

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 532**

51 Int. Cl.:

A61L 27/00 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2006** **PCT/JP2006/310805**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2006** **WO06129672**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2006** **E 06756753 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016** **EP 1905459**

54 Título: **Método para producir un diente, conjunto de dientes, y método para producir un tejido**

30 Prioridad:

30.05.2005 JP 2005157885
01.03.2006 JP 2006055569

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2017

73 Titular/es:

ORGAN TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
4-1-21 Toranomon, Minato-ku
Tokyo 105-0001, JP

72 Inventor/es:

TSUJI, TAKASHI y
NAKAO, KAZUHISA

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 599 532 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

Método para producir un diente, conjunto de dientes, y método para producir un tejido.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* de producción de un diente, un conjunto de dientes, y un método para producir un tejido y, específicamente, a un método de producción de un diente, un conjunto de dientes, y un método de producción de tejido periodontal y tejido de folículos pilosos usando células.

10

Técnica antecedente

El diente es un órgano, que puede perderse por caries dentales, enfermedades periodontales o similares, y que tiene los tejidos duros, tales como el esmalte en la capa más externa y la dentina en la capa interna, y tiene además un odontoblasto que forma la dentina en la capa más profunda del diente y de la pulpa dental en el núcleo. Generalmente, la pérdida de dientes hoy se compensa, principalmente, por las prótesis y los implantes en muchos casos, ya que se cree que esto es poco amenazante para la vida. Sin embargo, hay un interés creciente en el desarrollo de la tecnología de regeneración de dientes en vista de la influencia significativa que la presencia o ausencia de dientes tiene en la apariencia personal y en el sabor de la comida, y desde la perspectiva del mantenimiento de la salud y una alta calidad de vida.

Los dientes son unidades funcionales que se forman por inducción durante el proceso de desarrollo de la etapa fetal y se construyen con varios tipos de células, y se cree que son las mismas que para los órganos o los órganos internos. Por lo tanto, los dientes no se producen por el sistema de células madre en el que los tipos de células se producen a partir de células madre, tales como las células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales en el cuerpo de un adulto, y los dientes no pueden regenerarse únicamente por la implantación de células madre (terapia de implante de células madre) que actualmente se encuentra en fase de desarrollo por la medicina regenerativa. Además, aunque se está considerando la regeneración de los dientes mediante la identificación del gen que se expresa específicamente en el proceso de desarrollo de los dientes y que induce artificialmente un germen dentario, la regeneración dental no puede inducirse por completo simplemente mediante la identificación del gen.

Por lo tanto, recientemente se han realizado estudios enfocándose principalmente en la regeneración de los dientes mediante el trasplante de un germen dentario reconstituido obtenido mediante la reconstitución de un germen dentario usando células de germen dentario aisladas.

Por ejemplo, en el Documento no perteneciente a Patente 1, se desvela que un tejido tipo diente se regenera mediante el trasplante de células, tales como células epiteliales aisladas de un germen dentario y células del folículo dentario mesenquimales, con un vehículo bioabsorbible en una cavidad abdominal de una rata.

40

En el Documento no perteneciente a Patente 2, se describe que el co-cultivo por gel de colágeno es eficaz como un sistema en el que puede realizarse una interacción epitelio/mesenquimal por células subcultivadas.

Como un método para regenerar un germen dentario, se describe, por ejemplo, en el Documento de Patente 1, que las células de germen dentario se cultivan en presencia de sustancias fisiológicamente activas tales como factores de crecimiento de fibroblastos y similares. En el Documento de Patente 2, se propone que al menos un tipo de células seleccionadas entre células de germen dentario y células que pueden diferenciarse en estas células de germen dentario se cultivan junto con un vehículo que contiene fibrina, y se describe que un "diente" que tiene una forma específica se forma usando un vehículo que contiene fibrina que tiene la forma deseada para el germen dentario.

50

En los Documentos de Patente 3 y 4, se desvela un método para formar dientes que incluye sembrar una mezcla celular de una dentina que contiene germen dentario que forma células mesenquimales obtenidas de pulpa dental y células epiteliales que contribuyen a la formación de esmalte, de la mandíbula de un cerdo de 6 meses, en una estructura que es un polímero biodegradable solidificado que contiene un copolímero de ácido poliglicólico/ácido polilactico; y transplantándola a un cuerpo animal. Aquí, se describe que un "diente" que tiene una forma específica se forma usando una estructura que tiene la forma deseada para el germen dentario.

Adicionalmente, en el Documento de Patente 5, se desvela un método de regeneración dental para tratar un

paciente con pérdida o daño óseo. De acuerdo con este método, se forma un hueco sembrando células mesenquimales en un vehículo de malla de ácido poliglicólico y después laminando el vehículo con células epiteliales y colágeno, o envolviéndolo con una lámina de células epiteliales. Adicionalmente, en el Documento de Patente 5, se usa un vehículo para construir la forma de un hueso.

5

El Journal of Investigative Dermatology, 1998, vol. 111 (5), págs. 767-775 desvela la formación de pelo transplantando una masa celular de células mesenquimales que está en contacto con células epiteliales. Después, las células se transplantan en una cápsula renal.

10

Documento no perteneciente a Patente 1: J. Dent. Res., 2002, Vol. 81 (10), págs. 695-700

Documento no perteneciente a Patente 2: "Regenerative medicine using teeth and cells derived from a tooth germ and the possibility of the same", Regenerative Medicine, Journal of the Japanese Society for Regenerative Medicine, 2005, Vol. 4(1), págs. 79-83

15

Documento de Patente 1: Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública n.º 2004-331557

Documento de Patente 2: Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública n.º 2004-357567

Documento de Patente 3: Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2002/0119180

Documento de Patente 4: Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0219489

Documento de Patente 5: Publicación Internacional (WO) n.º 2005/014070

20 Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

Sin embargo, con el fin de funcionar como un tejido, es esencial que una pluralidad de tipos de células que constituyen un tejido se coloquen en una posición relativa apropiada (emplazamiento celular) y tengan direccionalidad como un tejido. El tejido, por ejemplo, un diente, es un "órgano interno" o un "órgano" producido por una interacción entre las células epiteliales derivadas de un germen dentario y células mesenquimales derivadas de células de la cresta neural craneal durante los procesos de diferenciación-desarrollo. Es posible producir dientes normales mediante el trasplante de un germen dentario tal como es; sin embargo, los dientes que tienen el emplazamiento celular específico y la direccionalidad de la unidad funcional que es un diente no se pueden regenerar solamente mediante el aislamiento y el cultivo de células de germen dentario constituidas por la pluralidad de tipos de células.

Aunque un germen dentario se reconstruye utilizando células, los factores celulares y similares, en las técnicas que se han mencionado anteriormente, el emplazamiento celular específico y la direccionalidad suficiente para expresar las funciones de un diente, no se regeneran.

Además, ha sido difícil de reconstruir el tejido que tiene el emplazamiento celular específico simplemente mediante el aislamiento y el cultivo de una pluralidad de células que constituyen el tejido.

40

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método *in vitro* de producción de un diente que tenga un emplazamiento celular específico, un conjunto de dientes preparado por este método, y un método de producción de tejido periodontal.

Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un método *in vitro* para producir un folículo piloso que tenga un emplazamiento celular específico de tejido.

Medios para resolver el problema

Un método de producción de un diente de la presente invención incluye un método de acuerdo con la reivindicación 1.

Un método de producción de tejido periodontal de la presente invención incluye un método de acuerdo con la reivindicación 7.

55

Un conjunto de dientes de la presente invención, embebido en un vehículo de soporte, se obtiene por el método desvelado en la reivindicación 8 de acuerdo con la reivindicación 8.

En ambos de los métodos que se han mencionado anteriormente o el conjunto de dientes, es preferible que cada

una de la primera masa celular y la segunda masa celular que se han mencionado anteriormente se obtenga a partir de un germen dentario. Además, cada una de la primera masa celular y la segunda masa celular que se han mencionado anteriormente puede ser una masa de células individuales.

- 5 Adicionalmente, un método de acuerdo con la invención es un método para producir tejido de folículo piloso como se desvela en la reivindicación 11.

En la presente invención, dado que las masas celulares que contienen sustancialmente únicamente células mesenquimales o células epiteliales se sitúan en el interior de un vehículo de soporte en contacto entre sí y se cultivan, cada masa celular crece en el interior del vehículo de soporte sin mezclarse con las células que constituyen la otra masa celular, mientras que el estado de contacto entre las masas se mantiene. Esto hace que sea posible reproducir eficazmente la excelente interacción entre las células mesenquimales y las células epiteliales requeridas en la formación del tejido.

- 15 Como resultado, puede prepararse un tejido que tiene el emplazamiento celular específico para el tejido diana. Además, un diente o un conjunto de dientes que tiene un emplazamiento celular específico, en el que hay esmalte fuera y dentina dentro, puede prepararse cuando al menos una de las células mesenquimales y las células epiteliales se obtiene a partir de un germen dentario.

20 Efecto, o efectos, de la invención

De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse un método de producción de un diente que tiene un emplazamiento celular específico, un conjunto de dientes preparado por este método, y un método de producción de tejido periodontal.

- 25 Además, de acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse un método de producción de folículos pilosos que tiene un emplazamiento celular específico para el tejido de folículo piloso.

Breve explicación de los dibujos

- 30 [Figura 1] La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra la formación del germen dentario.
[Figura 2] (A) a (D) son vistas esquemáticas que muestran conceptualmente un procedimiento para la reconstrucción de un germen dentario usando células mesenquimales y células epiteliales que se obtienen a partir de un germen dentario, de acuerdo con los Ejemplos de la presente invención.
- 35 [Figura 3] La figura 3 muestra imágenes de contraste de fases e imágenes de tinción de tejidos de germen dentario normal e imágenes de tinción de transcurso temporal del diente producido por el trasplante de la cápsula subrenal del germen dentario normal, de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 1 de la presente invención.
- 40 [Figura 4] La figura 4 muestra imágenes de contraste de fases de un germen dentario reconstituido por los tejidos epiteliales derivados de un germen dentario y células mesenquimales derivadas de un germen dentario e imágenes de tinción de transcurso temporal de un diente producido por el trasplante de la cápsula subrenal del germen dentario reconstituido, de acuerdo con el Ejemplo 1 de la presente invención.
- 45 [Figura 5] La figura 5 muestra imágenes de contraste de fases de un germen dentario reconstituido por tejido epitelial derivado de un germen dentario y células mesenquimales derivadas de un germen dentario de un ratón GFP y una imagen de tinción del 14º día del diente producido por el trasplante de la cápsula subrenal del germen dentario reconstituido, de acuerdo con el Ejemplo 1 de la presente invención.
- 50 [Figura 6] La figura 6 muestra imágenes de contraste de fases de un germen dentario reconstituido por células epiteliales derivadas de un germen dentario de un ratón GFP y tejidos mesenquimales derivados de un germen dentario y una imagen de tinción del 14º día del diente producido por el trasplante de la cápsula subrenal del germen dentario reconstituido, de acuerdo con el Ejemplo 2 de la presente invención.
- 55 [Figura 7] La figura 7 muestra imágenes de contraste de fases de un germen dentario reconstituido por células epiteliales derivadas de un germen dentario y células mesenquimales derivadas de un germen dentario y una imagen de tinción del 14º día del diente producido por el trasplante de la cápsula subrenal del germen dentario reconstituido, de acuerdo con el Ejemplo 3 de la presente invención.
- [Figura 8] La figura 8 muestra imágenes de contraste de fases de tejidos epiteliales derivados de un germen dentario y tejidos mesenquimales derivados de un germen dentario y figuras cromáticas del 14º día del trasplante individual de la cápsula subrenal de cada uno de los tejidos anteriores, de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 2 de la presente invención.
- [Figura 9] La figura 9 muestra imágenes de contraste de fases de un germen dentario de baja densidad

reconstituido usando tejidos epiteliales derivados de un germen dentario y células mesenquimales derivadas de un germen dentario e imágenes de tinción del 20º día del trasplante de la cápsula subrenal del germen dentario de baja densidad reconstituido, de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 3 de la presente invención.

5 [Figura 10] La figura 10 muestra imágenes de contraste de fases de un germen dentario reconstituido reconstituyendo tejidos epiteliales derivados de un germen dentario y células mesenquimales derivadas de un germen dentario en alta densidad y sin compartimentación, e imágenes de tinción del 20º día del trasplante de la cápsula subrenal del germen dentario de baja densidad reconstituido de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 4 de la presente invención.

10 [Figura 11] La figura 11 muestra imágenes de tinción del hueso alveolar y la membrana periodontal que son tejidos periodontales formados alrededor del diente producido a partir del germen dentario reconstituido de acuerdo con los Ejemplos 1 a 3 de la presente invención.

15 [Figura 12] La figura 12 muestra imágenes de tinción de ARNm de periostatina detectado específico de una membrana periodontal que es un tejido periodontal formado alrededor del diente producido a partir del germen dentario reconstituido de acuerdo con el Ejemplo 2 de la presente invención (17º día después del trasplante) y el Ejemplo Comparativo 1 (14º día después del trasplante).

[Figura 13] La figura 13 muestra imágenes de contraste de fases e imágenes de tinción del diente producido por un cultivo de órgano extendiendo el proceso de cultivo después de preparar el germen dentario reconstituido de acuerdo con los Ejemplos 4 y 5 de la presente invención y el Ejemplo Comparativo 5.

20 [Figura 14] La figura 14 muestra imágenes de contraste de fases de un germen dentario reconstituido por células epiteliales derivadas de un germen dentario y células mesenquimales derivadas de un germen dentario e imágenes de tinción del 14º día del diente producido por el trasplante de la cápsula subrenal del germen dentario reconstituido, de acuerdo con el Ejemplo 6 de la presente invención.

25 [Figura 15] (A) es una imagen de tinción de un ratón no candidato a trasplante el 14º día después de la extracción dental de la presente invención, y (B) es una vista ampliada del área delimitada por el cuadro de (A), de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 6.

[Figura 16] La figura 16 muestra imágenes de tinción del 14º día después del trasplante de un germen dentario separado individualmente en la cavidad oral, de acuerdo con el Ejemplo 6 de la presente invención.

30 [Figura 17] La figura 17 muestra imágenes de tinción del 14º día después del trasplante de un diente separado individualmente en la cavidad oral, de acuerdo con el Ejemplo 7 de la presente invención.

[Figura 18] La figura 18 muestra imágenes de contraste de fases de un folículo piloso reconstituido por células epiteliales derivadas de tejido de folículo piloso y células mesenquimales derivadas de tejido de folículo piloso e imágenes de tinción del 14º día del pelo producido por el trasplante de la cápsula subrenal del folículo piloso reconstituido, de acuerdo con el Ejemplo 8 de la presente invención.

35 [Figura 19] La figura 19 muestra imágenes de microscopio estereoscópico del 14º día del folículo piloso producido por el trasplante de la cápsula subrenal del folículo piloso reconstituido a partir de células epiteliales derivadas de tejido de folículo piloso y células mesenquimales derivadas de tejido de folículo piloso de acuerdo con el Ejemplo 8 de la presente invención.

40 [Figura 20] La figura 20 muestra imágenes de contraste de fases de un folículo piloso reconstituido por células epiteliales derivadas de tejido de folículo piloso y células mesenquimales derivadas de tejido de folículo piloso de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 7 de la presente invención e imágenes de tinción del 14º día del folículo piloso por el trasplante de la cápsula subrenal del folículo piloso reconstituido.

Mejor modo de realizar la invención

45 Un método *in vitro* de producción de un diente de la presente invención incluye: posicionar una primera masa celular que contiene sustancialmente únicamente una de las células mesenquimales o células epiteliales en la que al menos una de las células mesenquimales o las células epiteliales se obtiene a partir de un germen dentario, y una segunda masa celular que contiene sustancialmente únicamente la otra de las células mesenquimales o las células epiteliales, en el interior de un vehículo de soporte y en contacto entre sí (proceso de emplazamiento); y cultivar la primera y segunda masas celulares que se han mencionado anteriormente en el interior del vehículo de soporte que se ha mencionado anteriormente (proceso de cultivo).

55 En el presente método de producción de un diente, puesto que las células mesenquimales y las células epiteliales, obteniéndose al menos una de las células mesenquimales o las células epiteliales de un germen dentario, se cultivan como masas celulares en un vehículo de soporte mientras que están en contacto entre sí, la interacción entre las células puede realizarse eficazmente debido al estado de estrecho contacto entre las mismas y puede producirse un diente que tiene un emplazamiento celular específico para los dientes, en el que hay dentina en el interior y esmalte en el exterior.

En la presente invención, el término "diente" se refiere a un tejido que tiene una capa de dentina en el interior y una capa de esmalte exterior de forma contigua, y preferiblemente a un tejido que tiene estas estructuras estratificadas y también una direccionalidad que tiene una corona y una raíz. Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente la dentina y el esmalte morfológicamente por la tinción de tejidos y similares. Además, el esmalte se puede identificar por la presencia de ameloblastos, y la presencia de ameloblastos puede confirmarse por la presencia de amelogenina. Por otro lado, la dentina se puede identificar por la presencia de odontoblastos, y la presencia de odontoblastos puede confirmarse por la presencia de sialoproteína de dentina. La presencia de amelogenina y sialoproteína de dentina se puede confirmar fácilmente por un método ya conocido en la técnica; por ejemplo, hibridación *in situ*, tinción de anticuerpos o similares.

Además, la direccionalidad de un diente puede identificarse por el emplazamiento de una corona y la raíz. La corona y la raíz se pueden confirmar en base a la forma visualmente observada y la tinción tisular.

Además, en la presente invención, la expresión "tejido periodontal" se refiere a un hueso alveolar y una membrana periodontal formados principalmente en la capa exterior de un diente. El hueso alveolar y la membrana periodontal pueden ser fácilmente identificados morfológicamente por los expertos en la técnica mediante tinción tisular o similares.

Además, en la presente invención, la expresión "células mesenquimales" se refiere a células derivadas de tejido mesenquimal y "células epiteliales" se refiere a células derivadas de tejido epitelial.

En la presente invención, la expresiones "germen dentario" y "brote dentario" son expresiones utilizadas para referirse específicamente al germen dentario y el brote dentario que son distinguibles de otro tejido basado en la fase de desarrollo que se describe más adelante. En este caso, "germen dentario" se refiere a un embrión en fase inicial de un diente, que está destinado a convertirse en un diente en el futuro, y al tejido del estadio de brote al estadio de campana en las fases de desarrollo típicos de un diente y, específicamente, al tejido en el que no se identifica ninguna acumulación de dentina y esmalte, que son las características de los dientes como un tejido duro. Un "brote dentario" se refiere a un tejido en cuanto a la transición de las fases del "germen dentario" que se usa en la presente invención, y a un tejido entre la fase en la que se inicia la acumulación de dentina y esmalte, que son las características del tejido duro de un diente, y la fase antes de que el diente germine de la encía para manifestar las funciones típicas del diente.

