

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 804**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/44 (2015.01)

A61P 27/02 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2012 PCT/JP2012/054631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12115244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012 E 12748831 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2679673**

54 Título: **Método de producción de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano**

30 Prioridad:

25.02.2011 JP 2011040130

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

09.10.2019

73 Titular/es:

**RIKEN (100.0%)
2-1, Hirosawa, Wako-shi
Saitama 351-0198, JP**

72 Inventor/es:

**TAKAHASHI, MASAYO;
OKAMOTO, SATOSHI y
KAMA, HIROYUKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 726 804 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de producción de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método de producción de una lámina celular sin usar una membrana artificial, que comprende sembrar células epiteliales de pigmento retiniano sobre un gel de colágeno. La presente invención también se refiere a una lámina celular para trasplante, que comprende una capa celular formada a partir de células epiteliales de pigmento retiniano y una membrana basal.

Antecedentes de la técnica

10 En la actualidad, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una de las principales enfermedades causantes de ceguera legal en países avanzados, y se observa principalmente en personas de más de 50 años. La degeneración macular asociada a la edad es causada por cambios en la mácula asociados a la edad, y se divide, *grosso modo*, en una forma exudativa y una forma atrófica. La forma exudativa de degeneración macular asociada a la edad es una enfermedad asociada al desarrollo de vasos neovasculares en la coroides, en la mácula de personas de edad avanzada, seguido de lesión sangrante y exudativa bajo el epitelio pigmentario retiniano o la retina, y finalmente, formación de un tejido cicatricial. La forma atrófica de la degeneración macular asociada a la edad es una enfermedad acompañada de atrofia del área macular y acumulación de drusas. Una lesión precursora que conduce a degeneración macular asociada a la edad exudativa y atrófica es algunas veces referida particularmente como degeneración macular asociada a edades tempranas y esta lesión también es considerada una patología de degeneración macular asociada a la edad.

20 Para el tratamiento de degeneración macular asociada a la edad cuando es una forma exudativa suave, se puede optar por una terapia quirúrgica tal como terapia fotodinámica, fotocoagulación láser, extracción de vasos neovasculares y similares, o un método de tratamiento que apunta a la regresión y extracción de vasos neovasculares mediante una terapia farmacológica tal como administración de un inhibidor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) implicado en la angiogénesis y similares. Sin embargo, los medios antes mencionados no pueden proporcionar efectividad terapéutica para la forma exudativa o atrófica que ha progresado hacia la atrofia avanzada o falta de epitelio pigmentario de la retina (EPR). En tal caso, un método de tratamiento eficaz es el trasplante de células epiteliales del pigmento retiniano o el epitelio pigmentario de la retina al sitio deficiente bajo la retina.

30 Se han probado varios métodos de tratamiento mediante el trasplante de células epiteliales de pigmento retiniano. Se ha informado que el trasplante de células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas de fetos humanos en la forma de una suspensión celular muestra un injerto deficiente de las células trasplantadas. En los casos en que se trasplantó una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano que también contiene membrana de Bruch y coroides desprendida como una lámina de un ojo de cadáver, ocurrió rechazo postquirúrgico y no se obtuvo un efecto de tratamiento suficiente (documento no de patente 1). Además, se ha señalado que el método que utiliza un ojo de cadáver incluye un problema ético. Por otra parte, se ha dado a conocer un caso de visión mejorada de un paciente con degeneración macular asociada a la edad, en donde se usó un método que incluye recolectar las células epiteliales de pigmento retiniano normales y coroides del propio paciente y trasplantarlas al sitio deficiente bajo la mácula. Sin embargo, este método supone una carga extremadamente alta para los pacientes y un riesgo extremadamente alto de cirugía. Aunque se ha intentado utilizar las células epiteliales de pigmento del iris del propio paciente recolectadas del paciente con degeneración macular asociada a la edad para el trasplante en lugar de células epiteliales de pigmento retiniano, el límite superior de la visión final es bajo y no se ha obtenido un efecto suficiente, y más aún, la carga y riesgo de utilizar las propias células del paciente son altos (documento no de patente 2). Por lo tanto, los métodos de tratamiento convencionales que usan células recolectadas de un ojo de cadáver o las propias células del paciente no son prácticos en términos de ética, seguridad, efectos y similares, y se ha deseado una célula epitelial de pigmento retiniano verdaderamente utilizable para un tratamiento de trasplante.

45 Como uno de los métodos de producción de una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano, puede mencionarse un método que incluye recubrir un sustrato de cultivo celular con una matriz extracelular y similares, y cultivar células epiteliales de pigmento retiniano sobre la misma para formar una lámina. Por ejemplo, se puede formar una lámina celular mediante cultivo de células epiteliales de pigmento retiniano sobre un material recubierto con fibronectina, pero no se da a conocer la formación de una membrana basal, ni se describe en absoluto un método para extraer una lámina de un recipiente en el que se formó la lámina (documento no de patente 3). Teniendo en cuenta tales problemas, varios laboratorios han desarrollado un método para formar, de antemano, una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano usando una membrana artificial en lugar de una membrana basal. Sin embargo, se teme que una membrana artificial sea un trastorno para el injerto en el trasplante y el mantenimiento funcional del cuerpo. Aunque también se ha desarrollado una membrana artificial con una respuesta menos biológica, no es adecuada para trasplante debido a que induce problemáticamente inflamación y rechazo asociados con la misma, que son causados por las diferencias con la membrana basal producida por la propia célula en la composición, propiedades, rigidez y similares. Más aún, de manera convencional, se conoce un método para cultivar una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano que tiene polaridad. Sin embargo, esto solo es para

uso de modelo experimental en donde las células epiteliales de pigmento retiniano y la línea inmortalizada derivada de un organismo vivo se convierten en una lámina en un recipiente y se utiliza directamente, y todavía no ha podido efectuarse la recuperación real de una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano provista de una membrana basal como en los organismos vivos a partir de un recipiente (documento no de patente 4). Existe un método para obtener una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano por exfoliación de células epiteliales de pigmento retiniano cultivadas directamente en una placa de cultivo, sin usar una matriz extracelular y similares. Tal método para desprender las células mediante exfoliación no puede estabilizar la forma y tamaño de la lámina, la membrana basal y similares, causa mucho daño sobre las células epiteliales de pigmento retiniano mediante la exfoliación, y causa, en la mayoría de los casos, la desintegración de la forma de la lámina y células dispersas debido a la exfoliación, fallando así en proporcionar una lámina de células utilizable para trasplante y similares (documento no de patente 5). Además, aunque se ha dado a conocer el recubrimiento de un sustrato de cultivo celular con colágeno y el cultivo de las células sobre el colágeno, no se usan células epiteliales de pigmento retiniano humanas. Más aún, para aumentar la fuerza de gel, se necesita agregar por separado un agente reticulante, lo que sitúa al método en una posición alejada de ser conveniente y rápido (documento de patente 1). En la situación actual, sigue siendo problemática la producción de una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano, terapéuticamente eficaz para enfermedades retinales como la degeneración macular asociada a la edad y similares, y conveniente y estable de preparar.

El documento no de patente 6 describe el trasplante de láminas de células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas por ingeniería de tejidos en un modelo en conejos.

20 Lista de documentos

Documentos de patente

Documento de patente 1: JP-A-2005-261292

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Ophtalmic Surg. 1991 Feb; 22(2): 102-8.

25 Documento no de patente 2: Tohoku J Ex Med. 1999 Dec; 189(4): 295-305.

Documento no de patente 3: Nat. Protoc., 4(5), 2009, 662-673.

Documento no de patente 4: Invest. Ophtalmol. Vis. Sci., 47, 2006, 3612-3624.

Documento no de patente 5: Invest. Ophtalmol. Vis. Sci., 36(2), 195, 381-390.

Documento no de patente 6: Biomaterials., 30(5), 2009, 797-803.

