un periodo de tiempo entre aproximadamente varios días y un mes y medio. El factor o los factores inductores de diferenciación preferentemente contienen un inhibidor de GSK3 y ácido retinoico, más preferentemente un inhibidor de GSK3, ácido retinoico y un inhibidor de ROCK, y todavía más preferentemente un inhibidor de GSK3, ácido retinoico, un inhibidor de ROCK e insulina.

De la manera mencionada anteriormente, puede obtenerse una población celular que contiene una o más células endoteliales corneales a partir de células troncales. La población celular obtenida que contiene una o más células endoteliales corneales puede clasificarse inmediatamente para obtener células endoteliales corneales, o puede clasificarse tras llevar a cabo subcultivos repetidos durante un periodo predeterminado a fin de obtener células endoteliales corneales.

No existe ninguna limitación particular de los medios para obtener una población celular que contiene una o más células endoteliales corneales mediante el cultivo de células endoteliales corneales aisladas a partir de una córnea y cualquier método conocido o desarrollado posteriormente en la técnica puede seleccionarse convenientemente

para la utilización. Por ejemplo, puede obtenerse una población celular que contiene una o más células endoteliales corneales de acuerdo con el método dado a conocer en el documento nº WO2014/104366. Específicamente, se retira la membrana de Descemet de un tejido corneoescleral humano con células endoteliales corneales humanas unidas a la membrana de Descemet, y se tritura, seguido del cultivo en un medio que contiene aproximadamente 0.2% de colagenasa en 5% de CO₂ a 37°C durante 1 a 3 horas. Un medio utilizable es un medio DME que contiene suero de feto bovino al 15% (FCS) y 2 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). A continuación, se separan los fibroblastos mediante lavado por centrifugación, seguido de digestión trípica, obteniendo de esta manera una población celular que contiene células endoteliales corneales en forma de pellet (células de cultivo primario).

La población celular obtenida de esta manera que contiene una o más células endoteliales corneales puede cultivarse adicionalmente en un medio basal utilizado típicamente para el cultivo de células animales, tal como D-MEM y MEM. La concentración de glucosa añadida al medio es preferentemente de 2.0 g/l o inferior, y más preferentemente de 0.1 a 1.0 g/l. Asimismo resulta preferido añadir al medio un factor de crecimiento, tal como un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), EGF recombinante (rEGF) y/o factor de crecimiento fibroblástico (FGF). De estos factores, puede añadirse al medio un único factor o una combinación de dos o más factores. La concentración del factor o factores de crecimiento en el medio es típicamente de 1 a 100 ng/ml, y preferentemente de 2 a 5 ng/ml. Desde el punto de vista del cultivo eficiente de las células endoteliales corneales, resulta preferido añadir un derivado de ácido ascórbico 5 a 1,000 µg/ml, tal como 2-fosfato de ácido ascórbico, al medio.

El cultivo de las células endoteliales corneales puede llevarse a cabo mediante cultivo adherente utilizando un recipiente de cultivo (por ejemplo, una placa, una placa Petri, una placa de cultivo de tejidos, una multiplaca, una microplaca, una placa de micropocillos, una multiplaca, una placa de multipocillos, un portaobjetos con cámara, un Schale, un tubo, una bandeja y una bolsa de cultivo celular) recubierta con una matriz, tal como matrigel o colágeno. La temperatura de cultivo es típicamente de 35°C a 38°C, y preferentemente de 37°C. La humedad es típicamente de 90% a 100% y preferentemente es una humedad de 100%. La concentración de CO₂ es típicamente de 5% a 15%, y preferentemente de 10%. De esta manera, resulta preferido cultivar las células en un incubador capaz de mantener las condiciones. El periodo de tiempo para el cultivo no se encuentra particularmente limitado y, por ejemplo, las células pueden cultivarse hasta el estadio en que las células resultan confluyentes (estado estable) (por ejemplo, 1 a 5 días).

Las células pueden opcionalmente subcultivarse adicionalmente, tras resultar confluyentes. Por ejemplo, las células confluyentes se lavan con PBS y después se dispersan utilizando tripsina/EDTA, seguido de centrifugación. A continuación, las células se siembran en un recipiente de cultivo que contiene el mismo medio que el indicado anteriormente a una densidad celular de 500 a 60,000 células/cm² y se cultivan bajo las condiciones indicadas anteriormente. Adicionalmente, las células pueden subcultivarse repetidamente de manera adicional de la misma manera después de resultar confluyentes. Este procedimiento proporciona una población celular que contiene células endoteliales corneales que son células de subcultivo.

1-2. Clasificación de células endoteliales corneales mediante la utilización de un marcador molecular como indicación.

En una célula endotelial corneal, se expresan específicamente los siguientes factores: ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D, CLRN1, SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF, CNTN3, PPIP5K1 y/o PCDHB7. De esta manera, resulta posible producir una o más células endoteliales corneales mediante la clasificación de una o más células endoteliales corneales a partir de una población celular que contiene células endoteliales corneales utilizando la expresión de por lo menos una molécula seleccionada de dichas moléculas a modo de indicación. En la presente memoria, ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D, CLRN1, SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF, CNTN3, PPIP5K1 y PCDHB7 asimismo se denominan marcadores moleculares.

ZP4 es un gen que codifica una de las glucoproteínas que forman la zona pelúcida, que es una matriz extracelular que circunda el oocito (Hartmann JF, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2767-2769, 1972). Aunque la mayor parte de la proteína reside fuera de la célula, su extremo carboxilo-terminal es un dominio transmembranal celular (Gupta S.K. et al., Cell Tissue Res. 349: 665-678, 2012).

MRGPRX3 es un gen que codifica uno de los receptores acoplados a proteína G relacionados con Mas y se cree que participa en la modulación del dolor en las neuronas sensoriales (Lembo PM, et al. Nat. Neurosci. 5: 201-209, 2002).

GRIP1 es un gen que codifica una proteína que se une al extremo carboxilo-terminal del dominio intracelular de un receptor de ácido glutámico AMPA (propionato de α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol) y se informa de que se expresa en las sinapsis y en el cerebro (Dong H, et al., J. Neurosci. 19: 6930-6941, 1999).

GLP1R es un gen que codifica un receptor del péptido 1 de tipo glucagón, que es una de las incretinas que estimula la secreción de insulina por parte de las células β en el páncreas (Orskov C, Diabetologia, 35: 701-711, 1992). Se

informa de que GLP1R se expresa en el páncreas (Tornerhave D. et al., J. Histochem. Cytochem. 56: 841-851, 2008).

HTR1D es un gen que codifica uno de los receptores de serotonina y se expresa en fibras nerviosas del tejido craneofacial. Se cree que HTR1D participa en el desarrollo de la migraña (Harriott AM, et al., Cephalalgia 28: 933-944, 2008).

Se informa de que CLRN1 es uno de los genes causantes del síndrome de Usher de tipo IIIa, que causa trastornos del oído interno y retinitis pigmentosa (Kremer H, et al., Hum. Mol. Genet. 15 Spec nº 2:262-270, 2006). CLRN1 se expresa en las células pilosas en el oído interno y en células gliales en la retina, presuntamente desempeñando un papel crucial en el desarrollo y diferenciación de las células pilosas en el oído interno (Geller SF et al., PLoS Genet. 5: e1000607, 2009). Sin embargo, sigue sin conocerse su función exacta.

SCNN1D es un gen que codifica la subunidad δ del canal epitelial de Na (ENaC) y se informa de que se expresa en órganos, tales como cerebro, corazón, órgano respiratorio y riñón (Ji HL et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 303: 1013-1026, 2012).

PKD1 es un gen que codifica la policistina-1 y se informa de que es uno de los genes causantes del riñón poliquístico autosómico dominante (Gabow PA, N. Engl. J. Med. 329: 332-342, 1993). PKD1 se expresa a nivel elevado en el riñón. Se sugiere que la policistina-1 participa en la diferenciación de las células epiteliales tubulares del riñón (Boletta A. et al., Trends Cell Biol. 13: 484-492, 2003).

CNTN6 es un gen que codifica la contactina-6. La contactina-6, que es un elemento de la superfamilia de las inmunoglobulinas, funciona como una molécula de adhesión celular. Se sugiere que la contactina-6 participa en la formación de conexiones sinápticas durante el desarrollo del sistema nervioso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27255>).

NSF es un gen que codifica un factor sensible a la N-etilmaleimida. Esta proteína forma un conjugado junto con SNAP (proteína soluble de unión a NSF) y SNARE (receptor de SNAP), estimulando la fusión de la vesícula sináptica con la membrana celular (Sollner T. et al., Nature. 362: 318-324, 1993).

CNTN3 es un gen que codifica la contactina-3. Su estructura, al igual que la de la contactina-6, sugiere su participación en la adhesión celular. Se informa de que CNTN3 se expresa en el lóbulo frontal, lóbulo occipital, cerebelo, etc. (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9P232>).

PPIP5K1 es un gen que codifica una inositol cinasa y se cree que desempeña un papel crucial en la transducción de señales intracelulares (Gokhale NA et al., Biochem. J. 453: 413-426, 2013).

PCDHB7 es un gen que codifica la protocadherina $\beta 7$. Aunque se desconoce cuál es su función específica, se sugiere que PCDHB7 desempeña un papel crucial en la adhesión célula a célula en el sistema nervioso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56129>).