Un germen dentario, como se muestra en la figura 1, se desarrolla a través de cada fase de un estadio de brote, un estadio de casquete, un estadio de campana temprano y un estadio de campana tardío en el proceso ontogénico. En el estadio de brote, las células epiteliales se invaginan para envolverse alrededor de las células mesenquimales (véase (A) y (B) de la figura 1), y la porción de células epiteliales se convierte en el esmalte exterior y la porción de las células mesenquimales comienza a formar la dentina internamente (véase (C) y (D) de la figura 1) según se mueve al estadio de campana temprano y el estadio de campana tardío. Por lo tanto, se forma un germen dentario por la interacción entre las células epiteliales y las células mesenquimales.

Las células mesenquimales y las células epiteliales en la presente invención pueden ser aquellas en las fases del estadio de brote que se ha mencionado anteriormente al estadio de campana tardío, donde se forma, o puede formarse, un germen dentario (en lo sucesivo en el presente documento, simplemente denominado como un "germen dentario"), y desde el punto de vista del nivel de inmadurez y la homogeneidad en las fases de diferenciación de las células, es preferible que estén en los estadios del estadio de brote al estadio de casquete.

Además, la expresión "masa celular" se refiere a un estado en el que las células están estrechamente empaquetadas y puede referirse a la condición del tejido o la condición de las células individuales. Además, la expresión "que contiene sustancialmente" significa que cualquier otra cosa que no sean las células diana se excluye en la mayor medida posible. Dado que cada masa celular puede ser un tejido en sí o una parte del mismo, o una masa de células individuales, una cualquiera de las masas de células puede ser una masa celular constituida por células individuales o ambas de las masas celulares pueden ser masas celulares constituidas por células individuales; sin embargo, a fin de lograr eficazmente la reconstrucción de tejido de acuerdo con la presente invención, es preferible que ambas masas celulares estén constituidas por células individuales.

Una primera masa celular o una segunda masa celular pueden ser células epiteliales o células mesenquimales, y el número de células que constituyen la masa celular puede variar dependiendo de la especie animal, y del tipo, dureza y tamaño del vehículo de soporte, pero puede ser generalmente de 10^1 a 10^8 células por masa celular, y

preferiblemente de 10^3 a 10^8 células por masa celular.

En el proceso de posicionamiento, una primera masa celular y una segunda masa celular se sitúan en el interior de un vehículo de soporte en contacto entre sí.

5

En el proceso de posicionamiento del método de producción de la presente invención, dado que la primera y segunda masas celulares que se han mencionado anteriormente se sitúan en el interior de un vehículo de soporte que puede mantener el estado de contacto de las células, las células que constituyen cada masa celular no se mezclan con las células que constituyen la otra masa celular. Por lo tanto, en el proceso de posicionamiento, cada

10

masa celular se sitúa sin mezclarse entre sí, y se forma una superficie límite entre las masas celulares. Tal modo de posicionamiento se expresa adecuadamente como "compartimentación" en la presente memoria descriptiva.

En este caso, una primera masa celular y una segunda masa celular se preparan en procesos de preparación independientes (primer proceso de preparación de células y segundo proceso de preparación de células), de manera

15

que cada una de las masas celulares pueda constituirse sustancialmente por células mesenquimales o células epiteliales.

Al menos una cualquiera de las células mesenquimales o las células epiteliales usadas en el presente método de producción puede derivarse de un germen dentario para reproducir el emplazamiento celular *in vivo* para formar un

20

diente que tenga una estructura y direccionalidad específicas; sin embargo, con el fin de asegurar la producción dentaria, mucho más preferiblemente, tanto las células mesenquimales como las células epiteliales se obtienen a partir de un germen dentario.

Los ejemplos de células mesenquimales derivadas de otros que no sean un germen dentario incluyen células

25

derivadas de otros tejidos mesenquimales *in vivo*; preferiblemente, células de médula ósea, incluyendo células no sanguíneas, o células madre mesenquimáticas; más preferiblemente, células mesenquimales en la cavidad oral y células de la médula ósea en el interior del hueso de la mandíbula, y células mesenquimales derivadas de células de la cresta neural craneal; y células precursoras mesenquimatosas, que pueden generar las células mesenquimales anteriormente mencionadas, células madre de las mismas, y similares.

30

Además, los ejemplos de las células epiteliales derivadas de tejidos distintos de un germen dentario incluyen células derivadas de otros tejidos epiteliales *in vivo*; preferentemente, células epiteliales de la piel, membrana mucosa o

35

enciá en la cavidad oral; y más preferiblemente, células precursoras epiteliales inmaduras que pueden producir células epiteliales diferenciadas, por ejemplo, células epiteliales queratinizadas o paraqueratinizadas de la piel y la membrana mucosa; por ejemplo, células epiteliales no queratinizadas y las células madre de las mismas, y similares.

El germen dentario y otros tejidos pueden recogerse del hueso de la mandíbula de diversos animales, tales como mamíferos primates, tales como seres humanos y monos; ungulados, tales como cerdos, vacas y caballos; pequeños mamíferos roedores, tales como ratones, ratas y conejos. En la recogida del germen dentario y el tejido,

40

las condiciones utilizadas generalmente en la recogida de tejido pueden aplicarse sin modificación, y el germen dentario y el tejido pueden extraerse en condiciones estériles y almacenarse en una solución conservante apropiada. Además, los ejemplos de un germen dentario humano incluyen un germen dentario fetal, así como el tercer molar, o la denominada muela del juicio, pero es preferible utilizar el germen dentario de una muela del juicio desde el punto de vista de la utilización de tejidos autógenos.

45

La preparación de células mesenquimales y células epiteliales a partir de tal germen dentario se inicia mediante la separación de un germen dentario, que se ha aislado del tejido circundante, en un tejido mesenquimal de germen dentario y un tejido epitelial de germen dentario de acuerdo con las respectivas formas de los mismos. Los tejidos de germen dentario se pueden separar fácilmente por corte o desgarrar usando tijeras de disección, pinzas o similares,

50

ya que es posible identificar los tejidos de germen dentario estructuralmente bajo un microscopio. Además, la separación del tejido mesenquimatoso de germen dentario y el tejido epitelial de germen dentario del germen dentario se puede hacer fácilmente mediante corte o rasgado utilizando agujas de inyección, agujas de tungsteno, pinzas o similares, de acuerdo con las respectivas formas de los mismos.

55

Preferiblemente, pueden usarse fácilmente enzimas para separar las células de germen dentario del tejido circundante y/o para separar un tejido epitelial y un tejido mesenquimatoso de un tejido de germen dentario. Los ejemplos de las enzimas usadas en tales aplicaciones incluyen dispasa, colagenasa, tripsina y similares.

Las células mesenquimales y las células epiteliales se pueden preparar en un único estado celular a partir de un

tejido mesenquimal y un tejido epitelial, respectivamente. En el proceso de preparación, pueden usarse enzimas para hacer que las células sean fácilmente dispersables como células individuales. Los ejemplos de tales enzimas incluyen dispasa, colagenasa, tripsina y similares. En este caso, para la separación de las células epiteliales del tejido epitelial, es preferible realizar el tratamiento con tripsina y DNasa tratamiento después del tratamiento con colagenasa. Por otra parte, para la separación de las células mesenquimales del tejido mesenquimal, es preferible realizar un tratamiento con colagenasa y un tratamiento con tripsina simultáneamente, y por último, realizar un tratamiento con DNasa. En este caso, el tratamiento con DNasa se realiza con el fin de evitar una disminución en la cantidad de células recuperadas resultantes de la agregación celular causada por el ADN liberado en la solución cuando se lisa la membrana celular, después de que algunas de las células se dañen por los tratamientos enzimáticos.

Además, las células mesenquimales y células epiteliales pueden ser aquellas que se han sometido a un cultivo preliminar antes del proceso de posicionamiento con el fin de obtener un número suficientemente grande de cada clase de las células. En el cultivo de células mesenquimales y células epiteliales, las condiciones habituales, tales como la temperatura, que se usan en el cultivo de células animales pueden aplicarse sin modificación.

Como medio utilizado en el cultivo, puede usarse un medio utilizado generalmente para el cultivo celular animal, tal como medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Puede añadirse suero para promover la proliferación celular, o como alternativas al suero, se pueden añadir factores de crecimiento celular tales como FGF, EGF, PDGF y similares, o componentes de suero ya conocidos, tales como transferrina. Además, cuando se añade suero, la concentración del suero puede cambiarse apropiadamente dependiendo de las condiciones de cultivo, pero por lo general puede ser del 10 %. Para el cultivo celular, pueden aplicarse las condiciones de cultivo usadas generalmente en el cultivo, tales como el cultivo en una incubadora en una concentración de CO₂ al 5 % a 37 °C. Además, pueden añadirse antibióticos, tal como estreptomycin, según sea apropiado.

Como un vehículo de soporte utilizado en la presente invención, puede usarse un vehículo de soporte en el que las células pueden ser cultivadas, y es preferible una mezcla con el medio de cultivo que se ha mencionado anteriormente. Los ejemplos de tales vehículos de soporte incluyen colágeno, fibrina, laminina, una mezcla de matriz extra-celular, ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), copolímero de ácido láctico/ácido glicólico (PLGA), Cellmatrix (nombre comercial), Mebiol Gel (nombre comercial), y Matrigel (nombre comercial). Estos vehículos de soporte pueden ser de una dureza que prácticamente puede mantener la ubicación aproximada en la que se colocan las células en el interior de los mismos, y los ejemplos de los mismos incluyen vehículos de tipo gel, de tipo de fibra, y de tipo sólido. En este caso, el nivel de dureza que puede mantener la ubicación de las células puede ser el nivel de dureza generalmente aplicado en un cultivo tridimensional; en otras palabras, un nivel de dureza que no inhiba la hipertrofia de las células debido a la proliferación mientras que se mantiene el posicionamiento de las células, y el nivel de dureza se determina fácilmente. Por ejemplo, en el caso del colágeno, el uso a una concentración final de 2,4 mg/ml proporciona un nivel apropiado de dureza.

Además, en este caso, el vehículo de soporte puede ser de un espesor suficiente para que la primera y segunda masas de células crezcan en el interior del vehículo y se ajusta apropiadamente en base al tamaño de los tejidos diana.

Además, el vehículo de soporte puede ser uno que pueda mantener el estado de contacto entre las células. El "estado de contacto" al que se hace referencia en el presente documento es preferiblemente un estado de alta densidad con el fin de garantizar la interacción celular dentro de cada masa de células o entre las masas celulares.

Un estado de alta densidad se refiere a una densidad similar a la del momento en el que el tejido está constituido tal como, en el caso de las masas de células, 5×10^7 a 1×10^9 /ml en el momento del emplazamiento celular, preferiblemente 1×10^8 a 1×10^9 /ml para asegurar la interacción celular sin sacrificar la actividad celular, y mucho más preferiblemente 2×10^8 a 8×10^8 /ml. Con el fin de preparar una masa de células a tal densidad celular, es preferible agregar las células por centrifugación y haber precipitado éstas, ya que esto permite convenientemente una alta densidad sin sacrificar la actividad celular. La centrifugación se puede realizar a una velocidad de revolución equivalente a una fuerza centrífuga de 300 a $1.200 \times g$, que no impedirá la supervivencia celular, y preferiblemente de 500 a $1000 \times g$, durante 3 a 10 minutos. La centrifugación a menos de $300 \times g$ puede dar lugar a una precipitación celular insuficiente y la densidad celular puede llegar a ser baja, mientras que la centrifugación a más de $1200 \times g$ puede conducir a daño celular y, por lo tanto, ninguno de estos casos es preferible.

Cuando las células de alta densidad se preparan por centrifugación, centrifugación se realiza generalmente después de preparar una suspensión de células individuales en recipientes tales como tubos utilizados para la centrifugación

de células, y el sobrenadante se elimina en la mayor medida posible, dejando a las células como el precipitado. Es preferible que los recipientes, tales como tubos estén revestidos de silicio desde el punto de vista de eliminar por completo el sobrenadante.

- 5 Cuando se preparan precipitados por centrifugación, los precipitados se pueden colocar directamente en el interior del vehículo de soporte. Aquí, los componentes distintos de las células diana (por ejemplo, una solución de cultivo, una solución de tampón, el vehículo de soporte, y similares) son, preferiblemente, igual a o menor en volumen que las células, y mucho más preferiblemente, se excluyen los componentes distintos de las células diana. En tal masa celular de alta densidad, las células están en estrecho contacto entre sí y la interacción entre las células puede
10 conseguirse de manera eficaz.

- Al usarse en un estado de tejido, es preferible eliminar los componentes distintos de las células diana, tales como tejidos conectivos, realizando un tratamiento enzimático o similar. Cuando hay muchos componentes distintos de las células diana, por ejemplo, cuando el volumen de los otros componentes es igual o mayor que el de las células, la
15 interacción entre las células no puede conseguirse de manera suficiente, y esto no es preferible.

- Además, es más preferible cuando una primera masa de células y una segunda masa de células están en contacto muy estrecho, y es especialmente preferible posicionar la segunda masa de células para presionar contra la primera masa celular. Además, abarcar los alrededores de la primera masa celular y la segunda masa celular con una
20 solución de cultivo o sólido que no inhibe la permeación de oxígeno es también eficaz en la toma de contacto entre las masas celulares más cercanas, y también es preferible añadir y posicionar una suspensión celular a alta densidad en una solución con una viscosidad diferente para solidificar la solución tal cual, ya que el contacto celular se puede mantener fácilmente de esta manera. Aquí, es preferible poner el nudo del esmalte de un tejido epitelial de germen dentario en contacto con la primera masa celular cuando la primera masa celular es la masa de células
25 individuales de células mesenquimales de germen dentario y la segunda masa de células es un tejido epitelial de germen dentario, pero la invención no se limita a esto.

- Cuando el vehículo de soporte está en un estado de gel, un estado en solución o similares, el proceso de solidificación por el cual se solidifica un vehículo de soporte puede disponerse de manera que siga después del
30 proceso de posicionamiento. Las células situadas en el interior del vehículo de soporte se pueden fijar en el interior del vehículo de soporte por el proceso de solidificación. Para la solidificación del vehículo de soporte, las condiciones usadas generalmente para la solidificación de los vehículos de soporte pueden aplicarse sin modificación. Por ejemplo, cuando se utilizan compuestos solidificables tales como el colágeno para el vehículo de soporte, se pueden solidificar en condiciones generalmente aplicadas, por ejemplo, manteniéndose todavía durante
35 varios minutos a varias decenas de minutos a la temperatura del cultivo. De esta manera, la unión entre las células en el interior del vehículo de soporte puede ser fija y robusta.

- En el proceso de cultivo del método de producción de la presente invención, una primera masa celular y una segunda masa celular se cultivan en el interior del vehículo de soporte. En este proceso de cultivo, la interacción
40 entre las células se realiza eficazmente por la primera masa celular y la segunda masa celular que están en estrecho contacto entre sí, para reconstituir un tejido, es decir, un diente.

- El proceso de cultivo se puede realizar de tal manera que el estado de contacto entre la primera masa celular y la segunda masa celular se mantenga por el vehículo de soporte y el proceso puede ser un cultivo en un vehículo de
45 soporte que simplemente tiene la primera y segunda masas celulares, o un cultivo en presencia de otras células de animales.

- El período de cultivo varía en función del número de células colocadas en el vehículo de soporte y el estado de la masa celular y, además, en las condiciones en que se realiza el proceso de cultivo; sin embargo, por lo general tarda
50 de 1 a 300 días, y preferiblemente de 1 a 120 días, en formar un diente que tenga esmalte en el exterior y dentina en el interior, y preferiblemente de 1 a 60 días desde el punto de vista de proporcionar resultados rápidos. Además, típicamente tarda de 1 a 300 días, y preferiblemente de 1 a 60 días, en formar un diente que tenga tejido periodontal.

- Cuando el cultivo se realiza sólo en el vehículo de soporte, el cultivo se puede realizar en las condiciones generales
55 usadas para el cultivo de células animales. Aquí, las condiciones de cultivo usadas generalmente para células animales pueden aplicarse sin modificación, y las condiciones que se han mencionado anteriormente se pueden aplicar sin modificación. Además, el suero derivado de mamíferos y diversos factores celulares que se sabe que es eficaz en la proliferación y diferenciación de estas células, se puede añadir al cultivo. Los ejemplos de estos factores celulares incluyen FGF y BMP.

Además, es preferible usar el cultivo de órganos desde la perspectiva del intercambio de gases y el suministro de nutrientes para los tejidos y las masas celulares. En el cultivo de órganos, por lo general, el cultivo se realiza haciendo flotar una membrana porosa en un medio de cultivo adecuado para la proliferación de las células animales y poniendo las masas celulares embebidas en un vehículo de soporte en la membrana. La membrana porosa usada en el presente documento es, preferiblemente, una membrana que tiene muchos poros de 0,3 a 5 μm de diámetro y los ejemplos específicos incluyen un Cell Culture Insert (nombre comercial) y un filtro Isopore (nombre comercial).

La realización del cultivo en presencia de otras células de animales es preferible porque un diente que tiene un emplazamiento celular específico se puede formar en la fase temprana en respuesta a las acciones de diversas citocinas y similares, a partir de células animales. Tal cultivo en presencia de otras células de animales puede realizarse *ex vivo* usando células aisladas y células cultivadas.

Además, es especialmente preferible realizar un cultivo *in vivo* (diferente de la presente invención) mediante el trasplante del vehículo de soporte que tiene la primera y segunda masas celulares en un cuerpo vivo, ya que un diente y/o un tejido periodontal se puede formar en una fase temprana. En este caso, la primera y la segunda masas celulares se trasplantan con el vehículo de soporte en el cuerpo vivo.

Los animales que se pueden utilizar para esta solicitud incluyen, preferiblemente, mamíferos, por ejemplo, seres humanos, cerdos, ratones y similares, y más preferiblemente animales procedentes de la misma especie que la del tejido de germen dentario. Cuando se trasplanta un tejido de germen dentario humano, es preferible utilizar un ser humano o de mamíferos distintos de seres humanos que han sido alterados para ser inmunodeficientes. En cuanto a los sitios en un cuerpo vivo adecuados para tal crecimiento *in vivo*, son preferibles un trasplante de la cápsula subrenal, mesentérico, y subcutáneo para el trasplante con el fin de generar órganos o tejidos de las células animales lo más normalmente posible.