30 **Breve descripción de la invención**

Problemas que resuelve la invención

El problema de la presente invención es desarrollar un nuevo método para producir una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano de manera conveniente y estable sin usar una membrana artificial, y proporcionar a los pacientes con una enfermedad asociada a la falta de epitelio de pigmento retiniano, como la degeneración macular asociada a la edad y similares, una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano para trasplante, que muestra una alta tasa de injerto y una función superior.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores produjeron una lámina celular mediante formación de una capa de gel de colágeno sobre un sustrato de cultivo celular, y siembra y cultivo de células epiteliales de pigmento retiniano sobre ella. Una lámina celular obtenida mediante tal método mantiene una membrana basal entre el gel de colágeno y la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano, tiene capacidad de secreción de citocina y adhesividad entre células similar a la de las células epiteliales de pigmento retiniano in vivo, y permite un fácil desprendimiento de la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano desde el sustrato de cultivo celular mientras que se mantiene la membrana basal por descomposición del gel de colágeno con colagenasa. Además, las células que constituyen la lámina celular mantenían la expresión de un marcador específico de células epiteliales de pigmento retiniano. Los presentes inventores han conducido estudios intensivos y completaron la presente invención a partir de estos hallazgos. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona

[1] un método para producir una lámina celular compuesta por células epiteliales de pigmento retiniano, una estrecha unión formada entre las células epiteliales de pigmento retiniano, y una membrana basal formada sobre una cara de contacto con el gel de colágeno, que comprende las siguientes etapas

(1) sembrar y cultivar células epiteliales de pigmento retiniano sobre un gel de colágeno para formar una lámina

celular compuesta por las células epiteliales de pigmento retiniano, la estrecha unión formada entre las células epiteliales del pigmento retiniano y la membrana basal formada en una cara de contacto con el gel de colágeno, y

5 (2) degradar el gel de colágeno con colagenasa para desprender la lámina celular compuesta por las células epiteliales de pigmento retiniano, la estrecha unión formada entre las células epiteliales del pigmento retiniano y la membrana basal formada en una cara de contacto con el gel de colágeno;

[2] el método de producción de la lámina celular de [1] antes mencionado, en donde las células epiteliales de pigmento retiniano son células obtenidas induciendo diferenciación de las células madre o células progenitoras;

[3] el método de producción de la lámina celular de [2] antes mencionado, en donde las células madre son células ES o células iPS;

10 [4] el método de producción de la lámina celular de [1] antes mencionado, en donde la concentración de colágeno en el gel de colágeno es 0,1% - 0,5%;

[5] el método de producción de la lámina celular de cualquiera de [1] a [4] antes mencionados, que comprende además la siguiente etapa (3)

15 (3) confirmar la presencia o ausencia de una membrana basal sobre la superficie de contacto entre la lámina celular desprendida y el gel de colágeno.

Efecto de la invención

20 De acuerdo con la presente invención, se puede preparar de manera fácil y estable una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano que tiene una constitución que tiene una membrana basal que aparece sobre una superficie, sin usar una membrana artificial. Debido a que la lámina celular de la presente invención es superior en la tasa de injerto y funcionalidad, y es extremadamente útil para trasplante, una lámina compuesta por una membrana basal y células epiteliales de pigmento retiniano puede ser producida y aplicada a pacientes con enfermedades oftálmicas, como los pacientes con degeneración macular asociada a la edad y similares mediante trasplante. En particular, cuando la célula que se va a usar para cultivo es una célula epitelial de pigmento retiniano derivada de una célula iPS, se puede evitar el rechazo en el trasplante utilizando como fuente células del propio paciente.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra los resultados de la prueba de la capacidad secretoria de citocina de la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano.

Descripción de las realizaciones

La presente invención se explica en detalle a continuación.

30 La presente invención proporciona un método de producción de una lámina celular compuesta por células epiteliales de pigmento retiniano, una estrecha unión formada entre las células epiteliales de pigmento retiniano, y una membrana basal formada sobre una cara de contacto con el gel de colágeno, que comprende las siguientes etapas:

35 (1) sembrar y cultivar células epiteliales de pigmento retiniano sobre un gel de colágeno para formar una lámina celular compuesta por las células epiteliales de pigmento retiniano, la estrecha unión formada entre las células epiteliales del pigmento retiniano y la membrana basal formada en una cara de contacto con el gel de colágeno, y

(2) degradar el gel de colágeno con colagenasa para desprender la lámina celular compuesta por las células epiteliales de pigmento retiniano, la estrecha unión formada entre las células epiteliales del pigmento retiniano y la membrana basal formada en una cara de contacto con el gel de colágeno .

40 Aunque la célula epitelial de pigmento retiniano que se va a sembrar en la etapa (1) puede ser una célula obtenida a partir de cualquier mamífero, siempre y cuando se obtenga a partir de un mamífero (por ejemplo, ser humano, mono, ratón, rata, perro, bóvido, caballo, cerdo, borrego, cabra, gato, conejo, hámster, cobaya, etc.), es preferiblemente una célula obtenida a partir de un ser humano.

45 La célula epitelial de pigmento retiniano que se va a sembrar puede ser una célula primaria recolectada directamente de un globo ocular, o una célula después de varios pases. Las células epiteliales de pigmento retiniano primarias pueden ser aisladas mediante un método conocido. Por ejemplo, en el caso de células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas a partir de un globo ocular, se aísla un globo ocular de cadáver, se divide rápidamente en el segmento ecuatorial, se extirpan el cuerpo vítreo y la retina y se tratan con colagenasa, hialuronidasa y similares según sea necesario, se recogen las células mediante raspado con un raspador celular, o tratamiento en solución de EDTA o tripsina para liberar las células de la membrana de Bruch, se dejan estar en medio de cultivo para inducir adhesión a la placa de cultivo y crecimiento, y las células cultivadas en el número requerido son pasadas apropiadamente con un tratamiento de tripsina etc. para asegurar el número de células.

50

Adicionalmente, estas células también pueden ser las células obtenidas induciendo la diferenciación de células madre pluripotentes no diferenciadas, tal como células madre embrionarias (célula ES), células madre pluripotentes inducidas (célula iPS) y similares, células madre inclidas células madre somáticas tal como células madre neurales y similares, o células progenitoras incluidas células progenitoras neurales y células progenitoras retinianas. Además, como célula madre, la célula objeto se puede preparar induciendo la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (células iPS) dada a conocer en años recientes. Una célula iPS es una célula madre inducida obtenida a partir de una célula somática que tiene propiedades equivalentes a las de una célula ES, que se puede producir introduciendo una sustancia de reprogramación nuclear particular (ácido nucleico, proteína, compuesto de bajo peso molecular, etc.) en una célula somática [Takahashi, K. y Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006); Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)]. Las condiciones y medios usados para la diferenciación de la célula madre antes mencionada en la célula diferenciada objeto puede ser condiciones y medios convencionalmente conocidos, o pueden ser determinados apropiadamente por el experto normal en la técnica. En la presente invención, preferiblemente se usa una célula obtenida induciendo diferenciación de células madre o células progenitoras, preferiblemente células madre pluripotentes, como célula epitelial de pigmento retiniano que se va a usar para la lámina celular, ya que se puede preparar una célula epitelial de pigmento retiniano en una etapa de maduración apropiada, y en particular, se pueden preparar células epiteliales de pigmento retiniano comparativamente inmaduras y se puede formar ventajosamente una lámina celular. Además, cuando la lámina celular que se va a producir mediante la presente invención es para trasplante, es preferible el uso de una célula iPS ya que una lámina celular obtenida usando una célula somática del sujeto, quien recibe trasplante, como fuente de célula iPS no tiene antigenicidad contra el sujeto. Cuando induce una célula madre a diferenciarse, por ejemplo la célula ES humana o célula madre pluripotente, tal como la célula iPS y similares, se cultiva en un medio de diferenciación ES al que se ha añadido antagonista de Wnt, tal como Dkk-1, CKI-7 y similares, y antagonista de Nodal tal como Lefty A, SB-431542 y similares. Cuando se cultiva durante un periodo dado, se expresan Rx, Pax6 y Mitf, que son marcadores de células progenitoras retinales, y se pueden obtener células epiteliales de pigmento retiniano humanas mediante observación morfológica con un microscopio óptico, confirmando células que tienen una forma poligonal y pigmento [Neuroscience Letters 2009 Jul 24 458(3) 126-31, Journal of Cell Science 2009 Sep 1 122(Pt 17) 3169-79].

Las células epiteliales de pigmento retiniano de la presente invención se cultivan por siembra sobre un gel de colágeno. El colágeno usado para el gel de colágeno puede ser cualquiera siempre y cuando se obtenga a partir de un mamífero (por ejemplo, ser humano, mono, ratón, rata, perro, bovino, caballo, cerdo, borrego, cabra, gato, conejo, hámster, cobaya, etc.) y se usa, por ejemplo, colágeno obtenido a partir de ser humano o cerdo. Ejemplos del tejido obtenido a partir de colágeno incluyen tendón, piel y similares. Aunque el tipo de colágeno puede ser cualquiera, se prefiere uno que no sea el colágeno que constituye la membrana basal humana, y se prefiere específicamente uno que no sea colágeno tipo IV. De éstos, preferiblemente se usa el colágeno tipo I. Aunque puede producirse un gel de colágeno mediante, por ejemplo, un método de producción convencionalmente conocido, en la presente invención se produce un gel compuesto de una red de fibras de colágeno induciendo fibrogénesis de colágeno, como se describe en el Ejemplo mencionado más adelante. Como el colágeno fibrótico presenta una combinación de fuerza y flexibilidad, es fácil de manejar, muestra buen mantenimiento de la proliferación celular y de la diferenciación celular, y es preferible como gel de colágeno para uso en la presente invención. Además, se requiere que el colágeno que se va a usar en la presente invención mantenga las células, que están sembradas en el gel de colágeno, sobre la superficie del gel sin permitirles hundirse en la capa de gel. Por lo tanto, como colágeno se prefiere uno en donde el gel tiene la fuerza necesaria para la proliferación celular y, por ejemplo, es preferible un colágeno que tiene una gran cantidad de reticulación intermolecular. Como tal colágeno, puede mencionarse colágeno obtenido a partir de tendón.