El marcador molecular utilizado como indicación de las células endoteliales corneales podría ser únicamente un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D, CLRN1, SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF, CNTN3, PPIP5K1 y PCDHB7, o el marcador puede ser cualquier combinación de dos o más de dichas moléculas. En una forma de realización, el marcador molecular es preferentemente ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1, más preferentemente ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R y HTR1D, todavía más preferentemente ZP4, MRGPRX3, GRIP1 y GLP1R, aún todavía más preferentemente ZP4, MRGPRX3 y GRIP1, todavía más preferentemente ZP4 y MRGPRX3, y particularmente preferentemente ZP4, debido a que sus productos de expresión son proteínas de superficie de células endoteliales corneales y se expresan a nivel elevado específicamente en las células endoteliales corneales.

Se cree que SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF, CNTN3, PPIP5K1 y PCDHB7 asimismo se expresan en otros tejidos, tales como el cerebro, la médula espinal, el músculo esquelético o el hígado, tal como se muestra en la figura 1. Sin embargo, su expresión en dichos tejidos puede ignorarse mediante el ajuste del tipo de células troncales a partir de las que deriva un grupo celular que contiene una o más células endoteliales corneales y/o de las condiciones bajo las que se lleva a cabo la diferenciación de las células troncales en células endoteliales corneales, o mediante la utilización de un grupo celular obtenido mediante cultivo de células endoteliales corneales como grupo celular que contiene una o más células endoteliales corneales. De esta manera, dichos marcadores moleculares asimismo resultan útiles en la clasificación o detección de las células endoteliales corneales. De dichos marcadores moleculares, SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF, CNTN3 y PPIP5K1 resultan preferidos, SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF y CNTN3 resultan más preferidos, SCNN1D, PKD1, CNTN6 y NSF resultan todavía más preferidos, SCNN1D, PKD1 y CNTN6 son aún todavía más preferidos, SCNN1D y PKD1 son todavía adicionalmente más preferidos, y SCNN1D resulta particularmente preferido.

La clasificación de una o más células endoteliales corneales a partir de una población celular que contiene una o más células endoteliales corneales utilizando, como indicación, la expresión de por lo menos un marcador molecular seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D, CLRN1, SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF, CNTN3, PPIP5K1 y PCDHB7 puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, la clasificación de las células en las que se expresa por lo menos uno de los marcadores moleculares, en el caso de que la población celular contenga células endoteliales corneales pero no contenga otras células que permitan la expresión del marcador o marcadores moleculares. En el caso de que la población celular contenga otras células que permitan la expresión de por lo menos un marcador molecular además de las células endoteliales corneales, las células que muestran niveles de expresión significativamente más elevados que las demás células pueden clasificarse para aislar las células endoteliales corneales. El marcador molecular para la utilización como indicación puede ser cualquier combinación de dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más de las moléculas.

La expresión del marcador molecular puede detectarse mediante cualquier método disponible. Entre los ejemplos de métodos de detección típicos se incluyen un método que comprende la expresión del gen o genes que codifican el marcador o marcadores moleculares mediante RT-PCR, y un método que comprende detectar la presencia del marcador o marcadores moleculares utilizando una sustancia que se une específicamente al marcador o marcadores moleculares. La totalidad de los marcadores moleculares indicados anteriormente son proteínas de superficie de célula endotelial corneal. Debido a que el marcador molecular puede detectarse permaneciendo viables las células, el método que comprende detectar un marcador molecular utilizando una sustancia que se une específicamente al marcador resulta preferido.

El tipo de sustancia que se une específicamente al marcador molecular no se encuentra particularmente limitado. Entre los ejemplos de la sustancia se incluyen anticuerpos y aptámeros. La sustancia es preferentemente un anticuerpo o un fragmento del mismo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Entre los ejemplos del fragmento de anticuerpo se incluyen fragmentos Fab, fragmentos F(ab)₂ y fragmentos ScFv. En el caso de que se utilice la expresión de dos o más tipos de marcador molecular para detectar las células endoteliales corneales, las sustancias que se unen específicamente a los marcadores respectivos pueden utilizarse en combinación. En una forma de realización, las sustancias que se unen específicamente a los marcadores moleculares respectivos son preferentemente los que no pueden descomponerse mediante un tratamiento para separar el grupo celular que contiene una o más células endoteliales corneales en células individuales (por ejemplo, el tratamiento con una proteasa).

El anticuerpo para reconocer específicamente un marcador molecular para la utilización puede ser un anticuerpo disponible comercialmente, o puede prepararse mediante un método bien conocido. Existen métodos bien conocidos para preparar anticuerpos. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo policlonal mediante inmunización de un animal no humano con marcadores moleculares purificados o sus péptidos parciales, y obtener suero del animal de acuerdo con un método ordinario. Puede obtenerse un anticuerpo monoclonal a partir de un hibridoma preparado mediante fusión de células de bazo procedentes de un animal inmunizado con células de mieloma.

Para facilitar la detección de las células unidas a una sustancia que se une específicamente a un marcador molecular, la sustancia preferentemente se marca con una sustancia de marcaje. La sustancia de marcaje no se encuentra particularmente limitada. Entre los ejemplos de sustancias de marcaje se incluyen materiales fluorescentes, materiales radioactivos, materiales quimioluminiscentes, enzimas, biotina y estreptavidina. La sustancia que se une específicamente a un marcador molecular puede marcarse indirectamente. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo premarcado (un anticuerpo secundario) que se una específicamente a la sustancia (por ejemplo, un anticuerpo).

El método para reconocer células unidas a una sustancia que se une específicamente a un marcador molecular para clasificar las células no se encuentra particularmente limitado y puede seleccionarse convenientemente cualquier método conocido y desarrollado posteriormente en la presente memoria. Por ejemplo, el método para reconocer/clasificar células puede seleccionarse según el tipo de sustancia de marcaje utilizada. Entre los métodos típicos para reconocer/clasificar células se incluyen la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), la clasificación celular activada magnéticamente (MACS) y la cromatografía de afinidad. Debido a su capacidad de detectar simultáneamente múltiples marcadores moleculares, resultan preferentes FACS y MACS, y resulta más preferente FACS utilizando un citómetro de flujo provisto de un clasificador celular. El modo de FACS no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, FACS puede estar en un modo de carga de gotas o en un modo de captura celular. Las células endoteliales corneales pueden purificarse de esta manera.

Tal como se ha mencionado anteriormente, pueden obtenerse una o más células endoteliales corneales mediante clasificación de las células endoteliales corneales a partir de una población celular que contiene una o más células endoteliales corneales utilizando un marcador molecular como indicación. Entre la célula o células endoteliales corneales se incluyen las células precursoras de endotelio corneal. Siguiendo el método indicado anteriormente, asimismo resulta posible obtener una población celular que contiene células endoteliales corneales a una concentración significativamente elevada. El porcentaje de células endoteliales corneales en una población celular que contiene células endoteliales corneales a una concentración significativamente elevada (en número de células)

es, por ejemplo, de 50% o superior, de 55% o superior, de 60% o superior, de 65% o superior, de 70% o superior, de 75% o superior, de 80% o superior, de 85% o superior, de 90% o superior, de 95% o superior, o de 99% o superior.

5 1-3. Utilización de células endoteliales corneales.

Las células endoteliales corneales obtenidas mediante la utilización del marcador molecular mencionado anteriormente, a modo de indicación, puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades causadas por un trastorno funcional del endotelio corneal. De esta manera, puede proporcionarse una composición farmacéutica que contiene las células endoteliales corneales para el tratamiento de enfermedades endoteliales corneales. Dicha composición farmacéutica puede contener además diversos componentes, materiales de andamiaje, portadores, etc., para ayudar en el mantenimiento y proliferación de las células endoteliales corneales, o para ayudar en la aplicación de la composición en la zona afectada.

Entre los ejemplos de los componentes que ayudan en el mantenimiento y/o proliferación de las células se incluyen componentes utilizados para el medio, tales como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, vitaminas, minerales, sales y diversas citocinas. Entre los ejemplos de los materiales de andamiaje de ayuda en la aplicación de la composición en la zona afectada se incluyen colágeno, ácido poliláctico, ácido hialurónico, celulosa y derivados de los mismos. Dichos componentes y materiales de andamiaje pueden utilizarse en una combinación de dos o más. La composición farmacéutica puede encontrarse en forma de una solución acuosa inyectable (por ejemplo, solución salina fisiológica, tampones fisiológicos, tales como PBS, soluciones isotónicas que contienen glucosa y/o otros adyuvantes) a los que se han añadido células endoteliales corneales.

Puede obtenerse una lámina de células endoteliales corneales mediante el cultivo de las células endoteliales corneales obtenidas utilizando el marcador molecular como indicación, sobre un portador adecuado (por ejemplo, una membrana polimérica). El portador no se encuentra particularmente limitado y entre los ejemplos del portador se incluyen biopolímeros, tales como colágeno, atelocolágeno, colágeno tratado con álcali, gelatina, queratina, ácido hialurónico, glucosaminoglucano (condroitín sulfato, dermatán sulfato, ácido hialurónico, heparán sulfato, heparina, queratán sulfato), proteoglicano, ácido alginico, quitosano, poliaminoácido (ácido poliláctico) y celulosa y polímeros sensibles a la temperatura, tales como compuestos de (meta)acrilamida, derivados de (meta)acrilamida sustituidos con N-(o N,N-di)alquilo, derivados de éter vinílico y copolímeros de los mismos. Además de la forma de lámina, las células endoteliales corneales pueden utilizarse en forma de pellets obtenidos mediante concentración de las células, por ejemplo mediante filtración con un filtro (una masa de células).