El período de crecimiento de acuerdo con el trasplante varía dependiendo del tamaño del explante en el momento del trasplante y el tamaño del diente que se va a producir, pero es típicamente de 3 a 400 días. Por ejemplo, el período de trasplante de la cápsula subrenal es preferiblemente de 7 a 60 días desde el punto de vista de la regeneración dentaria y el tamaño del diente que se va a producir en el lugar del trasplante, aunque varía dependiendo del tamaño del explante a trasplantar y el tamaño del diente a regenerar.

El cultivo *ex vivo* (precultivo) puede realizarse antes del trasplante al cuerpo vivo. El precultivo es preferible ya que los enlaces entre las células y el enlace entre la primera y la segunda masas celulares pueden hacerse más fuerte para hacer que la interacción entre las células sea más fuerte. Como resultado, el período de crecimiento total se puede acortar.

El período de precultivo puede ser corto o largo. Es deseable tener un período más largo, por ejemplo, 3 días o más, y preferiblemente de 7 días o más, ya que un brote dentario puede producirse a partir de un germen dentario y, por lo tanto, el período hasta que un diente se forma después del trasplante se puede acortar. El período de precultivo, por ejemplo, del cultivo de órganos para trasplante debajo de una cápsula subrenal, es preferiblemente de 1 a 7 días con el fin de regenerar eficazmente un diente.

Un diente producido de acuerdo con el método de producción de la presente invención tiene un emplazamiento celular específico del diente (estructura) que tiene dentina en el interior y esmalte en el exterior, y preferiblemente tiene direccionalidad, es decir, tiene una punta (corona) y una raíz de un diente. Al tener al menos este emplazamiento celular específico, y al tener preferiblemente direccionalidad además del emplazamiento celular, las funciones de un diente pueden manifestarse. Por lo tanto, puede usarse ampliamente un diente de este tipo extensamente como un reemplazo de un diente. Particularmente, cuando se usan las células mesenquimales y las células epiteliales derivadas de un germen dentario autógeno, pueden evitarse los problemas causados por el rechazo. Generalmente, también es posible evitar los problemas causados por el rechazo cuando las células se derivan del germen dentario de otro ser humano que tiene un antígeno de trasplante correspondiente.

Además, en la presente invención, es posible formar el tejido periodontal, además del propio diente, tales como el hueso alveolar y la membrana periodontal, que soportan y estabilizan los dientes en el hueso de la mandíbula, extendiendo el período de cultivo. Como resultado, puede proporcionarse un diente viable después del trasplante.

Es decir, el método de producción de tejido periodontal de la presente invención se caracteriza por que contiene el proceso de cultivo que se ha mencionado anteriormente como una etapa para el cultivo de la primera y segunda

masas celulares que se han mencionado anteriormente en el interior de un vehículo de soporte hasta que pueden obtenerse un diente y un tejido periodontal contiguo al diente (proceso de cultivo), y que contiene además una etapa para aislar el tejido periodontal obtenido por el cultivo que se ha mencionado anteriormente.

- 5 En este método, un tejido periodontal puede estar formado de forma contigua al diente mediante la extensión del periodo de cultivo hasta que se obtiene el tejido periodontal, y el tejido periodontal puede obtenerse en aislamiento separándolo del diente. El aislamiento del tejido periodontal se puede realizar de acuerdo con cualquier método, en el que el tejido periodontal formado durante el proceso de cultivo se puede separar de un diente, por ejemplo, separación por pinzas o similares, digestión parcial por enzimas, o similar.

10

Además, cualquier cosa descrita en el método de producción de un diente que se ha mencionado anteriormente se puede aplicar al presente método de producción de un tejido periodontal, siempre que el período de cultivo no se limite.

- 15 El diente y el tejido periodontal obtenidos por el método de producción de un diente y el método de producción de tejido periodontal que se han mencionado anteriormente de la presente invención se pueden utilizar como una herramienta de investigación eficaz para la producción de tejido en relación con los dientes en el futuro ya que, además de usarse como un explante, pueden aplicarse a estudios de investigación de los procesos de desarrollo de los dientes.

20

Además, cuando el diente o tejido periodontal obtenido se utiliza como un explante, el proceso de cultivo de acuerdo con el método de producción se realiza preferiblemente en un cultivo de órganos en el que no hay contacto con otras células de animales y todo el procedimiento se puede procesar *in vitro*.

- 25 Un conjunto de dientes de la presente invención es un conjunto de dientes que tiene un emplazamiento celular específico del diente obtenido por el método de producción de un diente que se ha mencionado anteriormente.

Dado que tal conjunto de dientes está constituido por una pluralidad de dientes que tienen un emplazamiento celular específico del diente, cada diente individual se puede separar del conjunto de los dientes y usarse como un explante de un único diente, como se describe a continuación. Por lo tanto, en el método de producción de un diente de la presente invención, cuando se produce una pluralidad de dientes simultáneamente, los dientes pueden proporcionarse como un conjunto de dientes constituido por una pluralidad de dientes. Como resultado, pueden producirse de forma eficiente dientes para explantes.

30

- 35 El conjunto de dientes se puede obtener fácilmente mediante la aplicación del método de producción de un diente que se ha mencionado anteriormente sin modificación. En particular, en el primer y segundo procesos de preparación de células que se han mencionado anteriormente, cada una de una primera y una segunda masa celular se prepara por separado y después se sitúan en el interior de un vehículo de soporte en contacto entre sí en el proceso de emplazamiento y, por lo tanto, puede formarse fácilmente una pluralidad de dientes a partir de un grupo de células que normalmente forma solamente un único diente.

40

En el método de producción de un conjunto de dientes, es preferible que ambas de una primera y una segunda masas celulares estén constituidas por células individuales para facilitar la reinducción de gérmenes dentarios para producir una pluralidad de dientes. Además, el proceso de cultivo puede ser un cultivo de órgano o un cultivo de cápsula subrenal como se ha mencionado anteriormente, y cuando el diente obtenido se usa como un explante, es preferible realizar un cultivo de órgano en el que no hay contacto con otras células de animales y todo el procedimiento puede procesarse *in vitro*.

45

Además, un método de trasplante de diente se describe en la presente invención. Este método de trasplante incluye: un proceso para obtener el conjunto de dientes que se ha mencionado anteriormente; un proceso en el que cada diente se separa de un conjunto de dientes; y un proceso en el que un diente separado se alinea para tener la misma direccionalidad que otros dientes en el sitio de trasplante, y se trasplanta.

50

De este modo, se puede obtener de forma simultánea una pluralidad de dientes que tiene un emplazamiento celular específico y direccionalidad, y el trasplante de dientes puede realizarse de manera eficiente.

55

El diente de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a los tratamientos o procedimientos para la pérdida de dientes causada por diversos síntomas acompañados por la pérdida o daño de los dientes: por ejemplo, caries dental, periodontitis marginal (piorrea alveolar), y enfermedades periodontales, rotura del diente o arrancamiento

causado por accidentes, y similares.

En otras palabras, un método de tratamiento descrito en el presente documento incluye el trasplante del diente y/o el tejido periodontal obtenido por el método de producción de la presente invención en el sitio de la pérdida y/o daños de los dientes. De esta manera, los síntomas que se han mencionado anteriormente en el sitio de la pérdida y/o daños dentales pueden tratarse y/o aliviarse.

Otro método de tratamiento descrito en el presente documento incluye la realización de sólo el proceso de cultivo de la presente invención, o realizar el proceso de posicionamiento y el proceso de cultivo en el sitio de la pérdida y/o daño dental. En este caso, el tejido circundante en el sitio de la pérdida y/o daño dental en sí se puede aplicar como un vehículo de soporte, además de los vehículos de soporte que se han mencionado anteriormente. Por lo tanto, el sitio de la pérdida y/o daño dental puede tratarse más rápido por citocinas y similares, de los tejidos circundantes en el cuerpo vivo.

En la presente invención, ya que el tejido se puede reconstituir de manera eficaz por una interacción entre las células mesenquimales y células epiteliales, también puede proporcionarse un método *in vitro* de producción de folículos pilosos que están contruidos por una interacción entre las células mesenquimales y las células epiteliales.

En otras palabras, el método de producción de un tejido de la presente invención es un método de producción de folículos pilosos contruidos por una interacción entre las células mesenquimales y las células epiteliales, e incluye: posicionar una primera masa celular que contiene sustancialmente únicamente una de las células mesenquimales o células epiteliales y una segunda masa celular que contiene sustancialmente únicamente la otra de las células mesenquimales o las células epiteliales en el interior de un vehículo de soporte en contacto entre sí; y cultivar la primera y segunda masas celulares que se han mencionado anteriormente en el interior del vehículo de soporte que se ha mencionado anteriormente.

Además, los elementos descritos en el método de producción de un diente que se ha mencionado anteriormente se pueden aplicar de manera similar al presente método de producción de folículos pilosos, a menos que se indique otra cosa.

Como tejidos producidos por el presente método de producción de tejido, son relevantes los contruidos por la interacción entre las células mesenquimales y células epiteliales, y los ejemplos de estos incluyen un pelo, riñón (distinto de la invención), pulmón (no forma parte de la invención), hígado (no forma parte de la invención) o similares, además del diente que se ha mencionado anteriormente, y puede incluir todo el tejido o una parte del mismo.

En este caso, es preferible que al menos una de las células mesenquimales y las células epiteliales se obtenida a partir del tejido diana. De esta manera, un tejido se puede formar fácilmente mediante el uso de células que ya han sido dirigidas al tejido diana. Además, con el fin de producir un tejido diana de manera más fiable, es más preferible que ambas de las células mesenquimales y las células epiteliales se obtengan a partir del tejido diana.

Los ejemplos de tejidos utilizados para preparar una masa celular constituida respectivamente por células mesenquimales o células epiteliales incluyen: en el caso de un diente, un germen de diente y las células de la pulpa dental, células de la membrana periodontal, y las células epiteliales/mesenquimatosas en la cavidad oral; en el caso de pelo, un folículo piloso original en el proceso de desarrollo y un tejido folículo piloso de un adulto; en el caso de un riñón, un riñón original en el proceso de desarrollo y un tejido de riñón de un adulto (no forma parte de la invención); en el caso de un pulmón, un pulmón original en el proceso de desarrollo y un tejido pulmonar de un adulto (no forma parte de la invención); y en el caso de un hígado, un hígado primordial en el proceso de desarrollo y un tejido hepático de un adulto (no forma parte de la invención).

Con el fin de preparar cada masa celular de estos tejidos, se puede preparar una primera y una segunda masa de células como se ha descrito anteriormente mediante la separación de células mesenquimales y células epiteliales de un tejido, su posicionamiento en el interior de un vehículo de soporte, y el cultivo y/o el trasplante como se ha descrito anteriormente.

De esta manera, como con el diente que se ha mencionado anteriormente, puede obtenerse un tejido que tiene un emplazamiento celular específico para el tejido diana.

Los siguientes son explicaciones de los Ejemplos de la presente invención, pero la presente invención no se limita a

estos. "%" como se usa en los Ejemplos, se basa en el peso (masa), a menos que se indique otra cosa.

Ejemplos

5 [Ejemplos 1 a 3 y Ejemplos Comparativos 1 a 4]

(1) Preparación de células epiteliales de germen dentario y células mesenquimales de germen dentario

Se reconstruyó un germen dentario para formar un diente. Se usaron ratones como el modelo para este experimento.

Un tejido de germen dentario de un incisivo mandibular se extirpó de un embrión, que tenía una edad embrionaria de 14,5 días, de un ratón C57BL/6N (adquirido en CLEA Japan, Inc.) o un C57BL/6-TgN (act-EGFP) OsbC14-Y01-FM131 (ratón GFP: RIKEN Bioresource Center) que es un ratón transgénico de proteína verde fluorescente (EGFP), mediante el método convencional bajo un microscopio. El tejido de germen dentario de incisivo mandibular se lavó con una solución de tampón fosfato (PBS (-)) que no contenía Ca^{2+} ni Mg^{2+} , se trató con una solución enzimática, en la que se añadió Dispasa II (Roche, Mannheim, Alemania) a PBS (-) a una concentración final de 1,2 U/ml, a temperatura ambiente durante 12,5 minutos, y después se lavó tres veces con DMEM (Sigma, St. Louis, MO) al que se le había añadido un 10 % de FCS (JRH Biosciences, Lenexa, KS). Además, se añadió una solución de DNasa I (Takara, Shiga, Japón) para hacer la concentración final 70 U/ml y el tejido de germen dentario se dispersó, y los tejidos epiteliales de germen dentario y los tejidos mesenquimales de germen dentario se separaron quirúrgicamente usando una aguja de inyección de 25G (Terumo, Tokio, Japón).

Para las células epiteliales de germen dentario, el tejido epitelial de germen dentario que se ha obtenido anteriormente se lavó tres veces con PBS (-), y se trató dos veces con una solución enzimática, en la que se disolvió Colagenasa I (Worthington, Lakewood, NJ) a una concentración final de 100 U/ml en PBS (-), a 37 °C durante 20 minutos. Las células precipitadas y recuperadas por centrifugación se trataron adicionalmente con tripsina al 0,25 % (Sigma) - PBS (-) a 37 °C durante 5 minutos. Después de lavar las células tres veces con DMEM complementado con FCS al 10 %, a las células se les añadió una solución de DNasa I a una concentración final de 70 U/ml, y se obtuvieron por adición con pipeta células epiteliales de germen dentario individuales.

Por otra parte, para las células mesenquimales de germen dentario, el tejido mesenquimal de germen dentario se lavó tres veces con PBS (-) y se trató con PBS (-) que contenía tripsina al 0,25 % (Sigma) y 50 U/ml de Colagenasa I (Worthington). Se añadieron 70 U/ml de DNasa I (Takara) y se obtuvieron por adición con pipeta células mesenquimales de germen dentario individuales.

(2) Preparación de germen dentario reconstituido

A continuación, un germen dentario se reconstruyó usando células epiteliales de germen dentario y células mesenquimales de germen dentario preparadas como anteriormente.

Se añadieron células epiteliales de germen dentario o células mesenquimales de germen dentario suspendidas con DMEM (Sigma) complementado por FCS al 10 % (JRH Biosciences), en un microtubo de 1,5 ml recubierto con grasa de silicio (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), y las células se recuperaron como precipitados por centrifugación (580 x g). El sobrenadante de la solución de cultivo después de la centrifugación se eliminó en la mayor medida posible, la centrifugación se realizó de nuevo, y la solución de cultivo restante alrededor de los precipitados celulares se eliminó completamente usando una punta GELoader de 0,5 a 20 µl (Eppendorf) mientras que se observó bajo un estereomicroscopio para preparar células para usar en la generación de un germen dentario reconstituido.

Se añadieron por goteo 30 µl de Cellmatrix tipo I-A (Nitta Gelatin, Osaka, Japón) preparada con la solución de cultivo que se ha mencionado anteriormente a una concentración de 2,4 mg/ml sobre una placa de Petri recubierta con grasa de silicio para generar una gota (gota de gel) de solución de colágeno. Se aplicaron a esta solución de 0,2 a 0,3 µl de los precipitados de la centrifugación de las células epiteliales de germen dentario o las células mesenquimales de germen dentario que se han mencionado anteriormente usando una punta de pipeta (Quality Scientific Plastics) de 0,1 a 10 µl para generara agregados celulares como masas celulares.

Esto se explicará con referencia a la figura 2.

El agregado celular 12, que se puso en primer lugar en el interior de la gota de gel 10 usando la punta de pipeta 16,

configura una esfera en el interior de la gota de gel 10 (véase la figura 2 (B)). Cuando se inserta después otro agregado celular 14, el agregado celular esférico 12 se tritura y envuelve el agregado celular 14 en muchos casos (véase la figura 2 (C)). Después, mediante la solidificación de la gota de gel 10, las uniones entre las células se refuerzan.

5

En el presente Ejemplo, se prepararon un agregado celular que contenía células individuales de las células epiteliales o las células mesenquimales, y un tejido parcial que contenía células epiteliales y un tejido parcial que contenía células mesenquimales de un germen dentario, respectivamente, como masas celulares, y se usaron.

10 En el presente Ejemplo, al combinar los gérmenes dentarios reconstituidos obtenidos de un agregado celular y un tejido (Ejemplos 1 y 2), después de transferir el tejido parcial que contenía células epiteliales o células mesenquimales en una gota de gel, una superficie límite del germen dentario de cada tejido se puso en estrecho contacto con un agregado celular generado a partir de células epiteliales o células mesenquimales de germen dentario usando una aguja de tungsteno para generar un germen dentario reconstituido.

15

Además, para el germen dentario reconstituido (Ejemplo 3) usando células epiteliales de germen dentario y células mesenquimales de germen dentario que se hicieron como células individuales, se preparó un agregado celular aplicando las células epiteliales de germen dentario de una manera similar a la anterior para el contacto con el agregado celular de las células mesenquimales de germen dentario preparadas de antemano, y se preparó un germen dentario reconstituido de tal forma que ambos estuvieran en contacto estrecho entre sí.

20

Un germen dentario reconstituido preparado en el interior de una gota de gel se puso en una incubadora de CO₂ durante 10 minutos para solidificar la Cellmatrix tipo I-A (Nitta Gelatin), y un agregado celular junto con el gel circundante como un vehículo de soporte, se transfirieron sobre una membrana de un inserto de cultivo celular en un recipiente de cultivo que se dispuso de tal forma que el inserto de cultivo celular (membrana de PET con un tamaño de poro de 0,4 micrómetros; BD, Franklin Lakes, NJ) estuviese en contacto con DMEM (Sigma) complementado por FCS al 10 % (JRH), y el órgano se cultivó durante 18 a 24 horas. Después del cultivo del órgano, la generación del diente se analizó promoviendo la generación de dientes ectópicos después del trasplante del explante junto con el gen circundante bajo una cápsula subrenal de un ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad, o continuando el cultivo del órgano en el inserto de cultivo celular.

