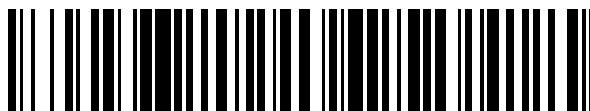


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 564**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/0797 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2010 PCT/JP2010/070163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO2011055855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2010 E 10828413 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2496688**

54 Título: **Un método de inducción de diferenciación de células madre cultivadas**

30 Prioridad:

05.11.2009 US 258439 P

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

26.06.2017

73 Titular/es:

RIKEN (50.0%)

2-1, Hirosawa

Wako-shi, Saitama 351-0198, JP y

SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED

(50.0%)

72 Inventor/es:

SASAI, YOSHIKI y

EIRAKU, MOTOTSUGU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 619 564 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

Un método de inducción de diferenciación de células madre cultivadas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método de inducción de diferenciación de células madre, más específicamente a un método de inducción de diferenciación de células madre que comprende la combinación de reagregación rápida y el cultivo en suspensión tridimensional en la puesta en práctica del cultivo de agregados de células madre.

Antecedentes de la técnica

10 Hasta la fecha, se han conocido algunos métodos de cultivo para la inducción de diferenciación de nervios de células madre pluripotentes tales como las células ES, que incluyendo las informadas por los presentes inventores [Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S.-i., Muguruma, K. y Sasai, Y. (2007), A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 25, 681-686, Su, H.-L.; Muguruma, K., Kengaku, M., Matsuo-Takasaki, M., Watanabe, K., y Sasai, Y. (2006), Generation of Cerebellar Neuron Precursors from Embryonic Stem Cells. *Developmental Biology* 290, 287-296; Ikeda, H., Watanabe, K., Mizuseki, K., Haraguchi, T., Miyoshi, H., Kamiya, D., Honda, Y., Sasai, N., Yoshimura, N., Takahashi, M. y Sasai, Y. (2005), Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 102, 11331-11336; el folleto para WO2005/123902; y JP-A-2008-99662]. Existen grandes expectativas para las células nerviosas derivadas de células ES (p. ej., células nerviosas de dopamina y similares) como fuente de células de injerto para la terapia de trasplante celular en la medicina regenerativa para enfermedades neurológicas intratables. Para este fin, las células nerviosas relacionadas con la enfermedad que están presentes en el cerebro y los tejidos circundantes se deben producir con precisión. Sin embargo, debido a que un número extremadamente grande de tipos de células nerviosas está presente en el cerebro y los tejidos circundantes, todavía hay muchos tipos de células nerviosas y tejidos para los cuales la diferenciación in vitro eficaz no ha tenido éxito.

25 La retina, un componente del globo ocular, derivado del diencefalo, se produce como un tejido membranoso delgado que cubre la pared interna detrás del globo ocular. Se observa en la retina una estructura laminar de células nerviosas dispuestas en forma regular. Las células nerviosas de la retina se pueden dividir en líneas generales en cinco tipos: células fotorreceptoras (conos, varillas), células bipolares, células horizontales, células amacrinas, y células ganglionares. La luz se convierte en una señal eléctrica en las células fotorreceptoras, la señal (información) se transmite a células bipolares y células horizontales a través de sinapsis químicas. Las células bipolares entran en contacto con células amacrinas y células ganglionares nerviosas a través de sinapsis, y los axones de células ganglionares, como nervios ópticos, se comunican con el centro visual del cerebro. Para el tratamiento de retinopatías, se han llevado a cabo hasta el momento investigación etiológica, investigación de descubrimiento de fármacos, investigación de terapia de trasplantes celulares y similares, pero es extremadamente difícil obtener tejido retiniano humano por el bien de tal investigación. Si bien recientemente ha sido posible inducir la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas al epitelio pigmentario retiniano [véase Hiram Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, Yoshimura N, Takahashi M. (2009), Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett.* 458(3):126-31], ha sido difícil controlar la inducción y la génesis de diferenciación selectiva en neuronas retinianas particulares y un tejido retiniano que contiene las mismas.

40 Los presentes inventores mostraron que el cultivo en suspensión en dispersión que utiliza un medio libre de suero (el método SFEB) es eficaz como método para la inducción de diferenciación de nervios de células madre pluripotentes tales como células ES animales y humanas [véase Ikeda, H., Watanabe, K., Mizuseki, K., Haraguchi, T., Miyoshi, H., Kamiya, D., Honda, Y., Sasai, N., Yoshimura, N., Takahashi, M. y Sasai, Y. (2005), Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 102, 11331-11336; Watanabe, K., Kamiya, D., Mishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Mizuseki, K., Watanabe, Y., y Sasai, Y. (2005), Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nature Neurosci.* 8, 288-296; y el folleto para WO2005/123902]. Este método permite la diferenciación eficaz de la inducción de células nerviosas células sensoriales del cerebro anterior, en particular del cerebro y la retina neural. Los presentes inventores también tuvieron éxito en la inducción de diferenciación de los tejidos del tronco encefálico tales como el cerebelo por medio de la adición de un factor de crecimiento tal como Wnt al medio mientras se lleva a cabo el método SFEB.

50 Sin embargo, un estudio analítico con células madre embrionarias de ratón reveló que cuando se aplicó el método SFEB, aproximadamente 30% de las células se diferenciaron en las células nerviosas cerebrales, pero la mayoría restante se produjo como una mezcla de otros tipos de células nerviosas. En forma adicional, las células de la corteza cerebral representaron sólo aproximadamente 40% de la inducción de diferenciación de células nerviosas cerebrales; la eficacia de inducción no fue tan alta. Además, la mayor parte del tejido cerebral inducido por un método convencional tal como el método SFEB falló en tener una morfología clara del tejido cortical, formando únicamente una masa celular desarticulada. En forma adicional, el método SFEB convencional no permite una inducción eficaz de diferenciación de tejido de diencefalo, que se desarrolla en el lado más rostral del sistema nervioso central.

Lista de referencias

Literatura patentes

documento de patente 1: WO2005/123902

documento de patente 2: JP-A-2008-99662

5 Literatura no patentes

documento no patente 1: Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S.-i., Muguruma, K. y Sasai, Y. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 25, 681-686

10 documento no patente 2: Su, H.-L., Muguruma, K., Kengaku, M., Matsuo-Takasaki, M., Watanabe, K., y Sasai, Y. (2006) Generation of Cerebellar Neuron Precursors from Embryonic Stem Cells. *Developmental Biology* 290, 287-296

documento no patente 3: Ikeda, H., Watanabe, K., Mizuseki, K., Haraguchi, T., Miyoshi, H., Kamiya, D., Honda, Y., Sasai, N., Yoshimura, N., Takahashi, M. y Sasai, Y. (2005) Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 102, 11331-11336

15 documento no patente 4: Hiramami Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, Yoshimura N, Takahashi M. (2009) Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett.* 458(3): 126-31

20 documento no patente 5: Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Mizuseki, K., Watanabe, Y., y Sasai, Y. (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem células. *Nature Neurosci.* 8, 288-296

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

25 Es un objetivo de la presente invención desarrollar un método muy práctico que permita la inducción de diferenciación de células madre tales como células ES, en particular la inducción selectiva de diferenciación para células que forman el tejido retiniano.

Medios para resolver los problemas

30 Para explicar la baja eficacia de la inducción de diferenciación de células nerviosas por medio del método SFEB, los presentes inventores formularon una hipótesis sobre que la formación de una estructura epitelial conocida como epitelio nervioso entre células progenitoras nerviosas en el tejido nervioso es necesaria para su diferenciación eficaz, la proliferación y génesis histológica en diversas células nerviosas, que incluyen células retinianas, de modo que la formación estable de la estructura epitelial sea esencial para la producción in vitro eficaz de células nerviosas y los tejidos del sistema nervioso central que contienen las mismas requieren. Sobre la base de esta hipótesis, los presentes inventores investigaron ampliamente la inducción de diferenciación de células madre embrionarias en ausencia de suero, y hallaron que por medio de la formación de agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero, y el cultivo en suspensión de los agregados en presencia de una preparación de membrana basal, células nerviosas, en particular células progenitoras retinianas, se pueden inducir por la diferenciación de células ES con alta eficacia.

40 Luego, los presentes inventores hallaron que las células progenitoras retinianas forman una estructura con forma de copa óptica, y que mediante su cultivación en un caldo de cultivo de órganos, un tejido retiniano que tiene una estructura laminar funcional comparable a la estructura retiniana después del nacimiento se puede producir in vitro.

Los presentes inventores llevaron a cabo investigaciones adicionales sobre la base de estos hallazgos, y han desarrollado la presente invención. En consecuencia, la presente invención proporciona:

[1] un método de inducción de diferenciación de una célula madre en una célula progenitora nerviosa, que comprende:

45 el paso (1) de la formación de agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero; y

el paso (2) de cultivo en suspensión de los agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero al que se le ha añadido una preparación de membrana basal en un recipiente de cultivo no adhesivo a células;

[2] el método de acuerdo con [1], en donde la célula progenitora nerviosa es una célula progenitora retiniana;

[3] el método de acuerdo con [2], en donde la preparación de membrana basal contiene una molécula de matriz

extracelular seleccionada entre laminina, colágeno de tipo IV, proteoglicano heparán sulfato y entactina;

[4] el método de acuerdo con [2] o [3], en donde el cultivo en suspensión se lleva a cabo en presencia de KSR;

[5] el método de acuerdo con [4], que se lleva a cabo en presencia adicional de Nodal o Activina;

5 [6] un método para la separación o la identificación de manera morfológica de una masa de células progenitoras retinianas, que comprende:

la puesta en práctica del método de acuerdo con cualquiera de [1] a [5]; lo que permite de ese modo que un tejido con forma de copa óptica se autoforme en los agregados;

[7] un método de inducción de diferenciación de una neurona específica de la capa retiniana, que comprende:

10 la puesta en práctica del método de acuerdo con [6]; y el cultivo en suspensión del tejido con forma de copa óptica autoformado en un caldo de cultivo de órganos;

[8] el método de acuerdo con [7], en donde el cultivo en suspensión se lleva a cabo en presencia de KSR;

[9] el método de acuerdo con [8], en donde el cultivo en suspensión se lleva a cabo en presencia adicional de Nodal o Activina;

15 [10] el método de acuerdo con cualquiera de [7] a [9], en donde la neurona específica de la capa retiniana se selecciona de entre células fotorreceptoras, células horizontales, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares;

[11] el método de acuerdo con cualquiera de [7] a [10], que es un método de producción de un tejido retiniano in vitro;

20 [12] el método de acuerdo con cualquiera de [7] a [10], que es un método de producción de una neurona específica de la capa retiniana.

Efecto de la invención

25 De acuerdo con la presente invención, es posible inducir la diferenciación de una célula madre en una célula progenitora nerviosa, en particular en una célula progenitora retiniana, de manera eficaz. El método de la presente invención también permite una inducción eficaz de diferenciación en células del sistema nervioso, en particular en células retinianas, una tarea que ha sido difícil de lograr por medio del método convencional de inducción de diferenciación. Por lo tanto, el método de la presente invención es particularmente útil en la aplicación de citoterapia para enfermedades asociadas con anomalías en un tejido nervioso, en particular en el tejido retiniano.

30 De acuerdo con el método de la presente invención, también es posible inducir en forma selectiva la diferenciación de neuronas específicas de la capa retiniana. El tejido retiniano obtenido por medio del método de la presente invención tiene una estructura laminar que es extremadamente similar a la retina viva. Además, la estructura laminar tridimensional de este tejido retiniano ha formado una red nerviosa funcional que es muy similar a la retina viva.

35 Por lo tanto, el método de la presente invención también es muy útil para proporcionar "materiales de tejido" para su uso en la medicina regenerativa para tejidos nerviosos, en particular para tejido retiniano, y para proporcionar "materiales de tejido" que sirven bien en el descubrimiento de fármacos de detección de semillas o pruebas de toxicidad de productos farmacéuticos, reactivos y similares que actúan en la retina, y similares, en la producción de productos farmacéuticos para trastornos del tejido nervioso, en particular para trastornos del tejido retiniano.

La presente invención también es útil en que la diferenciación de células madre se puede inducir sin utilizar una célula derivada de un animal como inductor, de modo que los niveles de riesgo en el trasplante de células obtenidas por medio del cultivo de células madre se pueden reducir a los de alotrasplante.

40 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra que los agregados de las células ES de ratón obtenidas por el método SFEBq se diferencian en células nerviosas homogéneas que tienen una estructura similar al epitelio.

La Fig. 2 muestra que los agregados de las células ES de ratón obtenidas por el método SFEBq se diferencian en neuronas específicas de la corteza cerebral a través de células progenitoras de la corteza cerebral.

45 La Fig. 3 muestra que una pluralidad de tejidos con forma de copa óptica se autoforma en un agregado de células ES de ratón obtenidas por el método SFEBq modificado.

La Fig. 4 es un diagrama esquemático de la retina viva.

La Fig. 5 muestra que un tejido retiniano se autoforma por medio del cultivo en suspensión de en un caldo de cultivo

de órganos de un tejido con forma de copa óptica de ratón autoformado por medio del método SFEBq modificado.

La Fig. 6 muestra un tejido humano con forma de copa óptica autoformado por el método SFEBq modificado.

La Fig. 7 muestra un tejido humano con forma de copa óptica autoformado por el método SFEBq modificado en presencia de laminina purificada y entactina, y Nodal/Activina.

5 Mejor modo para llevar a cabo la invención

De aquí en adelante la presente invención se describe en detalle.

(1) Células madre

10 “Una célula madre” se refiere a una célula capaz de retener un potencial constante para la diferenciación incluso después de la división celular. Los ejemplos de células madre incluyen células madre embrionarias (células ES) con una pluripotencia derivada de un óvulo fertilizado o un embrión clonado, células madre somáticas y células madre pluripotentes que están presentes en los tejidos en un organismo vivo, células madre hepáticas, células madre dérmicas, y células madre reproductivas que sirven como bases para los respectivos tejidos, células madre pluripotentes derivadas de células madre reproductivas, células madre pluripotentes obtenidas por células somáticas reprogramadas nucleares, y similares.

15 En particular, “una célula madre pluripotente” se refiere a una célula madre que permite el cultivo in vitro, y que tiene el potencial para diferenciarse en todas las células, pero la placenta, que constituye las células madre embrionarias del cuerpo [tejidos derivados de las tres capas germinales primarias del embrión (ectodermo, mesodermo, endodermo)] (pluripotencia), también se incluyen. “Una célula madre pluripotente” se obtiene de un óvulo fertilizado, un embrión clonado, una célula madre reproductiva, o una célula madre en el tejido. También se incluyen células
20 que tienen una pluripotencia de diferenciación similar a la de las células madre embrionaria, conferida en forma artificial por medio de la transferencia de varios genes diferentes para una célula somática (también denominada células madre pluripotentes inducidas). Las células madre pluripotentes se pueden preparar por medio de un método conocido per se. Los métodos disponibles incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en Cell 131(5), pp.861-87 2, Cell 126(4), pp.663-67 6 y en otras partes.