Aunque la concentración de colágeno del gel de colágeno antes mencionado puede estar en cualquier intervalo siempre y cuando pueda dar un gel con fuerza suficiente para permitir el injerto y el crecimiento de las células epiteliales de pigmento retiniano, y que satisfice la solubilidad que facilita la degradación por colagenasa, la viscosidad que permite el manejo fácil y similares, es preferiblemente 0,1% (p/v) – 0,5% (p/v), más preferiblemente 0,2% (p/v) – 0,3% (p/v). Cuando la concentración de colágeno del gel de colágeno es menor que 0,1% (p/v), la fuerza del gel de colágeno se vuelve insuficiente, y por lo tanto, disminuyen la tasa de colonización y la tasa de proliferación celular de las células epiteliales de pigmento retiniano. Cuando la concentración de colágeno del gel de colágeno excede de 0,5% (p/v), se alarga el tiempo de un tratamiento con colagenasa para degradar el gel de colágeno, que se teme que ejerza una influencia adversa sobre las células.

Aunque el volumen de una solución mixta de gel de colágeno usada para la producción del gel de colágeno antes mencionado varía dependiendo del área de cultivo y forma de un sustrato de cultivo que se va a usar para el cultivo celular, es preferiblemente aproximadamente 100 μ l – aproximadamente 250 μ l, más preferiblemente aproximadamente 150 μ l – aproximadamente 200 μ l, por unidad de área (cm^2). Cuando la cantidad de solución mezclada de gel de colágeno es demasiado pequeña, se forma una capa de gel de colágeno que tiene una parte central delgada debido a la influencia de una tensión superficial aplicada a la superficie de gel, y la lámina tiende a dañarse durante el corte de la lámina celular, ya que las células entran en contacto directo con un sustrato de cultivo cuando las células epiteliales de pigmento retiniano se cultivan. Cuando la cantidad de solución mezclada de gel de colágeno está en exceso, se forma una capa de gel de colágeno gruesa sobre un sustrato de cultivo, lo que reduce relativamente la cantidad del medio de cultivo, y por lo tanto, el mantenimiento del cultivo no es fácil de realizar, el tratamiento de colagenasa lleva tiempo, y se temen daños sobre la lámina celular.

En la etapa (1), se puede producir una lámina celular sembrando y cultivando las células epiteliales de pigmento retiniano antes mencionadas sobre el gel de colágeno de un sustrato de cultivo celular. El sustrato de cultivo celular en la presente invención es particularmente limitado siempre y cuando sea para cultivo celular. Ejemplos de los mismos incluyen recipientes de cultivo que tienen una membrana porosa, tal como una membrana Transwell y similares, un matraz, un matraz de cultivo de tejido, una placa, una placa petri, una placa de cultivo de tejido, una multi-placa, una microplaca, una placa de micropocillos, una multiplaca, una placa de multipocillos, un portaobjetos de cámara, un tubo, una bandeja, una bolsa de cultivo o una botella rodante. Los recipientes de cultivo que tienen una membrana porosa son preferibles, debido a que se realizan convenientemente un tratamiento de colagenasa y una operación de corte de la lámina celular. Por ejemplo, preferiblemente se usa una membrana Transwell comercialmente disponible. Los ejemplos del material del sustrato de cultivo celular en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, materiales inorgánicos, tales como materiales de metal, vidrio, cerámica, silicio y similares, materiales orgánicos representados por elastómeros, plásticos (por ejemplo, resina de poliéster, resina de polietileno, resina de polipropileno, resina ABS, nylon, resina acrílica, fluoro-resina, resina de policarbonato, resina de poliuretano, resina de metilpenteno, resina de fenol, resina de melanina, resina epoxi, resina de cloruro de vinilo).

El número de las células epiteliales de pigmento retiniano que se van a sembrar puede estar en cualquier intervalo siempre y cuando la densidad celular sea capaz de formar una lámina celular. Sin embargo, cuando la densidad celular es demasiado baja, la forma celular es mala, el tiempo de cultivo antes de alcanzar la confluencia es largo, y además, el tiempo necesario para la maduración celular y la coloración es largo. De manera similar, cuando la densidad celular es demasiado alta, se suprime la proliferación celular, el tiempo de cultivo antes de alcanzar la confluencia tiende a ser largo, y las células pueden morir por estar sobremasificadas. Por lo tanto, la densidad de las células que hay que sembrar es preferiblemente aproximadamente $4,5 \times 10^4$ células/cm² – aproximadamente $8,5 \times 10^5$ células/cm², más preferiblemente aproximadamente $8,5 \times 10^4$ células/cm² – aproximadamente $8,5 \times 10^5$ células/cm², muy preferiblemente $4,5 \times 10^5$ células/cm².

Puede formarse una población de células en monocapa (lámina celular) compuesta por células epiteliales de pigmento retiniano cultivando las células epiteliales de pigmento retiniano sembradas sobre gel de colágeno en un medio de cultivo. Puede usarse un medio de cultivo sin limitación particular siempre y cuando sea un medio de cultivo celular generalmente usado en el campo pertinente. Por ejemplo, puede usarse un medio basal descrito en "Japan tissue culture conference ed., Technique of Tissue Culture 3ª edición", página 581, publicada por Asakura Shoten, tal como medio F-10, medio F12, MEM, medio BME, DMEM, α MEM, medio IMD; medio ES, medio DM-160, medio Fisher, medio WE, medio RPMI1640 y similares. Además, puede añadirse suero (suero bovino fetal, etc.), varios factores de crecimiento (EGF, FGF, HGF, PDGF etc.), antibióticos, aminoácidos y similares al medio basal. El pH del medio preferiblemente es de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. En cuanto al cultivo, por ejemplo, generalmente se realiza un cultivo primario a una temperatura de aproximadamente 30 – aproximadamente 40°C durante aproximadamente 15 – aproximadamente 60 h hasta que las células epiteliales de pigmento retiniano se hacen confluentes. Posteriormente, se realiza un cultivo secundario durante aproximadamente 1 semana – aproximadamente 2 meses mientras se cambia el medio, después de lo cual se realiza el cultivo mientras que se airea y agita si es necesario hasta la formación de una lámina celular. Las células que constituyen la lámina celular obtenida mediante tal cultivo se mantienen como células epiteliales de pigmento retiniano. El mantenimiento de las células como células epiteliales de pigmento retiniano puede confirmarse al detectarse BEST1, RPE65, MERTK, CRALBP o similares como un marcador de diferenciación específica.

Ya que la lámina celular formada en la etapa (1) es adherida al gel de colágeno, por ejemplo, cuando se usa directamente para trasplante y similares, se teme que el gel de colágeno impida el injerto en un receptor de trasplante. Si el gel de colágeno puede ser separado de antemano, puede conducir a la resolución de tal problema. En la etapa (2) de la presente invención, el gel de colágeno que se adhiere a la lámina celular formada en la etapa (1) es degradado por colagenasa. El experto normal en la técnica pueden seleccionar la colagenasa apropiada de acuerdo con la clase de colágeno usada para preparar el gel de colágeno. Aunque la colagenasa que se va a usar para la degradación del gel de colágeno no está particularmente limitada siempre y cuando tenga una actividad para digerir el gel de colágeno, se prefiere una que no degrade fácilmente el colágeno que constituye la membrana basal humana (por ejemplo, colágeno tipo IV). Por ejemplo, puede usarse la colagenasa obtenida a partir de un microorganismo inducido por Clostridium (Clostridium histolyticum) o Streptomyces (Streptomyces parvulus), que están disponibles a un nivel comercial, son seguras y tienen una alta actividad enzimática.

Como actividad de la colagenasa antes mencionada, la actividad específica con relación al peso de colágeno en el gel de colágeno es más importante que la actividad por unidad de peso de colagenasa y que la actividad por unidad de volumen de una solución acuosa de colagenasa. La actividad específica de la colagenasa que se va a usar para disolver el gel de colágeno (actividad de colagenasa/peso de colágeno) es preferiblemente no menor que 0,1 U/mg. Cuando la actividad específica de la colagenasa es menor que 0,1 U/mg, la disolución del gel de colágeno puede llevar más tiempo de lo deseable o el gel puede disolverse menos de lo deseable. Más preferiblemente está en el intervalo de 0,1 – 10.000 U/mg, y aún más preferiblemente en el intervalo de 1 – 3.000 U/mg.

En el método de producción de la lámina celular de la presente invención, el método de actuación de la colagenasa sobre gel de colágeno no es particularmente limitado. Una solución de colagenasa preparada usando como disolvente un medio o una solución isotónica con capacidad reguladora del pH puede ser añadido al medio, o un gel de colágeno unido a células desprendido de una placa de cultivo celular puede ser sumergido en la solución de

colagenasa antes mencionada. Ya que se usa una membrana Transwell como sustrato de cultivo celular en la presente invención, puede quedar expuesta una capa de gel de colágeno al recuperar un inserto y separar la membrana en el fondo del inserto, y el gel de colágeno expuesto preferiblemente se sumerge directamente en la solución de colagenasa antes mencionada.

