

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 956**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071	(2010.01)
A61L 27/00	(2006.01)
C12N 5/0789	(2010.01)
C12N 5/079	(2010.01)
C12Q 1/02	(2006.01)
G01N 33/15	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
A61L 27/38	(2006.01)
A61K 35/30	(2015.01)
A61L 27/36	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2012 PCT/JP2012/080366**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13077425**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2012 E 12851901 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2784152**

54 Título: **Métodos para producir tejido retiniano y células relacionadas con la retina**

30 Prioridad:

25.11.2011 JP 2011258212
 25.11.2011 JP 2011258211
 25.11.2011 JP 2011258210
 25.11.2011 JP 2011258209
 29.02.2012 JP 2012043082
 29.02.2012 JP 2012043081
 29.02.2012 JP 2012043080
 29.02.2012 JP 2012043083

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2019

73 Titular/es:

SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED
(50.0%)
 27-1, Shinkawa 2-chome Chuo-ku
 Tokyo 104-8260, JP y
RIKEN (50.0%)

72 Inventor/es:

NAKANO, TOKUSHIGE;
ANDO, SATOSHI;
SASAI, YOSHIKI y
EIRAKU, MOTOTSUGU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 956 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

Métodos para producir tejido retiniano y células relacionadas con la retina

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con un método para producir un tejido retiniano y con células relacionadas con la retina, tales como células nerviosas específicas de la capa retiniana, epitelio pigmentario retiniano, etc.

Antecedentes de la técnica

10 Los tejidos del sistema nervioso central, tales como el cerebro y la retina, tienen una baja capacidad regenerativa y los tejidos dañados apenas se recuperan espontáneamente. Por lo tanto, se espera que la medicina regenerativa que trasplanta células diferenciadas a partir de células madre pluripotentes para el tratamiento sea el último cartucho para vencer enfermedades intratables. Además, se considera que las células derivadas de seres humanos obtenidas por diferenciación de células madre pluripotentes son capaces de evaluar con precisión los efectos de sustancias químicas sobre los humanos, y la investigación y el desarrollo hacia la aplicación a la evaluación de la toxicidad de compuestos y el descubrimiento de fármacos están en marcha.

15 La retina es un importante tejido sensorial que recibe luz, la convierte en señales eléctricas y, tras procesamiento de la información, transporta la información a través de los axones al centro visual del cerebro. La retina está en gran medida formada por dos tejidos epiteliales interno y externo superpuestos uno encima de otro. El interno es una retina neural que recibe luz y procesa la información, y contiene más de un tipo de célula, tal como un fotorreceptor. El externo es un epitelio pigmentario retiniano, que es una lámina celular monocapa que soporta la supervivencia y la función de los fotorreceptores.

20 Se conocen informes sobre la producción de células nerviosas específicas de la capa retiniana que constituyen la retina neural (fotorreceptores, células horizontales, células amacrinas, células ganglionares, etc.) a partir de células madre pluripotentes (documento de patente 1). Además, como método para producir un tejido retiniano tridimensional a partir de células madre pluripotentes, se describe que se pueden producir tejido progenitor retiniano, estructura de tipo copa óptica y tejido retiniano neural multicapa *in vitro* formando agregados homogéneos de células madre pluripotentes en un medio libre de suero y sometidos a cultivo de flotación en presencia de una preparación de membranas basales (documento no de patente 1 y documento de patente 2).

25 Por otro lado, también se conoce un informe sobre la producción de epitelios pigmentarios retinianos usando células madre pluripotentes (documento no de patente 2). Sin embargo, no hay ningún informe sobre la producción de epitelios pigmentarios retinianos con alta eficacia.