25 Las células madre pueden derivarse de un animal de sangre caliente, por ejemplo, preferiblemente de un mamífero. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, animales de laboratorio, que incluyen roedores tales como ratones, ratas, hámsters y conejillos de Indias, y conejos; animales domésticos tales como cerdos, ganado, cabra, caballos y ovejas; animales de compañía tales como perros y gatos; primates tales como seres humanos, monos, orangutanes y chimpancés.

30 Los ejemplos de células madre útiles en el método de la presente invención incluyen células madre embrionarias de un mamífero no humano o similar establecido por medio del cultivo de un embrión temprano de preimplantación (de aquí en adelante, abreviado como “células madre embrionarias I”), células madre embrionarias de un mamífero no humano o similar establecido por medio del cultivo de un embrión temprano no humano preparado por medio del trasplante nuclear del núcleo de una célula somática (de aquí en adelante, abreviadas como “células madre embrionarias II”), células madre pluripotentes inducidas (células iPS) establecidas por medio de la transferencia de
35 varios factores transcripcionales diferentes a una célula somática, y células madre pluripotentes preparadas por medio de la modificación de un gen en un cromosoma de las células madre embrionarias I, las células madre embrionarias II o las células iPS mediante el uso de una técnica de ingeniería genética (de aquí en adelante, abreviadas como “células madre pluripotentes modificadas”).

40 Más específicamente, las células madre embrionarias I incluyen células madre embrionarias establecidas a partir de una masa celular interna no humana que constituye un embrión temprano, células EG establecidas a partir de una célula germinal primordial, células aisladas de una población celular que poseen la pluripotencia de embriones tempranos de preimplantación (por ejemplo, un ectodermo primordial), y células obtenidas por medio del cultivo de estas células.

45 Las células madre embrionarias I se pueden preparar por medio del cultivo de un embrión temprano de preimplantación no humano de acuerdo con un método descrito en la bibliografía (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)).

Las células madre embrionarias II se pueden preparar mediante el uso de métodos informados por Wilmut et al. [Nature, 385, 810 (1997)], Cibelli et al. [Science, 280, 1256 (1998)], Akira Iritani et al. [Protein, Nucleic Acid and
50 Enzyme, 44, 892 (1999)], Baguisi et al. [Nature Biotechnology, 17, 456 (1999)], Wakayama et al. [Nature, 394, 369 (1998), Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 96, 14984 (1999)], Rideout III et al. [Nature Genetics, 24, 109 (2000)] y otros, por ejemplo, como se describe a continuación.

Por medio de la extracción del núcleo de una célula de mamífero no humano y luego la reprogramación del núcleo (una operación para devolver el núcleo a un estado para reanudar el desarrollo), el inicio del desarrollo mediante el
55 uso de un método que implica la inyección en un óvulo no fertilizado enucleado de un mamífero no humano, y el

cultivo del óvulo que ha comenzado el desarrollo, se obtiene un óvulo que tiene el núcleo de otra célula somática, y ha comenzado el desarrollo normal.

5 Se conoce una pluralidad de métodos de reprogramación del núcleo de una célula somática. Por ejemplo, el núcleo se puede reprogramar por medio del cambio del medio utilizado para cultivar la célula donante del núcleo de un medio que contiene 5 a 30%, (preferiblemente 10%) de suero fetal de ternera (p. ej., un medio M2) a un medio oligotrófico que contiene 0 a 1% (preferiblemente 0,5%) de suero fetal de ternera, y el cultivo de la célula durante 3 a 10 días (preferiblemente 5 días) para inducir el ciclo celular en un estado de fase en reposo (etapa G0 o etapa G1).

10 El núcleo también se puede reprogramar por medio de la inyección del núcleo de la célula donante del núcleo no humano en un óvulo no fertilizado enucleado de un mamífero de la misma especie, y el cultivo de la célula durante varias horas, preferiblemente durante aproximadamente 1 a 6 horas.

15 El núcleo reprogramado es capaz de iniciar el desarrollo en el óvulo no fertilizado enucleado. Se conoce una pluralidad de métodos para permitir que el núcleo reprogramado inicie su desarrollo en el óvulo no fertilizado enucleado. Mediante el trasplante de un núcleo reprogramado por medio de la inducción del ciclo celular a un estado de fase en reposo (fase G0 o fase G1) en un óvulo no fertilizado enucleado de un mamífero no humano de la misma especie por medio del método de electrofusión y similares, se puede activar el óvulo y permitirle comenzar el desarrollo.

20 Un núcleo reprogramado por medio de la inyección del núcleo en un óvulo no fertilizado enucleado de un mamífero no humano de la misma especie se trasplanta de nuevo a un óvulo no fertilizado enucleado de un mamífero de la misma especie por medio de un método mediante el uso de un micromanipulador o similar, y se estimula con un activador de óvulo (p. ej., estroncio y similares) y después se trata con un inhibidor de división celular (p. ej., citocalasina B y similares) para suprimir la liberación del segundo cuerpo polar, por medio del cual se puede iniciar el desarrollo. Este método es adecuado cuando el mamífero es, por ejemplo, un ratón o similar.

25 Siempre que se obtenga un huevo que una vez comenzó a desarrollarse, las células madre embrionarias se pueden adquirir mediante el uso de los métodos públicamente conocidos descritos en *Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press (1993); *Biomanual Serie 8 Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells*, Yodosha (1995) y similares.

30 Las células iPS se pueden producir por medio de la transferencia de Oct3/4, Sox2 y Klf4 (c-Myc o n-Myc añadidos adicionalmente de acuerdo con se requiera) a células somáticas (p. ej., fibroblastos, células dérmicas y similares) (Cell, 126: p. 663-676, 2006; Nature, 448: p. 313-317, 2007; Nat Biotechnol, 26: p. 101-106, 2008; Cell 131: 861-872, 2007).

35 Las células madre pluripotentes modificadas se pueden preparar por medio de, por ejemplo, tecnología de recombinación homóloga. Los ejemplos del gen en el cromosoma se pueden modificar en la preparación de células madre pluripotentes modificadas, genes del antígeno de histocompatibilidad, genes relacionados con enfermedades basadas en trastornos de las células neuronales, y similares. Una modificación del gen diana en el cromosoma se puede llevar a cabo mediante el uso de los métodos descritos en *Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994), *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press (1991), *Biomanual Serie 8 Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells*, Yodosha (1995) y similares.

40 En forma específica, por ejemplo, se aísla un gen genómico de un gen diana a modificar (por ejemplo, los genes del antígeno de histocompatibilidad, genes relacionados con enfermedades y similares), y se prepara un vector diana para la recombinación homóloga del gen diana mediante el uso del gen genómico aislado. Por medio de la transferencia del vector diana preparado para una célula madre embrionaria, y la selección de las células que experimentan la recombinación homóloga entre el gen diana y el vector diana, se pueden preparar las células madre que tienen un gen modificado en el cromosoma.

45 Los métodos de aislamiento de un gen genómico de un gen diana incluyen los métodos públicamente conocidos descritos en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987-1997) y en otras partes. Un gen genómico de un gen diana también se puede aislar mediante el uso de un sistema de cribado de biblioteca de ADN genómico (producido por Genome Systems), Kits Universal GenomeWalker™ (producido por CLONTECH) y similares.

50 La preparación de un vector diana para la recombinación homóloga de un gen diana y la clasificación eficaz de un recombinante homólogo se pueden lograr por medio de un método descrito en *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press (1993), *Biomanual Serie 8 Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells*, Yodosha (1995) y en otras partes. El vector diana utilizado puede ser cualquiera del tipo de sustitución y del tipo de inserción. Los métodos útiles de clasificación incluyen selección positiva, selección del promotor, selección negativa, selección poli A y similares.

Los métodos disponibles de selección de un recombinante homólogo deseado de entre las líneas celulares

clasificadas incluyen la hibridación Southern, PCR y similares para el ADN genómico.

Las células madre están disponibles a través de organizaciones especificadas, y los productos comerciales se pueden comprar. Por ejemplo, las células madre embrionarias humanas KhES-1, KhES-2 y KhES-3 están disponibles a través del Instituto de Ciencias Médicas Fronterizas, Universidad de Kioto. Los ejemplos de las células madre embrionarias de ratón incluyen células EB5 y similares.

Las células madre se pueden cultivar para su mantenimiento por medio de un método conocido per se. Por ejemplo, las células madre se pueden mantener por medio de cultivo sin células de alimentación con la adición de suero fetal de ternera (FCS), Reemplazo de Suero Knockout TM (KSR, por su sigla en inglés), y LIF.

(2) Células que permiten la inducción de diferenciación por medio del método de la presente invención

De acuerdo con la presente invención, las células diferenciadas se pueden obtener de células madre, preferiblemente células madre pluripotentes tales como células madre embrionarias. Las células inducidas por diferenciación de una célula madre por medio del método de la presente invención son preferiblemente células del sistema nervioso. Las células son más preferiblemente células madre nerviosas, en particular preferiblemente células progenitoras nerviosas, lo más preferiblemente células progenitoras retinianas. Las células nerviosas obtenidas a través de células progenitoras nerviosas también se pueden obtener por medio de la presente invención. Si bien el tipo de tales células nerviosas no está particularmente limitado, las células retinianas son preferibles. Las células obtenidas por medio del método de la presente invención se pueden identificar por medio de un método conocido per se, por ejemplo, mediante la expresión de un marcador celular.

Los ejemplos de marcadores de células del sistema nervioso incluyen, pero no se limitan a, Rx, NCAM, TuJ1, tirosina hidroxilasa (TH, por su sigla en inglés), serotonina, nestina, MAP2, MAP2ab, NeuN, GABA, glutamatos, ChAT, Sox1, Bf1, Emx1, VGluT1, Pax, Nkx, Gsh, Telencefalina, GluR1, CamKII, Ctip2, Tbr1, Reelina, Tbr1, Brn2 y similares. La expresión de un gen marcador se analiza, por ejemplo, por medio de la puesta en práctica de PCR cuantitativa mediante el uso del sistema de PCR en tiempo real Fast 7500 (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la normalización de los datos obtenidos mediante la expresión de GAPDH. El método de PCR cuantitativa es evidente para los expertos en la técnica. En forma alternativa, las células se pueden manipular para permitir que el gen marcador deseado se exprese como una proteína de fusión de un producto de gen marcador y GFP o similar (knock-in). También es posible detectar la expresión de la proteína mediante el uso de un anticuerpo específico para un producto de gen marcador. De aquí en adelante, para ejemplificar las células que se pueden inducir por diferenciación por medio del método de la presente invención, se describen en detalle las células madre nerviosas.

Una célula madre nerviosa se refiere a una célula que tiene tanto el potencial para la diferenciación en células nerviosas, astrocitos y oligodendrocitos como el potencial de la autorreproducción, que funciona en el cerebro para suministrar células nerviosas, astrocitos y oligodendrocitos. Las células madre nerviosas que se diferencian en las células nerviosas, en particular, se llaman células progenitoras nerviosas. En la presente memoria descriptiva, se entiende que las células madre nerviosas incluyen células progenitoras nerviosas.

Los métodos disponibles de confirmación de la identidad de la célula obtenida como una célula madre nerviosa incluyen un método en donde la célula en realidad se trasplanta a un cerebro vivo y se confirma su potencial de diferenciación, un método en donde la célula madre nerviosa se induce por diferenciación a células nerviosas/astrocitos/oligodendrocitos in vitro, y similares [Mol. Cell. Neuroscience, 8, 389(1997), Science, 283, 534(1999)]. Las células madre nerviosas que tienen estas funciones se pueden teñir con un anticuerpo anti-nestina que reconoce la proteína citoesquelética nestina, que es un marcador cuya expresión se ha confirmado en células progenitoras nerviosas, y un anticuerpo anti-sox1 que reconoce el factor nuclear Sox1 [Science, 276, 66(1997)]. Por lo tanto, también es posible confirmar la identidad de la célula madre nerviosa por medio de su tinción con un anticuerpo anti-nestina o anticuerpo anti-sox1. Sin embargo, a pesar de su identidad como células progenitoras nerviosas, las células progenitoras retinianas son excepcionalmente no teñibles con un anticuerpo anti-nestina o anticuerpo anti-sox1, pero en cambio se pueden teñir con anticuerpos anti-Rx y anti-Pax6, que reconocen Rx y Pax6, que son factores nucleares expresados en células progenitoras retinianas. Por lo tanto, las células progenitoras retinianas se pueden identificar como células positivas para Rx y Pax6 y negativas para nestina y Sox1 (Ikeda et al, PNAS 2005).

Las células progenitoras nerviosas no están particularmente limitadas, en la medida en que tengan el potencial para diferenciarse en diversas células nerviosas, e incluyan células progenitoras cerebrales, células progenitoras cerebelares, células progenitoras del mesencéfalo, células progenitoras después del cerebro, células progenitoras del diencefalo, células progenitoras retinianas y similares. En la presente invención, las células progenitoras nerviosas preferidas son células progenitoras del diencefalo y células progenitoras retinianas, con mayor preferencia dada a las células progenitoras retinianas. El método de la presente invención permite que estas células progenitoras nerviosas elegidas de manera opcional se induzcan por diferenciación, en particular, las células progenitoras del diencefalo y las células progenitoras retinianas, preferiblemente las células progenitoras retinianas, se pueden inducir por diferenciación de manera eficaz.

5 En forma alternativa, las células progenitoras nerviosas, en particular las células progenitoras retinianas, obtenidas por medio del método de la presente invención pueden caracterizarse por marcadores celulares. Los marcadores de una célula progenitora nerviosa incluyen, pero no se limitan a, Rx, NCAM, Sox1, Bf1, nestina, Emx1, Pax6, Nkx2.1, y Gsh2. Los marcadores de una célula progenitora progenitora retiniana, en particular, incluyen Rx, Pax6, Chx10 (con la provisión de la coexpresión con Ki67) y similares.

10 Los marcadores celulares nerviosos incluyen, pero no se limitan a, TuJ1, tirosina hidroxilasa (TH), serotonina, MAP2, MAP2ab, NeuN, GABA, glutamatos, ChAT, VGluT1, GluR1, CamKII, Reelina, Telencefalina, Ctip2, Tbr1, Tbr2, Brn2, L7 y similares. Las células progenitoras nerviosas obtenidas por medio del método de la presente invención son positivas para Rx en una alta frecuencia de por lo menos 60% o más, preferiblemente 80% o más, más preferiblemente aproximadamente 80 a 90%.