5 En el método de producción de la lámina celular de la presente invención, el tiempo para disolver el gel de colágeno por colagenasa no está particularmente limitado. Cuando el tiempo de acción de la colagenasa es demasiado largo, no preferiblemente pueden degradarse funciones celulares tales como la capacidad de adhesión, la capacidad proliferativa y similares. Aunque el tiempo de disolución por colagenasa puede variar dependiendo de la actividad específica de la colagenasa, temperatura, la forma del gel de colágeno, el método de tratamiento con colagenasa y similares, generalmente es 15 min – 60 min. El tratamiento con colagenasa puede ser un tratamiento realizado una sola vez o realizado varias veces.

10 La temperatura durante el tratamiento del gel de colágeno por colagenasa en el método de producción de la lámina celular de la presente invención preferiblemente se establece dentro del intervalo de 10 – 42°C, más preferiblemente 30 – 40°C, aún más preferiblemente 36 – 38°C, ya que la fluencia del citoplasma de la célula generalmente disminuye y metabolismo disminuye cuando la temperatura dentro de los organismos vivos llega a ser no más de 10°C (aproximadamente 30°C en seres humanos), la proteína es desnaturalizada y la función celular disminuye cuando la temperatura excede de 42°C, y la temperatura óptima de la colagenasa es principalmente 37°C y una temperatura por debajo de este nivel prolonga el tiempo de disolución.

15 En el método de producción de lámina celular de la presente invención, cuando la disolución de gel de colágeno progresa, la lámina celular es desprendida gradualmente del gel, y finalmente es liberada en la solución de colagenasa. Para recuperar la lámina celular, la lámina celular puede ser separada mecánicamente del gel restante, o puede recuperarse después de la disolución completa del gel. Aunque la separación mecánica acorta el tiempo de recuperación de la lámina celular, como la lámina celular puede ser destruida, preferiblemente se recupera después de la disolución completa del gel.

20 Aunque la lámina celular recuperada como se ha mencionado antes puede ser usada directamente para varias aplicaciones, como la colagenasa residual puede inhibir la adhesividad entre las láminas celulares o la adhesividad a un tejido, preferiblemente se lava con un medio o una solución isotónica con capacidad reguladora del pH. La temperatura durante la limpieza puede ser determinada de acuerdo con el tratamiento de disolución de gel de colágeno mediante colagenasa. Para remover suficientemente la colagenasa residual, el término es lavado preferiblemente una o más veces con un medio o una solución isotónica teniendo una capacidad reguladora del pH.

25 En la lámina celular obtenida por el método de la presente invención, la citocina específica para una célula epitelial de pigmento retiniano es secretada con una polaridad similar a la que se da en organismos vivos, y la resistencia eléctrica transepitelial (TER), que es un índice de enlace de adhesión cercano entre células, es tan elevado como en organismos vivos. Por lo tanto, tiene una función de barrera de capa celular similar a la que se da en organismos vivos. De acuerdo con el método de la presente invención, puede obtenerse una lámina celular con funciones similares a las que se dan en organismos vivos puede ser obtenida.

30 En la lámina celular obtenida por el método de la presente invención, se forma una unión estrecha entre células epiteliales de pigmento retiniano, y se forma una membrana basal sobre una cara de contacto con el gel de colágeno. En la presente memoria, la “membrana basal” es una membrana formada a partir de los componentes producidos a partir de las células epiteliales de pigmento retiniano, y significa una membrana que contiene al menos una parte del componente de membrana basal (de aquí en adelante referida como “membrana basal de células epiteliales de pigmento retiniano”). La membrana basal de las células epiteliales de pigmento retiniano en organismos vivos está presente como una película delgada entre una capa de células epiteliales de pigmento retiniano y una capa de colágeno interior que constituye la membrana de Bruch, y es una matriz extracelular que tiene colágeno tipo IV, laminina, proteoglicano de sulfato de heparano (perlecan), nidogen y similares como componentes representativos. La membrana de Bruch es una película delgada entre la capa de células epiteliales de pigmento retiniano y la coroides, y tiene una estructura de 5 capas, a saber, una membrana basal de células epiteliales de pigmento retiniano, una capa de colágeno interna, una capa de elastina, una capa de colágeno externa, y una membrana basal de lámina coriocalpilar. La lámina celular contiene una parte (membrana basal de células epiteliales de pigmento retiniano) de la estructura de la membrana de Burch. La formación de la estrecha unión puede confirmarse observando la forma de células estrechamente adheridas con forma hexagonal, y la expresión de ocludina, ZO-1 y similares entre las células mediante inmunomanchado. La formación de membrana basal puede confirmarse observando la expresión de marcadores de membrana basal, tales como laminina, proteoglicano de sulfato de heparano (perlecan), nidogen, o colágeno tipo IV y similares sobre una superficie celular mediante inmunomanchado, u observación al microscopio electrónico de barrido.

35 En general, las células epiteliales de pigmento retiniano cultivadas en una placa de cultivo producen componentes de membrana basal, pero es extremadamente difícil desprender las células en forma de una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano utilizable desprendida de una placa de cultivo (Invest. Ophthalmol. Vis. Scie., 36(2), 195, 381-390). De acuerdo con el método de la presente invención, las células epiteliales de pigmento retiniano junto con una membrana basal producida a partir de células epiteliales de pigmento retiniano pueden recuperarse

como una lámina sin utilizar una membrana artificial. Ya que las células epiteliales de pigmento retiniano forman una estructura de monocapa, cuando se manejan individualmente, la estructura de la lámina se desintegra y las células se diseminan en unidades celulares. Así, el trasplante de las mismas como una lámina es extremadamente difícil. Por otra parte, ya que la lámina celular va acompañada de una membrana basal y tiene suficiente rigidez, no se arruga fácilmente durante la recuperación, lo que facilita su manipulación extraordinariamente. En consecuencia, como el montaje en un dispositivo de trasplante celular y una operación de trasplante pueden realizarse suavemente, el trasplante celular puede ser mínimamente invasivo, y se espera que tanto el efecto como el pronóstico mejoren. Además, como la lámina celular va acompañada de una membrana basal, es extremadamente ventajosa para trasplante en una enfermedad en que la membrana basal se descoloca simultáneamente. Por ejemplo, la degeneración macular asociada a la edad algunas veces se acompaña de alteraciones de la membrana de Bruch. La membrana basal en la lámina celular de la presente invención compensa la parte alterada, con lo que la tasa de injerto de la lámina celular puede ser mejorada, y también puede esperarse un efecto de tratamiento de la misma. Por tanto, la lámina celular de la presente invención es preferible como una lámina para trasplante que se dirige específicamente a una enfermedad con una membrana basal alterada, y se puede utilizar preferiblemente como una lámina para trasplante que se dirige particularmente a la degeneración macular asociada a la edad.

El método de producción de la lámina celular puede comprender además la siguiente etapa (3):

(3) confirmar la presencia o ausencia de una membrana basal sobre la superficie de contacto entre la lámina celular desprendida y el gel de colágeno.

En la etapa (3), la formación de una lámina celular que tiene una capa celular compuesta por células epiteliales de pigmento retiniano y una membrana basal puede determinarse confirmando la presencia o ausencia de la membrana basal de la lámina celular. La presencia o ausencia de la membrana basal puede confirmarse mediante un método similar a la confirmación antes mencionada de la formación de la membrana basal, por ejemplo, expresión de un marcador de membrana basal, observación al microscopio electrónico de barrido y similares. Para la detección de la membrana basal, la expresión de un marcador de membrana basal puede confirmarse en cualquier sitio de la célula (por ejemplo, el citoplasma, la membrana celular, la membrana nuclear y similares). Preferiblemente, el blanco es un marcador expresado sobre una cara de contacto con el gel de colágeno.

El marcador de membrana basal en la presente memoria incluye un producto de transcripción, un producto de traducción o un producto de degradación en un gen expresado específicamente en la membrana basal. Ejemplos de tal gen incluyen laminina, proteoglicano de sulfato de heparano (perlecan), nidogen, colágeno tipo IV y similares. De éstos, se usan preferiblemente laminina, colágeno tipo IV y similares, que son componentes principales de la membrana basal.

Una muestra que se va a usar para "confirmar la presencia o ausencia de una membrana basal sobre la superficie de contacto entre la lámina celular desprendida y el gel de colágeno" no está particularmente limitada siempre y cuando contenga un marcador de membrana basal (por ejemplo, RNA, proteína, producto de degradación de la misma y similares) obtenido a partir de la lámina celular (o célula) desprendida en la etapa (2).