Puede añadirse opcionalmente un protector o componente similar a las células endoteliales corneales para conservar criogénicamente las células. Entre los ejemplos del protector se incluyen glicerol, DMSO (dimetilsulfóxido), propilenglicol y acetamida. Para mantener la seguridad de las células como injerto, las células pueden someterse a tratamiento térmico y/o tratamiento de radiación, o similar.

No existe ninguna limitación particular de las enfermedades que son el objetivo del tratamiento con células endoteliales corneales, una composición farmacéutica que contiene las células o una lámina de células endoteliales corneales. Entre los ejemplos de las enfermedades se incluyen la disfunción endotelial corneal, incluyendo queratopía bullosa, distrofia corneal, glaucoma del desarrollo, anomalía de Rieger, distrofia endotelial hereditaria congénita, dermoide limbal, esclerocórnea, irregularidades de la forma corneal, tales como queratocono y degeneración corneal marginal pelúcida, cicatrización corneal, infiltración corneal, depósitos corneales, edema corneal, úlcera corneal, lesiones oculares causadas por una sustancia química o calor, enfermedades oculares, tales como queratitis, degeneración corneal, infección corneal, neuroblastoma, enfermedad de Hirschprung, síndrome de Waardenburg, albinismo parcial y enfermedad de von Recklinghausen.

Un paciente que requiera el trasplante de células endoteliales corneales (por ejemplo, un paciente con cualquiera de las enfermedades indicadas anteriormente) puede recibir el trasplante de células endoteliales corneales o de una lámina de células endoteliales corneales para tratar su enfermedad. De esta manera, puede proporcionarse un método para tratar las enfermedades indicadas anteriormente y el método comprende administrar las células endoteliales corneales obtenidas en el método indicado anteriormente en un paciente que requiere el trasplante de células endoteliales corneales.

2. Método para evaluar las células endoteliales corneales.

El elemento o los elementos seleccionados de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D, CLRN1, SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF, CNTN3, PPIP5K1 y PCDHB7 indicado anteriormente se expresan específicamente en las células endoteliales corneales. De esta manera, puede proporcionarse un método para evaluar las células endoteliales corneales utilizando la expresión de por lo menos un marcador molecular como indicación. Por ejemplo, el marcador o marcadores moleculares se mide para su nivel de expresión en las células de ensayo que se considera (o se presume) que son células endoteliales corneales. Al confirmar la expresión específica (o la expresión significativa), se determina que las células de ensayo son células endoteliales corneales.

Los marcadores moleculares preferidos para la utilización en dicho método de evaluación son los mismos que los indicados en la sección 1-2, anteriormente.

No existe ninguna limitación particular de las células de ensayo. Entre los ejemplos de células de ensayo se incluyen células obtenidas mediante cultivo de las células indicadas en la sección 1-1, anteriormente, en un medio bajo condiciones adecuadas para la inducción de diferenciación en células endoteliales corneales y células obtenidas mediante el cultivo de células endoteliales corneales recogidas de una córnea. El método para medir el nivel de expresión de un marcador molecular no se encuentra particularmente limitado. Entre los ejemplos del método se incluye el método de medición mediante RT-PCR y el método de medición que utiliza una sustancia que se une específicamente a un marcador molecular indicado en la sección 1-2. Las células de ensayo de esta manera pueden utilizarse con seguridad como células endoteliales corneales.

3. Kit de detección de células endoteliales corneales.

La invención proporciona la utilización de un kit para detectar células endoteliales corneales, y el kit incluye una sustancia que reconoce específicamente por lo menos un marcador molecular seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D, CLRN1, SCNN1D, PKD1, CNTN6, NSF, CNTN3, PPIP5K1 y PCDHB7. La sustancia que reconoce específicamente por lo menos un marcador molecular no se encuentra particularmente limitada. Entre los ejemplos de la sustancia se incluyen los anticuerpos y aptámeros indicados en la sección 1-2, anteriormente. El kit puede incluir, además de la sustancia que reconoce específicamente un marcador molecular, cualquier sustancia utilizada en la detección de células endoteliales corneales, un recipiente, un manual, etc. Por ejemplo, el kit puede incluir una sustancia de marcaje que marca la sustancia que reconoce específicamente un marcador molecular tal como se ha indicado anteriormente.

Ejemplos

Los ejemplos a continuación describen la presente invención con mayor detalle. Sin embargo, la invención no se encuentra limitada a los ejemplos.

1. Identificación de las moléculas candidatas.

Los datos de secuencias de ARN (GSE41616, Chen, et al., Hum. Mol. Genet. 22: 1271-1279, 2013) de los que informan Chen et al. fueron obtenidos a partir de una base de datos de información de expresión génica (Gene Expression Omnibus: GEO) utilizados como información de genes expresados en células endoteliales corneales en seres humanos *in vivo*. Los datos incluyen información de los ARN expresados en células endoteliales corneales obtenidas de tres donantes adultos (de 31, 56 y 64 años de edad) e información sobre los ARN expresados en las células endoteliales corneales obtenidas de dos donantes fetales (de 16 a 18 semanas). Para confirmar la integridad de los datos, se examinó la información de los marcadores específicos de células endoteliales corneales KRT3 y KRT12 y se confirmaron los niveles de expresión elevada de KRT3 y KRT12 en células endoteliales corneales derivadas de donantes adultos de 56 años de edad. Debido a que la muestra derivada de dicho donante probablemente se encontraba contaminada con células epiteliales corneales, se utilizaron los datos de los restantes cuatro donantes para el análisis siguiente.

Se alinearon las lecturas de secuencias de ARN respecto al genoma de referencia humano (hg19) mediante la utilización de TopHat (versión 1.4.1) y se utilizaron los resultados para ensamblar modelos de transcripción mediante el paquete Cufflinks (versión 2.1.1) (Trapnell et al., Nat. Protoc. 7: 562-578, 2012). Se cuantificaron los niveles de expresión génica como FPKM (fragmentos por kilobase de exón por cada millón de fragmentos mapeados) Utilizando Cufflinks y se seleccionaron los genes expresados en células endoteliales corneales de 10 FPKM o más, más específicamente, se seleccionaron 10,627 genes. Después, de entre dichos genes se seleccionaron únicamente los genes codificantes de las proteínas de la membrana celular utilizando los términos GO indicados en la tabla 1. Como resultado, se seleccionaron sólo 1494 genes, tal como se muestra en la tabla 1. De ellos, 1075 genes se expresaron en células endoteliales corneales tanto adultas como fetales; se expresaron 225 genes en sólo células endoteliales corneales adultas y se expresaron 194 genes en únicamente células endoteliales corneales fetales.

Tabla 1

Término GO	ID GO	Ambos	Adulto	Fetal
Membrana plasmática	GO:0005886	762	155	124
Parte integral de la membrana plasmática	GO:0005887	215	49	57
Superficie celular	GO:0009986	111	20	28
Membrana plasmática apical	GO:0016324	59	18	9
Membrana plasmática basolateral	GO:0016323	50	12	8
Cara externa de membrana plasmática	GO:0009897	31	9	9
Membrana plasmática lateral	GO:0016328	10	0	4
Membrana plasmática basal	GO:0009925	8	2	2

Extrínseco a membrana plasmática	GO:0019897	8	2	0
Membrana plasmática apicolateral	GO:0016327	5	0	1
Anclado a cara externa de membrana plasmática	GO:0031362	4	0	0
Anclaje a membrana plasmática	GO:0046658	2	2	0
Extrínseco a cara externa de membrana plasmática	GO:0031232	2	0	0
Intrínseco a cara externa de membrana plasmática	GO:0031233	1	1	0
Intrínseco a membrana plasmática	GO:0031226	1	1	0
Membrana celular externa	GO:0009279	1	0	0
Cara externa de membrana celular externa	GO:0031240	0	0	0
Parte integrante de membrana celular externa	GO:0045203	0	0	0
Total		1,075	225	194

Finalmente, los genes que se expresan a 10 TPM o más (etiquetas por millón) en 5 o más tejidos o especies celulares fueron descartados basándose en la base de datos FANTOM5 (anotación funcional del genoma de mamíferos 5). Lo anterior seleccionó 13 genes codificantes de moléculas candidatas, mostrados en la tabla 2, a continuación.