15 De acuerdo con la presente invención, también es posible inducir la diferenciación de células madre en células retinianas a través de células progenitoras retinianas. En particular, las células retinianas obtenidas por medio de inducción de diferenciación por la presente invención se obtienen como un constituyente de un agregado celular que tiene una estructura laminar tridimensional que es extremadamente similar a la retina viva. Por lo tanto, las células retinianas de la presente invención pueden asumir una estructura laminar tridimensional que sea morfológicamente extremadamente similar a la retina viva, de modo que las neuronas específicas para las respectivas capas retinianas (en la presente memoria, éstas se describen como "neuronas específicas de la capa retiniana" de manera conjunta) se incluyan en el alcance de la invención.

20 Las células retinianas obtenidas por medio de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, todas las células que constituyen la retina; las células que constituyen las capas individuales retinianas (neuronas específicas de la capa retiniana) incluyen, por ejemplo, células fotorreceptoras, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células ganglionares retinianas y similares. De acuerdo con la presente invención, estas células se pueden obtener de manera eficaz por medio de la inducción de diferenciación de una célula madre. El tipo de las células retinianas obtenidas por medio de la presente invención se pueden identificar por medio de un método conocido per se, por ejemplo, mediante la expresión de un marcador celular.

25 Los marcadores celulares retinianos incluyen, pero no se limitan a, Rx (células progenitoras retinianas), PAX6 (células progenitoras), nestina (expresada en células progenitoras neuronales hipotalámicas, pero no en células progenitoras retinianas), Sox1 (expresado en el epitelio nervioso hipotalámico, pero no en la retina), Crx (células progenitoras de células fotorreceptoras) y similares. En particular, los marcadores de las neuronas específicas de la capa retiniana descritas con anterioridad incluyen, pero no se limitan a, Chx10 (células bipolares), L7 (células bipolares), Tuj1 (células ganglionares), Brn3 (células ganglionares), calretinina (células amacrinas), calbindina (células horizontales), rodopsina (células fotorreceptoras), recoverina (células fotorreceptoras), RPE65 (células epiteliales pigmentarias), Mifl (células epiteliales pigmentarias) y similares.

(3) Método de inducción de diferenciación de la presente invención

35 La presente invención proporciona un método de inducción de diferenciación de una célula madre en células progenitoras nerviosas, que comprenden el paso de la formación de agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero y el paso del cultivo en suspensión de los agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero al que se le ha añadido una preparación de membrana basal en un recipiente de cultivo no adhesivo a células.

40 (3-1) El paso de la formación de agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero [paso (1)]

45 "Formación de agregados homogéneos de células madre" se refiere a la formación de manera cualitativa de agregados homogéneos de células madre al permitir "un número dado de células madre dispersas para agregar con rapidez" al permitir que las células madre se ensamblen y formen agregados de células madre y el cultivo de los agregados (cultivo de agregado), haciendo referencia en particular a la promoción de la epitelización de las células derivadas de células madre al permitir que "las células se agreguen con rapidez". Por lo tanto, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "permitir que las células se agreguen con rapidez" se refiere a la formación con alta reproducibilidad una estructura similar al epitelio en las células producidas por permitir que las células madre se agreguen en forma homogénea.

50 Se puede emplear cualquier método para formar agregados homogéneos de células madre, en la medida que se formen agregados homogéneos de células madre al permitir que "las células se agreguen con rapidez", y una estructura similar al epitelio de las células producidas a partir de las células madre se forme con una alta reproducibilidad. Tales métodos incluyen, por ejemplo, un método en donde las células se encierran en pequeños espacios mediante el uso de una placa con pocillos pequeños (una placa de 96 pocillos), microporos o similar, un método en donde las células se agregan por medio de centrifugación durante un tiempo corto mediante el uso de pequeños tubos centrífugos, y similares.

55 Se puede utilizar cualquier incubador para formar agregados, en la medida que permita que los agregados homogéneos de células madre se formen al permitir que "las células se agreguen con rapidez"; los expertos en la técnica son capaces de determinar la elección de acuerdo con sea apropiado. Tales incubadores incluyen, por

ejemplo, matraces, matraces de cultivo de tejidos, microplacas, placas de micropocillos, microporos, placas múltiples, placas de múltiples pocillos, cámaras de diapositivas, placas de Petri, tubos, bandejas, bolsas de cultivo, y botellas de rodillos. Desde el punto de vista de la formación de agregados homogéneos, es preferible que estos incubadores sean no adhesivos a las células. Los incubadores no adhesivos a las células útiles incluyen incubadores cuyas superficies no se han sometido a un tratamiento artificial (p. ej., un recubrimiento con matriz extracelular y similares) para mejorar la adhesividad celular.

Un medio utilizado para formar agregados se puede preparar mediante el uso de un medio en uso para el cultivo de células animales como medio basal. Se puede utilizar cualquier medio basal disponible para el cultivo de células animales; los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un medio BME, medio BGJb, medio CMRL 1066, medio MEM de Glasgow, medio de opción de zinc de MEM mejorado, medio IMDM, medio 199 medio, medio MEM de Eagle, medio de α MEM, medio de DMEM, medio de Ham, medio de RPMI 1640, medio de Fischer, un medio mixto de los mismos y similares.

Aquí, un medio libre de suero utilizado para formar agregados significa un medio que no contiene un suero no ajustado o no purificado. Se puede utilizar cualquier tal medio libre de suero en la presente invención. Sin embargo, para evitar lo meticuloso en la preparación de medio libre de suero, se puede utilizar un medio libre de suero (GMEM o dMEM, 0,1 mM de 2-mercaptoetanol, 0,1 de mM de una mezcla de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio) suplementados con una cantidad apropiada (p. ej., 1 a 20%) de KSR disponible de manera comercial.

El medio libre de suero puede contener un sustituto de suero. El sustituto de suero puede ser, por ejemplo, uno que contenga de acuerdo con sea apropiado albúmina, transferrina, ácidos grasos, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol o 3'-tiolglicerol, o equivalentes de los mismos y similares. Estos sustitutos de suero se pueden preparar, por ejemplo, por medio de un método descrito en WO98/30679. También, para llevar a cabo el método de la presente invención más convenientemente, se puede utilizar un sustituto de suero disponible de manera comercial. Los ejemplos de tales sustitutos de suero disponibles de manera comercial incluyen un Concentrado de lípido químicamente definido (producido por Gibco Company) y Glutamax (producido por Gibco Company).

El medio libre de suero utilizado para el cultivo en suspensión también puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (p. ej., aminoácidos no esenciales), vitaminas, factores de crecimiento, citoquinas, antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agentes amortiguadores, sales inorgánicas y similares.

La concentración de células madre en el momento de la formación del agregado se puede fijar de acuerdo con sea apropiado por los expertos en la técnica, de manera tal que los agregados de células madre se formen de manera más homogénea y eficaz. La concentración de células madre en el momento de la formación del agregado puede ser cualquier concentración que permita que se formen los agregados homogéneos de células madre. En el caso del cultivo de diferenciación de células ES de ratón mediante el uso de una placa de micropocillos de 96 pocillos, por ejemplo, sus suspensiones preparadas para obtener una densidad celular de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 5×10^3 células, preferiblemente aproximadamente 2×10^3 a aproximadamente 4×10^3 células, por pocillo, se añaden a la placa, y la placa se mantiene en reposo para permitir que se formen agregados. En el caso de las células ES humanas, se utilizan suspensiones preparadas para obtener una densidad celular de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 12×10^3 células, preferiblemente aproximadamente 4×10^3 a aproximadamente 10×10^3 células, por pocillo.

Otras condiciones de cultivo tales como la temperatura de cultivo y la concentración de CO_2 en el momento de la formación del agregado se pueden fijar de acuerdo con sea apropiado. La temperatura de cultivo no está particularmente limitada, y es, por ejemplo, aproximadamente 30 a 40°C, preferiblemente aproximadamente 37°C. La concentración de CO_2 es, por ejemplo, aproximadamente 1 a 10%, preferiblemente aproximadamente 5%.

Si bien el tiempo hasta la formación de agregados se puede determinar de acuerdo con sea apropiado de acuerdo con la elección de la célula madre utilizada, en la medida que se permitan agregar las células con rapidez, es deseable que la formación se lleve a cabo tan pronto como sea posible para garantizar la formación de agregados homogéneos. En forma convencional, esta formación de agregados se lleva a cabo durante aproximadamente 2 días (véase, por ejemplo, Watanabe, K. et al., Nature Neurosci. 8, 288-296, Schuldiner M, Benvenisty N. Factors controlling human embryonic stem cell differentiation. Methods Enzymol. 2003; 365: 446-461). En la presente invención, por contraste, este tiempo se acorta para permitir una inducción eficaz de diferenciación de las células nerviosas deseadas y similares. En el caso de células madre embrionarias de ratón, por ejemplo, es deseable que los agregados se formen preferiblemente dentro de las 12 horas, más preferiblemente dentro de las 6 horas. Mientras tanto, en el caso de las células madre embrionarias humanas, es deseable que los agregados se formen preferiblemente dentro de las 24 horas, más preferiblemente dentro de las 12 horas. Si se excede este tiempo, los agregados homogéneos de células madre no se pueden formar, lo que a su vez puede causar una notable reducción en la eficacia de diferenciación en el paso posterior. Este tiempo para agregar la formación se puede ajustar de acuerdo con sea apropiado por medio de la elección de una herramienta para la agregación de células, las condiciones centrífugas y similares por los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica son capaces de emitir una opinión con respecto a la formación de agregados

“homogéneos” de células madre y la formación de una estructura similar al epitelio en cada tipo de célula que forma los agregados, sobre la base del tamaño de las masas de agregados y el número de células en los mismos, la morfología macroscópica, la morfología microscópica de acuerdo con lo analizado por tinción histológica y la uniformidad de los mismos, la expresión de la diferenciación y la no diferenciación de marcadores y la uniformidad de los mismos, el control de la expresión de los marcadores de diferenciación y la sincronización de los mismos, la reproducibilidad de interagregados de la eficacia de diferenciación, y similares.

En forma específica, los agregados homogéneos de células madre se pueden formar, por ejemplo, por medio de un método en donde las células madre embrionarias se cultivan para su mantenimiento, seguido por un tratamiento de dispersión, y se suspenden en un medio apropiado (p. ej., medio MEM de Glasgow suplementadas con 10% de KSR, 0,1 mM de una solución de aminoácido no esencial, 2 mM de glutamina, 1 mM de ácido pirúvico y 0,1 mM 2-mercaptoetanol; pueden contener cantidades apropiadas de los factores que se describen a continuación, se añaden de acuerdo con se requiera, y similares), y las células se suspenden en 150 μ l del medio descrito con anterioridad en 3×10^3 células por pocillo mediante el uso de una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo en U no adhesiva a las células para formar agregados con rapidez.

(3-2) El paso de cultivo en suspensión de los agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero en presencia de una preparación de membrana basal [paso (2)]

Éste es un paso en donde los agregados homogéneos de células madre formados en el paso (1) se someten a un cultivo en suspensión en presencia de una preparación de membrana basal para inducir la diferenciación de células madre.

“La preparación de membrana basal” puede ser cualquiera que contenga un componente constituyente de membrana basal que tiene la función de controlar la morfología, diferenciación, proliferación, motor, expresión funcional y similares de células similares a las células epiteliales cuando las células deseadas capaces de formar una membrana basal se siembran y se cultivan en la misma. Tal preparación de membrana basal se puede preparar por medio de, por ejemplo, la eliminación de las células capaces de formar la membrana basal, la adhesión a un soporte a través de la membrana basal, mediante el uso de una solución capaz de disolver los lípidos de las células.

Las preparaciones preferidas de membrana basal incluyen productos disponibles de manera comercial como componentes de membrana basal (p. ej., Matrigel) y aquéllos que contienen una molécula de matriz extracelular públicamente conocida como un componente de membrana basal (p. ej., laminina, colágeno de tipo IV, proteoglicano heparán sulfato, entactina y similares). Estas moléculas de matriz extracelular a utilizar son productos deseablemente purificados.

Como tales moléculas de matriz extracelular, preferiblemente se pueden utilizar laminina y entactina. En particular, cuando se utilizan Nodal y Activina a mencionarse más adelante de manera simultánea para llevar a cabo la presente invención, preferiblemente se pueden utilizar laminina purificada y entactina como componentes de membrana basal.

Matrigel es una preparación de membrana basal derivada de sarcoma de ratón Engelbreth Holm Swam (EHS, por su sigla en inglés). Los componentes principales de Matrigel son colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicano heparán sulfato, y entactina. En adición, TGF- β , el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por su sigla en inglés), el activador tisular del plasminógeno, y el factor de crecimiento producido de manera natural por los tumores EHS también están contenidos. Los “productos de factor de crecimiento reducido” de Matrigel tienen concentraciones más bajas de factores de crecimiento que en el Matrigel ordinario; las concentraciones estándar de los mismos son < 0,5 ng/ml para EGF, < 0,2 ng/ml para NGF, < 5 pg/ml para PDGF, 5 ng/ml para IGF-1, y 1,7 ng/ml para TGF- β . En el método de la presente invención, es preferible utilizar “un producto de factor de crecimiento reducido”.

La concentración de la preparación de membrana basal añadida al medio para el cultivo en suspensión en este paso no está particularmente limitada, en la medida que la estructura epitelial de un tejido nervioso (p. ej., tejido retiniano) se mantenga en forma estable. Por ejemplo, preferiblemente se pueden utilizar laminina purificada y entactina. En particular, cuando se utilizan Nodal y Activina a mencionarse más adelante (se utiliza un complejo de laminina/entactina), en general se añade a una concentración de 1 μ g/ml-5000 μ g/ml, preferiblemente 10 μ g/ml-2000 μ g/ml, más preferiblemente 20 μ g/ml-1000 μ g/ml, y lo más preferiblemente 50 μ g/ml-500 μ g/ml, a un medio. Cuando se utiliza Matrigel, por ejemplo, se añade preferiblemente en un volumen 1/100 a 1/20, más preferiblemente en un volumen 1/100 a 1/50, del volumen del caldo de cultivo. Si bien la preparación de membrana basal se puede añadir al medio ya en el comienzo del cultivo de la célula madre, se añade al medio preferiblemente dentro de varios días después del comienzo del cultivo en suspensión (p. ej., 1 a 3 días después del comienzo del cultivo en suspensión).

“A los agregados homogéneos del cultivo en suspensión de células madre” o “a los agregados homogéneos del cultivo de células madre como agregados suspendidos (también denominados masas de agregados)” se refiere al cultivo de la población de células madre que se han ensamblado para formar agregados homogéneos, obtenidos en el paso (1) descrito con anterioridad, en un medio de cultivo libre de suero bajo condiciones que no son adhesivas al incubador de células (en la presente memoria, los pasos (1) y (2) descritos con anterioridad a veces se describen como “el método SFEBq modificado” de manera conjunta; el método en donde no se utiliza preparación de

membrana basal en el paso (2) se describe como “el método SFEBq”). Cuando se cultivan células madre en suspensión, el cultivo preferiblemente se lleva a cabo en ausencia de células de alimentación para facilitar la formación de agregados suspendidos, y/o para lograr una inducción de diferenciación eficaz (p. ej., una inducción de diferenciación en células ectodérmicas tales como células del sistema nervioso).