30

Como ejemplos comparativos, cada uno de los siguientes se preparó y se analizó de la misma manera que anteriormente: un explante trasplantado con un tejido de germen dentario completo bajo una cápsula subrenal (Ejemplo Comparativo 1); un explante trasplantado respectivamente con cada uno del tejido epitelial y el tejido mesenquimal separados individualmente de un germen dentario (Ejemplo Comparativo 2); un explante que usa un agregado de baja densidad que contiene una cantidad de una solución de cultivo igual al volumen de las células (Ejemplo Comparativo 3); y un explante formado a partir de un agregado celular en el interior de un vehículo de soporte mezclando las células epiteliales y las células mesenquimales separadas de un germen dentario sin compartimentación entre las células epiteliales y las células mesenquimales (Ejemplo Comparativo 4). Además, en el Ejemplo Comparativo 4, después de mezclar suavemente las células epiteliales y las células mesenquimales a la relación de 1:1, se preparó un agregado celular usado para la generación de un germen dentario reconstituido de la misma manera que en los Ejemplos 1 a 3.

35

40

(3) Análisis histológico

45

En el caso de un trasplante de la cápsula subrenal, un germen dentario reconstituido junto con un tejido renal circundante se extirpó el 7º día o el 14º día después del trasplante, se descalcificó con EDTA al 4,5 % (pH 7,2) durante 24 horas después de fijarse con una solución de paraformaldehído al 4 %- tampón fosfato durante 6 horas, y se incluyó en parafina mediante un método convencional para producir una sección de 10 µm de un germen dentario reconstituido. Para el análisis histológico, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina de acuerdo con un método convencional.

50

Cuando se usó un germen dentario obtenido de un ratón GFP para un germen dentario reconstituido, el germen dentario se descalcificó con EDTA al 4,5 % (pH 7,2) durante 24 horas después de fijarse en una solución al 50 % (p/v) de sacarosa-paraformaldehído al 4 %-tampón fosfato durante 18 horas, se incluyó en un compuesto OCT (Miles Inc., Naperville, IL), y se hicieron secciones de 10 µm con criostato (Leica, Wetzlar, Alemania) a observar bajo un microscopio de fluorescencia (fabricado por Zeiss).

55

Los resultados del cultivo de todo el tejido de germen dentario se muestran en la figura 3 y los resultados del cultivo

de acuerdo con el método de generación de la presente invención se muestran en las figuras 4 a 7.

En el Ejemplo Comparativo 1, todo el germen dentario extirpado se trasplantó bajo una cápsula subrenal. Como se muestra en la figura 3, dado que la interacción entre las células mesenquimales y las células epiteliales que constituyen el germen dentario no se ve afectada, se formaron el esmalte derivado de las células epiteliales y la dentina y la pulpa dental derivadas de las células mesenquimales, y se formó un diente que tenía una punta y una raíz además de esmalte y dentina dispuestos en las posiciones determinadas.

Por otra parte, como se muestra en las figuras 4 a 6, cuando se usó una forma celular individual preparada a partir de un germen dentario de acuerdo con la presente invención, en otras palabras, cuando se reconstitución se realizó combinando células mesenquimales de germen dentario con tejido epitelial de germen dentario (Ejemplo 1, véanse las figuras 4 y 5) y combinando el tejido mesenquimal de germen dentario con las células epiteliales de germen dentario (Ejemplo 2, véase la figura 6), se generó un diente que tenía un emplazamiento celular específico con dentina en el interior y esmalte en el exterior mediante un trasplante de la cápsula subrenal en un periodo de 11 a 14 días. El diente obtenido de esta manera demostró que es posible reconstituir el mismo tipo de diente que el generado normalmente cultivando un germen dentario en su totalidad (figura 3).

Además, como se muestra en la figura 4, con la presente reconstitución y trasplante de la cápsula subrenal, se identificaron fácilmente el esmalte externo, el ameloblasto, la dentina y el odontoblasto el 11^º día después del trasplante. La porción de raíz también fue la misma que la de la generación normal y el hueso alveolar se identificó en la circunferencia externa de la porción de raíz. Además, a partir de la observación temporal, se identificaron fácilmente la dentina y el odontoblasto el 3^{er} día después del trasplante, y había comenzado a formarse una estructura específica de diente en el emplazamiento del tejido. Además, el 7^º día, la acumulación de dentina, odontoblasto y ameloblasto fue evidente, y la generación del diente avanzó a partir de entonces (datos no mostrados).

Además, inmediatamente después del posicionamiento en el interior de una gota de gel, se observó bajo el microscopio que las células que constituían un agregado celular estaban presentes individualmente, y después de un único día de cultivo corto, las células estaban unidas fuertemente y habían cambiado a un tejido cohesivo individual como en el caso de un germen dentario extirpado normal. Esto indicó que el cultivo corto antes del trasplante es eficaz en la formación del diente.

Además, cuando se usaron células mesenquimales obtenidas de un ratón GFP, las células se localizaron en las células de la pulpa dental y los odontoblastos obtenidos de células mesenquimales en el lado interno (figura 5). Por otra parte, cuando se usaron células epiteliales obtenidas de un ratón GFP, las células se localizaron en los ameloblastos en el lado exterior, y las imágenes fluorescentes eran congruentes con las de los tipos de células usados (figura 6). Por lo tanto, era obvio que se realizó la misma interacción celular que en la generación normal y que la reconstitución del tejido se realizó sin sacrificar la direccionalidad de las células durante la generación.

Además, cuando el cultivo de órgano continuó aplicando un trasplante de la cápsula subrenal, se identificaron fácilmente un germen dentario reconstituido que se cultivó en el transcurso temporal desde el comienzo del cultivo, que se volvió gradualmente mayor, la dentina y el odontoblasto el 16^º día después del trasplante, y la formación de una estructura específica de diente se identificó en el emplazamiento tisular (datos no mostrados). Este tipo de construcción por medio del cultivo de órganos se identificó no sólo cuando una o las otras de las células epiteliales y las células mesenquimales se usaron como tejido, pero también cuando se usaron ambas.

Además, cuando se usaron células epiteliales de germen dentario y células mesenquimales de germen dentario (Ejemplo 3), como se muestra en la figura 7, la presencia de dentina y esmalte se confirmó, como cuando únicamente una de las células epiteliales de germen dentario y las células mesenquimales de germen dentario se usó como tejido. Cuando se usaron células epiteliales de germen dentario y células mesenquimales de germen dentario, se observó que la pluralidad de dientes que tenía direccionalidad y estructura se generó con frecuencia a partir de un único germen dentario reconstituido, sugiriendo la posibilidad de generar una pluralidad de dientes separando un brote dentario después de la generación. En particular, cuando las células mesenquimales de germen dentario se situaron en primer lugar en el interior de una gota de gel y después las células epiteliales de germen dentario se situaron para presionar contra las células mesenquimales de germen dentario, la estructura específica, en la que el esmalte y la dentina se pusieron fuera y dentro, respectivamente, se construyó con más precisión y la forma del diente se formó más fácilmente, y se demostró que puede ser ventajoso en la formación de dientes (datos no mostrados).

Además, cuando un germen dentario reconstituido disponiendo células epiteliales y células mesenquimales de acuerdo con la presente invención se cultivó en órgano, se observó con frecuencia la formación de la pluralidad de gérmenes dentarios y/o brotes dentarios. Esto sugiere la posibilidad de generar una pluralidad de dientes a partir de un único germen dentario reconstituido separando quirúrgicamente esta pluralidad de gérmenes dentarios y/o brotes dentarios.

Por otra parte, en el caso del Ejemplo Comparativo 2, cuando se realizó un cultivo con un tejido epitelial en solitario o un tejido mesenquimal en solitario, como se muestra en la figura 8, un diente con la estructura específica que se ha mencionado anteriormente no pudo construirse. Por lo tanto, esto sugiere que el tejido que tiene la estructura específica está reconstituido realizando una interacción celular mediante el método de la presente invención.

Además, en el caso del Ejemplo Comparativo 3, cuando se usó un agregado celular de baja densidad, como se muestra en la figura 9, las células individuales ya se habían dispersado en una gota de gel de colágeno durante el cultivo y la estructura específica del diente no se reconstituyó ni siquiera mediante el trasplante de las células bajo una cápsula subrenal. Esto sugiere que es preferible usar celulares a una densidad lo más alta posible para reconstituir un diente por interacción celular.

Además, en el caso del Ejemplo Comparativo 4, cuando se formó un agregado celular a una alta densidad mezclando las células epiteliales de germen dentario y las células mesenquimales de germen dentario por adelantado en la relación de 1:1 sin compartimentación, como se muestra en la figura 10, no se identificó tejido duro, tal como esmalte ni dentina. Esto sugiere que es importante formar un agregado celular compartimentando la masa de las células epiteliales de germen dentario y la masa de las células mesenquimales de germen dentario, después de preparar por separado las masas respectivas.

25 (4) Confirmación del tejido periodontal

A continuación, se comprobó si un diente formado de acuerdo con el presente método tenía o no tejido periodontal. Se usó hibridación *in situ* como se describe a continuación para confirmar la presencia de tejido periodontal, además de la observación que se ha mencionado anteriormente usando imágenes de tinción de HE.

Un germen dentario reconstituido trasplantado bajo una cápsula subrenal se extirpó el 14^º día después del trasplante, se incluyó en parafina mediante un método convencional, y se cortó en secciones de 10 µm de espesor. La parafina se eliminó impregnando las secciones en una serie de dilución de xileno/etanol. Las secciones se trataron con 10 µg/ml de Proteasa K (Nacalai Tesque, Kyoto, Japón) en PBS (-) durante 3 minutos y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 % (Nacalai Tesque)-tampón fosfato durante 15 minutos. Se trató Triton X-100 al 0,1 % (v/v) (Sigma) en PBS (-) durante 3 minutos y se lavó con PBS (-) durante 3 minutos. Después, se trataron con HCl 0,2 N (Wako) durante 10 minutos y se lavaron con PBS (-) y DEPC (pirocarbonato de dietilo) y agua respectivamente durante 5 minutos cada vez. Después del tratamiento con trietanol amina al 1,5 % (v/v) (Nacalai Tesque), HCl 0,33 N (Wako), y anhídrido acético al 0,25 % (v/v) (Nacalai Tesque) en DEPC y agua durante 10 minutos, las secciones se lavaron dos veces con 2 X SSC durante 10 minutos. Se usó una sonda de periostina (Genbank n.º de acceso NM#015784) marcando con DIG la sección de ADNc obtenida con PCR usando un cebador de sentido (-7; ggctgaagatgttctctc, SEQ NO: 1) y un cebador antisentido (573; gtacattgaaggaataacca, SEQ NO: 2). Se realizó una hibridación *in situ* de acuerdo con un método convencional, se realizó la colorización con un fragmento de Fab anti-DIG-Ap (Roche) y una solución madre de NBT/BCIP (Roche), y el análisis se realizó con un Axio Imager A. 1 (Zeiss) y un AxioCam Mrc5 (Zeiss).

Cuando el tejido periodontal en los Ejemplos que se han mencionado anteriormente se examinó en detalle para determinar la presencia o ausencia de tejido periodontal, se formó hueso alveolar similar al del trasplante de germen dentario normal del Ejemplo Comparativo 1 (véase la figura 3) alrededor del diente el 14^º día después del trasplante en cada uno de los Ejemplos 1 a 3, como se muestra en las figuras 4 a 7.

Además, como se muestra en la figura 11, a pesar de la combinación de células individuales y tejido, se formaron hueso alveolar y membrana periodontal, que eran similares a lo del trasplante de germen dentario normal del Ejemplo Comparativo 1, alrededor del diente obtenido en cada uno de los Ejemplos 1 a 3. Además, cuando se observó el diente del Ejemplo 2, como se muestra en la figura 12, la expresión de ARNm de periostina, que es un gen específico de la membrana periodontal, se identificó en una región en la que la formación de la membrana periodontal se identificó por tinción de HE (lo mismo se identificó en los Ejemplos 1 y 3).

Esto indica que un germen dentario preparado como en los Ejemplos 1 a 3 puede formar tejidos periodontales, tales

como hueso alveolar y membrana periodontal.

[Ejemplos 4 y 5, Ejemplo Comparativo 5]

5 Después de completar el proceso de posicionamiento como se ha descrito anteriormente, el cultivo de órganos comúnmente utilizado en procesos de cultivo se realizó de forma continua durante 14 días para analizar la generación dental. Se usó una combinación de tejido epitelial y células mesenquimales derivadas de un germen dentario en el Ejemplo 4, y se utilizó una combinación de células epiteliales y células mesenquimatosas derivadas de un germen dentario en el Ejemplo 5. Además, el cultivo de órganos que usaba un germen dentario normal se aplicó en el Ejemplo Comparativo 5. Los resultados se muestran en la figura 13.

Como se muestra en la figura 13, tanto en el Ejemplo 4 como 5, el tamaño del germen dentario aumentó según el periodo de cultivo se alargó, y se observó la generación de un diente que tenía una estructura específica aproximadamente igual que la obtenida realizando el trasplante de la cápsula subrenal.

15 Además, tanto en el Ejemplo 4 como 5, los dientes obtenidos del cultivo de órganos formaron un conjunto constituido por una pluralidad de dientes (por ejemplo, seis dientes cuando se usaron células mesenquimales y células epiteliales; figura 13, fila inferior).

20 [Ejemplos 6 y 7, Ejemplo Comparativo 6]

Como se muestra en el Ejemplo 5, un diente obtenido a partir de un germen dentario reconstituido se indujo de nuevo para formar una pluralidad de dientes, a pesar del hecho de que las células mesenquimales y las células epiteliales se prepararon a partir de un único germen dentario reconstituido. El análisis se realizó para observar si cada diente inducido de nuevo simultáneamente por el germen dentario reconstituido puede crecer en un único diente.

(1) Análisis de separación de una pluralidad de gérmenes dentarios generados a partir de gérmenes dentarios reconstituidos y potencial de generación de dientes

30 1) Separación individual y cultivo de órganos de una pluralidad de gérmenes dentarios generados

Un germen dentario reconstituido obtenido de una manera similar a la del Ejemplo 3 se cultivó en órgano durante 2 a 5 días, y se generó una pluralidad de gérmenes dentarios a partir de un único germen dentario reconstituido. Después, del 2º día al 5º día del cultivo de órgano, los gérmenes dentarios individuales se separaron quirúrgicamente del germen dentario reconstituido que había generado una pluralidad de gérmenes dentarios usando una aguja de inyección y pinzas bajo un estereomicroscopio.

Las gotas de gel se prepararon añadiendo por goteo 30 µl de Cellmatrix tipo I-A (Nitta gelatin, Osaka, Japón) sobre una placa de Petri recubierta con grasa de silicio de la misma manera que en el Ejemplo 1. Cada uno de los gérmenes dentarios separados individualmente que se han mencionado anteriormente se puso en el interior de una gota de gel, y se dejó en una incubadora de CO₂ durante 10 minutos para solidificar la Cellmatrix tipo I-A (Nitta Gelatin). Cada uno de los gérmenes dentarios separados individualmente, junto con el gel circundante, que era un vehículo de soporte, se transfirió sobre la membrana de un inserto de cultivo celular en un recipiente de cultivo, en el que el inserto de cultivo celular (membrana de PET de un tamaño de poro de 0,4 micrómetros; BD, Franklin Lakes, NJ) se ajustó para entrar en contacto con DMEM (Sigma) complementado por FCS al 10 % (JRH), y se cultivó en órgano durante 18 a 24 horas.

2) Análisis histológico

50 Después del cultivo, cada uno de los gérmenes dentarios separados individualmente junto con el gel circundante, se trasplantó bajo una cápsula subrenal de un ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad, y los gérmenes dentarios separados individualmente se extirparon el 14º día después del trasplante junto con el tejido de riñón circundante. Después de fijar el tejido con una solución de paraformaldehído al 4 %-tampón fosfato durante 6 horas, el tejido se incluyó en parafina mediante un método convencional para hacer una sección de 10 µm. Para el análisis histológico, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina de acuerdo con un método convencional.

3) Resultados

Los resultados del análisis histológico de los gérmenes dentarios separados, que se trasplantaron bajo una cápsula subrenal que se generará durante 14 días, se muestran en la figura 14. Como se muestra en la figura 14, cada uno de los gérmenes dentarios separados trasplantados se desarrolló en un único diente caracterizado por esmalte, dentina, pulpa dental, una corona y una raíz. Además, en los dientes obtenidos, se observó la presencia de esmalte y dentina en la porción de corona (véase "a" en las filas central e inferior de la figura 14) y una abertura de la raíz en la porción de raíz (véase "b" en la fila central de la figura 14).

Estas observaciones indican que: están presentes ameloblastos y odontoblastos en la porción de corona como en un diente generado normalmente; el diente tiene la misma configuración que la de un diente generado normalmente; y cada diente generado al mismo tiempo como uno de un conjunto de dientes es el mismo que un diente generado normalmente en cuanto al emplazamiento celular y la direccionalidad.

(2) Generación de diente por trasplante de un germen dentario reconstituido en una cavidad oral (no forma parte de la invención)

1) Generación de gérmenes dentarios separados individualmente y dientes separados individualmente

Los gérmenes dentarios separados individualmente se prepararon a partir de un germen dentario reconstituido, a partir del cual se generó una pluralidad de gérmenes dentarios, del 2º día al 5º día del cultivo de órgano como se ha descrito anteriormente. Además, una pluralidad de dientes generados a partir del germen dentario reconstituido, que se trasplantó bajo una cápsula subrenal y se extirpó después de 14 días del trasplante, se separaron quirúrgicamente de forma individual usando una aguja de inyección y unas pinzas bajo un estereomicroscopio.

En el caso de un germen dentario separado individualmente, se preparó una gota de gel mediante la adición por goteo de 30 µl de Cellmatrix de tipo I-A (Nitta gelatin, Osaka, Japón), que se preparó a una concentración de 2,4 mg/ml en la solución de cultivo que se ha mencionado anteriormente, sobre una placa de Petri recubierta por grasa de silicio como se ha descrito anteriormente. El germen dentario separado individualmente que se ha descrito anteriormente se puso en el interior de esta gota de gel, se puso en una incubadora de CO₂ durante 10 minutos para solidificar la Cellmatrix de tipo I-A (Nitta Gelatin). A continuación, el germen dentario separado individualmente junto con el gel circundante como un vehículo de soporte, se transfirió sobre la membrana de un inserto de cultivo celular en un recipiente de cultivo, en el que el inserto de cultivo celular (membrana de PET de un tamaño de poro de 0,4 micrómetros; BD, Franklin Lakes, NJ) se ajustó para estar en contacto con DMEM (Sigma) complementado por FCS al 10 % (JRH), y se cultivó en órgano durante 18 a 24 horas.