Tabla 2

Gen	sec. de ARN	Valor de FPKM	FANTOM5 CAGE	
	CEC adulta	CEC fetal	muestra primaria expresa el máximo (tpm)	muestra primaria expresa >10 tpm
Genes de expresión elevada únicamente en CEC adultas				
PPIP5K1,	17.39	6,17	ninguna	0
CLRN1,	14.15	0.56	células epiteliales del cristalino (22.91)	2
MRGPRX3,	11.16	0.26	células derivadas de Malassez (26.14)	1
GLP1R	10.85	2.64	corazón fetal (10.51)	1
Genes altamente expresados		en sólo CEC	fetales	
CNTN3	5.36	19.86	ninguna	0
PCDHB7	1.11	11.14	duramadre (9.37)	0
HTR1D	7.41	10.48	intestino delgado (12)	2
Genes de expresión elevada en CEC tanto adultas como fetales				
GRIP1	39.33	22.70	lóbulo temporal fetal (6.46)	0
NSF	31.58	14.09	glándula pineal (7.84)	0
PKD1	24.99	38.47	aorta (8.45)	0
SCNN1D	21.72	28.05	progenitores de granulocitos-macrófagos (22.21)	4
ZP4	12.22	56.52	ninguna	0
CNTN6	11.48	22.09	cerebelo (24.20)	4

2. Niveles de expresión de ARN de moléculas candidatas en tejidos oculares y tejidos corporales completos.

Para confirmar los niveles de expresión de los 13 genes seleccionados en la sección 1, anteriormente, en células endoteliales corneales y en tejidos corporales completos, se llevó a cabo una PCR cuantitativa para examinar sus niveles de expresión de ARN en células endoteliales corneales humana adultas y en 22 otros tejidos. Los detalles del procedimiento se proporcionan posteriormente. Los resultados revelan que la totalidad de los genes se expresaba en las células endoteliales corneales, lo que es consistente con los resultados del análisis de los datos mostrados en la figura 1. En particular, ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1 mostraron niveles de expresión más elevados en células endoteliales corneales que en otros tejidos, mientras que su expresión asimismo se confirmó en únicamente unos cuantos otros tejidos.

Después, se llevó a cabo PCR cuantitativa de dichos 6 genes a fin de confirmar sus niveles de expresión en los tejidos oculares. Para preparar los tejidos oculares, se utilizaron cuatro globos oculares procedentes de dos donantes adultos. Tal como se muestra en la figura 2, se confirmó que la totalidad de los genes mostraba niveles de expresión elevados en las células endoteliales corneales. Dado que el estroma corneal es contiguo al endotelio corneal y se origina a partir de la cresta neural craneal al igual que las células endoteliales corneales, la ausencia de expresión o niveles de expresión más bajos en el estroma corneal se considera una de las características importantes de un marcador de células endoteliales corneales. CLRN1 se expresa a un nivel sustancialmente bajo en el estroma corneal, y los otros 5 genes no se expresan en el estroma corneal. Los resultados indican que la totalidad de dichas moléculas resulta útil como marcadores específicos de las células endoteliales corneales.

Se llevó a cabo la extracción del ARN de células endoteliales corneales siguiendo el procedimiento siguiente. Todas las muestras humanas se manipularon de acuerdo con los preceptos de la Declaration of Helsinki. Se obtuvieron borde corneoescleral y glóbulos oculares completos de grado de investigación de un donante humano de Sight Life (Seattle, Washington). Los tejidos corneoesclerales se sumergieron y conservaron en Optisol-GS (Bausch & Lomb, Rochester, New York) a 4°C y se utilizaron dentro de los 4 días siguientes a la muerte del donante. La edad del donante era 58 años. El borde corneoescleral se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) tres veces y se diseccionaron el endotelio corneal y la membrana de Descemet a lo largo de la línea de Schwalbe con pinzas. A partir del endotelio corneal diseccionado, se extrajo el ARN con un minikit miRNeasy Qiagen (QIAGEN Inc.).

Se llevó a cabo la extracción del ARN de las células endoteliales corneales en cultivo, siguiendo el procedimiento siguiente. Se obtuvieron bordes corneoesclerales a partir de 4 globos oculares procedentes de 4 donantes. Las edades de los donantes estaban comprendidas entre 14 y 25 años. Se aislaron los endotelios corneales y membranas de Descemet tal como se ha indicado anteriormente. Los tejidos aislados se incubaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM: Invitrogen) que contenía 1.2 U/ml de dispasa II (Godo Shusei Co., Ltd.) y 1% de antibiótico-antimicótico (Anti-Anti, Invitrogen/Gibco) a 37°C durante 1 hora para aislar las células endoteliales corneales a partir de las membranas de Descemet. Las células endoteliales corneales aisladas se centrifugaron suavemente y se recogieron, y después se suspendieron en un medio DMEM que contenía 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, suero de feto bovino al 10% (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio) y 2 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, Invitrogen). Las células se sembraron en placas recubiertas con un reactivo de adhesión celular (mezcla de recubrimiento FNC, Athena ES, Baltimore, Maryland) y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. A continuación, se extrajo el ARN utilizando un kit de extracción de ARN Isogen. Todas las células utilizadas para la extracción de ARN eran las recolectadas durante el primer pase.

La extracción del ARN a partir de tejidos oculares humanos se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento siguiente. Se conservaron cuatro globos oculares procedentes de 2 donantes en una cámara húmeda a 4°C y se utilizaron en los 5 días siguientes a la muerte de los donantes. Las edades de los donantes eran 75 y 79 años. En primer lugar, se prepararon tejidos corneoesclerales y el cuerpo ciliar, iris y cristalino se aislaron a partir del segmento anterior de cada ojo y después se aisló el estroma del iris y las células epiteliales pigmentarias del iris. El endotelio corneal y la membrana de Descemet se pelaron de la manera indicada anteriormente y se aisló la red trabecular. Además, se diseccionaron las conjuntivas respecto del tejido corneoescleral y la parte central de la córnea y la parte limbal se separaron con un trépano de 8.0 mm de diámetro y se trataron con dispasa I (Godo Shusei Co., Ltd., Tokyo) a 4°C durante la noche. Se separó el epitelio corneal y el epitelio limbal respecto del estroma. Se peló la retina neural respecto del segmento posterior de cada ojo con pinzas y se extrajeron las células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) y el corioide juntas en forma de agregado. Finalmente, se aisló el nervio óptico. Se extrajeron los ARN de la totalidad de dichos tejidos aislados, utilizando un kit de extracción de ARN ISOGEN.

Para las muestras de ARN procedentes de los tejidos corporales humanos completos, excepto por los tejidos oculares, se adquirió el panel maestro de ARN total II (nº 636643, Clontech, Mountain View, California). Debido a que dicho producto no incluía ARN renal y ARN de páncreas, asimismo se adquirieron por separado ARN total renal humano (nº AM7976, Ambion, Austin, Texas) y ARN total de páncreas humano (nº AM7954, Ambion).

Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa-transcripción inversa (RT-qPCR) de acuerdo con el procedimiento siguiente: el ADNc se transcribió inversamente a partir de cada ARN con un sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, California) y se llevó a cabo una PCR en tiempo real cuantitativa (un ciclo inicial a 95°C durante 30 s, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 5 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s) para cuantificar el ADNc. Se utilizó premezcla SYBR de dímero Eraser (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y el control interno utilizado era β-actina (ACTB). La tabla 3 muestra el listado de cebadores utilizados.

Tabla 3

Gen	Directo/inverso	Secuencia de bases de cebador	SEC nº	Número de acceso
ACTB	Directo	5'-ACAGAGCCTCGCCTTTGC-3'	SEC nº 1	NM_001101
	Inverso	5'-GCGGCGATATCATCATCC-3'	SEC nº 2	
GRIP1	Directo	5'-ATGTGGACAAGAAGCAGCAC-3'	SEC nº 3	NM_021150,
	Inverso	5'-GGAGTTTTGGCAACTTCGAC-3'	SEC nº 4	
NSF	Directo	5'-CCTATTGGCCCTCGATTTTC-3'	SEC nº 5	NM_006178
	Inverso	5'-GGCTAGTGGTCCCAATGATAAG-3'	SEC nº 6	
PKD1	Directo	5'-AAGACACCCACATGGAAACG-3'	SEC nº 7	NM_001009944,
	Inverso	5'-CCAGCGTCTCTGTCTTCTCC-3'	SEC nº 8	
SCNN1D	Directo	5'-TGGAGCTGCTACACAACACC-3'	SEC nº 9	NM_001130413,
	Inverso	5'-GAGCAGGTCTCCACCATCAG-3'	SEC nº 10	

Gen	Directo/inverso	Secuencia de bases de cebador	SEC nº	Número de acceso
ZP4	Directo	5'-AAACAGGCCCTCAGGGGA-3'	SEC nº 11	NM_021186
	Inverso	5'-GACAGGTCACCACACAGGAT-3'	SEC nº 12	
CNTN6	Directo	5'-TTCTGAGTCGGAAGGCAAAG-3'	SEC nº 13	NM_014461,
	Inverso	5'-CGGACAGATACTGTGCTTCTTG-3'	SEC nº 14	
PPIP5K1	Directo	5'-CTTTCCCTACGTCAAGTGAGTG-3'	SEC nº 15	NM_014659,
	Inverso	5'-GCTGCTGTGCATGGAATC-3'	SEC nº 16	
CLRN1	Directo	5'-AATGCAGTACGGGCTTTTCC-3'	SEC nº 17	NM_174878,
	Inverso	5'-GCTCACTGGGATTGCTTTG-3'	SEC nº 18	
MRGPRX3	Directo	5'-GGAGGTCTTCACCACTGGAC-3'	SEC nº 19	NM_054031,
	Inverso	5'-ACCCAAGACTGGGATGGTTG-3'	SEC nº 20	
GLP1R	Directo	5'-GCAGAAATGGCGAGAATACC-3'	SEC nº 21	NM_002062,
	Inverso	5'-TTCATCGAAGGTCCGGTTG-3'	SEC nº 22	
CNTN3	Directo	5'-CCATGGAAACAGTTGATCCTG-3'	SEC nº 23	NM_020872
	Inverso	5'-GCTGTTGCTGGGTTCTTTG-3'	SEC nº 24	
PCDHB7	Directo	5'-ATTTTGTGCGGTCGCTCTAC-3'	SEC nº 25	NM_018940,
	Inverso	5'-TCCCCATTACTTCCGGTATC-3'	SEC nº 26	
HTR1D	Directo	5'-CATGCGTTTCTTCCACTGAG-3'	SEC nº 27	NM_000864,
	Inverso	5'-CATCGGCACTGCAAATACTG-3'	SEC nº 28	