5 Un medio utilizado en el cultivo en suspensión de los agregados obtenidos en el paso (1) mencionado con anterioridad se puede preparar con un medio para el cultivo de células animales como medio basal. El medio basal no está particularmente limitado, en la medida que sea un medio que se puede utilizar para el cultivo de células animales; por ejemplo, se pueden mencionar un medio BME, medio BGJb, medio CMRL 1066, medio MEM de Glasgow, medio de opción de zinc de MEM mejorado, medio IMDM, medio 199 medio, medio MEM de Eagle, medio de dMEM, medio de DMEM, medio de Ham, medio de RPMI 1640, medio de Fischer, y un medio mixto de los mismos y similares. A menos que se especifique lo contrario, el medio utilizado en el paso (1) se puede utilizar como está para el cultivo en suspensión.

10 Cuando los agregados mencionados con anterioridad se cultivan en suspensión, se utiliza un medio libre de suero como medio. Aquí, un medio libre de suero significa un medio que no contiene suero no ajustado o no purificado. Un medio que contiene un componente derivado de sangre purificada o un componente derivado de tejido animal (por ejemplo, el factor de crecimiento) se debe interpretar como un medio libre de suero, en la medida que no contenga suero no ajustado o no purificado.

15 El medio libre de suero utilizado en el cultivo en suspensión puede ser, por ejemplo, uno que contiene un sustituto de suero. El sustituto de suero, por ejemplo, puede ser uno que contiene de acuerdo con sea apropiado una albúmina (por ejemplo, una albúmina rica en lípidos), transferrina, ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol o 3'-tioglicerol, o sus equivalentes y similares. Tales sustitutos de suero se pueden preparar por medio de, por ejemplo, un método descrito en WO98/30679. Para facilitar una implementación más fácil de un método de la presente invención, se pueden utilizar sustitutos de suero disponibles de manera comercial. Los ejemplos de tales sustitutos de suero disponibles de manera comercial incluyen Reemplazo de Suero Knockout (KSR), Concentrado de lípidos químicamente definidos (producido por Gibco) y Glutamax (producido por Gibco).

20 En adición, el medio libre de suero utilizado en el método de la presente invención puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos no esenciales), vitaminas, factores de crecimiento, citoquinas, antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agentes amortiguadores, sales inorgánicas y similares. Por ejemplo, se puede utilizar 2-mercaptoetanol sin limitaciones particulares en la medida que se utilice a una concentración adecuada para el cultivo de células madre, y se puede utilizar a concentraciones de, por ejemplo, aproximadamente 0,05 a 1,0 mM, preferiblemente aproximadamente 0,1 a 0,5 mM, más preferiblemente aproximadamente 0,2 mM.

25 El medio libre de suero utilizado para el cultivo en suspensión no está particularmente limitado, en la medida que sea como se describió con anterioridad. Sin embargo, desde el punto de vista de evitar lo meticuloso en la preparación, y de inducir de manera eficaz la diferenciación de células madre en células progenitoras nerviosas, preferiblemente células progenitoras retinianas, es preferible que un medio libre de suero (GMEM o dMEM, 0,1 mM 2-mercaptoetanol, 0,1 mM de una mezcla de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio) suplementado con una cantidad apropiada de KSR disponible de manera comercial (Reemplazo de Suero Knockout) se utilice como el medio libre de suero. La cantidad de KSR añadida al medio libre de suero no está particularmente limitada. En el caso de células ES de ratón, por ejemplo, la cantidad añadida es normalmente 1 a 20% (v/v). Cuando las células progenitoras retinianas se van a inducir por diferenciación a partir de células ES de ratón de manera más eficaz, la cantidad añadida es preferiblemente 1 a 5%, lo más preferiblemente 2%. En el caso de las células ES humanas, la cantidad de KSR añadida es normalmente 1 a 20%. Cuando las células progenitoras retinianas se van a inducir por diferenciación a partir de células ES humanas de manera más eficaz, la cantidad de KSR añadida es preferiblemente 2 a 20%. Por medio del cultivo en suspensión de los agregados con la adición de KSR, en adición a la preparación de membrana basal mencionada con anterioridad, el método de inducción de diferenciación de la presente invención que se describe a continuación y similares se pueden llevar a cabo de manera más eficaz.

30 El recipiente de cultivo utilizado para el cultivo en suspensión no está particularmente limitado, en la medida que permita que el cultivo en suspensión de células; los ejemplos incluyen matraces, matraces de cultivo de tejidos, platos, placas de Petri, platos de cultivo de tejidos, platos múltiples, microplacas, placas de micropocillos, placas múltiples, placas de múltiples pocillos, cámaras de diapositivas, placas de Petri, tubos, bandejas, bolsas de cultivo, y botellas de rodillos.

35 Cuando los agregados se cultivan en suspensión, el recipiente de cultivo es preferiblemente no adhesivo a células. Como el recipiente de cultivo no adhesivo a células, se puede utilizar un recipiente de cultivo cuya superficie no se ha tratado de manera artificial con el fin de aumentar la adhesividad a células (p. ej., un tratamiento de recubrimiento con matriz extracelular y similares).

40 Otras condiciones de cultivo tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂ y la concentración de O₂ en el momento del agregado del cultivo en suspensión se pueden fijar de acuerdo con sea apropiado. La temperatura de cultivo no está particularmente limitada, y es, por ejemplo, aproximadamente 30 a 40°C,

preferiblemente aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, aproximadamente 1 a 10%, preferiblemente aproximadamente 5%. Mientras tanto, cuando las células progenitoras retinianas se van a inducir por diferenciación, y teniendo en cuenta la alta demanda de oxígeno por ende, la concentración de O₂ es, por ejemplo, 20 a 70%, preferiblemente 20 a 50%, más preferiblemente 20 a 40%. El tiempo de cultivo en este paso no está particularmente limitado, y es normalmente 48 horas o más, preferiblemente días o más.

Después del cultivo en suspensión, los agregados se pueden mantener tal cual o se tratan con dispersión (p. ej., un tratamiento con tripsina/EDTA), y las células se pueden cultivar de manera adicional bajo condiciones adhesivas (de aquí en adelante, descritas como "cultivo de adhesión" si se requiere). Si se lleva a cabo un cultivo de adhesión, es preferible que se utilice un incubador adhesivo a células, por ejemplo, un incubador recubierto con una matriz extracelular y similares (p. ej., poli D-lisina, laminina, entactina, fibronectina). Las condiciones de cultivo tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂, la concentración de O₂ y el tiempo de cultivo en el cultivo de adhesión se pueden determinar con facilidad por los expertos en la técnica.

En el cultivo en suspensión y el cultivo de adhesión, se puede utilizar en combinación un inductor de diferenciación conocido. Por ejemplo, cuando las células progenitoras nerviosas se van a inducir por diferenciación a partir de una célula madre embrionaria, se puede utilizar en combinación un inductor de diferenciación conocido en células progenitoras nerviosas. Los ejemplos de tales inductores de diferenciación incluyen NGF [Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 552(1994)], ácido retinoico [Dev. Biol., 168, 342(1995); J. Neurosci., 16, 1056(1996)], un factor inhibidor de BMP [Nature, 376, 333-336(1995)], IGF [Genes & Development, 15, 3023-8(2003)], inhibidor de Nodal, inhibidor de Wnt [Nature Neurosci. 8, 288-296(2005)], Activina (Proc Natl.Acad.Sci. Estados Unidos, 9 de agosto de 2005; 102(32) 11331-6), y similares. En la presente invención, cuando se utilizan laminina y entactina como preparación de membrana basal, se utilizan deseablemente Nodal y Activina como inductores de diferenciación conocidos.

La cantidad del inductor de diferenciación a utilizar en combinación no está particularmente limitada y aquéllos con experiencia ordinaria en la técnica pueden preparar una cantidad adecuada que induzca una diferenciación deseada. Cuando se utilizan Nodal y Activina para la inducción de diferenciación de células progenitoras retinianas, En general se añade Nodal a una solución de cultivo a una concentración de 50 ng/ml-4000 ng/ml, preferiblemente 200 ng/ml-2000 ng/ml, y en general se añade Activina a una solución de cultivo a una concentración de 20 ng/ml-2000 ng/ml, preferiblemente 50 ng/ml-500 ng/ml. La solución de cultivo deseablemente se intercambia a diario. Por medio de la adición de un inductor de diferenciación además de las preparaciones de membrana basal mencionadas con anterioridad cuando se lleva a cabo un cultivo flotante de agregados, el método de inducción de diferenciación que se va a describir a continuación se puede llevar a cabo de manera más eficaz.

El momento de la adición de un inductor de diferenciación no está particularmente limitado, y se pueden añadir desde la etapa inicial de inducción de diferenciación o en un punto de tiempo adecuado. Cuando se utilizan Nodal y Activina para el objeto mencionado con anterioridad, pueden añadirse un día después del comienzo del cultivo y añadirse de manera continua durante 7 a 10 días de allí en adelante.

De acuerdo con el método y combinación del cultivo en suspensión descrito con anterioridad del cultivo en suspensión y el cultivo de adhesión, se pueden obtener células progenitoras nerviosas de una célula madre al fijar la duración del cultivo y similares de acuerdo con sea apropiado. En particular en el paso (2), cuando los agregados homogéneos de células madre se cultivan en suspensión en presencia de una preparación de membrana basal durante varios días a varias decenas de días (p. ej., a 12 días para las células ES de ratón, 20 a 40 días para las células ES humanas), la autoformación de una pluralidad de estructuras ópticas de protrusión con forma de copa como se muestra en la Fig. 3 (de aquí en adelante, esta estructura se describe como "tejido con forma de copa óptica") se observa en el agregado de células madre [de aquí en adelante, del paso (2), en particular el paso de permitir que un tejido con forma de copa óptica se autoforme en el agregado se describe como "paso (2)"].

La identidad de las células progenitoras retinianas obtenida por medio del método o combinación del cultivo en suspensión descrito con anterioridad del cultivo en suspensión y el cultivo de adhesión se puede confirmar por la presencia o ausencia de la expresión de un gen marcador y similar o la forma y similares de las células o tejido como índice, que se pueden combinar de acuerdo con se requiera. La elección del gen marcador para las células progenitoras retinianas y cómo analizar su expresión son como se describió en (2) con anterioridad.

El tejido con forma de copa óptica obtenido de este modo no sólo simplemente de manera morfológica tiene una protrusión con forma de copa óptica en el agregado, sino que también exhibe un alto nivel de expresión del marcador Rx de la célula progenitora retiniana de las células que constituyen el tejido. También se observa en la parte externa de la protrusión una capa de células epiteliales pigmentarias retinianas que expresan Pax6. Esta estructura de tejido con forma de copa óptica es extremadamente similar a la estructura del tejido de copa óptica en la génesis de un organismo vivo. Por lo tanto, de acuerdo con el método de la presente invención, es posible producir no sólo células progenitoras nerviosas (preferiblemente células progenitoras retinianas), sino también un tejido con forma de copa óptica autoensamblado, a partir de una célula madre.

Debido a que el tejido con forma de copa óptica obtenido se autoforma como una protrusión del agregado, es posible obtener una masa altamente pura de células progenitoras retinianas por medio de la separación de la

protrusión. En consecuencia, la presente invención proporciona un método para la separación o la identificación de una masa de células progenitoras retinianas, que comprende los pasos (1) y (2') descritos con anterioridad.

5 Una masa de células progenitoras retinianas se puede obtener por medio del corte del tejido con forma de copa óptica autoformado del agregado de manera física y morfológica. Por lo tanto, este método hace posible separar con facilidad la masa de células progenitoras retinianas. Debido a que este método obvia la operación de confirmación de la posición de las células progenitoras retinianas mediante el uso de un marcador de célula progenitora retiniana y similares en la obtención de las células progenitoras retinianas por medio del cultivo en suspensión de agregados de células madre, una masa de células progenitoras retinianas se puede obtener con facilidad por medio de simplemente el corte de la masa celular formada como una protrusión en el agregado.

10 (3-3) El paso de cultivo en suspensión del tejido con forma de copa óptica formado en un caldo de cultivo de órganos [paso (3)]

Éste es un paso en donde el tejido con forma de copa óptica obtenido en el paso (2') se cultiva en suspensión en un caldo de cultivo de órganos.

15 En este paso, el tejido con forma de copa óptica autoformado en el paso (2') se cultiva en suspensión en un caldo de cultivo de órganos. El tejido con forma de copa óptica utilizado puede ser el agregado de células madre que contiene el tejido con forma de copa óptica; el tejido con forma de copa óptica formado como una protrusión del agregado de células madre se puede cortar de manera física y morfológica, y ésta se puede cultivar en suspensión en un caldo de cultivo de órganos. Cuando se ha cortado el tejido con forma de copa óptica, todo el agregado de células madre se puede manejar como una masa de células progenitoras retinianas positivas para Rx; por lo tanto, es posible
20 inducir la diferenciación de células progenitoras retinianas de manera más eficaz para producir el tejido retiniano y las neuronas específicas de la capa retiniana.

El tejido con forma de copa óptica se puede cortar mediante el uso de cualquier método; es posible cortar el tejido de un agregado de células madre mediante el uso de micropinzas y similares.

25 Si bien el caldo de cultivo de órganos utilizado para cultivar el tejido con forma de copa óptica no está particularmente limitado, preferiblemente se utiliza un caldo de cultivo de órganos en uso común para la inducción de células retinianas. Los ejemplos incluyen (1) DMEM/F12/N2 + 0,5 μ M de ácido retinoico, (2) 66% E-MEM-HEPES + 33% HBSS + 1% de suplemento de FCS+N2 + 5,75 mg/ml de glucosa + 200 mM de L-glutamina + 20 ng/ml de aFGF + 20 ng/ml de bFGF + 20nM de Shh + 1 mM de ácido retinoico + 100 de mM de taurina, o (3) G-MEM + 5% de KSR + suplemento de N2 + 0,1 mM de aminoácidos no esenciales + 1 mM de piruvato + 0,1 de mM 2-mercaptoetanol + 1 mM de ácido retinoico + 100 mM de taurina y similares.
30

El tejido con forma de copa óptica se cultiva en un caldo de cultivo de órganos. El incubador utilizado en el cultivo en suspensión del tejido con forma de copa óptica puede ser el mismo que el incubador utilizado en el paso (2) descrito con anterioridad. Otras condiciones de cultivo tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂ y la concentración de O₂ en el momento de tejido con forma de copa óptica cultivo en suspensión se pueden fijar de acuerdo con sea apropiado. La temperatura de cultivo no está particularmente limitada, y es, por ejemplo, aproximadamente 30 a 40°C, preferiblemente aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, aproximadamente 1 a 10%, preferiblemente aproximadamente 5%. Mientras tanto, La concentración de O₂ es, por ejemplo, 20 a 70%, preferiblemente 20 a 60%, más preferiblemente 30 a 50%, cuando las células progenitoras retinianas se van a inducir por diferenciación, y por ende teniendo en cuenta el alto requerimiento de oxígeno.
35

40 El tiempo de cultivo en este paso no está particularmente limitado, y es normalmente 48 horas o más, preferiblemente 7 días o más.