Después del cultivo, el gel circundante se eliminó quirúrgicamente con una aguja de inyección y unas pinzas, y el germen dentario separado individualmente se trasplantó en un orificio de extracción de incisivo mandibular de un ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad; y esto se designó como Ejemplo 6. Además, un diente separado individualmente del germen dentario reconstituido que se había trasplantado bajo una cápsula subrenal se trasplantó en un orificio de extracción de incisivo mandibular de un ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad sin incluirse en un gel después de la separación; y esto se designó como Ejemplo 7.

2) Métodos de extracción dental de un incisivo y trasplante en una cavidad oral (no forma parte de la invención).

3 días antes del trasplante en una cavidad oral, a un ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad anestesiado con éter dietílico inhalado se le inyectó por vía intraperitoneal una solución salina fisiológica que contenía 5 mg/ml de pentobarbital sódico a una relación de 200 µl con respecto a cada 20 g de peso corporal. Una mandíbula cerca del sitio de erupción de un incisivo mandibular del ratón, cuyo sentido del dolor se había adormecido, se exfolió con un bisturí y se expuso una punta del incisivo incrustado en el hueso de la mandíbula. Se extrajo un incisivo de la mandíbula usando unas pinzas, la sangre se limpió con algodón absorbente, y el sangrado se detuvo. En aras de la ingestión de alimentos, solamente se extrajo el incisivo mandibular en un lado y recibió alimento triturado para cría cada día.

Un ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad, cuyo diente se había extraído por el método que se ha mencionado anteriormente, se anestesió con éter dietílico inhalado y se inyectó por vía intraperitoneal una solución salina fisiológica que contenía 5 mg/ml de pentobarbital sódico en una relación de 200 µl con respecto a cada 20 g de peso corporal. El ratón, cuyo sentido del dolor se adormiló, se fijó en una mesa de disección, de tal forma que el lado de la mandíbula, del cual se extrajo el diente, estuviera de frente, y la mandíbula se expuso cortando la piel y la capa muscular del lado de la cabeza en el área de la porción de raíz del orificio dejado por el diente extraído. Se hizo un orificio con un diámetro de 1 mm en el caso de un germen dentario separado individualmente y un orificio con un

diámetro de 2 mm en el caso de un diente separado individualmente con un bisturí en la mandíbula que cubría el área de la porción de raíz del orificio dejado por el diente extraído, después el germen dentario separado individualmente o el diente separado individualmente se trasplantó al área de la porción de raíz del orificio dejado por el diente extraído a través del orificio hecho con el bisturí. La orientación del germen dentario separado individualmente o el diente separado individualmente a trasplantar se alineó con la de un diente generado normalmente y también con la direccionalidad del esmalte y la membrana periodontal que se observa en los incisivos mandibulares de ratones adultos. La capa muscular cortada y la piel se suturaron mediante un método convencional. El ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad que había recibido el trasplante en la cavidad oral se alimentó con comida triturada para cría cada día.

Además, el Ejemplo Comparativo 6 se designó como un ejemplo en el que el trasplante no se realizó en un ratón que no había sido trasplantado.

3) Análisis histológico

Las mandíbulas a las que se había trasplantado un germen dentario separado individualmente y un diente separado individualmente se extirparon el 14º día después del trasplante en la cavidad oral. El hueso se descalcificó con ácido fórmico al 22,5 % durante 72 horas después de fijarse con una solución de paraformaldehído al 4 %-tampón fosfato durante 16 horas; después se incluyó en parafina mediante un método convencional para hacer secciones de 10 µm. Se usaron 50 ml de solución de descalcificación para cada dos mandíbulas y toda la cantidad se reemplazó a las 48 horas de la descalcificación. Para el análisis histológico, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina de acuerdo con un método convencional.

Cuando se usó un germen dentario obtenido de un ratón C57BL/6 TgN (act-EGFP) OsbC14-Y01-FM131 para un germen dentario separado individualmente y un diente separado individualmente, se descalcificó con ácido fórmico al 22,5 % durante 72 horas después de fijarse con una solución de paraformaldehído al 4 %-tampón fosfato durante 16 horas, se incluyó en un compuesto OCT (Miles Inc., Naperville, IL) de acuerdo con un método convencional, y se hicieron secciones de 10 µm con criostato (Leica, Wetzlar, Alemania) a observar bajo un microscopio de fluorescencia (Zeiss).

4) Resultados

Las imágenes histológicas el 14º día después de la extracción dental de un ratón en el Ejemplo Comparativo 6, en el que el trasplante no se realizó en el ratón después de la extracción del incisivo, se muestran en la figura 15, y las imágenes histológicas de un germen dentario separado individualmente (Ejemplo 6) y un diente separado individualmente (Ejemplo 7) el 14º día después del trasplante en el orificio dejado por un incisivo extraído, se muestran en las figuras 16 y 17, respectivamente.

Como se muestra en la figura 15, en el ratón no trasplantado del Ejemplo Comparativo 6, únicamente se identifican celulares infiltradas y hueso generado y no se identificó un diente que tuviese tejido duro en un lugar correspondiente al sitio de trasplante en el orificio dejado por el incisivo extraído.

Por otra parte, como se muestra en la figura 16, en el sitio que se ha mencionado anteriormente donde se trasplantó un germen dentario separado individualmente en el Ejemplo 6, se generó un diente que tenía esmalte en el exterior y dentina en el interior. El diente generado tenía una punta y raíz de diente, la direccionalidad de un diente, y la misma estructura que la de un diente generado normalmente.

Además, en el ratón del Ejemplo 7, en el que un diente separado después de la generación debido al trasplante de la cápsula subrenal se trasplantó en un orificio dejado por un diente extraído, como se muestra en la figura 17, se generó un diente que tenía esmalte en el exterior y dentina en el interior en el sitio que se ha mencionado anteriormente. El diente generado tenía una punta y raíz de diente, vasos sanguíneos en el interior de la pulpa dental, así como membrana periodontal y hueso alveolar alrededor del diente, y la misma estructura que la de un diente generado normalmente.

[Ejemplo 8 y el Ejemplo Comparativo 7]

(1) Reconstitución del folículo piloso

Con el fin de demostrar que la tecnología desarrollada en la presente invención es útil en la formación de otros

órganos, además de contribuir a la generación de un germen dentario, se realizó la reconstitución de un folículo piloso. Se usaron ratones como modelos para este experimento.

1) Método de separación de células

5

Un tejido de folículo piloso de un bigote maxilar se extirpó de un embrión de una edad de 14,5 días de un ratón C57BL/6N (adquirido en CLEA Japan, Inc.) o un ratón C57BL/6-TgN (act-EGFP) OshC14-Y01-FM131 (RIKEN Bioresource Center) que es un ratón transgénico de proteína verde fluorescente (EGFP), bajo un microscopio mediante un método convencional. El tejido de folículo piloso del bigote maxilar se lavó con una solución de tampón fosfato (PBS (-)) que no contenía Ca^{2+} ni Mg^{2+} , se trató con una solución enzimática en la que se había añadido Dispasa II (Roche, Mannheim, Alemania) a una concentración final de 1,2 U/ml al PBS (-), a temperatura ambiente durante 60 minutos, y después se lavó tres veces con DMEM (Sigma, St. Louis, MO), a la que se había añadido un 10 % de FCS (JRH Biosciences, Lenexa, KS). Además, se añadió una solución de DNasa I (Takara, Shiga, Japón) para hacer una concentración final de 70 U/ml para dispersar el tejido de folículo piloso, y el tejido epitelial de folículo piloso y el tejido mesenquimal de folículo piloso se separaron quirúrgicamente, usando una aguja de inyección de 25G (Terumo, Tokio, Japón).

Para las células epiteliales de folículo piloso, el tejido epitelial de folículo piloso que se ha obtenido anteriormente se lavó tres veces con PBS (-), y se trató dos veces con una solución enzimática en la que se disolvió Colagenasa I (Worthington, Lakewood, NJ) a una concentración final de 100 U/ml en PBS (-), a 37 °C durante 20 minutos. Las células precipitadas y recuperadas por centrifugación se trataron adicionalmente con tripsina al 0,25 % (Sigma) - PBS (-) a 37 °C durante 5 minutos. Después de lavar las células tres veces con DMEM complementado por FCS al 10 %, a las células se les añadió una solución de DNasa I a una concentración final de 70 U/ml, y se obtuvieron por adición con pipeta células epiteliales de folículo piloso individuales.

25

Por otra parte, para las células mesenquimales de folículo piloso, el tejido mesenquimal de folículo piloso se lavó tres veces con PBS (-) y se trató con PBS (-) que contenía tripsina al 0,25 % (Sigma) y 50 U/ml de Colagenasa I (Worthington). Se añadieron 70 U/ml de DNasa I (Takara) y se obtuvieron por adición con pipeta células mesenquimales de folículo piloso individuales.

30

2) Método de generación de folículo piloso reconstituido

A continuación, las células usadas en la generación de un folículo piloso reconstituido se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usaron las células epiteliales de folículo piloso y las células mesenquimales de folículo piloso que se han preparado anteriormente; se aplicaron de 0,2 a 0,3 μl de cada una de las células a una gota de gel de colágeno para preparar los agregados celulares respectivos; y se generó un folículo piloso reconstituido situando ambos agregados celulares en estrecho contacto entre sí.

3) Trasplante de cápsula subrenal

40

Para el folículo piloso reconstituido generado en un gel, como en el Ejemplo 1, los agregados celulares, junto con el gen circundante como un vehículo de soporte, se transfirieron sobre una membrana de un inserto de cultivo celular en un recipiente de cultivo y se cultivaron en órgano durante 18 a 48 horas. Después del cultivo de órgano, estos se trasplantaron bajo una cápsula subrenal de un ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad para promover el crecimiento de pelo ectópico, y el crecimiento del pelo se analizó.

45

Por otra parte, en el Ejemplo Comparativo 7, se preparó un único agregado celular mezclado dos tipos de células *ex vivo* de la misma manera que en el Ejemplo Comparativo 4, excepto que se usaron las células epiteliales de folículo piloso y las células mesenquimales de folículo piloso, y se trasplantó bajo una cápsula subrenal como en el Ejemplo 8.

50

4) Análisis histológico

En el caso de un trasplante de la cápsula subrenal, un folículo piloso reconstituido se extirpó junto con el tejido de riñón circundante el 14^º día después del trasplante. En el cultivo de órgano, el agregado celular se recuperó el 14^º día del cultivo. Después, el tejido o agregado celular se fijó con una solución de paraformaldehído al 4 %-tampón fosfato durante 6 horas, y se incluyó en parafina mediante un método convencional para hacer secciones de 10 μm . Para el análisis histológico, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina de acuerdo con un método convencional.

55

5) Resultados

Los resultados del trasplante de la cápsula subrenal de un folículo piloso en el mismo tipo de ratón de acuerdo con el Ejemplo 8 se muestran en la figura 18. Como se muestra en la figura 18, un folículo, una vaina de raíz interna, y una vaina de raíz externa de las células epiteliales y las células de la papila pilosa obtenidas de células mesenquimales se identificaron en una sección longitudinal de un folículo piloso (sección A), ya que la interacción celular entre las células epiteliales y las células mesenquimales que constituyen el folículo piloso inicial no se afectó cuando se trasplantó el folículo piloso reconstituido. Además, en la sección A, aunque el pelo se disolvió en el momento de la tinción tisular, se identificó pelo que no se había disuelto por completo. En la sección transversal (sección B), el emplazamiento celular de una vaina de raíz interna y una vaina de raíz externa se identificó de tal forma que las células epiteliales podían incluir poros. Dado que el pelo se disolvió en el momento de la tinción tisular, se identificó el residuo de la disolución del pelo.

Además, como se muestra en la figura 19, en un explante que se extirpó el 14º día después del trasplante de la cápsula subrenal de un folículo piloso reconstituido, se identificó un pelo crecido a partir de un folículo piloso.

Por otra parte, en el caso del Ejemplo Comparativo 7, cuando las células epiteliales y las células mesenquimales se mezclaron de antemano y se reconstituyeron en un vehículo de soporte, no se identificó un tejido de folículo piloso, como se muestra en la figura 20.

Por lo tanto, de acuerdo con el Ejemplo 8, el pelo pudo generarse a partir de tejido de folículo piloso de forma similar a los casos en los que se generó un diente usando un germen dentario en los Ejemplos 1 a 7.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se muestra que la diferenciación celular puede inducirse eficazmente y puede generarse un tejido que tenga un emplazamiento celular específico de tejido y direccionalidad, mediante la preparación de tejido/células epiteliales y tejido/células mesenquimales por separado, de manera que la interacción entre las células epiteliales y las células mesenquimales pueda realizarse eficazmente, y mediante la compartimentación del tejido/células y su cultivo en contacto entre sí a alta densidad, y no únicamente para los dientes y el pelo.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, es posible producir artificialmente tejido construido por interacción celular, ya que el tejido puede reconstruirse a partir de diversas células individuales sin alterar la interacción celular.

35 Explicación de letras y números

- 10 compresión de gel (vehículo de soporte)
- 12 agregado celular (una primera masa celular)
- 14 agregado celular (una segunda masa celular)
- 40 16 punta de pipeta

<110> Tokyo University of Science Educational Foundation Administrative Organization

<120> Método para producir diente, conjunto de dientes, y método de producción de tejido

<130> CO-F03193-00

<140> PCT/JP2006/310805

<141> 30-05-2006.

<150> JP2005-157885

<151> 30-05-2005.

<150> JP2006-055569

<151> 01-03-2006

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.4

	<210> 1
	<211> 20
	<212> ADN
5	<213> Artificial
	<220>
	<223> cebador
10	<400> 1
	ggctgaagat ggttcctctc 20
	<210> 2
	<211> 20
15	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
	<223> antisentido
20	<400> 2
	gtacattgaa ggaataacca 20

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de producción de un diente, que comprende:
5 posicionar una primera masa celular que contiene sustancialmente únicamente una de las células mesenquimales o células epiteliales, en el que al menos una de las células mesenquimales o las células epiteliales se obtiene a partir de un germen dentario, y una segunda masa celular que contiene sustancialmente únicamente la otra de las células mesenquimales o las células epiteliales, en el interior de un vehículo de soporte y en estado de contacto estrecho entre sí sin mezclar entre las masas celulares; y
10 cultivar la primera y la segunda masas celulares en el interior del vehículo de soporte.
2. El método de producción de un diente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que tanto las células mesenquimales como las células epiteliales se obtienen a partir de un germen dentario.
- 15 3. El método de producción de un diente de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente un primer proceso de preparación para preparar la primera masa celular y un segundo proceso de preparación para preparar la segunda masa celular antes de poner las masas celulares en contacto entre sí.
4. El método de producción de un diente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
20 que comprende realizar el crecimiento en el interior del vehículo de soporte en presencia de otras células de animales.
5. El método de producción de un diente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada una de la primera masa celular y la segunda masa celular es una masa celular de células individuales.
25 6. El método de producción de un diente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende continuar el cultivo hasta que se forme el tejido periodontal.
7. Un método *in vitro* de producción de tejido periodontal, que comprende:
30 posicionar una primera masa celular que contiene sustancialmente únicamente una de las células mesenquimales o células epiteliales, en el que al menos una de las células mesenquimales o las células epiteliales se obtiene a partir de un germen dentario, y una segunda masa celular que contiene sustancialmente únicamente la otra de las células mesenquimales o las células epiteliales, en el interior de un vehículo de soporte y en estado de contacto estrecho entre sí sin mezclar entre las masas celulares;
35 cultivar la primera y la segunda masas celulares en el interior del vehículo de soporte hasta que se obtienen un diente y tejido periodontal contiguo al diente; y
40 aislar el tejido periodontal obtenido por el cultivo.
8. Un conjunto de dientes embebidos en un vehículo de soporte, obtenido
45 posicionando *in vitro* una primera masa celular que contiene sustancialmente únicamente una de las células mesenquimales o células epiteliales, en el que al menos una de las células mesenquimales o las células epiteliales se obtiene a partir de un germen dentario, y una segunda masa celular que contiene sustancialmente únicamente la otra de las células mesenquimales o las células epiteliales, en el interior de un vehículo de soporte y en estado de contacto estrecho entre sí sin mezclar entre las masas celulares; y
50 cultivar *in vitro* la primera y la segunda masas celulares en el interior del vehículo de soporte.
9. El conjunto de dientes de acuerdo con la reivindicación 8, en el que tanto las células mesenquimales como las células epiteliales se obtienen a partir de un germen dentario.
10. El conjunto de dientes de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que el vehículo de soporte es un gel.
- 55 11. Un método *in vitro* para producir un folículo piloso que está construido por una interacción entre las células mesenquimales y las células epiteliales, comprendiendo el método:
60 posicionar una primera masa celular que contiene sustancialmente únicamente una de las células mesenquimales o células epiteliales y una segunda masa celular que contiene sustancialmente únicamente

la otra de las células mesenquimales o las células epiteliales, en el interior de un vehículo de soporte y en estado de contacto estrecho entre sí sin mezclar entre las masas celulares; y cultivar la primera y la segunda masas celulares en el interior del vehículo de soporte, en el que al menos una de las células mesenquimales y las células epiteliales se obtiene a partir de un tejido de folículo piloso.

5

12. El método de producción de un tejido de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende adicionalmente un primer proceso de preparación para preparar la primera masa celular y un segundo proceso de preparación para preparar la segunda masa celular antes de poner las masas celulares en contacto entre sí.