3. Inmunotinción de células endoteliales corneales en tejido corneal

Con el fin de confirmar la expresión de los 6 genes al nivel de las proteínas, se inmunotifieron secciones de tejido corneal procedentes de un donante humano, utilizando los anticuerpos mostrados en la tabla 4, a continuación. Tal como se muestra en la figura 3, en cada tinción de proteínas, el endotelio corneal se encontraba intensamente teñido. En particular, los tres anticuerpos, anticuerpo anti-ZP4, anticuerpo anti-GLP y anticuerpo anti-HTR1D, tiñeron específicamente únicamente el endotelio corneal. Aunque el estroma corneal asimismo fue teñido por GRIP1, CLRN1 y MRGPRX3, la intensidad de fluorescencia era claramente inferior a la intensidad en las células endoteliales corneales. De esta manera, resulta posible discriminar las células endoteliales corneales respecto del estroma corneal basándose en dicha diferencia significativa de nivel de expresión. Tal como se ha indicado anteriormente, los 6 genes y proteínas codificadas por los 6 genes se encontró que resultaban útiles como marcadores para reconocer específicamente las células endoteliales corneales.

Tabla 4

Anticuerpo	Proveedor	Especie y tipo	Dilución utilizada
Proteína 1 de interacción con el receptor glutamato GRIP1, nº de cat. ab122514	Abcam, Cambridge, MA	Anticuerpo policlonal de conejo	1:100
Glucoproteína 4 de zona pelúcida ZP4, nº de cat. LS-C160968	LifeSpan BioSciences, Inc. Seattle, WA	Anticuerpo policlonal de conejo	1:50
CLRN1 clarina 1, nº de cat. sc-69073	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA	Anticuerpo policlonal de cabra	1:50
GRP relacionado con MAS MRGPRX3, elemento X3, nº de cat. ab140863	Abcam, Cambridge, MA	Anticuerpo policlonal de conejo	1:25
Receptor de péptido 1 de tipo glucagón GLP1R, nº de cat. GTX44806	Genetex Inc., Irvine, CA	Anticuerpo policlonal de conejo	1:100
receptor 1D de 5-hidroxitriptamina, HTR1D, nº de cat. ab140486	Abcam, Cambridge, MA	Anticuerpo policlonal de conejo	1:150

La inmunotinción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento siguiente. Se utilizaron tejidos corneoesclerales dentro de los 11 días siguientes a la muerte del donante. La edad del donante era 27 años. El borde corneoescleral se incluyó en compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) y se cortaron secciones congeladas utilizando un micrótopo-criostato (HM560, Thermo Fisher Scientific Inc., Walldorf, Alemania) en secciones de 10 µm. Tras secar a temperatura ambiente durante 30 minutos, las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con Tris (TBS, Takara Bio Inc.) 3 veces y se incubaron con TBS que contenía suero de burro al 5% y Triton X-100 al 0.3% durante 1 hora para bloquear las reacciones no específicas. A continuación, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos, presentados en la tabla 4, a 4°C durante la noche. Después, las secciones

se lavaron nuevamente con TBS 3 veces y se incubaron con una dilución 1:200 de sus anticuerpos secundarios respectivos conjugados con Alexa Fluor 488 (Life Technologies) y una dilución 1:100 de Hoechst 33342 (nº B2261, Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 2 horas. Las secciones se observaron con un microscopio de fluorescencia (Axio Observer D1, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Alemania).

4. Expresión de ZP4 en células endoteliales corneales inducidas a partir de células iPS humanas.

Se indujeron células endoteliales corneales a partir de células iPS humanas (proporcionadas por el Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University), que son células troncales pluripotentes. Tal como se muestra en la figura 4, el nivel de expresión de ZP4 se incrementó debido a la inducción. La expresión de ZP4 se midió mediante RT-PCR. La expresión de ZP4 específica de las células endoteliales corneales y de las células precursoras indica que ZP4 es un marcador útil para producir células endoteliales corneales y evaluar las células endoteliales corneales.

Tabla de secuencias

PCT_corneal endothelial cell marker _20150903_144718_4.txt

Listado de secuencias

<110> RIKEN

<110> OSAKA UNIVERSITY

<120> Marcador de células endoteliales corneales

<130> P15-113

<150> \201@JP 2014-180985

<151> \201@2014-09-05

<160> 28

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> humano

<400> 1

acagagcctc gcctttgc 18

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> humano

<400> 2

gcggcgatat catcatcc 18

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> humano

<400> 3

atgtggacaa gaagcagcac 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> humano

<400> 4

ggagttttgg caacttcgac 20

5	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 5 cctattggcc ctcgatttc	20
10	<210> 6 <211> 22 <212> ADN <213> humano	
15	<400> 6 ggctagtggc cccaatgata ag	22
20	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
25	<400> 7 aagacaccca catggaaacg	20
30	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 8 ccagcgtctc tgtcttctcc	20
35	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
40	<400> 9 tggagctgct acacaacacc	20
45	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 10 gagcaggtct ccaccatcag	20
50	<210> 11 <211> 18 <212> ADN <213> humano	
55	<400> 11 aaacaggccc tcagggga	18
60	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
65	<400> 12 gacaggtcac cacacaggat	20

ES 2 807 625 T3

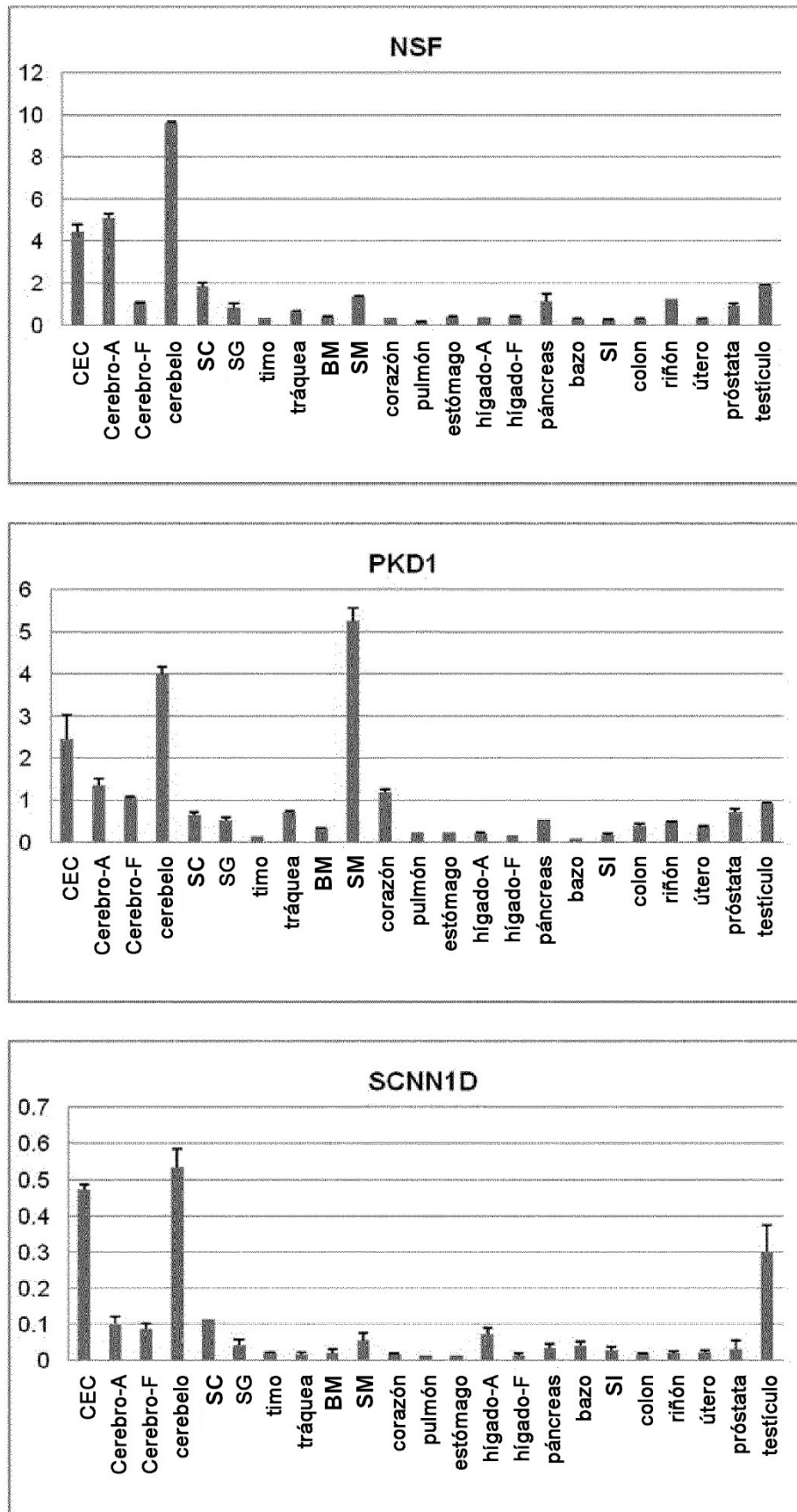
5	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 13 ttctgagtcg gaaggcaaag	20
10	<210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> humano	
	<400> 14 cggacagata ctgtgcttct tg	22
20	<210> 15 <211> 22 <212> ADN <213> humano	
	<400> 15 ctttccctac gtcaagtgag tg	22
30	<210> 16 <211> 18 <212> ADN <213> humano	
	<400> 16 gctgctgtgc atggaatc	18
40	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 17 aatgcagtac gggctttcc	20
50	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> humano	
	<400> 18 gctcactggg attgcttg	19
60	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 19 ggaggtcttc accactggac	20
65	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 20 accaagact gggatggttg	20
	<210> 21 <211> 20	