30 [Lista de documentos]

[Documentos de patente]

Documento de patente 1: WO 2008/087917

Documento de patente 2: WO 2011/055855

[Documentos no de patente]

35 Documento no de patente 1: Mototsugu Eiraku, Nozomu Takata, Hiroki Ishibashi, Masako Kawada, Eriko Sakakura, Satoru Okuda, Kiyotoshi Sekiguchi, Taiji Adachi & Yoshiki Sasai (2011) Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. Nature Volumen: 472, Páginas: 51-56

40 Documento no de patente 2: Maria Idelson, Ruslana Alper, Alexey Obolensky, Etti Ben-Shushan, Itzhak Hemo, Nurit Yachimovich-Cohen, Hanita Khaner, Yoav Smith, Ofer Wisner, Michal Gropp, Malkiel A. Cohen, Sharona Even-Ram, Yael Berman-Zaken, Limor Matzrafi, Gideon Rechavi, Eyal Banin y Benjamin Reubinoff (2009) Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Functional Retinal Pigment Epithelium Cells. Cell Stem Cell 5, 396-408

Compendio de la invención

Problemas que la invención ha de resolver

45 Se ha demandado un método para producir tejido retiniano, estructura de tipo copa óptica y células nerviosas específicas de la capa retiniana y epitelio pigmentario retiniano con mayor eficacia.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han realizado estudios intensivos en vista de tal situación y han llegado a la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención es como sigue.

[1] Un método para producir un tejido retiniano, que comprende las siguientes etapas (1) a (3):

- (1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de receptores de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes;
- (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales, y
- (3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado.

[2] Un método para producir una estructura de tipo copa óptica, que comprende:

- (1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de los receptores de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes;
- (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;
- (3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado, y
- (4) una cuarta etapa de someter el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero o medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización Sonic hedgehog seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Hedgehog, Shh, un receptor de Shh, un agonista del receptor de Shh, Purmorfamina y SAG, y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Wnt, un receptor de Wnt, un agonista del receptor de Wnt, un inhibidor de GSK3 β , 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021 y Kenpaulona.

[3] Un método para producir un epitelio pigmentario retiniano, que comprende:

- (1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de los receptores de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes;
- (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;
- (3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado, y
- (4) una cuarta etapa de someter el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero o medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Wnt, un receptor de Wnt, un agonista del receptor de Wnt, un inhibidor de GSK3 β , 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021 y Kenpaulona, y además en donde dichos medio libre de suero y medio que contiene suero están libres de una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización Sonic hedgehog seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Hedgehog, Shh, un receptor de Shh, un agonista del receptor de Shh, Purmorfamina y SAG.

[4] El método del antes mencionado [3], en donde dicho medio libre de suero o medio que contiene suero que contiene una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt comprende además una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de la Activina seleccionada de una proteína perteneciente a la familia de la Activina, Activina A, Activina B, Activina C y Activina AB, un receptor de Activina y un agonista del receptor de Activina.

[5] El método de cualquiera de los antes mencionados [1] a [4], en donde dichas células madre pluripotentes son células madre pluripotentes de primate.

[6] El método de cualquiera de los antes mencionados [1] a [4], en donde dichas células madre pluripotentes son

células madre pluripotentes humanas.

[7] El método de cualquiera de los antes mencionados [1] a [6], en donde dicha preparación de membranas basales es al menos una molécula de la matriz extracelular seleccionada del grupo consistente en laminina, colágeno de tipo IV, sulfato de heparano proteoglicano y entactina.

5 [8] El método de cualquiera de los antes mencionados [1] a [7], en donde se realizan de dicha primera etapa a la tercera etapa en presencia de reemplazo de suero Knockout.

[9] Un método para producir una célula neural específica de la capa retiniana, que comprende:

10 (1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes de primate a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de los receptores de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes de primate;

15 (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;

(3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado, y

20 (4) poniendo en contacto una célula progenitora retiniana contenida en un tejido retiniano obtenido en la tercera etapa con una sustancia que inhibe la ruta de señalización Notch seleccionada de un anticuerpo Notch, un antagonista de los receptores de Notch, un inhibidor de ADAM y un inhibidor de la gamma secretasa.

[10] El método del antes mencionado [9], en donde dicha sustancia que inhibe la ruta de señalización de Notch es éster t-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina.

[11] El método del antes mencionado [9] o [10], en donde dicho primate es humano.

25 [12] El método de cualquiera de los antes mencionados [9] a [11], en donde la célula neural específica de la capa retiniana es un fotorreceptor.

[13] El método de cualquiera de los antes mencionados [9] a [11], en donde la célula neural específica de la capa retiniana es una célula ganglionar.