La expresión del gene marcador de membrana basal cuando la muestra antes mencionada es RNA se puede examinar preparando una fracción de RNA (p.ej., RNA total, mRNA) a partir de la célula de la lámina celular desprendida en la etapa (2) y detectando un producto de transcripción del gen marcador contenido en la fracción, o detectando directamente un producto de gen marcador en la célula sin extraer RNA de la célula.

Cuando se prepara una fracción de RNA (por ejemplo, RNA total, mRNA) a partir de la célula, puede prepararse usando un método conocido, tal como el método de ultracentrifugación con guanidina-CsCl, el método de extracción con AGPC y similares. Utilizando un kit de extracción de RNA comercialmente disponible (por ejemplo, RNeasy Mini Kit; fabricado por Qiagen, etc.), puede prepararse rápida y convenientemente RNA total con alta pureza a partir de trazas de una muestra. Ejemplos del método para detectar un producto de transcripción de un gen marcador de membrana basal en una fracción de RNA incluyen un método que usa hibridación (Transferencia Northern, transferencia en mancha, análisis de chip de DNA, etc.), un método que usa PCR (RT-PCR; PCR competitiva, PCR de tiempo real, etc.) y similares. Se prefieren los métodos de PCR cuantitativos tales como PCR competitiva, PCR de tiempo real y similares, ya que la variación de expresión de un gen marcador de membrana basal puede detectarse rápida y convenientemente a partir de trazas de una muestra, y un análisis de chip de DNA es preferible ya que la variación de expresión de genes marcadores plúrales puede detectarse colectivamente y el desempeño de cuantificación también puede mejorarse seleccionando un método de detección y similares.

Cuando se emplea hibridación de transferencia Northern o de transferencia en mancha, el gen marcador de membrana basal puede detectarse usando un ácido nucleico (sonda) capaz de hibridarse con un producto de transcripción del gen. Ejemplos de tal ácido incluyen un ácido nucleico capaz de hibridarse con un producto de transcripción de un gen marcador de membrana basal bajo condiciones de alta rigurosidad. Ejemplos de las "condiciones de alta rigurosidad" incluyen reacción de hibridación a 45°C en 6xSSC (cloruro de sodio/citrato de sodio), seguido de lavado una o más veces a 65°C en 0,2xSSC/0,1% SDS y similares. El experto normal en la técnica puede establecer fácilmente una rigurosidad deseada cambiando apropiadamente la concentración de sal de una solución de hibridación, la temperatura de reacción de hibridación, la concentración de sonda, la longitud de

sonda, el número de discrepancias, el tiempo de reacción de hibridación, la concentración de sal de lavado, la temperatura de lavado y similares. El ácido nucleico puede ser DNA, RNA o quimera de DNA/RNA, dando preferencia a DNA.

5 El ácido nucleico que se va a usar como sonda puede ser bicatenario o monocatenario. Cuando es bicatenario, puede ser DNA bicatenario, RNA bicatenario o un híbrido de DNA:RNA. Cuando es monocatenario, puede usarse una hebra antisentido. Aunque la longitud del ácido nucleico no está particularmente limitada siempre y cuando pueda hibridarse específicamente con el ácido nucleico diana, tiene, por ejemplo, no menos de aproximadamente 15 bases, preferiblemente no menos de aproximadamente 30 bases. Para permitir la detección y cuantificación del ácido nucleico diana, preferiblemente el ácido nucleico se etiqueta. Ejemplos de la etiqueta incluyen un radioisótopo, una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente y similares. Ejemplos de radioisótopo incluyen [³²P], [³H], [¹⁴C] y similares. Como enzima, es preferible una enzima estable que tiene una alta actividad específica, por ejemplo, β-galactosidasa, β-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa, deshidrogenasa de ácido málico y similares. Ejemplos de sustancia fluorescente incluyen fluorescamina, isotiocianato de fluoresceína y similares. Ejemplos de sustancia luminiscente incluyen luminol, obtenido a partir de luminol, luciferina, lucigenina y similares. Además, también puede usarse biotina-(estrept)avidina para unir una sonda y una etiqueta.

20 Cuando se emplea una hibridación Northern, una fracción de RNA preparada como se ha mencionado antes se separa mediante electroforesis en gel, se transfiere a una membrana de nitrocelulosa, nylon, difluoruro de polivinilideno y similares, se hibrida bajo las "condiciones de alta rigurosidad" antes mencionadas en un tampón de hibridación que contiene una sonda de etiquetado como se menciona antes, y se mide la cantidad de la etiqueta unida a la membrana para cada banda mediante un método adecuado, y así puede medirse el nivel de expresión de cada gen marcador de membrana basal. También en el caso de transferencia en mancha, una membrana manchada con una fracción de RNA se somete a una reacción de hibridación similar (realizada para cada gen marcador), y se mide la cantidad de la etiqueta en la mancha, y así puede medirse el nivel de expresión de cada gene marcador. Cuando se emplea análisis de chip de DNA, por ejemplo, se sintetiza un cDNA en el que se ha introducido un promotor adecuado, tal como promotor T7 y similares, mediante reacción de transcripción inversa, a partir de una fracción de RNA preparada como se ha mencionado antes, se sintetiza cRNA usando RNA polimerasa (en este caso, ese obtiene el cRNA etiquetado usando un mononucleótido etiquetado con biotina y similares como sustrato). El cRNA etiquetado se pone en contacto con un chip que tiene la sonda antes mencionada inmovilizada sobre el mismo para realizar una reacción de hibridación, y se mide la cantidad de la etiqueta unida a cada sonda sobre la fase sólida, y así puede medirse el nivel de expresión de cada gen marcador de membrana basal. Este método es ventajoso en términos de rapidez y conveniencia conforme aumenta el número de genes marcadores diferenciados detectados (por lo tanto, sondas para estar en fase sólida).

35 Por otra parte, cuando se detecta un gen marcador sin extraer RNA de la célula, puede usarse hibridación in situ como medio de detección. En este método, la célula se inmoviliza tratándola con un agente fijador, preferiblemente, un agente fijador de precipitación, por ejemplo, acetona, o incubándola durante un corto periodo de tiempo en una solución de formaldehído reguladora del pH, en lugar de extraer RNA de la célula. Después de la inmovilización, la célula se incrusta en parafina para formar un bloque, y se puede usar una rebanada cortada de la misma como muestra. Una muestra incrustada en parafina bien preparada puede conservarse a temperatura ambiente durante muchos años. Como ácido nucleico que se va a usar como sonda, se puede usar cualquiera que sea similar a los ejemplos antes mencionados. Preferiblemente se usa hibridación in situ en la presente invención, ya que la expresión de un marcador de membrana basal sobre la superficie de contacto entre la célula y el gel de colágeno puede confirmarse directamente.

45 De manera alternativa, la expresión de un marcador de membrana basal en la lámina de células separadas en la etapa (2) puede confirmarse preparando una fracción de proteína de la lámina celular (o célula), y detectando un producto de traducción (es decir, proteína marcadora) del gen marcador contenido en la fracción, o detectando directamente un producto de traducción del gen marcador en la lámina celular (o célula), sin extraer la proteína de la lámina celular (o célula). Una proteína marcadora puede detectarse por un método de medición inmunológico (por ejemplo, ELISA, FIA, RIA, transferencia Western, etc.) usando un anticuerpo para cada proteína y, en el caso de una proteína que muestra una actividad fisiológica medible, tal como una enzima y similares, puede detectarse midiendo la actividad fisiológica de cada proteína marcadora por un método conocido. De manera alternativa, una proteína marcadora también puede ser detectada por un método de espectrometría de masas, tal como MALDI-TOFMS y similares.

55 Puede obtenerse un anticuerpo para cada proteína marcadora de acuerdo con una técnica de producción de anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales generalmente usada y usando una proteína o proteína marcadora, o un péptido parcial de la misma como antígeno de inmunización.

60 Cuando se aplican métodos de medición inmunológicos respectivos al método de examen de la presente invención, no es necesario establecer condiciones u operaciones especiales, y similares. Puede construirse un sistema de medición de proteína marcadora de membrana basal añadiendo las consideraciones técnicas generales del experto normal en la técnica a condiciones generales y métodos operativos en cada método. En cuanto al detalle de estos medios técnicos generales, se pueden mencionar compendios, libros y similares. Por ejemplo, "Radioimmunoassay" editado por Hiroshi Irie (Kodansha, publicado en 1974), "cont. Radioimmunoassay" editado por Hiroshi Irie

(Kodansha, publicado en 1979), "Enzyme Immunoassay" editado por Eiji Ishikawa et al. (2ª edición) (Igaku-Shoin, publicado en 1982), "Enzyme Immunoassay" editado por Eiji Ishikawa et al. (3ª edición) (Igaku-Shoin, publicado en 1987), "Methods in Enzymology", vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A)), ibidem, Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)), ibidem, Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C)), ibidem, Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), ibidem, Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), ibidem, Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (todo publicado por la Academic Press) y similares.