El tejido con forma de copa óptica autoformado en el paso (2') se autoinduce a un tejido retiniano a través de este paso. Por lo tanto, por medio del cultivo en suspensión del tejido con forma de copa óptica autoformado en el paso (2') en un caldo de cultivo de órganos, un tejido retiniano o una población celular que constituye el tejido retiniano se autoinduce in vitro. En consecuencia, la presente invención proporciona un método de producción de un tejido retiniano in vitro por medio de la autoformación de tejido retiniano y un método de producción de una población celular que constituye el tejido retiniano. Aquí, "in vitro" simplemente se refiere a no estar en un organismo vivo.
45

Como se muestra en la Fig. 4, el tejido retiniano en un organismo vivo tiene una estructura en donde las células nerviosas están dispuestas en orden en una estructura de láminas de cinco capas regulares para permitir que la luz incidental a través de la córnea y la lente sea recibida por células fotorreceptoras superficiales y se convierta en una señal eléctrica, para transmitir información en el orden de las células bipolares y las células ganglionares nerviosas, y finalmente transmitir la señal al cerebro. El tejido retiniano autoformado por medio del método de la presente invención no es un simple ensamblaje de células retinianas, sino que sorprendentemente tiene una estructura que es morfológicamente extremadamente similar al tejido retiniano vivo.
50

55 El tejido retiniano autoformado por la presente invención tiene una estructura de cinco láminas autoformada a partir de células nerviosas en disposición regular en el mismo orden que en el tejido retiniano de un organismo vivo. Las cinco capas están configuradas por diferentes tipos de células retinianas (células fotorreceptoras, células

horizontales, células bipolares, células amacrinas, células ganglionares), al asumir esta estructura, el tejido retiniano es capaz de transmitir estímulos de luz desde fuera del cuerpo al sistema nervioso central como estímulos eléctricos. De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de inducción de diferenciación selectiva de una célula madre a una población celular que constituye este tejido retiniano, es decir, la "neurona específica de la capa retiniana". También se proporciona un método de producción de "una neurona específica de la capa retiniana" de una célula madre.

La neurona específica de la capa retiniana obtenida de ese modo se puede mantener tal cual o se trata con dispersión (p. ej., un tratamiento con tripsina/EDTA), y las células se pueden cultivar de manera adicional bajo condiciones adhesivas. En el cultivo de adhesión, es preferible que se utilice un incubador adhesivo a células, por ejemplo, un incubador recubierto con una matriz extracelular y similares (p. ej., poli D-lisina, laminina, entactina, fibronectina). Las condiciones de cultivo para el cultivo de adhesión, tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂, y la concentración de O₂, se pueden determinar con facilidad por los expertos en la técnica. En esta operación, las células se pueden cultivar en presencia de un inductor de diferenciación conocido. Los ejemplos de tales inductores de diferenciación incluyen NGF [Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 552(1994)], ácido retinoico [Dev. Biol., 168, 342(1995), J. Neurosci., 16, 1056(1996)], un factor inhibidor de BMP [Nature, 376, 333-336(1995)], IGF [Genes & Development, 15, 3023-8(2003)] y similares.

El tejido retiniano y la neurona específica de la capa retiniana obtenidos de este modo se pueden identificar por la presencia o ausencia de la expresión de un gen marcador y similar como índice, que se puede combinar de acuerdo con se requiera. La neurona específica de la capa retiniana obtenida también se puede identificar por medio del examen de la morfología de las células. Además, sobre la base de estos patrones de expresión de marcadores o la morfología celular, también es posible aislar las células particulares deseadas.

La expresión de un gen marcador se puede confirmar por medio de la puesta en práctica de PCR cuantitativa como se describió en (2) con anterioridad. En forma alternativa, la identidad se puede confirmar mediante la expresión de GFP y similares por medio de la manipulación de las células para permitir que un gen marcador deseado se exprese como una proteína de fusión de un producto de gen marcador y GFP o similar. La expresión de la proteína se puede detectar mediante el uso de un anticuerpo específico para un producto de gen marcador.

Los ejemplos de genes marcadores útiles incluyen, pero no se limitan a, marcadores públicamente conocidos tales como Rx (células progenitoras retinianas), PAX6 (células progenitoras retinianas), nestina (expresada en células progenitoras neuronales hipotalámicas, pero no en células progenitoras retinianas), Sox1 (expresado en el epitelio nervioso hipotalámico, pero no en la retina), Crx (células progenitoras de células fotorreceptoras) Chx10 (células bipolares y células progenitoras retinianas juveniles), L7 (células bipolares), Tuj1 (células ganglionares), Brn3 (células ganglionares), calretinina (células amacrinas), calbindina (células horizontales), rodopsina (células fotorreceptoras), recoverina (células fotorreceptoras), RPE65 (células epiteliales pigmentarias), y Mitf (células epiteliales pigmentarias). Por medio de la combinación de acuerdo con sea apropiado de la presencia y ausencia de la expresión de estos genes marcadores, se pueden identificar las células obtenidas. Por ejemplo, las células amacrinas son positivas tanto para calretinina como Pax6 y negativas para Tuj1, como se indicó con anterioridad. Las células ganglionares retinianas son positivas tanto para Brn3 and Tuj1.

(4) Productos de cultivo

También se proporcionan productos de cultivo de acuerdo con lo obtenido por medio del método de la presente invención. Los productos de cultivo pueden incluir todos los productos de cultivo celular obtenidos por medio del método de la presente invención, tales como un agregado suspendido de células madre, células obtenidas por medio de tratamiento de dispersión de un agregado suspendido, y células obtenidas por medio del cultivo de células tratadas con dispersión. Los productos de cultivo también incluyen células homogéneas y poblaciones de células ensambladas aisladas y purificadas de los productos de cultivo descritos con anterioridad hasta el grado de administración aceptable a los sujetos, por ejemplo, células progenitoras nerviosas (p. ej., células progenitoras retinianas) y similares obtenidas a través de los pasos (1) y (2), tejido con forma de copa óptica, una masa de células progenitoras retinianas de acuerdo con lo obtenido a través de los pasos (1) y (2'), o tejido retiniano, la neurona específica de la capa retiniana y similares obtenidos a través de los pasos (1), (2') y (3).

Los productos de cultivo se pueden utilizar como fármacos terapéuticos para enfermedades basadas en trastornos de células del sistema nervioso (p. ej., células retinianas), como reforzadores de células y tejidos lesionados por otras causas (p. ej., para su uso en cirugías de trasplantes), y para otros propósitos.

Los ejemplos de enfermedades basadas en trastornos de células del sistema nervioso incluyen la enfermedad de Parkinson, degeneración espinocerebelosa, la corea de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, enfermedades cerebrales isquémicas (p. ej., accidentes cerebrovasculares), epilepsia, traumas cerebrales, lesiones en la columna vertebral, enfermedades del nervio motor, enfermedades neurodegenerativas, pérdida auditiva coclear, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades causadas por trastornos neurotóxicos, y similares. En particular, enfermedades basadas en trastornos de las células de la retina incluyen, por ejemplo, degeneración pigmentaria de la retina, degeneración macular senil, glaucoma, retinopatía diabética, retinopatía neonatal, y obstrucción de la arteria retiniana. Los productos de cultivo también se puede utilizar para complementar células y

tejidos perdidos debido a cirugía oftalmológica (p. ej., después de retinoplastia para el desprendimiento de retina) y similares (p. ej., cirugía de trasplante de retina).

5 Cuando se utilizan células obtenidas por medio del método de la presente invención (p. ej., células progenitoras nerviosas) como fármaco terapéutico para una enfermedad basada en un trastorno de las células, es preferible que las células se trasplanten al sujeto después de aumentar la pureza de las células.

10 Se puede utilizar cualquier método de separación celular de conocimiento público para la purificación celular. Tales métodos incluyen, por ejemplo, un método que utiliza un citómetro de flujo [véase, por ejemplo, *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), *Monoclonal Antibodies: principles and practice*, Tercera edición, Acad. Press (1993), *Int. Immunol.*, 10, 275 (1998)], el método de panoramización [véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies: principles and practice*, Tercera edición, Acad. Press (1993), *Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press (1996), *J. Immunol.*, 141, 2797 (1988)], y fraccionamiento celular sobre la base de diferencias de densidad de sacarosa [véase, por ejemplo, *Soshiki Baiyou no Gijyutsu* (3ra edición), Asakura Shoten (1996)].

15 El método para aumentar la pureza celular comprende el paso del cultivo de células obtenidas por medio de la inducción de diferenciación de las células madre descritas con anterioridad (p. ej., células progenitoras nerviosas) en un medio que contiene un agente anticancerígeno. Por ende, las células indiferenciadas se pueden eliminar, haciendo posible obtener células diferenciadas de mayor pureza, que son más adecuadas para uso farmacéutico. Por lo tanto, por medio de un tratamiento con un agente anticancerígeno, las células distintas de las células diferenciadas deseadas, por ejemplo, las células indiferenciadas, se pueden eliminar.

20 Aquí, el agente anticancerígeno se ejemplifica por medio de mitomicina C, 5-fluorouracilo, adriamicina, Ara-C, metotrexato y similares. Estos agentes anticancerígenos preferiblemente se utilizan a concentraciones que son más citotóxicas para las células indiferenciadas que para las células inducidas por diferenciación. En forma específica, el cultivo con estos agentes anticancerígenos se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos de cultivo descritos con anterioridad para determinar concentraciones óptimas. Por ejemplo, un método es útil en donde las células se cultivan en un incubador de CO₂ aireado con 5% de dióxido de carbono gaseoso a 37°C durante varias horas, durante 2 horas, mediante el uso de un medio que contiene estos agentes anticancerígenos a concentraciones un centésimo a un tiempo el intervalo de concentraciones para organismos vivos especificados en la Farmacopea Japonesa.

30 Aquí se puede utilizar cualquier medio que permita el cultivo de las células inducidas por diferenciación. En forma específica, los medios mencionados con anterioridad y similares son útiles.

En la terapia de trasplante, el rechazo de injertos debido a diferencias del antígeno de histocompatibilidad a menudo es problemático, cuyo problema, sin embargo, se puede resolver mediante el uso de una célula madre que tiene el núcleo de una célula somática trasplantado a la misma, o una célula madre que tiene un gen modificado en el cromosoma de la misma.

35 Por medio de la inducción de diferenciación mediante el uso de una célula madre que tiene el núcleo de una célula somática trasplantado a la misma, se pueden obtener células progenitoras nerviosas, células progenitoras retinianas, células del sistema nervioso, neuronas específicas de la capa retiniana y similares del individuo que es el donante de la célula somática. Las células de tal individuo no sólo son eficaces en los medicamentos de trasplante tal como son, sino que también son útiles como material de diagnóstico para determinar si un fármaco existente es eficaz en el individuo. Además, por medio del cultivo de células inducidas por diferenciación durante un largo periodo, es posible determinar su susceptibilidad al estrés oxidativo y la senescencia. Por medio de la comparación de sus funciones o la duración de la vida con las de células de otros individuos, es posible evaluar los riesgos individuales de contraer enfermedades neurodegenerativas y otras. Estos datos de evaluación son útiles para proporcionar un método profiláctico eficaz para las enfermedades diagnosticadas como de desarrollo en altas incidencias en el futuro.

45 Las células inducidas por diferenciación a partir de una célula madre por medio del método de la presente invención, por ejemplo, células progenitoras nerviosas, células progenitoras retinianas, células del sistema nervioso, neuronas específicas de la capa retiniana y similares se pueden trasplantar a un sitio de enfermedad de un paciente por medio de un método conocido per se [véase, p. ej., *Nature Neuroscience*, 2, 1137(1999)].

50 (5) Formación de la red nerviosa retiniana

La presente invención proporciona un método de permitir que una red nerviosa retiniana se autoforme in vitro, que comprende los pasos (1), (2') y (3). De acuerdo con este método, es posible permitir que un agregado celular obtenido por medio del método SFEBq modificado forme una red nerviosa retiniana en el mismo sin que se convierta en una masa de células nerviosas desordenada.

55 La construcción de una red nerviosa retiniana en los agregados celulares in vitro se puede confirmar, por ejemplo, por medio de la observación de excitación eléctrica por estimulación de la luz [Homma et al., (2009), *J. Neurosci. Res.* 87 (9)2175-2182] o análisis de imágenes con liberación de calcio como índice. Aquí, "in vitro" se refiere a no

estar en un organismo vivo.

En la red nerviosa retiniana autoformada por medio del método de la presente invención, una elevación de Ca^{2+} (oscilación de calcio) sincronizada o no sincronizada con células circundantes se observa repetidamente en muchas células. Por lo tanto, la red nerviosa retiniana formada por medio del método de la presente invención preferiblemente puede estar acompañada de una activación espontánea sincronizada. Aquí, "activación" se refiere a una actividad excitatoria debido a despolarización de células nerviosas, y "activación espontánea" se refiere a la ocurrencia espontánea de la activación. Por lo tanto, la red nerviosa retiniana formada por medio del método de la presente invención puede causar actividades nerviosas similares a la retina viva en un cierto aspecto.

Se proporciona un producto de cultivo de acuerdo con lo obtenido por medio del método de la presente invención, en forma específica un agregado celular que constituye la red nerviosa retiniana descrita con anterioridad. Este producto de cultivo (agregado celular) ha formado una red nerviosa retiniana que es extremadamente similar a la red nerviosa retiniana en un organismo vivo, de modo que se pueda utilizar para el cribado de fármacos terapéuticos para enfermedades basadas en trastornos de células del sistema nervioso, por ejemplo, células retinianas, cribado para fármacos terapéuticos para lesiones celulares debido a otras causas, o pruebas de toxicidad de las mismas y similares. Aquí, los ejemplos de enfermedades basadas en trastornos de células retinianas incluyen intoxicación por mercurio orgánico, retinopatía de cloroquina, degeneración pigmentaria de la retina, degeneración macular senil, glaucoma, retinopatía diabética, retinopatía neonatal, y similares.

Este producto de cultivo (agregado celular) también se puede utilizar como un fármaco terapéutico para enfermedades basadas en trastornos de las células de la retina, un fármaco terapéutico para lesiones celulares debido a otras causas y similares.