FIG.1

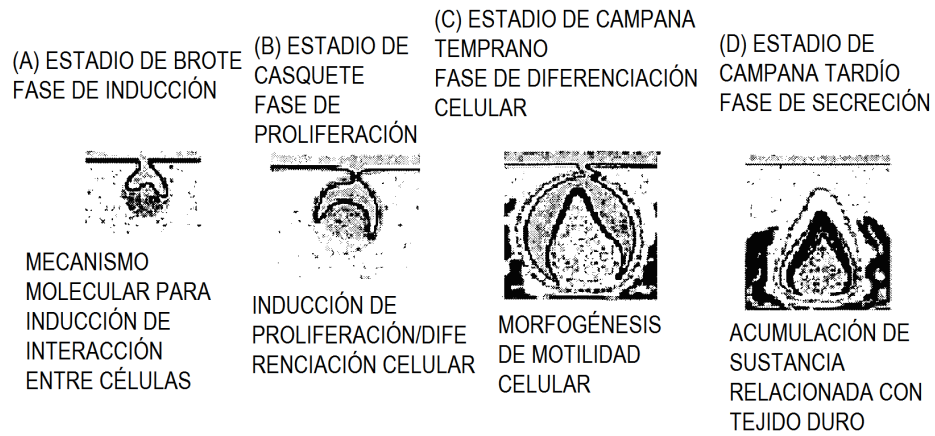


FIG.2A

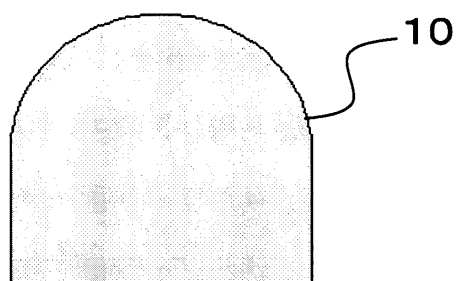


FIG.2B

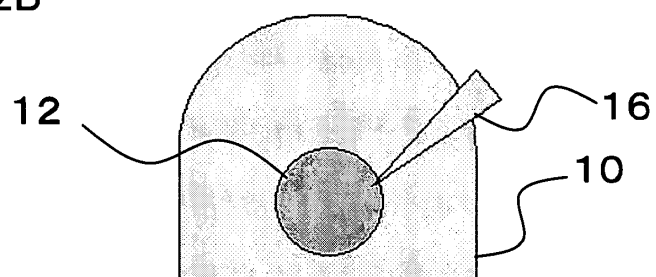


FIG.2C

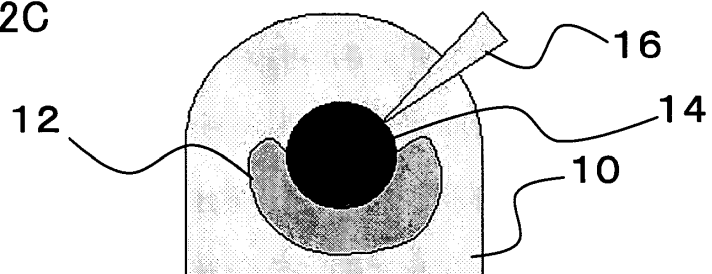


FIG.2D

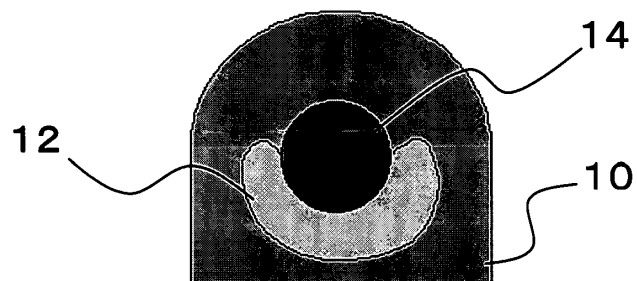
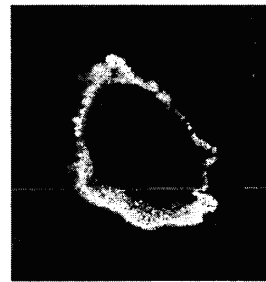


FIG.3

ED 14.5 GERMEN DENTARIO DE INCISIVO

IMAGEN MICROSCÓPICA DE GERMEN DENTARIO EXTIRPADO DIENTE



TRASPLANTE BAJO CÁPSULA SUBRENAL DE RATÓN ADULTO INDUCCIÓN DE GENERACIÓN DE DIENTE

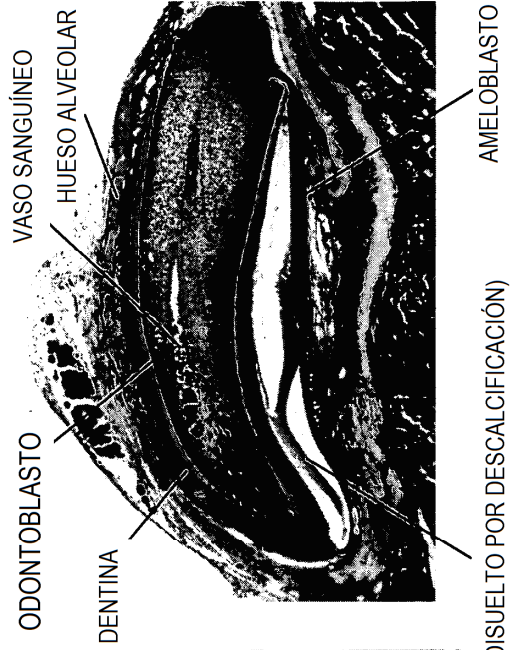
14º DÍA DESPUÉS DEL TRASPLANTE

IMAGEN DE TINCIÓN DE HE DE DIENTE GENERADO POR TRASPLANTE BAJO CÁPSULA SUBRENAL DE RATÓN ADULTO

3ER DÍA DESPUÉS DEL TRASPLANTE



7º DÍA DESPUÉS DEL TRASPLANTE



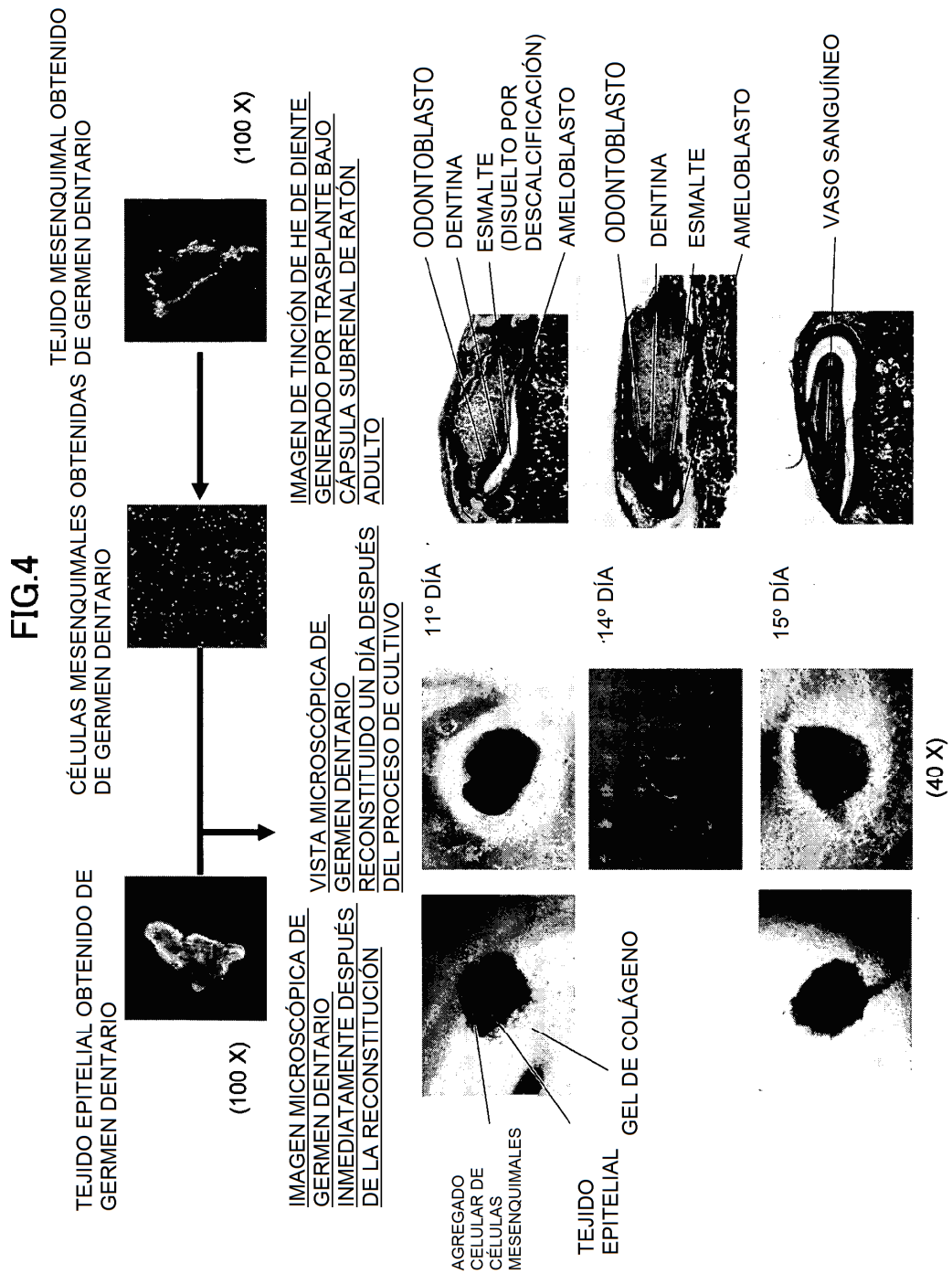


FIG.5

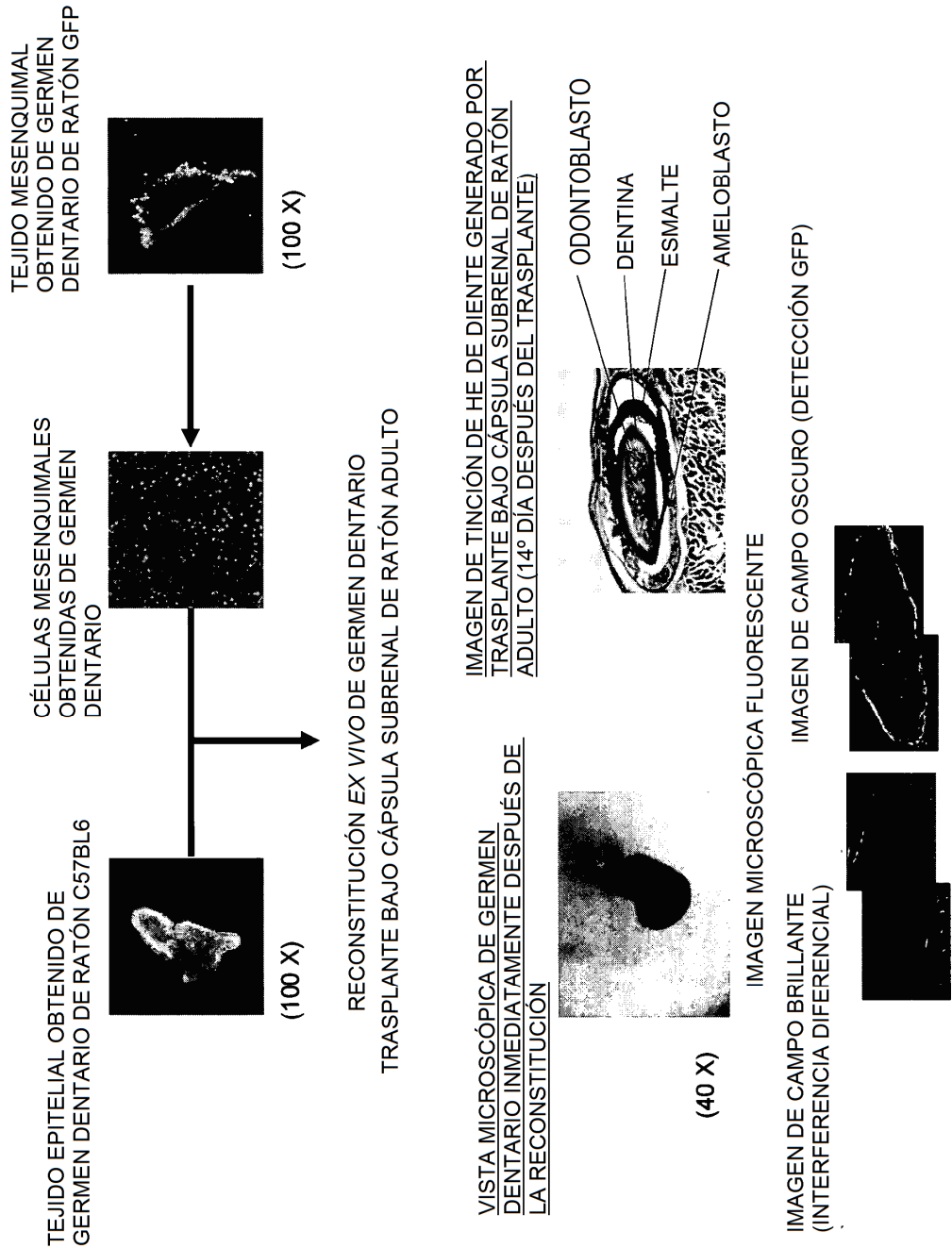
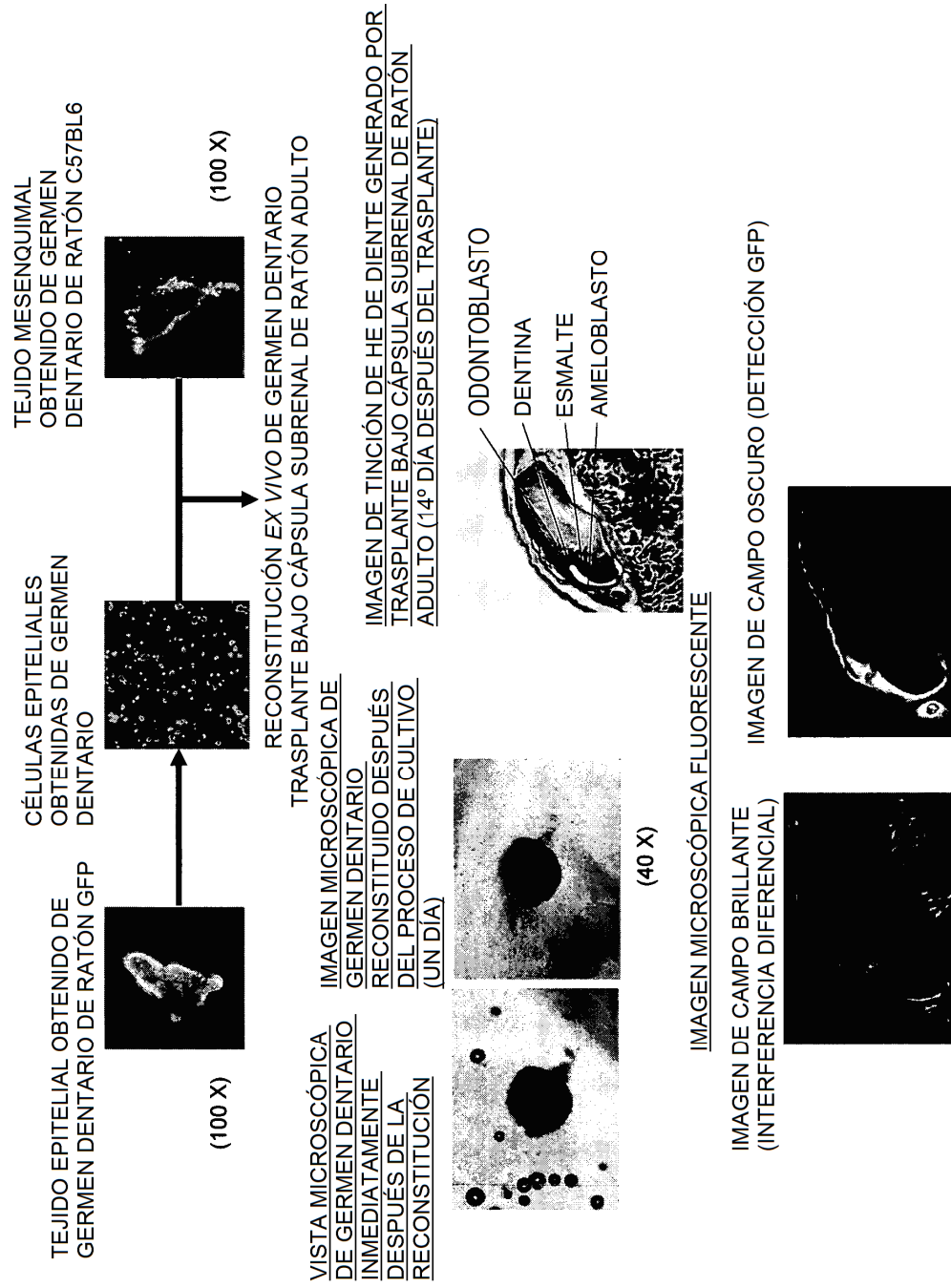