[14] Un método para producir una célula neural específica de la capa retiniana, que comprende:

30 (1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes de primate a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de los receptores de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes de primate;

35 (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;

(3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado;

40 (4) una cuarta etapa de someter el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero o medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Sonic hedgehog seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Hedgehog, Shh, un receptor de Shh, un agonista del receptor de Shh, Purmorfamina y SAG, y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Wnt, un receptor de Wnt, un agonista del receptor de Wnt, un inhibidor de GSK3 β , 6-bromindirrubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021 y Kenpaulona, para formar una estructura de tipo
45 copa óptica, y

(5) una etapa de someter la estructura de tipo copa óptica formada en la cuarta etapa a cultivo de flotación.

Efecto de la Invención

50 Según la presente invención, se puede producir un tejido retiniano, una estructura de tipo copa óptica, una célula nerviosa específica de la capa retiniana o un epitelio pigmentario retiniano con alta eficacia. Por consiguiente, con vistas a una provisión eficaz de un tejido retiniano, una estructura de tipo copa óptica, una célula nerviosa específica

de la capa retiniana o un epitelio pigmentario retiniano con fines de evaluación de la toxicidad o de la eficacia como fármaco de una sustancia química, etc., un tratamiento de trasplante, etc., la presente invención es altamente útil.

Breve descripción de los dibujos

5 La Fig. 1 es una vista que muestra una imagen de campo brillante (A) y una imagen de fluorescencia (B) de agregados derivados de células madre pluripotentes humanas, que se produjeron añadiendo Matrigel (al que de aquí en adelante a veces se hará referencia como Matrigel) solo y sin añadir una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, el día 25 tras el inicio del cultivo de flotación, una imagen de campo brillante (C) y una imagen de fluorescencia (D) de agregados derivados de células madre pluripotentes humanas, que se produjeron añadiendo una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Nodal y Matrigel, el día 25 tras el inicio del cultivo de flotación, y una imagen de campo brillante (E) y una imagen de fluorescencia (F) de agregados derivados de células madre pluripotentes humanas, que se produjeron añadiendo una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt y Matrigel, el día 25 tras el inicio del cultivo de flotación.

15 La Fig. 2 es una vista que muestra una imagen de campo brillante (A) y una imagen de fluorescencia (B) de agregados el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación, que se produjeron por cultivo de flotación de células madre pluripotentes humanas añadiendo una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, cultivo de flotación de los mismos en presencia de Matrigel y luego cultivo de flotación de los mismos en ausencia de suero fetal de ternera, una imagen de campo brillante (C) y una imagen de fluorescencia (D) de agregados el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación, que se produjeron por cultivo de flotación de células madre pluripotentes humanas añadiendo una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, cultivo de flotación de los mismos en presencia de Matrigel y luego cultivo de flotación de los mismos en presencia de suero fetal de ternera, y una imagen de campo brillante (E) y una imagen de fluorescencia (F) de agregados el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación, que se produjeron por cultivo de flotación de células madre pluripotentes humanas añadiendo una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, cultivo de flotación de los mismos en presencia de Matrigel y luego cultivo de flotación de los mismos en presencia de suero fetal de ternera y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Sonic hedgehog (al que de aquí en adelante a veces se hará referencia como "Shh").

25 La Fig. 3 muestra histogramas FACS (A) de células que expresan GFP que constituyen agregados el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación, que se produjeron por cultivo de flotación de células madre pluripotentes humanas añadiendo una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, cultivo de flotación de los mismos en presencia de Matrigel y luego cultivo de flotación de los mismos en ausencia de suero fetal de ternera, histogramas FACS (B) de células que expresan GFP que constituyen agregados el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación, que se produjeron por cultivo de flotación de células madre pluripotentes humanas añadiendo una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, cultivo de flotación de los mismos en presencia de Matrigel y luego cultivo de flotación de los mismos en presencia de suero fetal de ternera, histogramas FACS (C) de células que expresan GFP que constituyen agregados el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación, que se produjeron por cultivo de flotación de células madre pluripotentes humanas añadiendo una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, cultivo de flotación de los mismos en presencia de Matrigel y luego cultivo de flotación de los mismos en presencia de suero fetal de ternera y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Shh, y un gráfico (D) que muestra la proporción de células fuertemente positivas a GFP, que son células progenitoras retinianas.