(6) Formación de la estructura de tejido retiniano

La presente invención proporciona un método de permitir que la estructura estérica del tejido retiniano se autoforme in vitro, que comprende los pasos (1), (2') y (3). De acuerdo con este método, es posible formar la estructura estérica del tejido retiniano en un agregado celular obtenido por medio del método SFEBq modificado sin que se convierta en una masa de células nerviosas desordenada. Más preferiblemente, es posible imitar el proceso inicial de la histogénesis retiniana con el autoensamblaje en curso en la misma secuencia que la formación retiniana hallada en el primordio de la copa óptica.

La autoformación de la estructura estérica del tejido retiniano en el agregado celular in vitro se puede confirmar, por ejemplo, por medio de la expresión de los marcadores celulares retinianos de capa específica tales como Chx10, Tuj1, calretinina, calbindina, y rodopsina, análisis morfológico microscópico de luz o electrónico, imágenes in vivo de las células transferidas por GFP y similares. Aquí, "in vitro" tiene el mismo significado que el anterior.

Se proporciona el producto de cultivo obtenido por medio del método de la presente invención, en forma específica un agregado de células que constituye la estructura estérica del tejido retiniano. El producto de cultivo tiene una estructura que es morfológicamente extremadamente similar a la retina viva, de modo que se pueda utilizar para el cribado de fármacos terapéuticos para enfermedades basadas en trastornos de células del sistema nervioso, en particular células progenitoras retinianas y células retinianas, cribado para fármacos terapéuticos para lesiones celulares debido a otras causas, o pruebas de toxicidad de las mismas y similares. Aquí, las enfermedades basadas en trastornos de células progenitoras retinianas o células retinianas incluyen, por ejemplo, intoxicación por mercurio orgánico, retinopatía de cloroquina, degeneración pigmentaria de la retina, degeneración macular senil, glaucoma, retinopatía diabética, retinopatía neonatal, y similares.

(7) Método de cribado

Se proporciona un método de cribado de sustancia de prueba que comprende el uso de un producto de cultivo. En particular, un producto de cultivo tiene una red nerviosa ya formada que es extremadamente similar a la red nerviosa viva, y también tiene un tejido retiniano ya formado que es extremadamente similar a la protrusión histogenética de la retina, de modo que se pueda aplicar para el cribado de fármacos terapéuticos para enfermedades basadas en trastornos de células del sistema nervioso, por ejemplo, células progenitoras retinianas y células retinianas, cribado para fármacos terapéuticos para lesiones celulares debido a otras causas, o pruebas de toxicidad de las mismas, y el desarrollo de un nuevo método terapéutico para enfermedades de los sistemas nerviosos y similares.

Aquí, "una sustancia de prueba" se ejemplifica por medio de sustancias cuya eficacia como fármacos terapéuticos para enfermedades de los sistemas nerviosos ha de determinarse y sustancias que son fármacos terapéuticos para otras enfermedades cuyas influencias (p. ej., la toxicidad) en los nervios se deben determinar. La sustancia puede ser cualquiera de los compuestos de bajo peso molecular, compuestos de alto peso molecular, proteínas, ácidos nucleicos (ADN, ARN y similares), virus y similares. Tales sustancias se pueden elegir de acuerdo con sea apropiado por los expertos en la técnica.

De aquí en adelante se describe la presente invención en más detalle por medio de los siguientes Ejemplos Comparativos y los Ejemplos, que, sin embargo, son para fines ilustrativos únicamente y nunca limitan el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1: Inducción de diferenciación altamente eficaz en células progenitoras de la corteza cerebral por medio del método SFEBq

(Método)

5 Se cultivaron células EB5 de células ES de ratón (derivadas de E14) o células de una línea celular derivada de E14 en donde el gen de Venus, que es una GFP (proteína fluorescente verde) modificada, que se habían sometido a "knock-in" en el gen Bf1 del marcador del nervio cerebral como una diferenciación de nervios informada por una recombinación homóloga (de aquí en adelante descrita como "células Bf1/mES-Venus") como se describió en la bibliografía (Watanabe et al., Nature Neuroscience, 2005), y como se utilizó en los experimentos.

10 El medio para el cultivo de mantenimiento utilizado fue un medio G-MEM (Invitrogen) suplementado con 1% de suero fetal de ternera, 10% de KSR (Reemplazo de Suero Knockout; Invitrogen), 2 mM de glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de ácido pirúvico, 0,1 mM de 2-mercaptoetanol y 2000 U/ml de LIF. Para la inducción de la diferenciación de nervios por cultivo en suspensión, se monodispersaron las células ES mediante el uso de 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), y se suspendieron en 150 µl del medio de diferenciación en una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva a las células (una placa esferoide SUMILON, Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) a 15 3x10³ células por pocillo para permitir que los agregados se formen con rapidez, después de lo cual se incubó la placa a 37°C, 5% de CO₂ durante 7 días (método SFEBq; Fig. 1A).

20 El medio de diferenciación utilizado en esta operación fue un medio libre de suero preparado por medio de la adición de 10% de KSR, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 0,1 mM de 2-ME, 250 µg/ml de Dkk-1 humano recombinante, y 1 µg/ml de Lefty-1 humano recombinante a un medio G-MEM (véase Watanabe et al., Nature Neuroscience, 2005).

Se recuperaron las masas de agregados en un plato de plástico no adhesivo de 6 cm (3,5 ml del medio de diferenciación), y se continuaron cultivando en suspensión durante 3 días (10 días en total), después de lo cual se analizó el estado de diferenciación por medio de inmunotinción fluorescente. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

25 (Resultados)

El análisis de inmunotinción reveló que 10 días después del comienzo del cultivo de diferenciación, aproximadamente 70% de las células en el agregado expresado el marcador específico del cerebro Bf1, con el 90% de las células positivas para Bf1 expresaron el marcador específico de corteza cerebral Emx1. También cuando las Bf1/células mES-Venus diferenciadas se analizaron mediante la expresión de Venus-GFP, aproximadamente 70% de las células fueron positivas, la mayoría de las cuales expresaron Emx1 (Fig. 1A). Por lo tanto, el método SFEBq permite que las células de la corteza cerebral (células progenitoras) se induzcan por diferenciación con alta eficacia cuando se utiliza el medio de diferenciación descrito con anterioridad. Cuando se utiliza un método convencional en donde agregados de células ES se forman de manera gradual mediante el uso de un plato de cultivo de 10 cm (Watanabe et al., Nature Neuroscience, 2005), Las células positivas para Bf1 representaron hasta 30%, de las cuales menos del 40% se volvieron positivas para el marcador de la corteza cerebral Emx1. La presencia de una estructura similar al epitelio con polaridad en los agregados se confirmó mediante la expresión de N-cadherina (Ncad), CD-133, laminina y similares (Fig. 1B a G; Dapi muestra el núcleo), observación microscópica electrónica de la morfología de la unión apretada (Fig. 1H, entre paréntesis), unión adherente (Fig. 1I, entre paréntesis) y similares, formación de rosetas (Fig. 1J, Fig. 1K, la línea punteada indica una roseta), la expresión de los marcadores de polaridad y los marcadores de diferenciación (Fig. 1L a O, la línea punteada indica una roseta, el asterisco indica un lumen) y similares.

Por lo tanto, el método SFEBq, comparado con el método convencional, promueve la diferenciación de células ES en el cerebro, en particular en la corteza cerebral, de manera más eficaz.

45 Ejemplo comparativo 2: Producción in vitro de neuronas cerebrales a partir de células progenitoras de la corteza cerebral inducidas por medio del método SFEBq

(Método)

Los agregados obtenidos por medio de cultivo de diferenciación continuado durante 12 días por medio del método descrito en el Ejemplo comparativo 1 se dispersaron de manera enzimática (kit de disociación de tejido neural SUMILON₂), se sembraron sobre una placa de cultivo recubierta con Poli-D-lisina/laminina/fibronectina a 5x10⁴ células/cm², y se cultivaron mediante el uso de un medio DMEM/F12 suplementado con un suplemento 1xN2 y 10 ng/ml de FGF2 durante 2 días. Posteriormente, se cultivaron adicionalmente las células mediante el uso de un medio Neurobasal (suplementados con un suplemento B27) + 50 ng/ml de BDNF + 50 ng/ml de NT3 durante 6 días. Las propiedades de la neurona diferenciada se analizaron por medio de un método de inmunotinción fluorescente. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

55

(Resultados)

La mayoría de las células en el tubo de ensayo se volvieron Neuronas positivas para TuJ1, de las cuales 80% fueron positivas para el marcador específico de corteza cerebral Emx1 y positivas para el marcador VGluT1 de la neurona glutamatérgica (abundantemente presente en la corteza cerebral) (Fig. 2A a B). También se observó la expresión de una pluralidad de marcadores nerviosos característicos de la neurona cerebral (Telencefalina, GluR1, CamKII, Ctíp2, Tbr1, Sinapsina y similares) (Fig. 2C a F).

Por lo tanto, se confirmó la diferenciación de células progenitoras de la corteza cerebral inducidas por medio del método SFEBq en la neurona específica del cerebro.

Ejemplo 1: Inducción de diferenciación altamente eficaz para células progenitoras retinianas por medio del método SFEBq modificado con altas concentraciones de componentes de la matriz añadidas y una concentración de KSR optimizada

(Método)

Se trataron las células mES Rx-EGFP (células ES de ratón que tienen EGFP sometido a "knock-in" en el locus de Rx inicial del gen marcador de la célula progenitora retiniana; Wataya et al, PNAS, 2008) por medio del método SFEBq (una placa de cultivo de 96 pocillos de baja capacidad de unión celular) para generar con rapidez agregados homogéneos a 3000 células por pocillo, que se cultivaron para su diferenciación. La inducción de diferenciación medio utilizada aquí fue un medio G-MEM (Invitrogen), 2% de KSR, 2 mM de glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de ácido pirúvico, y 0,1 mM de 2-mercaptotanol. Comenzando un día después, se añadió Matrigel al medio en una relación en volumen de 1/100 a 1/25, y se sometieron las células a cultivo de agregado en suspensión durante 7 días 5% CO₂, a 37°C. Posteriormente, se continuó adicionalmente el cultivo bajo las condiciones de promoción de diferenciación nerviosa. Se llevó a cabo el análisis de diferenciación por medio del método de inmunotinción fluorescente (secciones congeladas) mediante el uso del marcador progenitor del nervio cerebral Sox1, el marcador cerebral Bf1, el marcador Rx de la célula progenitora retiniana, la célula progenitora retiniana neural y el marcador celular bipolar Chx10, el anticuerpo de rodopsina del marcador de células fotorreceptoras y similares.

(Resultados)

Cuando se utiliza el medio que comprende un volumen de 1/100 de Matrigel suplementado con 10% de KSR como en el Ejemplo comparativo 1, se indujeron las células progenitoras de la corteza cerebral que expresan Bf1 con una eficacia constante (> 50%; 9 días después). Mientras tanto, cuando se utiliza el mismo medio pero suplementado con 2% de KSR bajo las mismas condiciones, la expresión de Bf1 disminuyó a menos de 10%. Con el 2% del medio de KSR que comprende un volumen de 1/50 o 1/25 de Matrigel, la expresión de Bf1 se convirtió en menos de 5%. Por el contrario, en el cultivo de diferenciación con un 2% del medio de KSR suplementado con Matrigel en un volumen de 1/100 o más, las células positivas para Rx-EGFP y positivas para el anticuerpo de Rx emergieron al 5% o más de las células en las masas celulares. Con la adición de Matrigel en un volumen de 1/50 o 1/25 o más, aproximadamente 60% de las células se volvieron positivas para Rx-EGFP. En el cultivo de diferenciación con un 10% del medio de KSR suplementado con Matrigel en un volumen de 1/100, la expresión de Bf1 fue de menos de 1%.

Ejemplo 2: Autoformación del tejido con forma de copa óptica a partir de células progenitoras retinianas mediante el uso del método SFEBq modificado (Método)

Se cultivaron los agregados de células positivas para Rx obtenidas en el Ejemplo 1 mediante el uso de un caldo de cultivo preparado por medio de la adición de Matrigel en un volumen de 1/50 a 2% del medio de KSR durante 7 días, después de lo cual se transfirió a un caldo de cultivo preparado por medio de la adición de un aditivo de N2 al medio DMEM/F12, y se cultivó adicionalmente en suspensión bajo condiciones 5% de CO₂ /40% de O₂ durante 3 días.

(Resultados)

La porción fuertemente positiva para Rx-EGFP formó un tejido como una protrusión de la masa celular (Fig. 3). Su perfil histológico fue similar al de la copa óptica fetal (un tejido retiniano inicial formado como una protrusión del diencéfalo), que representa una estructura en donde se envolvió el tejido retiniano neural juvenil positivas para Rx, y positivo para Chx10 por una capa de células pigmentarias retinianas.

Ejemplo 3: Autoensamblaje del tejido retiniano a partir de células progenitoras retinianas mediante el uso del método SFEBq modificado

(Método)

Se separó el tejido con forma de copa óptica de acuerdo con lo obtenido en el Ejemplo 2 (10 días de cultivo) de la masa celular mediante el uso de micropinzas, y se sometió a cultivo en suspensión con DMEM/F12/N2 + 0,5 µM de ácido retinoico (conocido por promover la supervivencia de células fotorreceptoras).

(Resultados)

El tejido con forma de copa óptica cultivado en suspensión se había inducido a una estructura laminar que es estructuralmente extremadamente similar a la retina después del nacimiento (Figs. 2 y 3). Había una estructura plana regularmente formada en la capa más externa de las células fotorreceptoras (positiva para rodopsina y que tenía una estructura de segmento exterior), que posee la polaridad de la célula derecha. Debajo de esta capa había una capa de células bipolares positivas para Chx10 y una capa de células horizontales positivas para Calbindina, debajo de la que estuvo presente una capa de células amacrinas positivas para Calretinina/positivas para Pax6/negativas para TuJ1, y la capa más inferior fue una capa de células ganglionares retinianas positivas para Brn3- positivo/positivas para TuJ1, que se formaron de manera ordenada (Fig. 5). El orden de estas capas correspondió a la estructura laminar retiniana in vivo. En resumen, se ha demostrado que cuando se aplica el método SFEBq modificado para el cultivo de masas de células en suspensión por medio del método SFEBq en consideración de la combinación optimizada del tratamiento de matriz y el medio, no sólo se forman células progenitoras retinianas de manera eficaz, sino que también se autoforma in vitro un tejido retiniano que tiene una estructura laminar de estas células progenitoras retinianas.

15 **Ejemplo 4: Actividades electrofisiológicas del tejido retiniano producidas por el método SFEBq modificado**

(Método)

Se separó el tejido con forma de copa óptica de la masa celular mediante el uso de micropinzas de la misma manera que el Ejemplo 3, y se cultivó con DMEM/F12/N2 + 0,5 µM de ácido retinoico. Para el examen electrofisiológico, se cultivó el tejido en una placa con múltiples microelectrodos planares (sonda MED); 2 días después, los potenciales de acción de los axones que emergen del tejido con forma de copa óptica se examinaron por medio del método del potencial de campo del electrodo multipolar (MED64; Alpha MED Scientific Inc.).