FIG.6



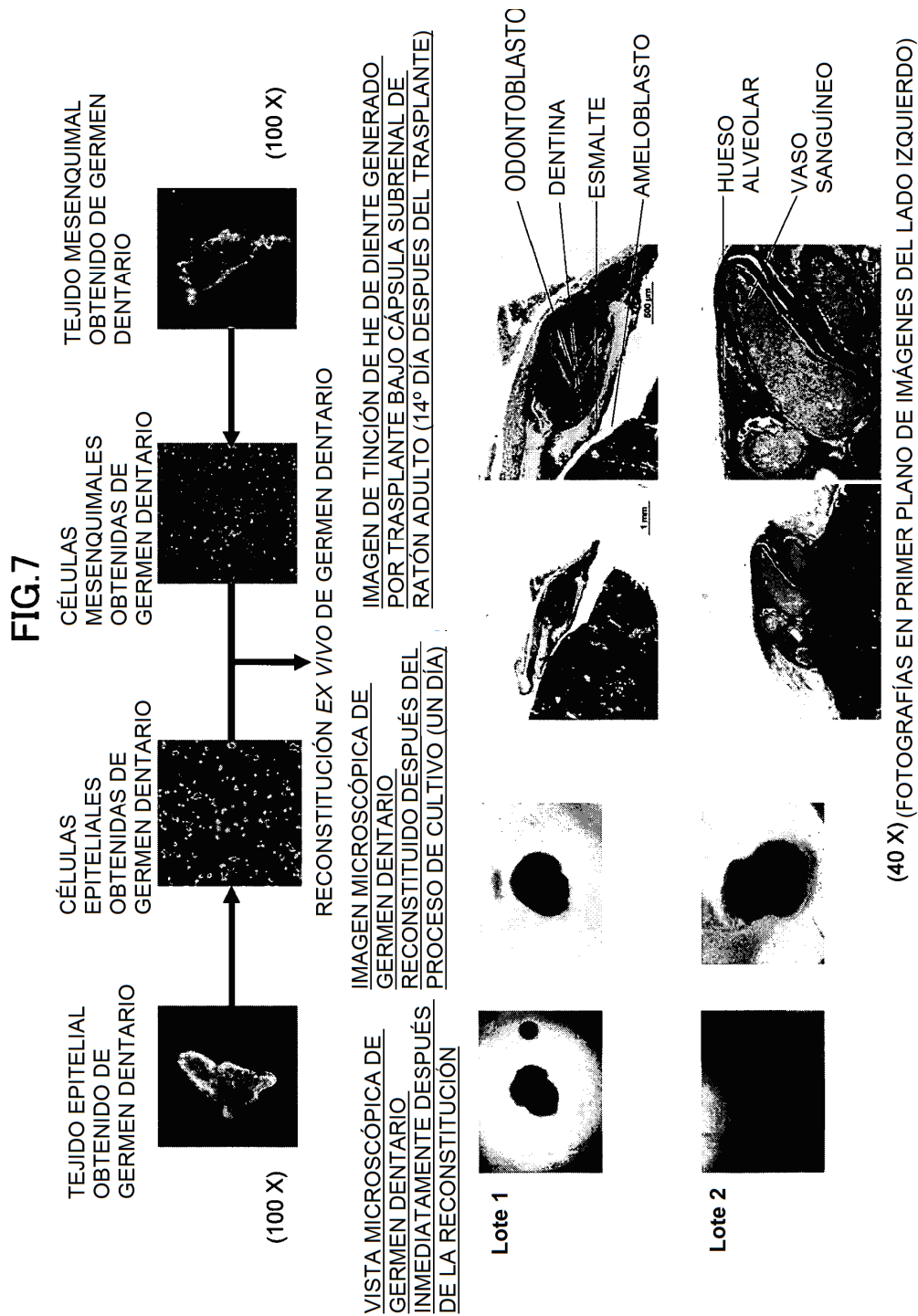


FIG.8

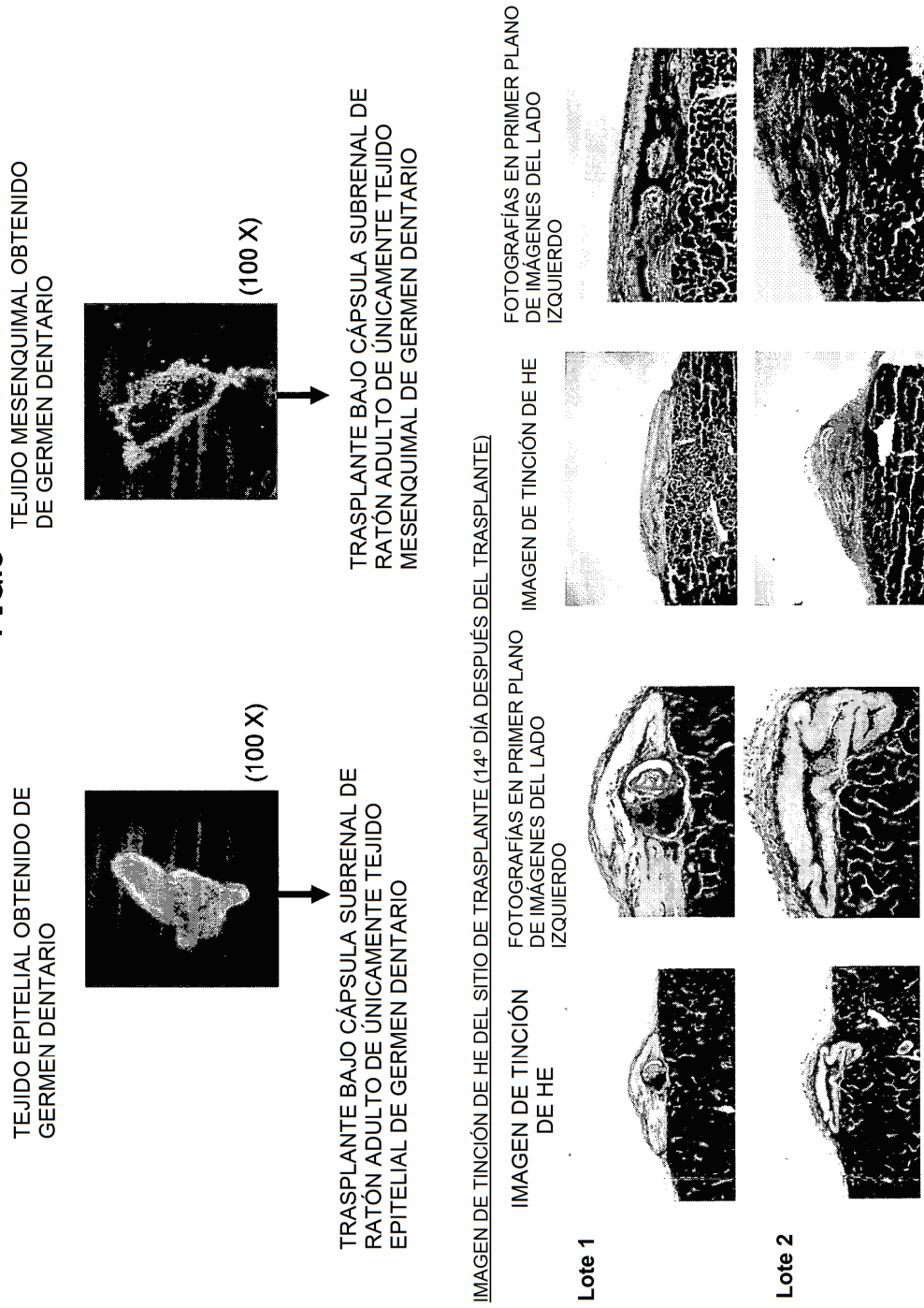


FIG.9

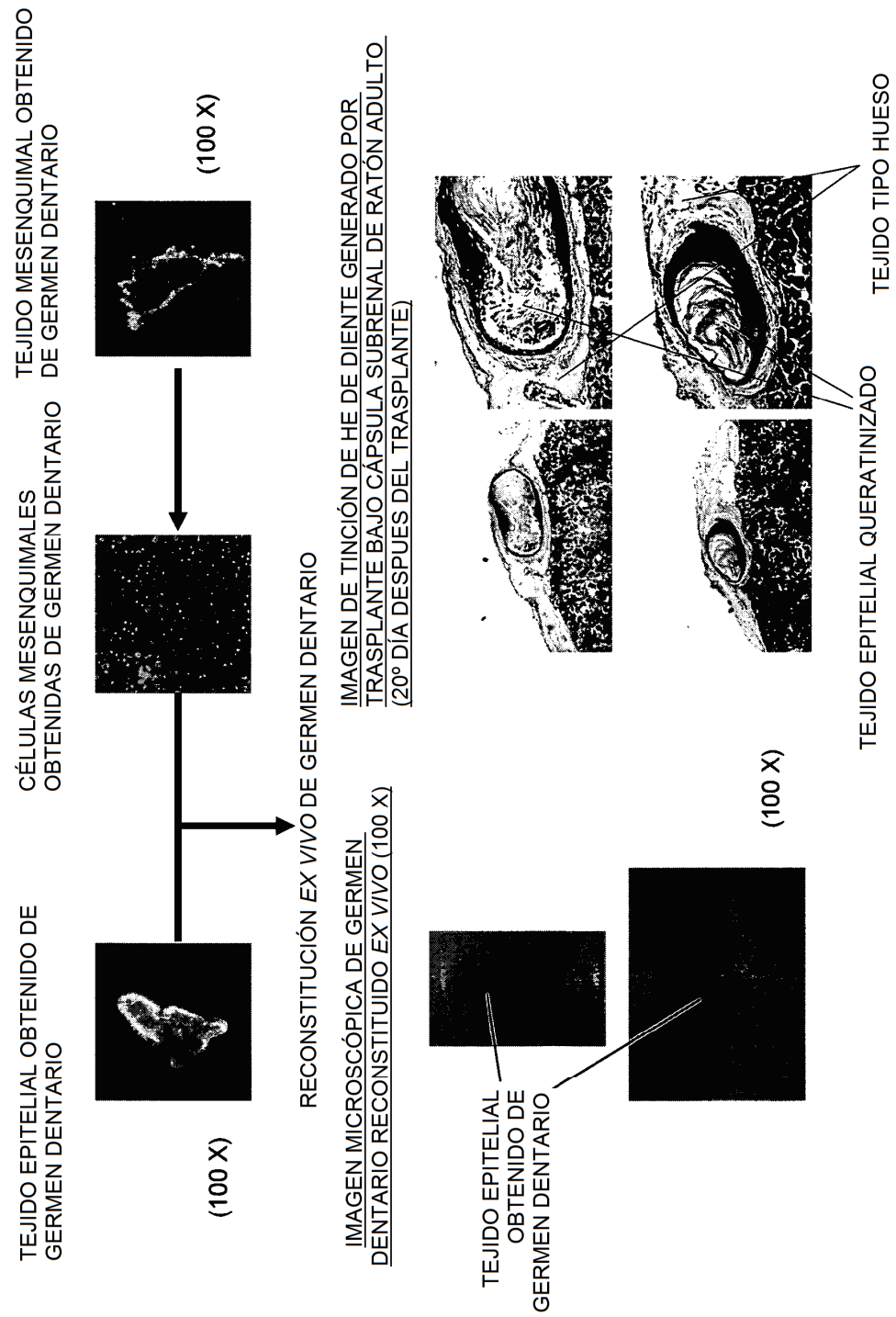


FIG.10

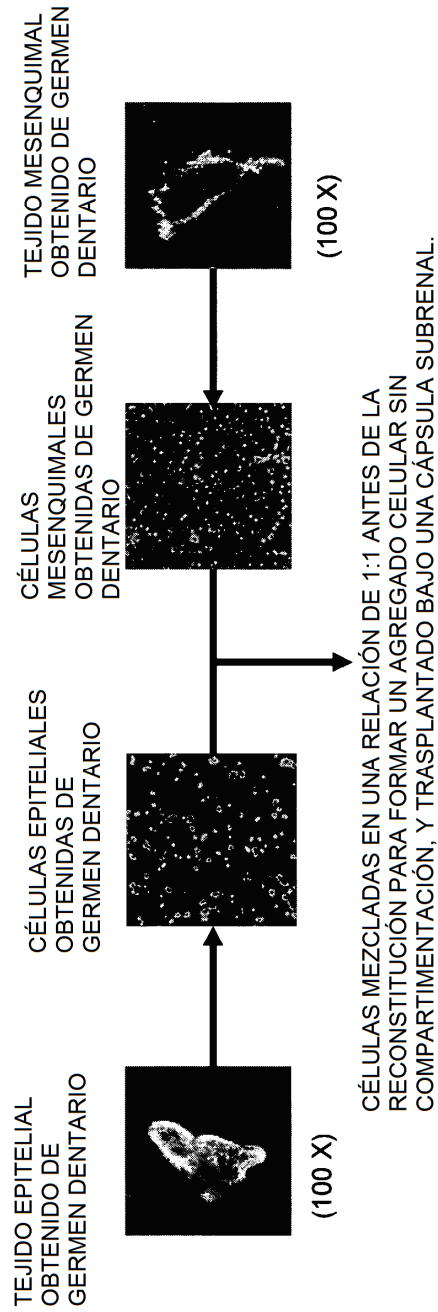


IMAGEN MICROSCÓPICA DE GERMEN
DENTARIO RECONSTITUIDO DESPUÉS DEL
PROCESO DE CULTIVO (UN DÍA)

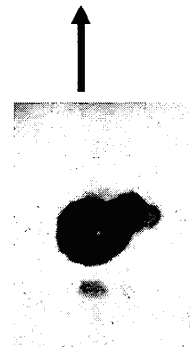


IMAGEN DE TINCIÓN DE HE DE DIENTE GENERADO
POR TRASPLANTE BAJO CÁPSULA SUBRENAL DE
RATÓN ADULTO (14º DÍA DESPUÉS DEL TRASPLANTE)

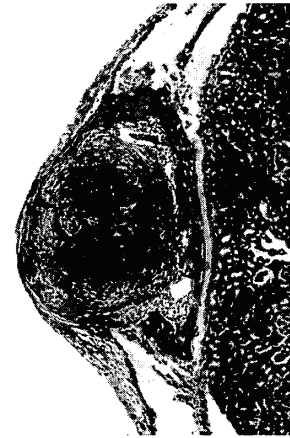
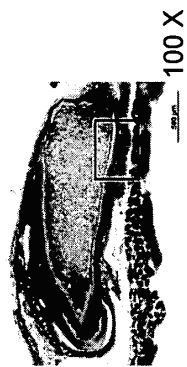
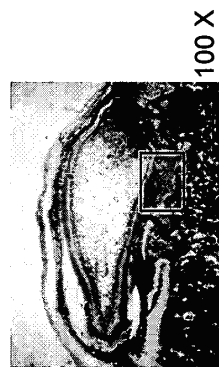


FIG.11

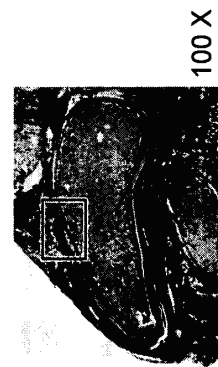
EJEMPLO 1



EJEMPLO 2



EJEMPLO 3



MEMBRANA PERIODONTAL

HUESO ALVEOLAR

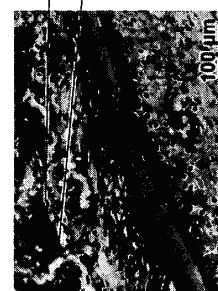
FOTOGRAFÍA EN PRIMER PLANO DE
ÁREA ENMARCADA DE IMAGEN DEL
LADO IZQUIERDO (200 X)



MEMBRANA PERIODONTAL

HUESO ALVEOLAR

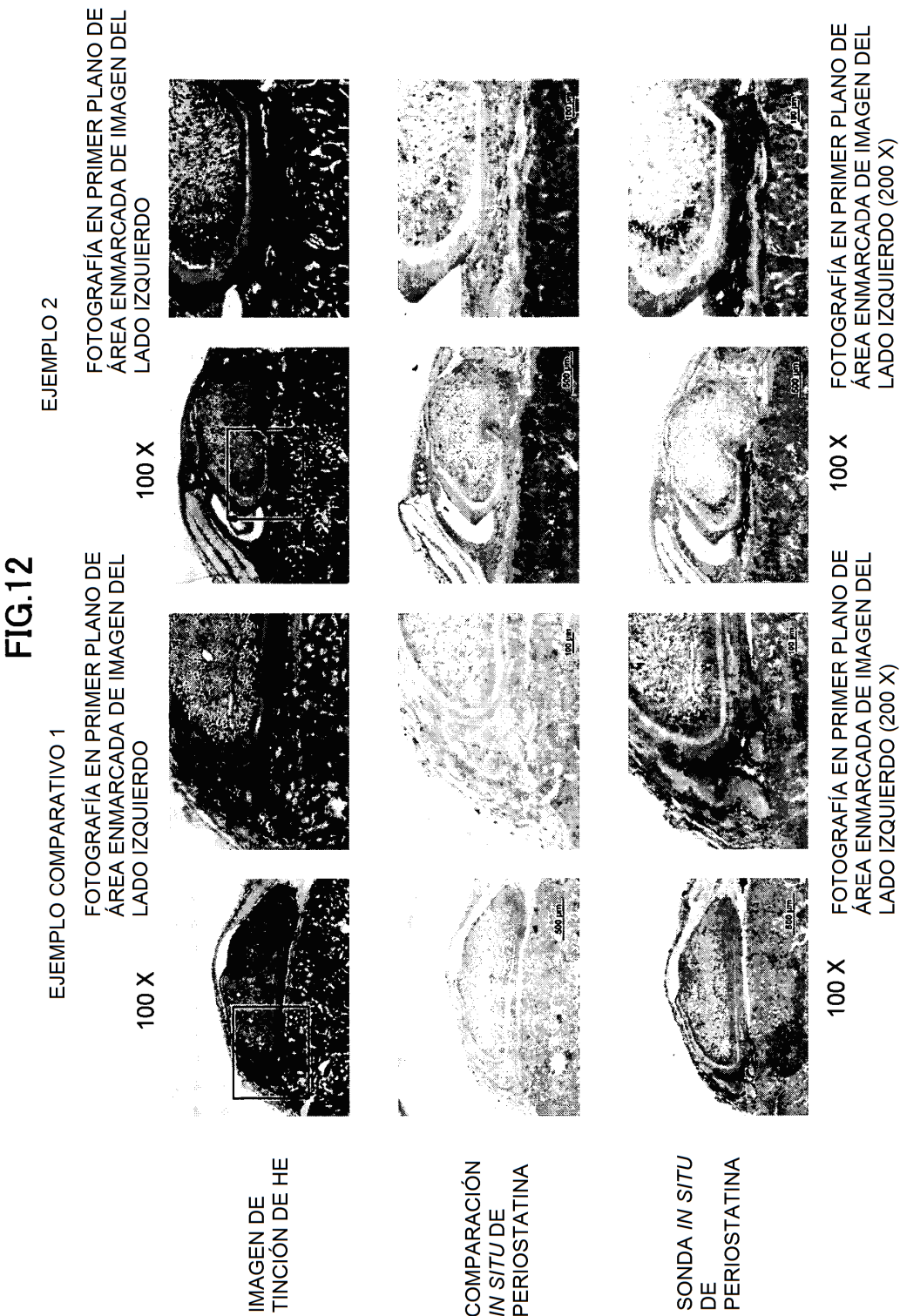
FOTOGRAFÍA EN PRIMER PLANO DE
ÁREA ENMARCADA DE IMAGEN DEL
LADO IZQUIERDO (200 X)



MEMBRANA PERIODONTAL

HUESO ALVEOLAR

FOTOGRAFÍA EN PRIMER PLANO DE
ÁREA ENMARCADA DE IMAGEN DEL
LADO IZQUIERDO (200 X)