40 La Fig. 4 es una vista que muestra los resultados de inmunotinción de tejidos retinianos (A, B, C) el día 60 tras el inicio del cultivo de flotación y tejidos retinianos (D, E, F, G, H, I) el día 126 tras el inicio del cultivo de flotación, que se produjeron por el método de producción de tejido retiniano de la presente invención.

45 La Fig. 5 es una vista que muestra imágenes de un solapamiento de una imagen de campo brillante y una imagen de fluorescencia de la misma parte de un agregado el día 14 (A), el día 15 (B), el día 16 (C) y el día 17 (D) tras el inicio del cultivo de flotación mediante el método de producción de una estructura de tipo copa óptica de la presente invención.

50 La Fig. 6 es una vista que muestra una imagen de campo brillante (A) y una imagen de fluorescencia (B) por observación microscópica, y una imagen de observación al microscopio de dos fotones (C) y una imagen de reconstrucción en 3D (D) obtenida a partir de una imagen de observación al microscopio de dos fotones, de un agregado cultivado en flotación los días 24 a 26 tras el inicio del cultivo de flotación por el método de producción de una estructura de tipo copa óptica de la presente invención.

La Fig. 7 es una vista que muestra los resultados de inmunotinción de una sección congelada de una estructura de tipo copa óptica producida por cultivo de flotación mediante el método de producción de una estructura de tipo copa óptica de la presente invención, con un anticuerpo anti-Mitf y un anticuerpo anti-Chx10.

55 La Fig. 8 es una vista que muestra un microscopio de fluorescencia (A) en el caso de cultivo de flotación hasta el día 41 tras el inicio del cultivo de flotación, el inicio del cultivo de flotación en condiciones de no adición de DAPT 10 µM, un microscopio de fluorescencia (B) en el caso de cultivo de flotación hasta el día 41 tras el inicio del cultivo de flotación en condiciones de adición de DAPT, fotografía de una sección congelada inmunoteñida con un anticuerpo anti-Recoverina (C) o con un anticuerpo anti-Brn3 (E) en el caso de cultivo de flotación hasta el día 43 tras el inicio del

cultivo de flotación en condiciones de no adición de DAPT 10 μ M, y fotografía de una sección congelada inmunoteñida con un anticuerpo anti-Recoverina (D) o con un anticuerpo anti-Brn3 (F) en el caso de cultivo de flotación hasta el día 43 de inducción de la diferenciación en condiciones de adición de DAPT, en cada caso usando un tejido retiniano derivado de células ES humanas con inserción Crx::GFP el día 29 tras el inicio del cultivo de flotación.

5 La Fig. 9 es una vista que muestra un microscopio de fluorescencia (A) en el caso de cultivo de flotación, hasta el día 49 tras el inicio del cultivo de flotación en condiciones de no adición de DAPT 10 μ M, un microscopio de fluorescencia (B) en el caso de cultivo de flotación hasta el día 49 tras el inicio del cultivo de flotación en condiciones de adición de DAPT, fotografía de una sección congelada inmunoteñida con un anticuerpo anti-Recoverina (C) o con un anticuerpo anti-Brn3 (E) en el caso de cultivo de flotación hasta el día 49 tras el inicio del cultivo de flotación en condiciones de
10 no adición de DAPT 10 μ M, y fotografía de una sección congelada inmunoteñida con un anticuerpo anti-Recoverina (D) o con un anticuerpo anti-Brn3 (F) en el caso de cultivo de flotación hasta el día 49 tras el inicio del cultivo de flotación en condiciones de adición de DAPT, de un tejido retiniano derivado de células ES humanas knock-in Crx::GFP el día 38 tras el inicio del cultivo de flotación después de congelar-descongelar el tejido retiniano el día 33 tras el inicio del cultivo de flotación.