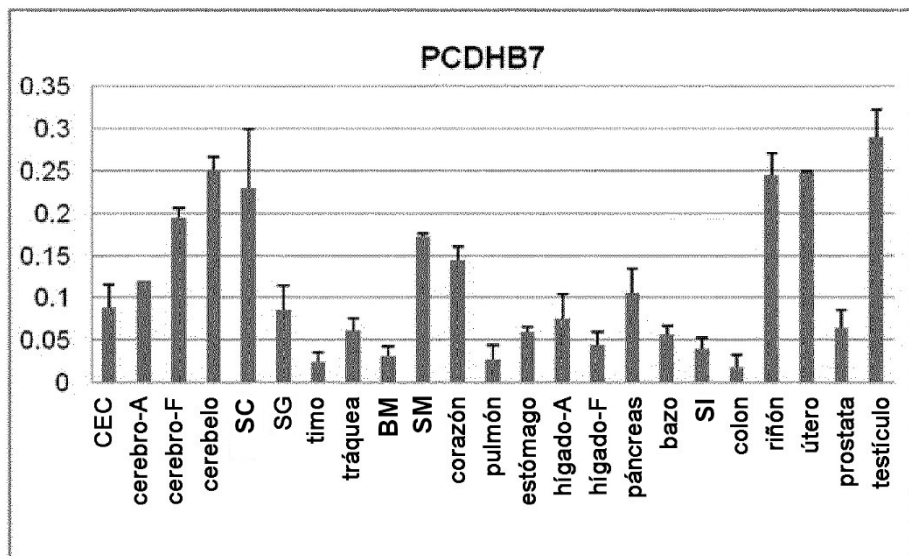
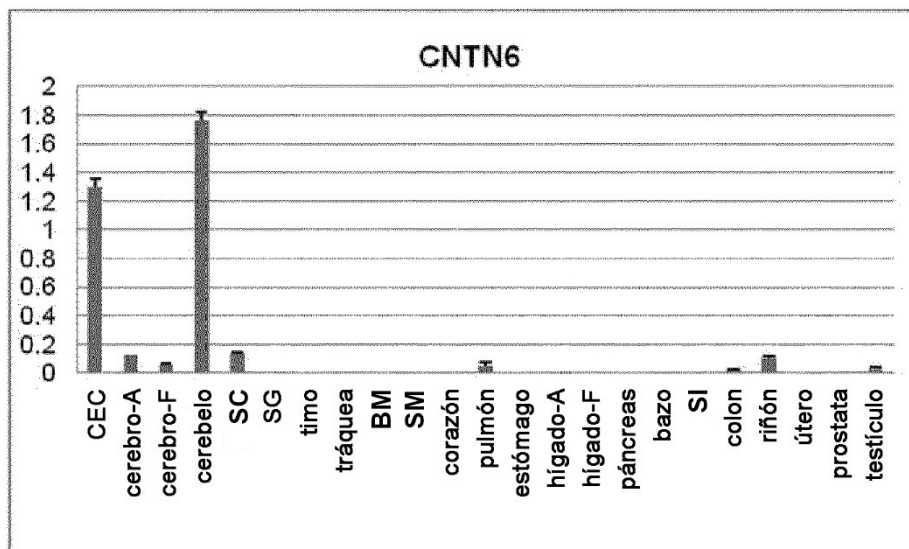
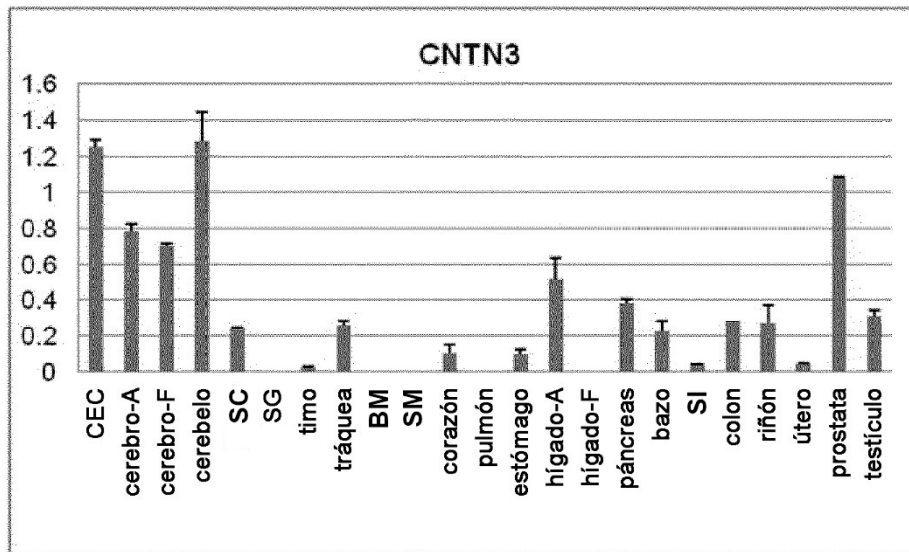
	<212> ADN <213> humano	
5	<400> 21 gcagaaatgg cgagaatacc	20
10	<210> 22 <211> 19 <212> ADN <213> humano	
15	<400> 22 ttcatcgaag gtccggttg	19
20	<210> 23 <211> 21 <212> ADN <213> humano	
25	<400> 23 ccatggaac agtgcctct g	21
30	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> humano	
35	<400> 24 gctgttgctg ggttcttg	19
40	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
45	<400> 25 atttgtgctg gtcgctctac	20
50	<210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
55	<400> 26 tccccattac ttccggtatc	20
60	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 27 catgcgtttc ttccactgag	20
	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
	<400> 28 catcggcact gcaaatactg	20