También se describe una lámina celular obtenida de acuerdo con el método de producción de lámina celular antes mencionado, preferiblemente, una lámina celular para trasplante que comprende una capa celular formada a partir de células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas mediante inducción de diferenciación ex vivo, y una membrana basal. La lámina de células epiteliales de pigmento retiniano de la presente invención es preferible como material de trasplante para el tratamiento retinal de pacientes con enfermedades oftálmicas. Ejemplos de enfermedades oftálmicas incluyen enfermedades degenerativas retinales, tales como enfermedad de degeneración macular asociada a la edad, retinitis pigmentosa, retinopatía diabética, desprendimiento de retina y similares. Ya que la lámina celular de la presente invención contiene una membrana basal, puede ser trasplantada con una tasa de injerto alta para una enfermedad que implica simultáneamente una alteración de la membrana de Bruch. Además, ya que la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano de la presente invención tiene una membrana basal hecha a partir de componentes similares a los que se presentan en organismos vivos, también puede ser utilizada para varios fines de cribado, tales como cribado de eficacia, evaluación de toxicidad y similares en las enfermedades oftálmicas antes mencionadas. Para el cribado de eficacia para las enfermedades oftálmicas antes mencionadas, por ejemplo, la lámina celular puede aplicarse al cribado de una sustancia que tiene eficacia para las enfermedades oftálmicas antes mencionadas, de acuerdo con el método descrito en JP-A-2007-500509. Para ser específicos, la lámina celular de la presente invención se cultiva en presencia o ausencia de una sustancia candidato que tiene eficacia bajo las condiciones de tensión posiblemente causantes de las enfermedades oftálmicas antes mencionadas (por ejemplo, la luz (por ejemplo, luz blanca, luz azul; la luz induce muerte de células retinales, en particular células foto-receptoras, y puede ser un factor incitador de degeneración macular), A2E [N-retiniliden-N-retinil-etanolamina retinoide] (se considera que la acumulación de A2E contribuye a la neurodegeneración asociada a la edad de células retinales, en particular a la expresión de la degeneración macular), el tiempo de tabaquismo acumulado (fumar es considerado como un factor de riesgo de degeneración macular), la presión externa (por ejemplo, presión hidrostática; se sospecha que el aumento en la presión intraocular está involucrado en glaucoma)), y la evaluación puede ser realizada en función del número de fotorreceptores que expresan rodopsina, y mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo anti-caspasa 3. Para la evaluación de toxicidad, la lámina celular puede aplicarse a cribado para una sustancia tóxica de acuerdo con el método descrito en JP-A-2007-517210. Para ser específicos, la lámina celular de la presente invención se cultiva en presencia o ausencia de una sustancia candidato a ser tóxica y usando el péptido marcador de integrina descrito en JP-A-2007-517210, excitado con un láser a una longitud de onda de 488 nm, y se detecta la fluorescencia a 520 nm para la evaluación. Más aún, la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano también puede utilizarse como un modelo in vitro para la evaluación de varias funciones in vivo de las células epiteliales de pigmento retiniano, tal como la función que se refiere al mantenimiento de células visuales, como la capacidad fagocítica del segmento exterior de foto-receptores, acción neuroprotectora y similares, función de barrera de vasos sanguíneos retinales tal como acción de bombeo, unión estrecha y similares.

La lámina celular para trasplante puede usarse para el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas en seres humanos y mamíferos diferentes de humanos (por ejemplo, mono, ratón, rata, perro, bovino, caballo, cerdo, borrego, cabra, gato, conejo, hámster, cobaya, etc.).

El intervalo del área de enfermedad al que puede aplicarse la lámina celular para trasplante se determina apropiadamente dependiendo de la enfermedad diana, la especie animal, la edad, el sexo, el peso corporal y los síntomas del sujeto de administración, y similares.

La lámina celular para trasplante puede ser trasplantada en una o en varias veces. El número de aplicaciones de trasplante es determinado por profesionales del cuidado de la salud de acuerdo con la enfermedad y las directrices. Por ejemplo, cuando la enfermedad es degeneración macular asociada a la edad, la lámina celular para trasplante puede ser trasplantada dos o más veces dependiendo de la gravedad de la misma. Cuando el trasplante es realizado varias veces, el intervalo no está particularmente limitado, y puede establecerse un periodo de varios días a varias semanas.

La lámina celular para trasplante es trasplantada por profesionales del cuidado de la salud de acuerdo con un método de trasplante apropiado de acuerdo con las directrices. Cuando la lámina celular para trasplante de la presente invención es trasplantada bajo la retina, puede emplearse un método de trasplante que incluye suministrar la lámina sobre un flujo de agua desde una aguja de inyección perforada, hasta el sitio de trasplante bajo la retina del globo ocular, o también puede usarse un aparato terapéutico exclusivo para trasplante.

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación haciendo referencia a Ejemplos, que son meras ejemplificaciones y no limitan el alcance de la presente invención en modo alguno.

Ejemplo de producción 1. Preparación de células epiteliales de pigmento retiniano

Como células epiteliales de pigmento retiniano para uso en la obtención de la lámina en el Ejemplo 1 siguiente, se usaron células epiteliales de pigmento retiniano maduras (253G1, K11PD2, 59M8, 59SV2, 59SV3, 59SV9, 46a, K21EV15, 101EV3, K11EV9, 454E2) obtenidas induciendo la diferenciación de células iPS, y células epiteliales de pigmento retiniano (hES, CMK6) obtenidas induciendo diferenciación de células ES, de acuerdo con el método descrito en *Neuroscience Letters* 458 (2009) 126-131.

Células epiteliales de pigmento retiniano derivadas de iPS humanas

253G1 es una célula epitelial de pigmento retiniano obtenida induciendo diferenciación de células iPS humanas obtenidas a partir de un ser humano sano, y K11PD2 y 59M8 son células epiteliales de pigmento retiniano inducidas a diferenciarse de células iPS humanas obtenidas a partir de pacientes con retinitis pigmentosa diferentes entre sí. Las células iPS fueron establecidas por un método que incluye introducir genes Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en fibroblastos obtenidos a partir de piel humana usando retrovirus, de acuerdo con el método descrito en *Cell* 131, 861-872, 2007.

59SV2, 59SV3 y 59SV9 son células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas induciendo diferenciación de células iPS humanas obtenidas a partir del mismo paciente de retinitis pigmentosa. Las células iPS fueron establecidas por un método que incluye introducir Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en fibroblastos obtenidos a partir de piel humana usando virus Sendai, de acuerdo con el método descrito en *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 85 (2009) 348-362.

K21EV15, 101EV3, K11EV9 y 454E2 son células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas induciendo diferenciación de células iPS humanas obtenidas a partir de pacientes con retinitis pigmentosa diferentes entre sí. Las células iPS fueron establecidas por un método que incluye introducir Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc y LIN28 humanos en fibroblastos obtenidos a partir de piel humana usando vector episomal, de acuerdo con el método descrito en *Nat Methods*. 2011 Mayo; 8(5): 409-12).

Células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas a partir de iPS de mono

46a es una célula epitelial de pigmento retiniano obtenida induciendo diferenciación de una célula iPS de mono (mono cinomolgo), de acuerdo con el método descrito en *Jpn. J. Transplant.* 44, 231-235.

Células epiteliales de pigmento retiniano obtenido a partir de ES

hES es una célula epitelial de pigmento retiniano obtenida induciendo diferenciación de la línea de células ES humanas khES-1. CMK6 es una célula epitelial de pigmento retiniano obtenida induciendo diferenciación de células ES de mono, de acuerdo con el método descrito en *Neuroscience Letters* 458 (2009) 126-131.

Ejemplo 1. Método de producción de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano

Preparación de solución mezclada de gel de colágeno

Se prepararon: A: Colágeno tipo I soluble en ácido, obtenido a partir de tendón de cerdo Cellmatrix I-A (Nitta Gelatin, 3.0 mg/ml), B: medio de cultivo concentrado a una concentración de 5 veces [DMEM/F12 (Invitrogen, 12500-062, 3 g) se disolvió en agua MilliQ, y el volumen total (50 ml) se trató con filtro], y C: tampón para reconstitución [NaOH 1N (50 mM; 5 ml), NaHCO₃ (260 mM, 2,2 g) y HEPES (200 mM, 4,77 g) se disolvieron en agua MilliQ, y el volumen total (100 ml) se trató por filtración]. Bajo enfriamiento, B (2 vol) se mezcló (amarillo pálido) con A (7 vol) sin burbujeo. Después, se añadió C (1 vol) y la mezcla se agitó (rosa pálido) para dar una solución mezclada de gel de colágeno al 0,21%.