(Resultados)

Los axones del tejido con forma de copa óptica fueron Tuj1-positivos y se cree que se derivaron de células ganglionares al igual que tejido retiniano. Se observó un gran número de activaciones espontáneas de los potenciales de acción irregulares de estos axones por medio del método del potencial de campo del electrodo multipolar. Estos resultados confirmaron que se había formado una red que induce actividades nerviosas espontáneas, observadas en la retina juvenil de recién nacidos in vivo y similares, en el tejido con forma de copa óptica. También parece posible examinar los potenciales de acción inducidos por la luz con MED 64 por medio del método de Homma et al. [Homma et al, (2009), J. Neurosci. Res. 87(9)2175-2182].

30 Referencia

Ejemplo comparativo 3: Formación espontánea del tejido de protrusión con forma de copa óptica a partir de células ES humanas

(Método)

Se cultivaron células ES humanas (khES1) para su mantenimiento por medio de un método ordinario (Ueno et al, PNAS 103, 9554-9559, 2006).

Se aislaron de la placa las células ES humanas por medio de un método ya en el dominio público, y se monodispersaron con tripsina (Watanabe et al., Nature Biotech. 25, 681-686, 2007). Se volvieron a agregar células con rapidez mediante el uso de una placa de cultivo de 96 pocillos de baja capacidad de unión celular de la misma manera que el Ejemplo comparativo 1 y el Ejemplo 1 para obtener agregados homogéneos. En esa operación, se suspendieron en las células un caldo de cultivo a 9000 células por pocillo de la placa de 96 pocillos. El caldo de cultivo utilizado fue DMEM/F12 + 10-20% de KSR + 2 mM de glutamina + 0,1 mM de aminoácidos no esenciales + 0,1 mM de 2-ME, con la adición de 10 µM del inhibidor de Roca Y-27 632 (un supresor de muerte celular) durante los primeros 6 días. A partir de los 3 días de cultivo, se añadió Matrigel en un volumen de 1/100, y se cultivaron las células hasta el día 18. Entre el día 18 y el día 25, se continuó el cultivo en suspensión mediante el uso de DMEM/F12 + N2 + 1 µM de RA, con la concentración de O₂ elevada a 40%. Entre el día 25 y el día 40, se cultivaron las células en suspensión en presencia de Neurobasal + B27+ 1 µM de RA, 40% de O₂.

(Resultados)

En el cultivo descrito con anterioridad, únicamente cuando se añadió Matrigel, se observó la formación de un tejido epitelial continuo de células progenitoras retinianas positivas para Rx, y positivas para Pax6 en una masa celular derivada de una célula ES humana. Después de 20 días de cultivo, como en el día 7 del cultivo de células ES de ratón, se confirmó la formación de Tejido positivos para Rx, y positivo para Pax6 como una protrusión del cuerpo principal de una masa celular derivada de la célula ES humana. Comprendieron un tejido progenitor de la retina neural fuertemente positivo para Rx un tejido progenitor de epitelio pigmentario débilmente positivo para Rx, las cuales fueron negativas para nestina. También, 35 días después, se confirmó la presencia de un tejido de epitelio columnar pseudoestratificado positivo para Rx, positivo para Pax6, negativo para nestina (una característica

morfológica del tejido progenitor de la retina neural).

Ejemplo 5: Inducción eficaz del epitelio retiniano en agregados de células ES mediante el uso de proteínas de matriz purificadas y Nodal/Activina

(Método)

5 Se cultivaron células ES de Rx-GFP (3000 células/pocillo, placa de 96 pocillos) en un cultivo de SFEBq con G-MEM suplementado con 1,5% de KSR. En este experimento, en lugar de añadir Matrigel para cultivar, se añadieron laminina purificada y entactina (alta concentración complejo de laminina/entactina; BD; 120 µg/ml) como proteínas de matriz extracelular en el día 1 (24 horas después de la aparición del cultivo de diferenciación). También se añadió Nodal de Ratón Recombinante (R&D; 500-1000 ng/ml) o Activina Humana (R&D; 250 ng/ml) en el día 1 y se
10 continuó el tratamiento Nodal hasta el día 7. Se cultivaron los agregados de SFEBq durante 7 a 10 días y se examinó la formación de vesículas RxGFP+ y estructuras de copa bajo un microscopio fluorescente. Se sabe que Nodal y Activina actúan sobre receptores de superficie celular comunes y activan señales Smad2/3 en la célula.

Resultados:

15 Las células ES cultivadas sin proteínas de matriz extracelular (Matrigel o laminina/entactina) o Nodal no expresaron Rx-GFP en los días 7 a 10. A diferencia del 2% de Matrigel, la laminina + entactina solas no indujeron Rx-GFP+ epitelio retiniano en el día 7 o 10. En contraste, cuando las células se trataron con laminina + entactina y Nodal (tanto 500 como 1000 ng/ml) o Activina durante días 1 a 7, aparecieron grandes manchas de Rx-GFP + epitelios en los agregados de SFEBq el día 7 (Figura 7). Formaron una morfología de tipo vesícula óptica en el día 10. TGF-beta1 o 2 (1000 ng/ml) no reemplazó la actividad inductora de Nodal incluso cuando se combinó con laminina + entactina. El
20 tratamiento de células SFEBq con Nodal o Activina desde el día 0 inhibió tanto la diferenciación neuronal (Sox1) como la retiniana (Rx) de acuerdo con informes previos (Watanabe et al, Nature Neuroscience, 2005), lo que indicó que la ausencia de señales de Nodal/Activina en la fase inicial del cultivo de SFEBq es una condición preferida. La formación de tejido retiniano tridimensional se puede ser inducir por las proteínas de matriz definidas laminina y entactina en presencia de Nodal.

25 Si bien la presente invención se ha descrito con énfasis en las realizaciones preferidas, es evidente para los expertos en la técnica que las realizaciones preferidas se pueden modificar. La presente invención tiene por objeto que la presente invención se pueda realizar por medio de métodos distintos de los descritos en detalle en la presente memoria descriptiva. En consecuencia, la presente invención abarca todas las modificaciones incluidas en el punto esencial y el alcance de las "REIVINDICACIONES" adjuntas.

30 Aplicabilidad Industrial

De acuerdo con el método de la presente invención, es posible inducir por diferenciación de manera eficaz células del sistema nervioso, lo que permite de ese modo que la citoterapia para enfermedades neurodegenerativas. El método de la presente invención también hace posible la inducción de diferenciación de manera eficaz de tejidos de diencefalo (en particular tejido retiniano), una tarea que ha sido difícil de lograr por medio del método convencional
35 de diferenciación, lo que permite de ese modo que se aplique la citoterapia para enfermedades asociadas con anomalías de los tejidos de diencefalo (en particular el tejido retiniano).

Además, de acuerdo con la presente invención, la estructura estérica del tejido retiniano que tiene una red nerviosa retiniana y una estructura laminar se puede producir in vitro. Por lo tanto, la presente invención también es de gran utilidad al proporcionar "materiales de tejido" que sirven bien en la medicina regenerativa, el descubrimiento de
40 fármacos y pruebas de toxicidad para los productos farmacéuticos descritos con anterioridad y similares.

Otra ventaja de la presente invención es que el riesgo en el trasplante de células obtenidas por medio del cultivo de células madre se puede reducir a los niveles de riesgo en los alotrasplantes debido a que no implica el uso de una célula derivada de un animal como inductor.

REIVINDICACIONES

1. Un método de inducción de diferenciación de una célula madre en una célula progenitora nerviosa, que comprende:
el paso (1) de la formación de agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero; y
- 5 el paso (2) de cultivo en suspensión de los agregados homogéneos de células madre en un medio libre de suero al que se le ha añadido una preparación de membrana basal en un recipiente de cultivo no adhesivo a células.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula progenitora nerviosa es una célula progenitora retiniana.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la preparación de membrana basal contiene una molécula de matriz extracelular seleccionada entre laminina, colágeno de tipo IV, proteoglicano heparán sulfato y entactina.
- 10 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde el cultivo en suspensión se lleva a cabo en presencia de KSR.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que se lleva a cabo en presencia adicional de Nodal o Activina.
- 15 6. Un método para la separación o la identificación de manera morfológica de una masa de células progenitoras retinianas, que comprende:
la puesta en práctica del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; lo que permite de ese modo que un tejido con forma de copa óptica se autoforme en los agregados.
7. Un método de inducción de diferenciación de una neurona específica de la capa retiniana, que comprende:
- 20 la puesta en práctica del método de acuerdo con la reivindicación 6; y el cultivo en suspensión del tejido con forma de copa óptica autoformado en un caldo de cultivo de órganos.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el cultivo en suspensión se lleva a cabo en presencia de KSR.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cultivo en suspensión se lleva a cabo en presencia
- 25 adicional de Nodal o Activina.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la neurona específica de la capa retiniana se selecciona de entre células fotorreceptoras, células horizontales, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que es un método de producción de un
- 30 tejido retiniano in vitro.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que es un método de producción de una neurona específica de la capa retiniana.