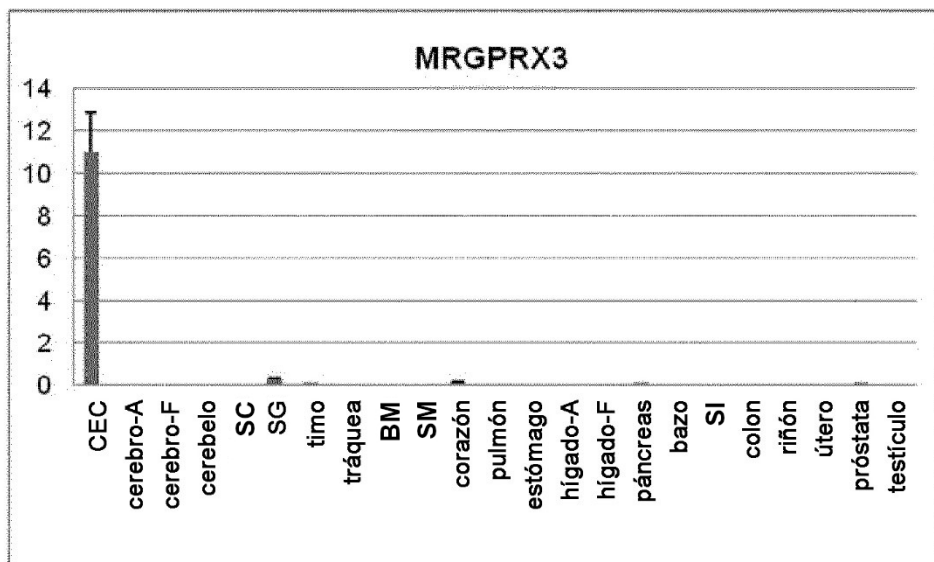
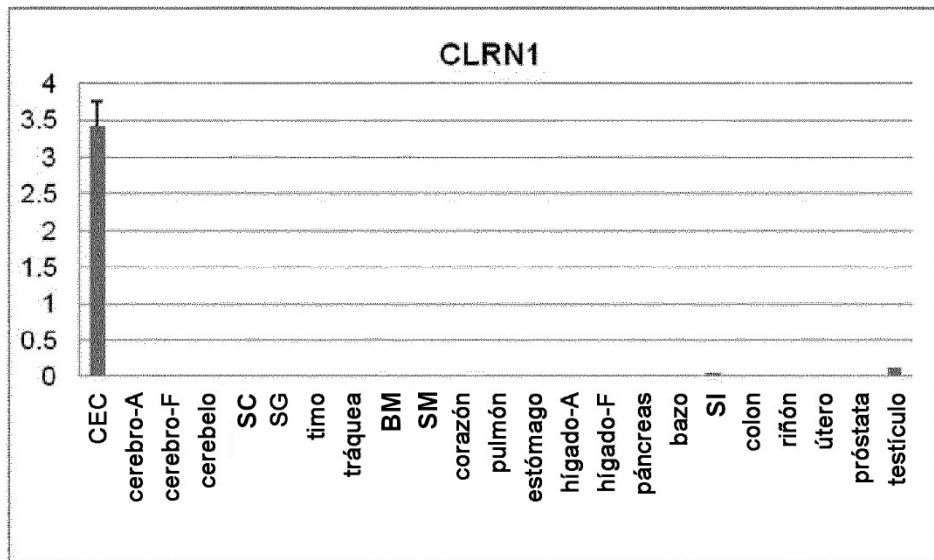
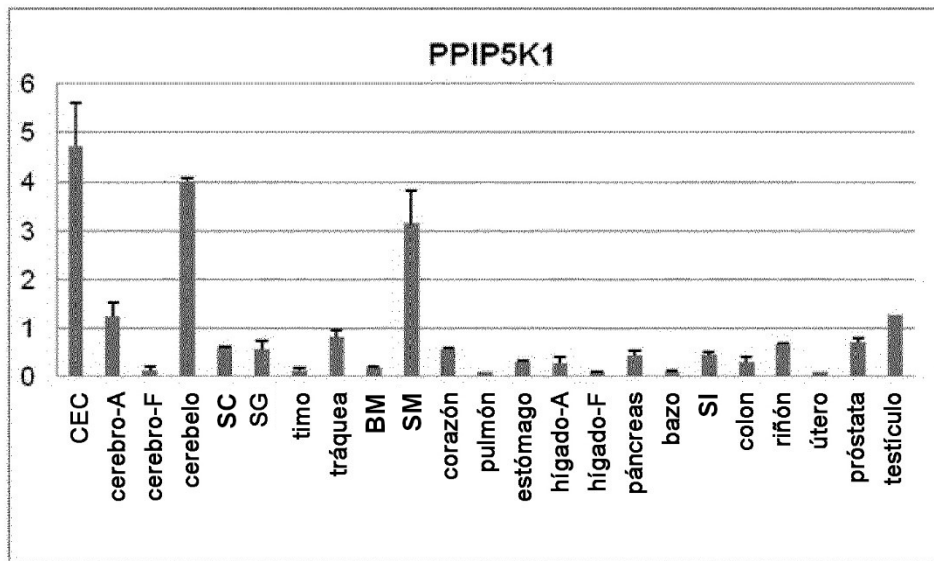
REIVINDICACIONES

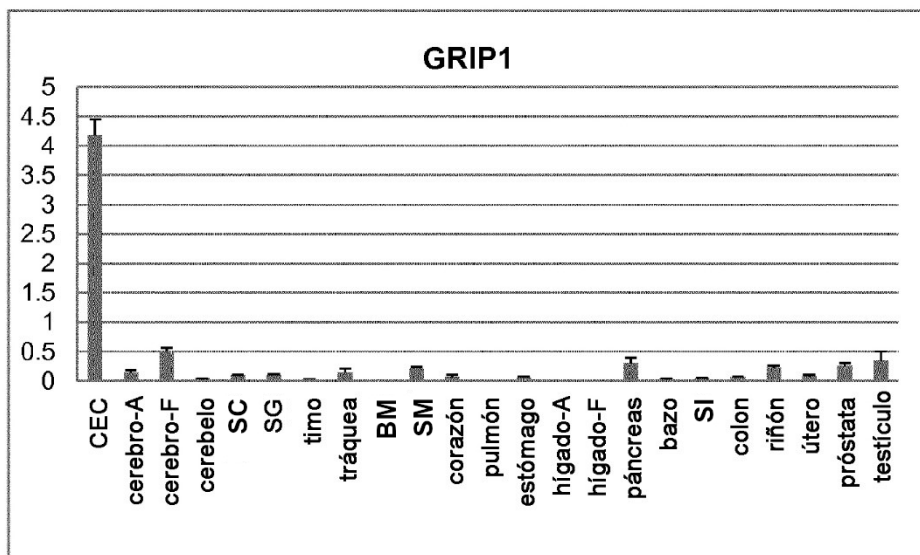
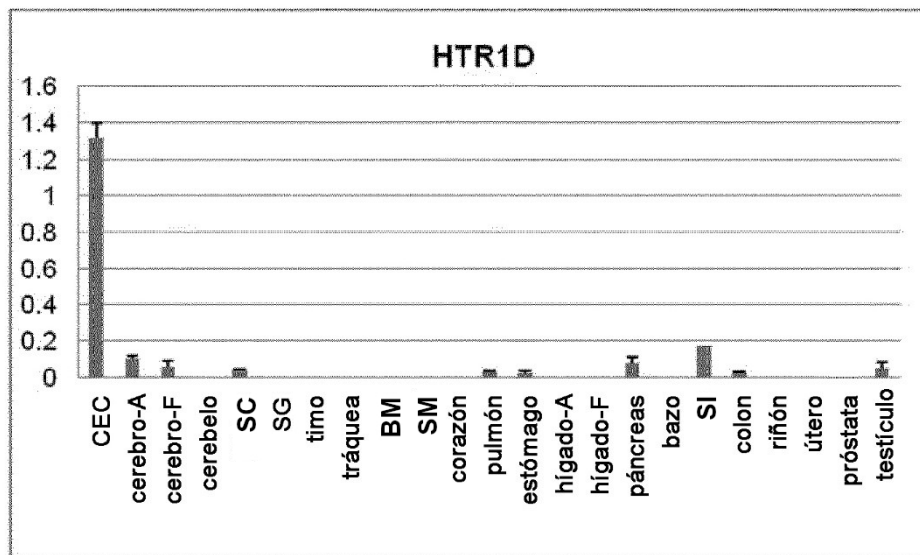
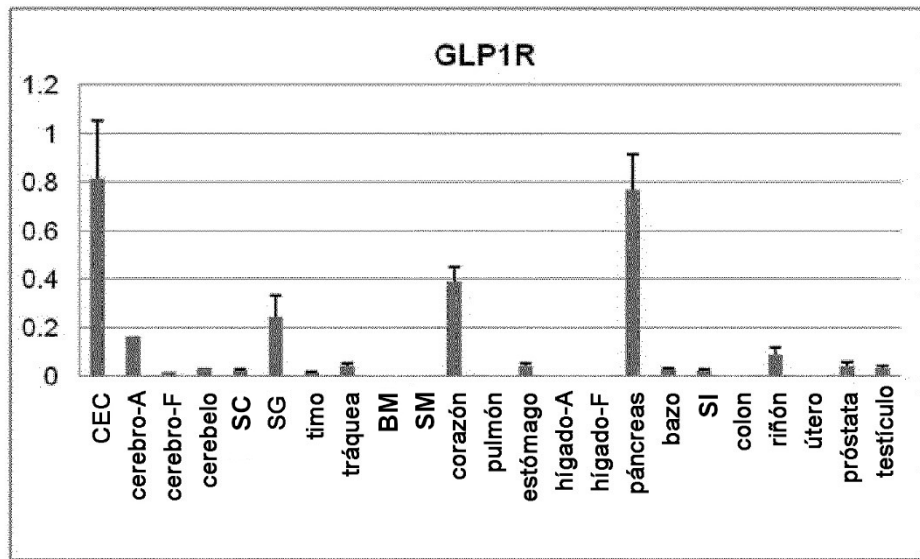
1. Método para producir una célula endotelial corneal, comprendiendo el método la etapa de clasificar, a partir de una población celular que comprende una célula endotelial corneal, una célula en la que se expresa por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1.
5
2. Método según la reivindicación 1, en el que la población celular que comprende una célula endotelial corneal se obtiene induciendo la diferenciación de las células troncales.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la población celular que comprende una célula endotelial corneal se obtiene cultivando unas células endoteliales corneales.
10
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de clasificar comprende unir un anticuerpo que reconoce específicamente por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1 a la población celular que comprende una célula endotelial corneal.
15
5. Método para evaluar una célula endotelial corneal que utiliza la expresión de por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1 como una indicación.
20
6. Utilización de un marcador que comprende por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1 para detectar *in vitro* una célula endotelial corneal.
7. Utilización de un kit que comprende una sustancia que reconoce específicamente por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ZP4, MRGPRX3, GRIP1, GLP1R, HTR1D y CLRN1 para detectar *in vitro* células endoteliales corneales.
25