Preparación de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano

La solución mezclada de gel de colágeno al 0,21% (200 µl) se adicionó al inserto de un inserto Transwell de 12 mm (membrana de poliéster con poros de 0.4 µm); Corning, 3460), y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Después, se añadió F10-10% FBS [F-10 (Sigma, N6908, 445 ml), FBS (50 ml), penicilina-estreptomicina (Invitrogen, 15140-122, 5 ml)] en una cantidad de 1500 µl al exterior del inserto y 500 µl al interior del inserto, y la membrana Transwell se incubó a 37°C durante 24 h. Posteriormente, el interior y exterior del inserto se lavaron una vez con F10-10% FBS, las células epiteliales de pigmento retiniano respectivo obtenidas en el Ejemplo de producción 1 fueron sembradas a 5x10⁵ (F10-109% FBS, 500 µl) dentro del inserto, y se añadió F10-10% FBS (1500 µl) al exterior del inserto. Las células epiteliales de pigmento retiniano fueron cultivadas en F10-10% FBS hasta confluencia. Después de alcanzar la confluencia, el medio se cambió a SFRM-B27 [DMEM (Sigma, D6046, 350 ml), F12 HAM (Sigma, N6658, 150 ml), B27 (Invitrogen, 17504-044, 10 ml), 200 mM L-glutamina (Sigma, G7513, 5 ml), penicilina-estreptomicina (Invitrogen, 15140-122, 5 ml), bFGF (wako, 060-04543, 10 ng/ml)] (1500 µl al exterior del inserto 500 µl al interior del inserto, el cambio de medio se hizo 3 veces/semana), y las células epiteliales de pigmento retiniano fueron cultivadas hasta que mostraron color y forma adecuados.

Corte

Después de progresar durante 6 semanas desde el inicio del cultivo, la membrana del inserto se separó, se añadió colagenasa L (Nitta Gelatin, PBS(+): Sigma, 2600 U/ml, 100 µl) debajo del inserto, y el inserto se incubó a 37°C durante 60 min y se lavó 3 veces con PBS(+). Se añadió SFRM-B27 en forma de gotas de manera que la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano no se secase y se cortó al tamaño deseado con PALM MicroBeam (ZEISS).

Ejemplo 2. Método de producción de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano (tipo de colágeno)

Se produjeron láminas celulares y se cortaron para dar láminas de células epiteliales de pigmento retiniano de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que, en la etapa de producción de una lámina celular usando 253G1 (células epiteliales de pigmento retiniano de iPS) en el Ejemplo 1, (A) se usó colágeno TE tipo I obtenido a partir de piel de cerdo (producto de pedido especial: que contenía principalmente colágeno tipo I, una pequeña cantidad de colágeno tipo III, Nitta Gelatin, 5 mg/ml) como solución mezclada de colágeno al 0,35%/pocillo, (B) se usó colágeno T-1002 tipo I obtenido a partir de tendón de cerdo (producto de pedido especial: colágeno tipo I, Nitta Gelatin, 5,1 mg/ml) como solución mezclada de colágeno al 0,35%/pocillo, (C) se usó colágeno etiquetado con FITC I (Chondrex, 1 mg/ml) como solución mezclada de colágeno al 0,07%/pocillo, (D) se usó colágeno I etiquetado con FITC (pedido especial, Chondrex, 3 mg/ml) como solución mezclada de colágeno al 0,21%/pocillo, (E) se usó atelocolágeno (KOKEN, 3 mg/ml) como solución mezclada de colágeno al 0,215%/pocillo, y (F) se usó membrana de colágeno de permeabilidad para cultivo celular (KOKEN), respectivamente, en lugar de colágeno Cellmatrix I-A tipo I soluble en ácido obtenido a partir de tendón de cerdo (Nitta Gelatin, 3 mg/ml) como solución mezclada de colágeno al 0,21%/pocillo.

Los resultados de ensayo del Ejemplo 1 y los casos usando cada uno de los colágenos antes mencionados se compararon y evaluaron en términos de 4 propiedades [1. Fuerza de gel; 2. Adhesión celular; 3. Crecimiento celular; 4. Seguridad]. Los resultados fueron, (A) {1. Inferior; 2. Equivalente; 3. Inferior; 4. Buena}, (B) {1. Buena (5,1 mg/ml); 2. Equivalente; 3. Inferior; 4. Buena}, (C) {1. Inferior (1 mg/ml); 2. Inferior; 3. Desconocido; 4. Desconocida}, (D) {1. Equivalente (3 mg/ml); 2. Equivalente; 3. Inferior; 4. Desconocida}, (E) {1. Equivalente (3 mg/ml); 2. Inferior; 3. Desconocido; 4. Buena}, y (F) {no fue lisado por colagenasa, por lo que fue inutilizable}. En cuanto a la fuerza de gel, se requiere un cierto nivel de fuerza para permitir el crecimiento de células epiteliales de pigmento retiniano. A partir de tal aspecto, los tipos y concentración de colágeno particularmente preferibles fueron el colágeno Cellmatrix I-A tipo I soluble en ácido obtenido a partir de tendón de cerdo del Ejemplo 1 y (B) el colágeno T-1002 tipo I obtenido a partir de tendón de cerdo usados a la concentración antes mencionada. Cuando el sustrato no tiene un cierto nivel de fuerza, el epitelio de pigmento retiniano no crece y no puede ser usado para la presente invención.

Ejemplo 3. Método de producción de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano (cantidad de colágeno)

Se produjeron y cortaron láminas celulares de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que, en la etapa de producción de una lámina celular usando 253G1 (células epiteliales de pigmento retiniano de iPS) del Ejemplo 1, la cantidad de solución mezclada de gel de colágeno que se iba a usar se cambió de 200 µl a 100 µl o 300 µl, por lo que se recuperaron láminas de células epiteliales de pigmento retiniano.

En comparación con el Ejemplo 1, cuando la cantidad usada de solución mezclada de gel de colágeno fue 100 µl, se formó una capa de gel de colágeno delgada en la parte central debido a una influencia de la tensión superficial causada por la pequeña cantidad de la solución mezclada de gel de colágeno y, conforme procedió el cultivo, las células epiteliales de pigmento retiniano sembradas contactaron directamente con la membrana del fondo con facilidad, lo que provocó ruptura de la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano durante la operación de corte de la lámina. Cuando la cantidad usada de solución mezclada de gel de colágeno fue 300 µl, como la cantidad de solución mezclada de gel de colágeno fue alta, se formó una capa de gel de colágeno gruesa, lo que redujo relativamente la cantidad del medio que podía ser retenido en la inserción, y por lo tanto, el mantenimiento del cultivo no fue fácil de realizar, el tratamiento de colagenasa llevó tiempo y se temió que los daños sobre la lámina celular se hicieran más grandes. Cuando la cantidad usada de solución mezclada de gel de colágeno fue 100 µl, las células entraron en contacto directamente con la membrana, y la lámina celular se rompió por esa parte al retirar la membrana.

Ejemplo 4. Método de producción de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano (cantidad de colagenasa y tiempo de tratamiento)

Las láminas celulares fueron producidas y cortadas de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que en la etapa de producción de una lámina celular usando 253G1 (célula epitelial de pigmento retiniano de iPS) del Ejemplo 1, se puso en contacto 1% de Collagenase L (Nitta Gelatin) o colagenasa tipo I (Roche) con la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano durante 10 min en una cantidad de 10 µl, 20 min en una cantidad de 10 µl, 30 min en una cantidad de 10 µl, 20 min en una cantidad de 20 µl, 60 min en una cantidad de 20 µl, y 50 min en una cantidad de 30 µl, en lugar de 30 min en una cantidad de 30 µl, con lo que se recuperaron láminas de células epiteliales de pigmento retiniano.

Como resultado, cuando se realizó un tratamiento con colagenasa durante 60 min en una cantidad de 10 µl, o 60

min en una cantidad de 20 μ l, se observó degradación de colágeno al mismo nivel que con 30 μ l durante 30 min.

Ejemplo 5. Método de producción de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano (número de células sembradas)

5 Se produjeron y cortaron láminas celulares de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que, en la etapa de producción de una lámina celular usando 253G1 (célula epitelial de pigmento retiniano de iPS) del Ejemplo 1, el número de las células que se iban a sembrar dentro del inserto se cambió de 5×10^5 células/500 μ l a (A) 5×10^4 células/500 μ l, (B) 1×10^5 /500 μ l o (C) 1×10^6 /500 μ l, por lo que se recuperaron láminas de células epiteliales de pigmento retiniano.

10 En comparación con el Ejemplo 1, (A) y (B) requirieron un tiempo más largo para alcanzar la confluencia celular debido al pequeño número de células, y (C) mostró crecimiento lento y también tendió a requerir un tiempo más largo para alcanzar la confluencia celular.

Ejemplo 6. Membrana basal formada sobre lámina de células epiteliales de pigmento retiniano

15 Se preparó una criosección (sección congelada) a partir de la lámina celular producida a partir de 253G1 (célula epitelial de pigmento retiniano de iPS) en el Ejemplo 1 y se sometió a manchado inmunohistoquímico. La formación de una unión estrecha se confirmó mediante la expresión de ZO-1, y la formación de una membrana basal se confirmó mediante la expresión de laminina y colágeno tipo IV. Para la detección de cada proteína, se usaron los anticuerpos respectivos de conejo anti-ZO-1 fabricados por Zymed (dilución 1:100), laminina de conejo fabricada por Abcam (dilución 1:200) y anticuerpo de colágeno tipo IV anti-humano de ratón fabricado por Calbiochem (1:40). Además, se confirmó que la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano tiene una forma epitelial de capa simple a partir del estado de manchado nuclear usando 4',6-diamidino-2-fenilindol fabricado por Molecular Probes (DAPI; 1 μ g/ml).