Fig. 1

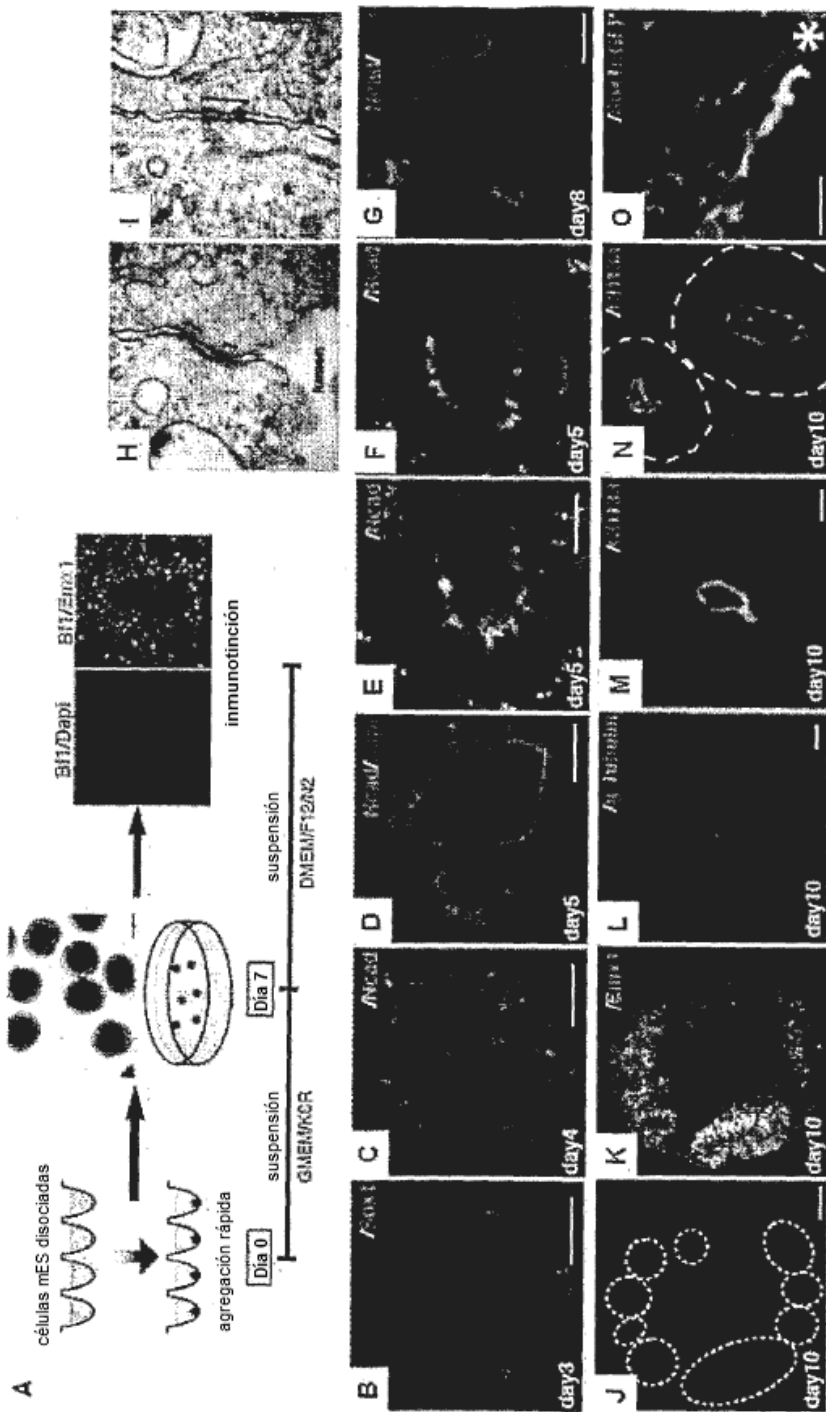


Fig. 2

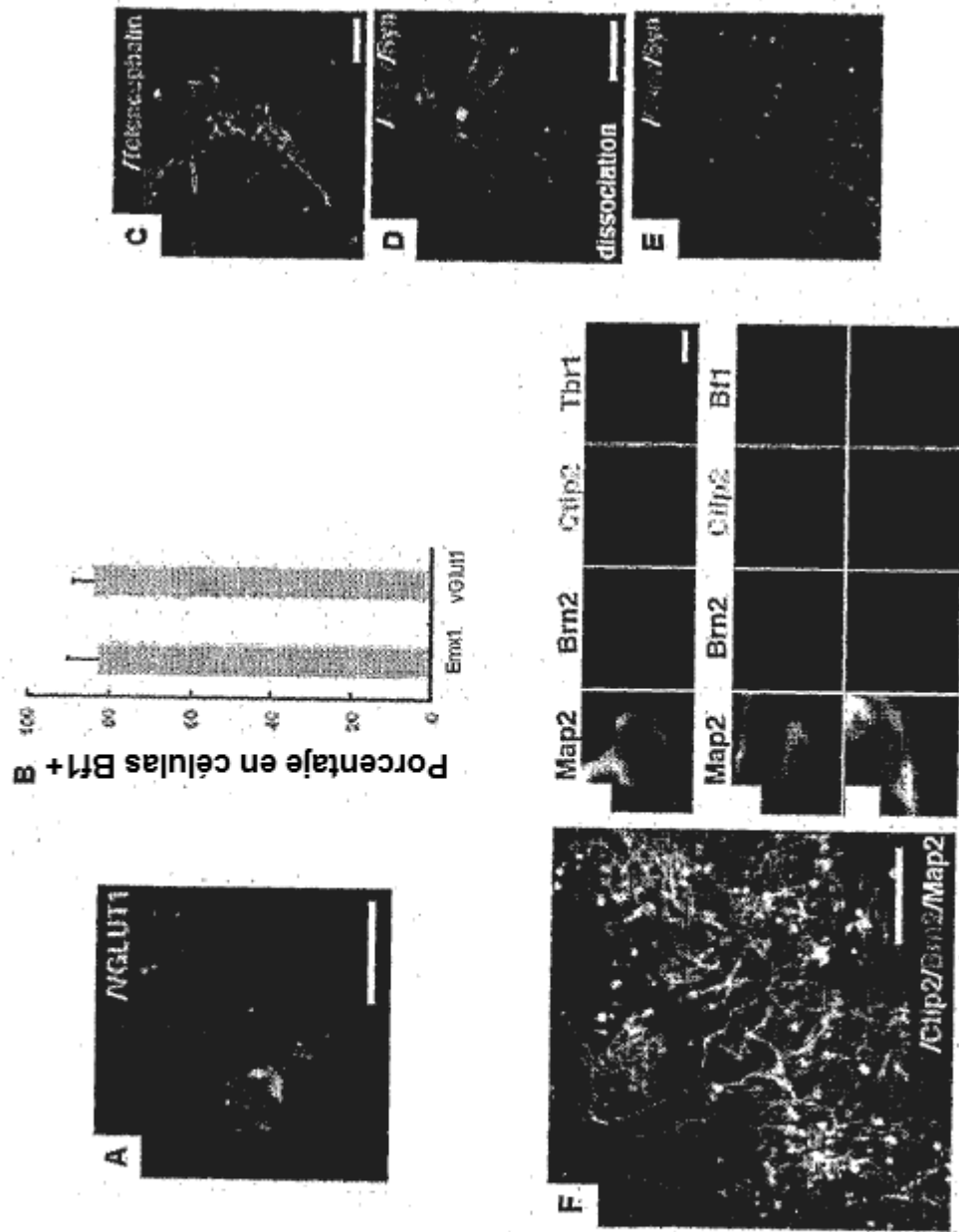


Fig. 3

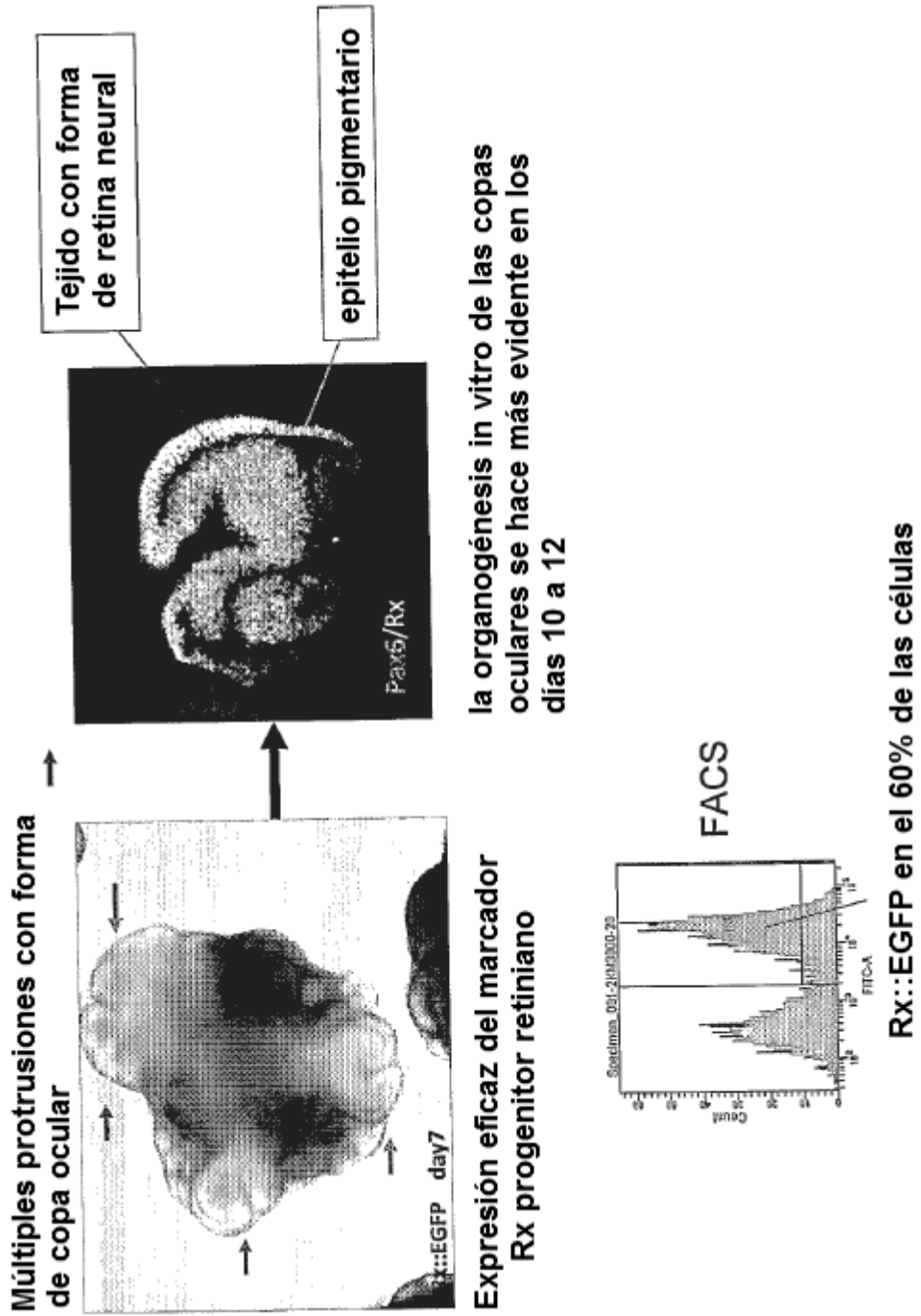


Fig. 4

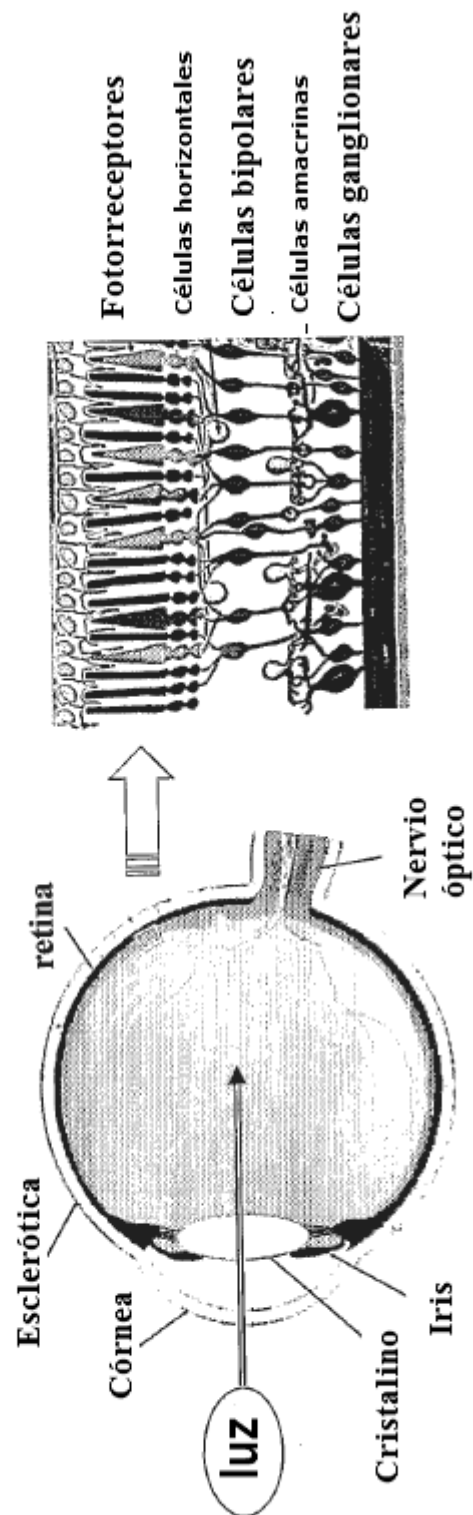
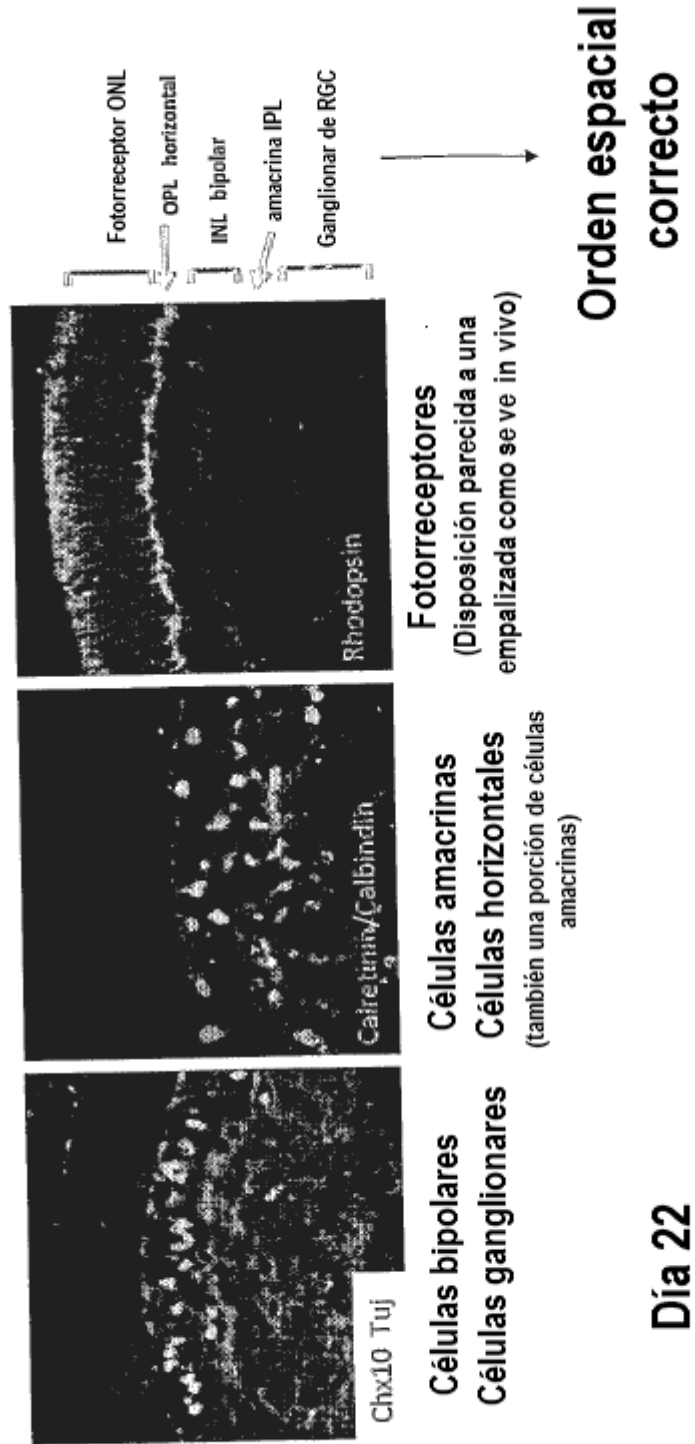


Fig. 5



Día 22

Fig. 6

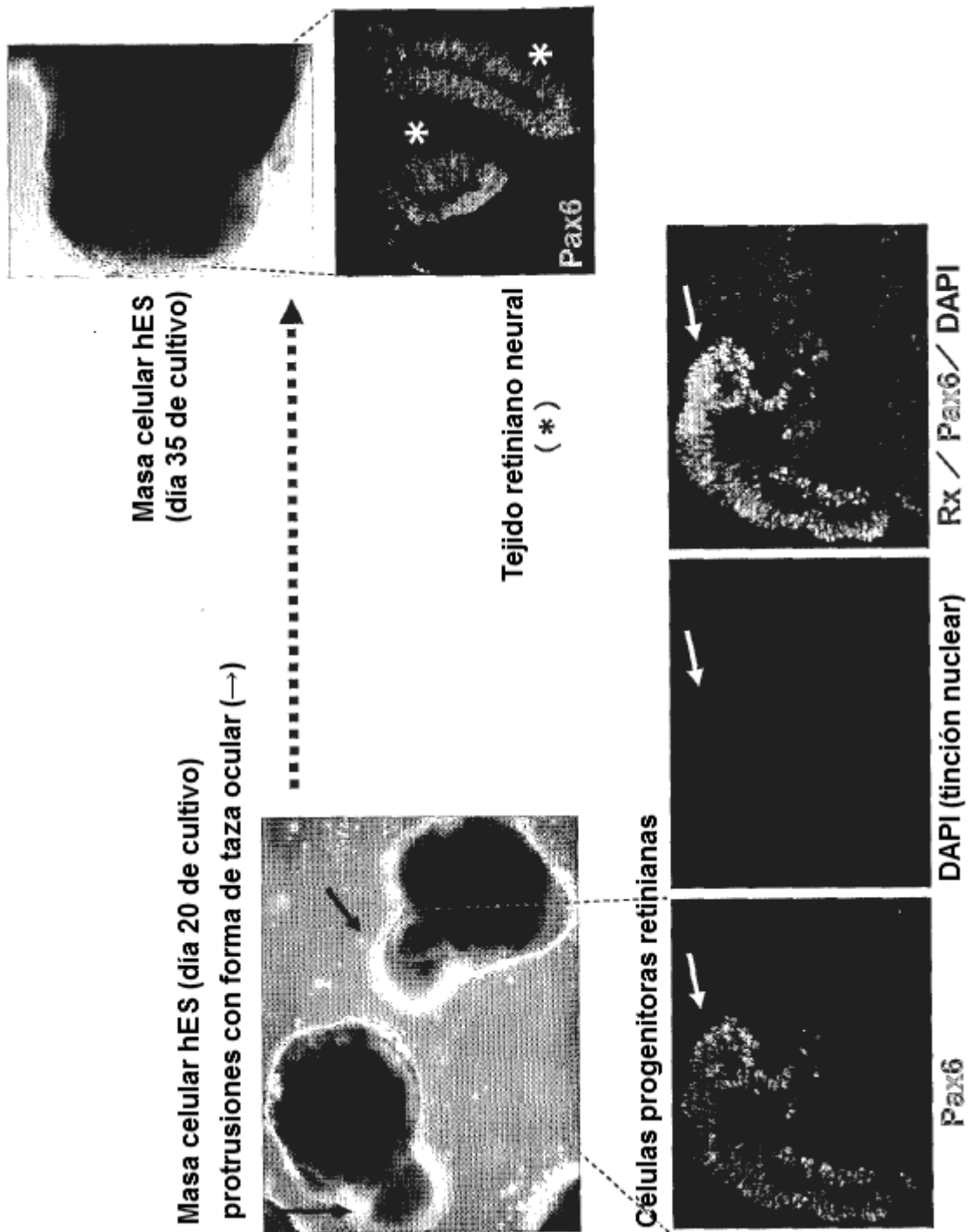


Fig. 7