Fig.1









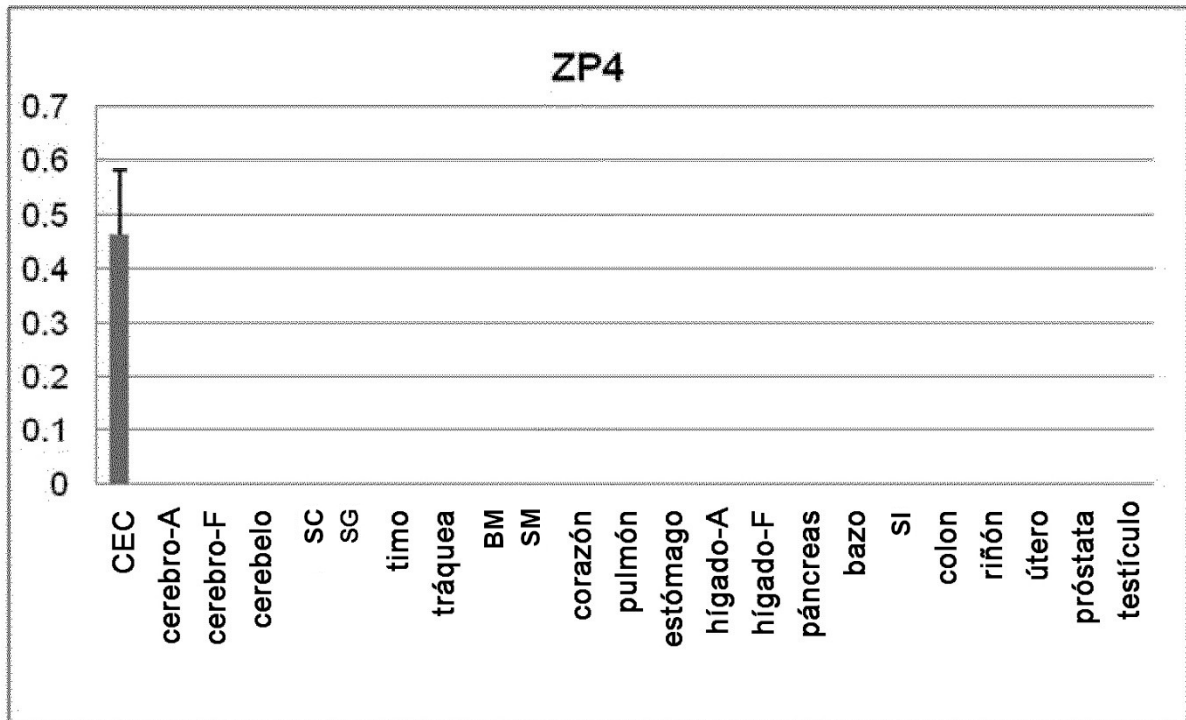


Fig. 2

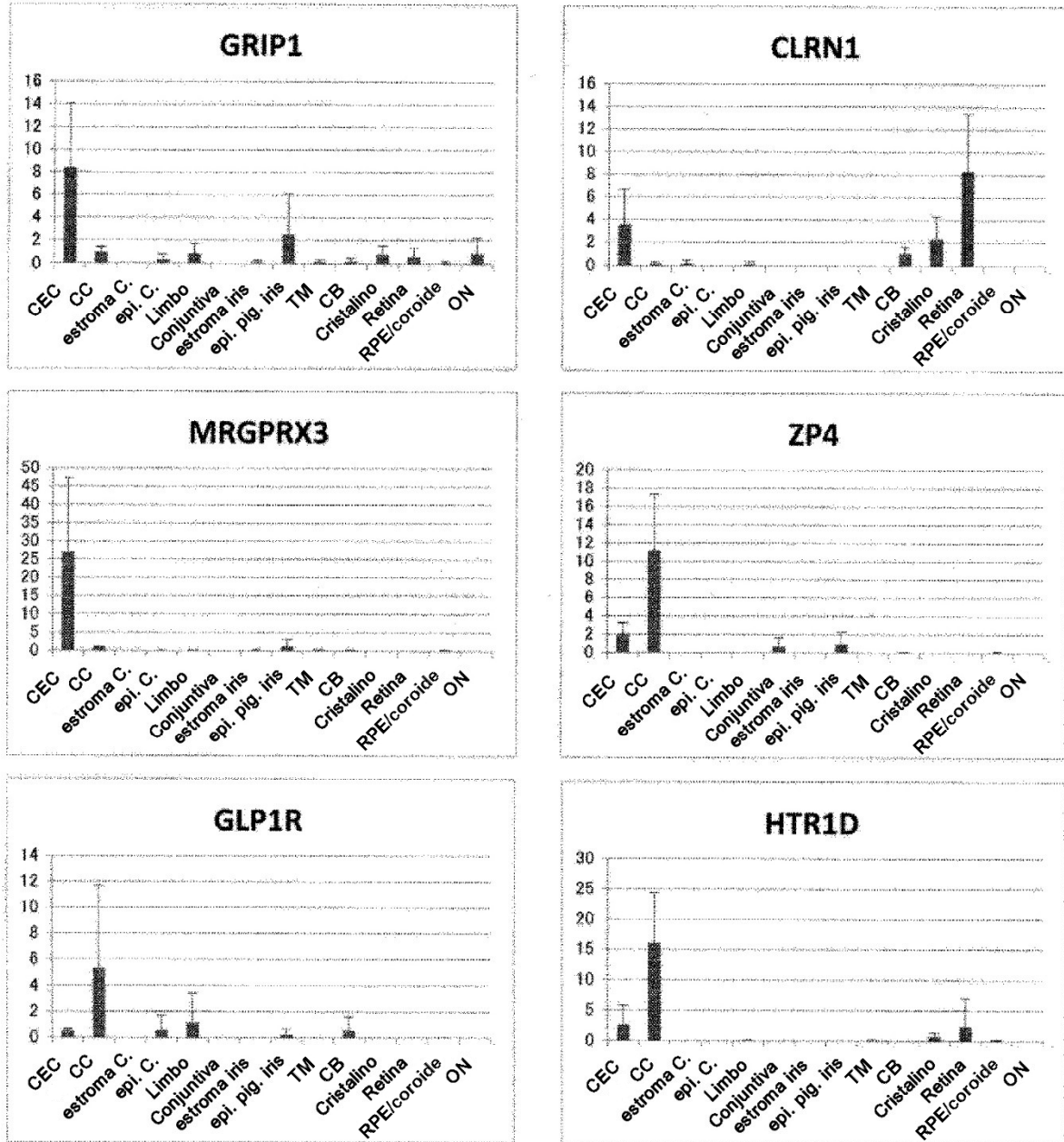


Fig. 3

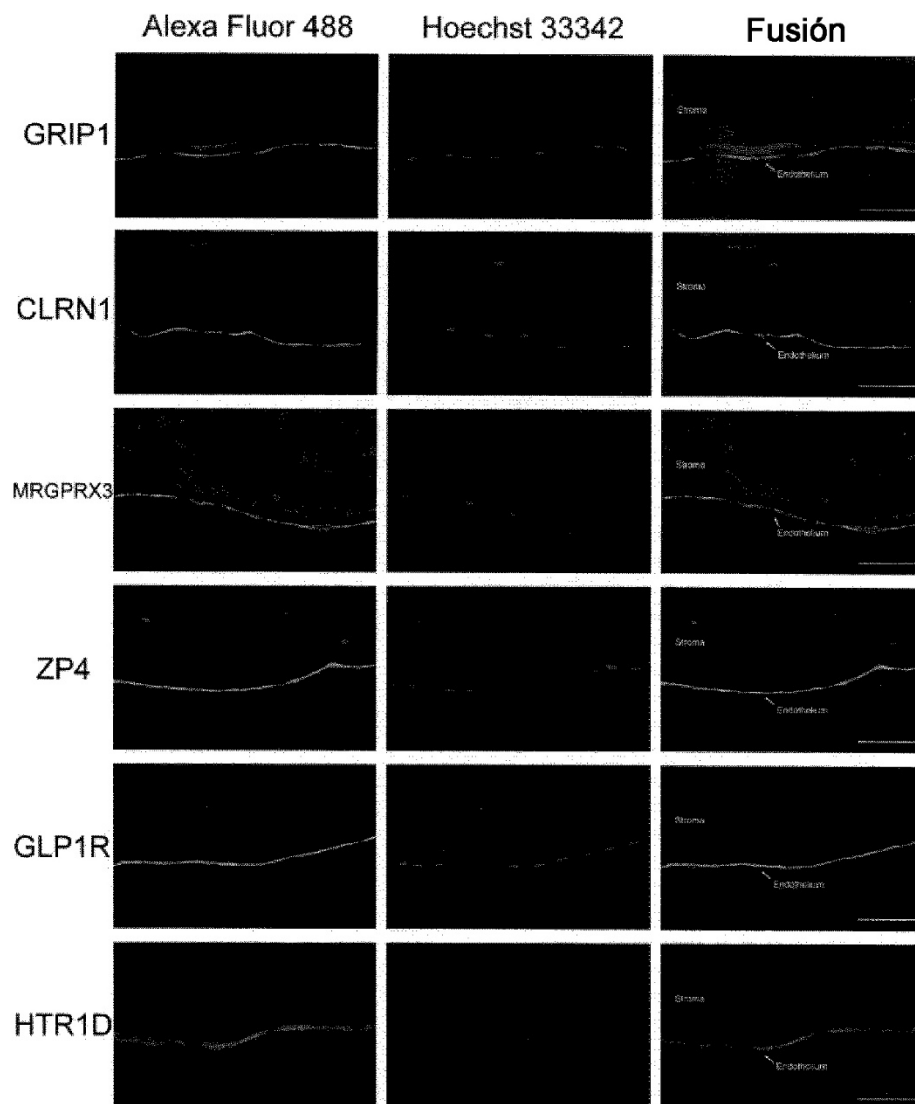


Fig. 4