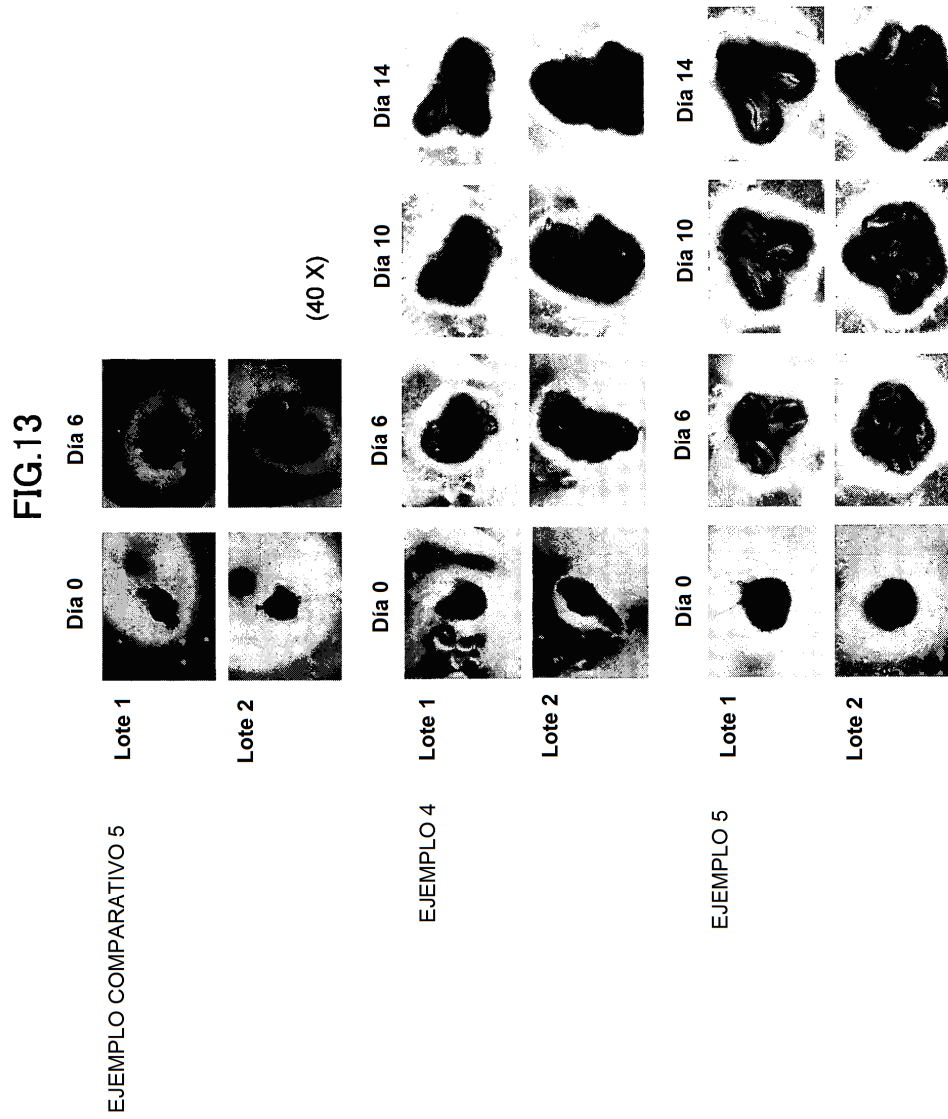


FIG.14

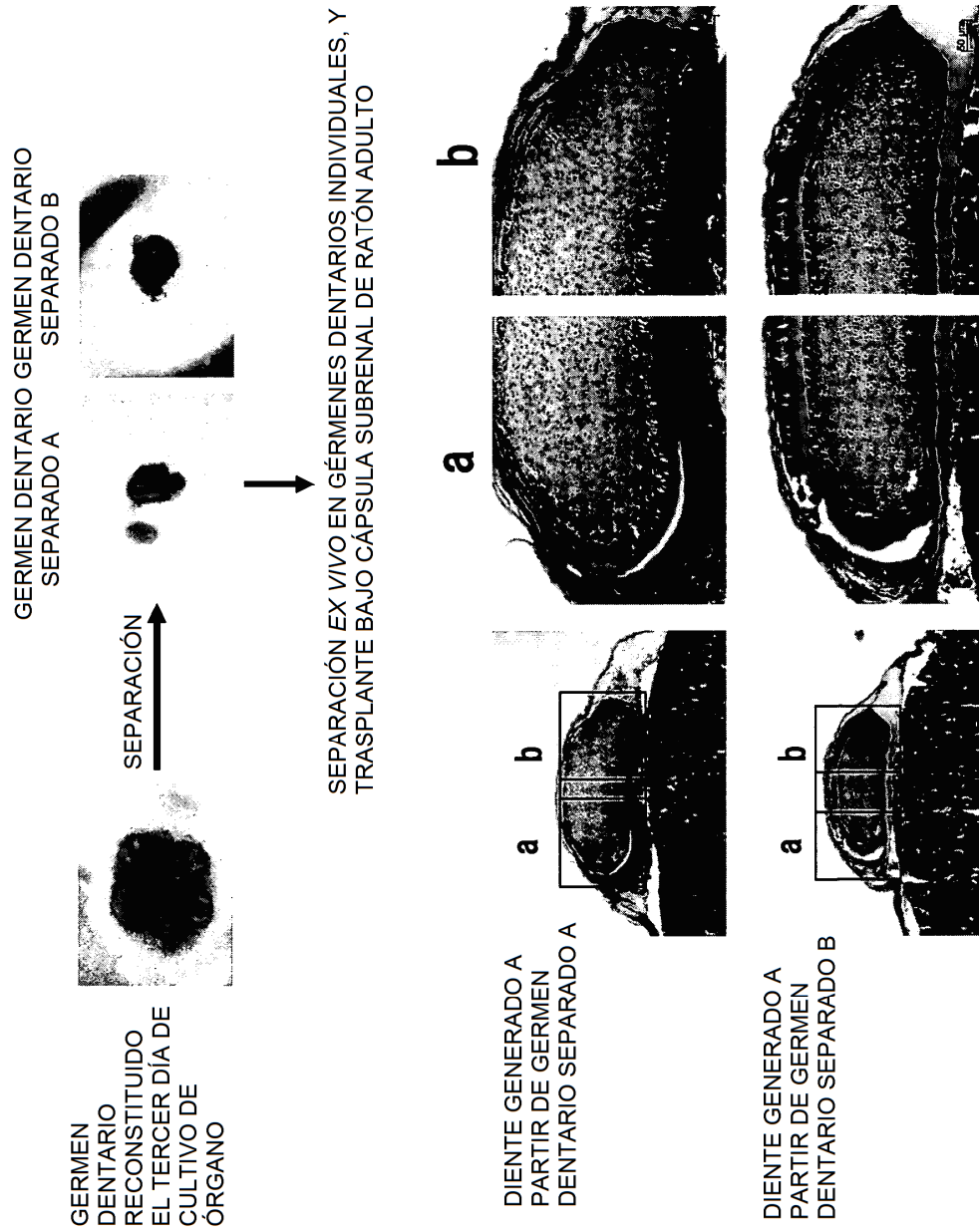


FIG.15A



FIG.15B



FIG.16

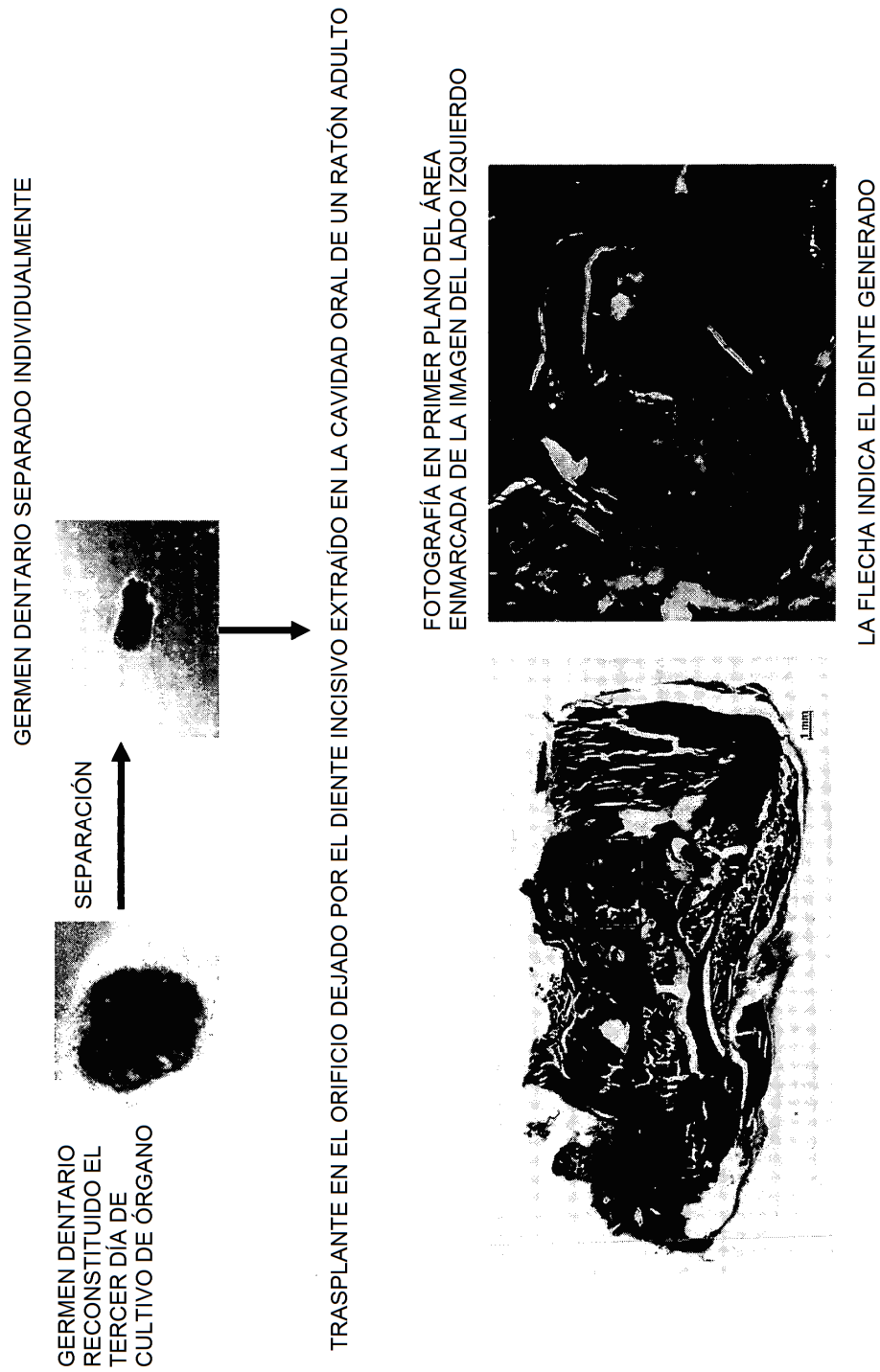
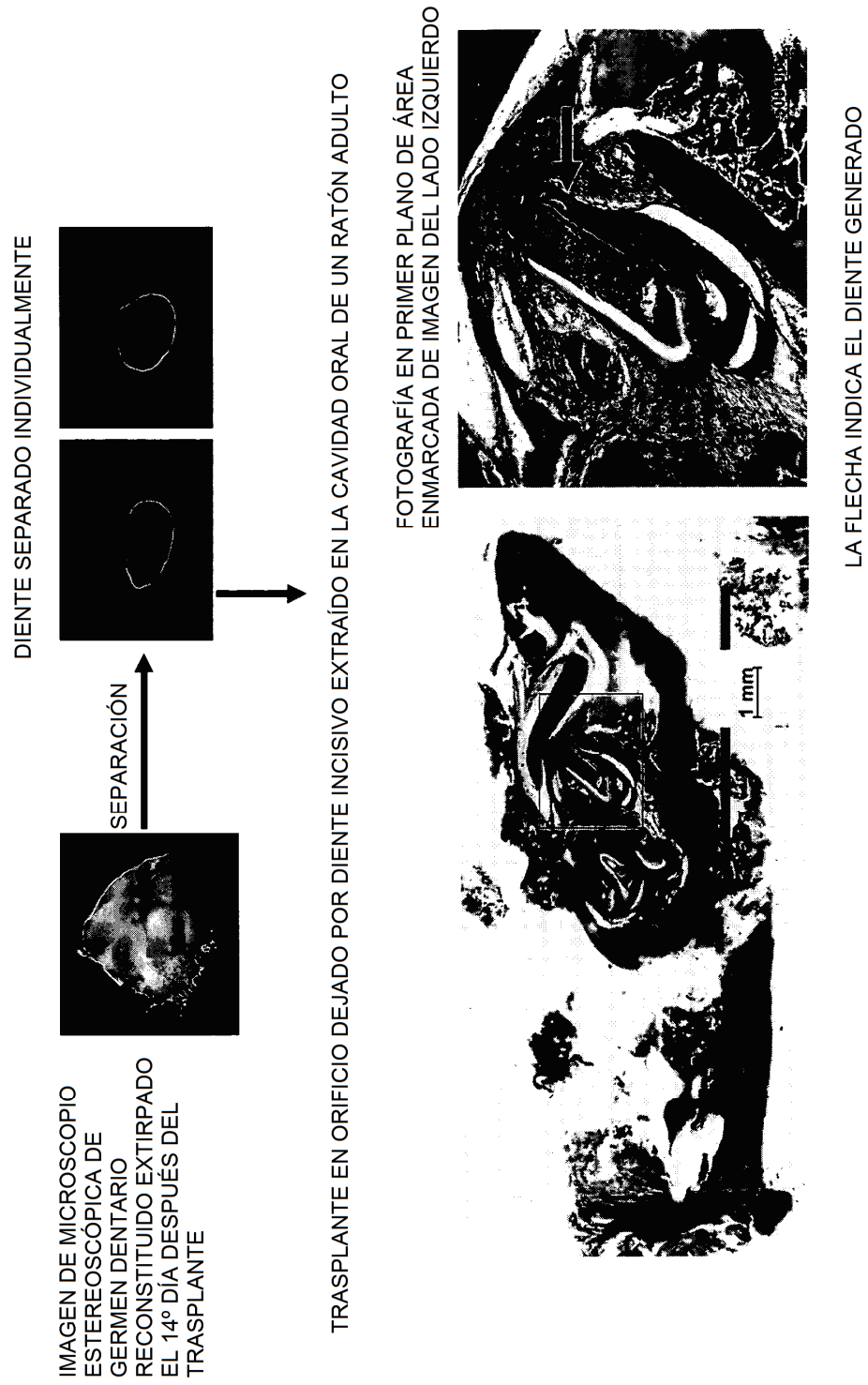
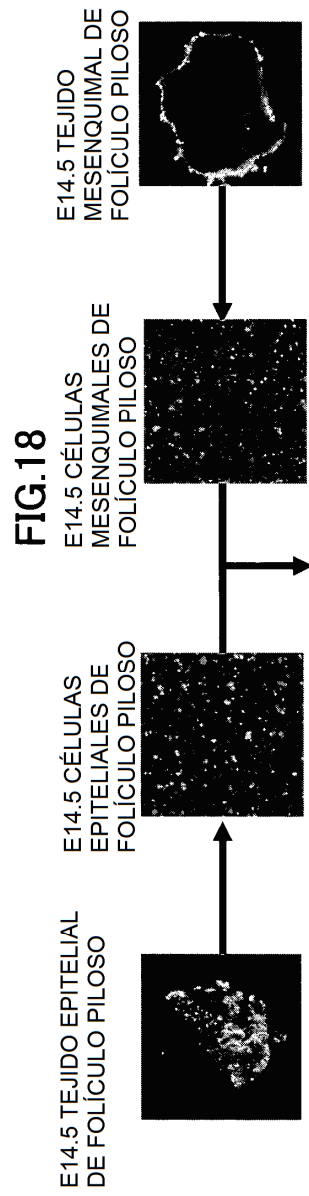


FIG.17





FOTOGRAFÍA EN PRIMER PLANO DE ÁREA ENMARCADA DE IMAGEN DEL LADO IZQUIERDO

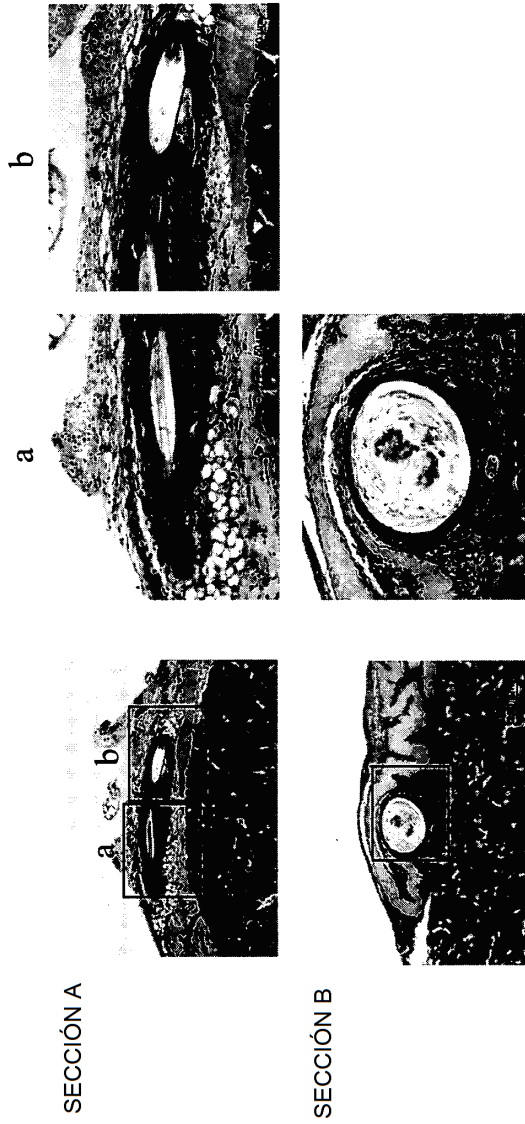
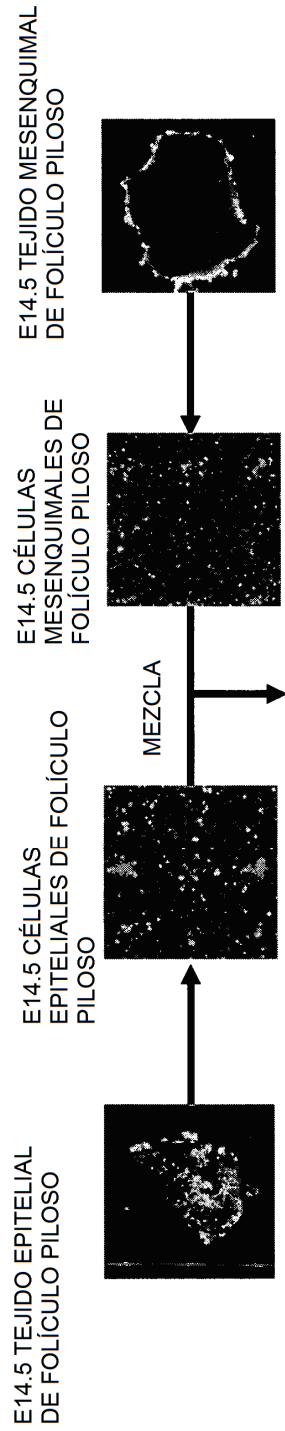


FIG.19



FIG.20



SE MEZCLARON EX VIVO DOS TIPOS DE CÉLULAS PARA PREPARAR UN AGREGADO CELULAR TRASPLANTE BAJO CÁPSULA SUBRENAL DE RATÓN ADULTO



SECCIÓN A



SECCIÓN B