Evaluación 1. Perfil de expresión de gen específico epitelial de pigmento retiniano de la lámina celular

25 En la etapa de producción de una lámina celular de 59SV3, 59SV9 (células epiteliales de pigmento retiniano de iPS) del Ejemplo 1, la expresión de BEST1, RPE65, MERTK, CRALBP en las células que constituían las láminas después del transcurso de 1 semana, 4 semanas, 2 meses, en donde el día en que el medio fue cambiado a SFRM-B27 después de la confluencia celular fue el día 0, se confirmó mediante RT-PCR. Como resultado, se observó la expresión al mismo nivel que el del control positivo (RNA total de células epiteliales de pigmento retiniano humano (fabricado por ScienCell, Cat. No. 6545)). Aquí, BEST1, RPE65, MERTK son genes expresados específicamente en células epiteliales de pigmento retiniano. CRALBP es un gen expresado en células epiteliales de pigmento retiniano y células de Muller.

Evaluación 2. Medición de colágeno residual en lámina epitelial de pigmento retiniano

35 Se prepararon criosecciones (secciones congeladas) mediante corte, antes y después del tratamiento con colagenasa, a partir de láminas celulares respectivas producidas a partir de 253G1 (célula epitelial de pigmento retiniano de iPS) en el Ejemplo 1, y se sometieron a manchado inmunohistoquímico. El núcleo fue manchado con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1 μ g/ml) fabricado por Molecular Probes, y el colágeno tipo 1 fue manchado con anticuerpo de anti(colágeno tipo I humano) de conejo (dilución 1:40) fabricado por Calbiochem. Como resultado, no se detectó colágeno en las láminas después del tratamiento con colagenasa, y se confirmó que la colagenasa retiró el colágeno que recubría la placa de cultivo. Por otra parte, se detectó colágeno en las láminas cortadas antes del tratamiento con colagenasa.

40 Evaluación 3. Capacidad de secreción de citocina de la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano

45 Los medios de cultivo sobre el lado Apical y el lado Basal en la membrana transwell se recuperaron antes de la etapa de recortar láminas células epiteliales de pigmento retiniano en las láminas celulares producidas a partir de 253G1 (célula epitelial de pigmento retiniano de iPS) y 454E2 (célula epitelial de pigmento retiniano de iPS) del Ejemplo 1, y las cantidades de producción de VEGF y PEDF fueron detectadas mediante ELISA de acuerdo con el método descrito en Arvydas M, IOVS, 2006; 47: 3612-3624. Como resultado, se confirmó que, de modo similar al epitelio de pigmento retiniano obtenido a partir de embrión humano dado a conocer en Arvydas M, IOVS. 2006; 47: 3612-3624, se secretó VEGF principalmente en el lado Basal, y se secretó PEDF principalmente en el lado Apical (Fig. 1). Se mostró que la lámina celular de la presente invención tiene capacidad secretora de citocina similar a la que se produce en organismos vivos, y es superior en cuanto a funcionalidad.

50 Evaluación 4. Resistencia eléctrica transepitelial de la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano

55 Se ve una fuerte correlación entre la función de barrera de una capa celular y la impedancia, a saber, la resistencia eléctrica transepitelial/transendotelial (TER). Se colocó una sonda en el medio interior y exterior del inserto de acuerdo con el método descrito por MILLIPORE (usando Millicell ERS-2), antes de la etapa de cortar la lámina de células epiteliales de pigmento retiniano producida a partir de 454E2 (célula epitelial de pigmento retiniano de iPS) en el Ejemplo 1, y se midió la TER eléctricamente. Como resultado, TER fue $640 \Omega \cdot \text{cm}^2$, y mostró un valor de TER

alto como el epitelio de pigmento retiniano obtenido a partir de embrión humano dado a conocer en Nature Protocols vol 4, nº 5 662-673 (2009), Fig. 10. Se mostró que la lámina celular de la presente invención tiene una alta función de barrera similar a la de los organismos vivos.

5 Evaluación 5. Trasplante de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano obtenida a partir de células ES de mono

10 Una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano de mono producida a partir de células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas a partir de células ES de mono, CMK6 en el Ejemplo 1, fue trasplantada en un ojo de un mono de acuerdo con el método descrito en Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995 Feb; 36(2): 381-90. Antes del trasplante, se practicó una fotocoagulación retinal para alterar la retina del ojo que se iba a someter al trasplante. Al día 28 del trasplante en el ojo del mono que tenía la mácula de fotocoagulación retinal formada en el mismo, se tomaron fotografías del fondo del ojo, y se generaron imágenes de las secciones de fondo ocular como secciones histológicas usando OCT (tomografía de coherencia óptica), y se confirmó la condición de la retina en base a ellas. Como resultado, no se encontró fuga de fluorescencia por angiografía con fluoresceína, el injerto sobrevivió y no se encontraron alteraciones tales como adelgazamiento de la retina y similares.

15 Evaluación 6. Trasplante de lámina de células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas a partir de células iPS de mono

20 Una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano de mono producida a partir de células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas a partir de células iPS de mono, 46a en el Ejemplo 1, se trasplantó bajo la retina de un ojo para trasplante autólogo y tres ojos para trasplante cruzado de acuerdo con el método descrito en Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995 Feb; 36(2): 381-90. Hasta un año después del trasplante, se tomaron fotografías del fondo del ojo y se produjeron imágenes de las secciones de fondo ocular como secciones histológicas usando OCT (tomografía de coherencia óptica), en base a las cuales se observó la condición de la retina con el transcurso del tiempo. En los trasplantes cruzados, se encontraron claras reacciones de rechazo tales como cambios fibrosos sobre la periferia del injerto, fuga de fluorescencia por angiografía con fluoresceína y lesión de alto brillo bajo la retina mediante OCT. Por otra parte, en el trasplante autólogo, no se observó tal rechazo evidente, ni se encontró fuga de fluorescencia mediante angiografía con fluoresceína, el injerto sobrevivió y no se encontraron alteraciones tales como adelgazamiento de retina sensorial y similares.

Aplicabilidad industrial

30 Usando el método de la presente invención, puede producirse de forma comparativamente conveniente una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano para ser aplicada por trasplante a pacientes con degeneración macular asociada a la edad. En particular, cuando las células que se van a usar para cultivo son células epiteliales de pigmento retiniano obtenidas a partir de iPS, pueden usarse las propias células del paciente, lo que puede evitar rechazo en el trasplante. Más aún, ya que la lámina celular obtenida mediante el método de la presente invención tiene una membrana basal hecha a partir de los mismos componentes que en organismos vivos, puede reproducirse una lámina de células epiteliales de pigmento retiniano más parecida al estado en organismos vivos, lo que es útil para varios propósitos de cribado.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una lámina celular compuesta por células epiteliales de pigmento retiniano, una estrecha unión formada entre las células epiteliales de pigmento retiniano, y una membrana basal formada sobre una cara de contacto con el gel de colágeno, que comprende las siguientes etapas
- 5 (1) sembrar y cultivar células epiteliales de pigmento retiniano sobre un gel de colágeno para formar una lámina celular compuesta por las células epiteliales de pigmento retiniano, la estrecha unión formada entre las células epiteliales del pigmento retiniano, y la membrana basal formada en una cara de contacto con el gel de colágeno, y
- 10 (2) degradar el gel de colágeno con colagenasa para desprender la lámina celular compuesta por las células epiteliales de pigmento retiniano, la estrecha unión formada entre las células epiteliales del pigmento retiniano, y la membrana basal formada en una cara de contacto con el gel de colágeno.
2. El método de producción de la lámina celular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células epiteliales de pigmento retiniano son células obtenidas induciendo la diferenciación de células madre o células progenitoras.
- 15 3. El método de producción de la lámina celular de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las células madre son células ES o células iPS.
4. El método de producción de la lámina celular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la concentración de colágeno en el gel de colágeno es 0,1% - 0,5%.
5. El método de producción de la lámina celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además la siguiente etapa (3):
- 20 (3) confirmar la presencia o ausencia de una membrana basal sobre la superficie de contacto entre la lámina celular desprendida y el gel de colágeno.

Fig. 1

253G1 (iPS-RPE) (48 h)

(ng/pocillo)	VEGF	PEDF
Apical	8,61	792
Basal	24,53	429

454GE1 (iPS-RPE) (48 h)

(ng/pocillo)	VEGF	PEDF
Apical	1,65	644
Basal	14,81	473

referencia: Arvydas M,

IOVS.2006;47:3612-3624 (24 h)

(ng/pocillo)	VEGF	PEDF
Apical	8,7	661
Basal	14,7	285