15 La Fig. 10 es una vista que muestra un campo brillante de un agregado producido por cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt para formar un agregado, cultivo de flotación del agregado formado en un medio libre de suero en presencia de una preparación de membranas basales, cultivo del agregado cultivado en un medio que contiene un suero y cultivo del agregado cultivado en un medio que contiene una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización Wnt.

20 La Fig. 11 es una vista que muestra un campo brillante de un agregado producido por cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt para formar un agregado, cultivo de flotación del agregado formado en un medio libre de suero en presencia de una preparación de membranas basales, cultivo del agregado cultivado en un medio que contiene un suero y cultivo del agregado cultivado en un medio que contiene una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt_ y una sustancia que actúa sobre la ruta de la
25 Activina A.

Modo(s) de realización de la invención

A continuación, se explica(n) con detalle el(los) modo(s) de realización de la presente invención.

En la presente invención, el "transformante" significa la totalidad o una parte de la materia viva, tal como una célula, producida por transformación. Como ejemplos del transformante, se incluyen células procarióticas, levaduras, células
30 animales, células de plantas, células de insectos, etc. Dependiendo del objetivo, a veces también se llama al transformante célula transformada, tejido transformado, huésped transformado, etc. La célula usada en la presente invención puede también ser un transformante.

Como ejemplos de la célula procariótica usada para la técnica de ingeniería genética en la presente invención, se incluyen células procarióticas pertenecientes al género Escherichia, al género Serratia, al género Bacillus, al género Brevibacterium, al género Corynebacterium, al género Microbacterium, al género Pseudomonas, etc., tales como
35 Escherichia XL1-Blue, Escherichia XL2-Blue y Escherichia DH1. Se describen específicamente estas células en, por ejemplo, "Molecular Cloning (3ª edición)", de Sambrook, J y Russell, D.W., Apéndice 3 (Volumen 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor USA 2001).

El "vector" en la presente invención significa un vector capaz de transferir una secuencia polinucleotídica deseada a una célula objeto. Como ejemplos de dicho vector, se incluyen los que son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula huésped, tal como una célula procariótica, una levadura, una célula animal, una célula de planta, una célula de insecto, un individuo animal y un individuo vegetal, o capaces de incorporarse a un cromosoma, y que contienen un promotor en una posición adecuada para la transcripción del polinucleótido.

De tales vectores, a veces se indica un vector adecuado para clonación como un "vector de clonación". Dicho vector de clonación generalmente tiene múltiples sitios de clonación que contienen una pluralidad de sitios de enzimas de restricción. Actualmente, existen muchos vectores utilizables para clonación génica en el campo pertinente, y los venden distribuidores con nombres diferentes, ya que son ligeramente diferentes (por ej., tipo y secuencia de enzimas de restricción en sitios de multiclonación). Por ejemplo, se describen algunos representativos (también se describen distribuidores) en "Molecular Cloning (3ª edición)", de Sambrook, J y Russell, D.W., Apéndice 3 (Volumen 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor USA, 2001), y los expertos en la técnica los pueden usar como
50 consideren apropiado según el objeto.

El "vector" en la presente invención también incluye "vector de expresión", "vector indicador" y "vector recombinante". El "vector de expresión" significa una secuencia de ácido nucleico en donde se unen diversos elementos reguladores además de un gen estructural y un promotor que regula su expresión de tal modo que pueden ser operables en la
55 célula huésped. Como ejemplos del "elemento regulador", se incluyen finalizador, marcador de selección, tal como un gen de resistencia a fármacos, y uno que contiene un potenciador. Es bien conocido para los expertos en la técnica que el tipo de vector de expresión de la materia viva (por ej., animal) y el tipo de elemento regulador que se ha de usar

pueden variar dependiendo de la célula huésped.

Como ejemplos del "vector recombinante" en la presente invención, se incluyen (a) vector lambda FIX (vector fago) para cribado de genoteca, (b) vector lambda ZAP (vector fago) para cribado de ADNc, y (c) vector pBluescript II SK+/- , pGEM y pCR2.1 (vector plasmídico) para clonación de ADN genómico. Como ejemplos del "vector de expresión", se incluyen vector pSV2/neo, vector pcDNA, vector pUC18, vector pUC19, vector pRc/RSV, vector pLenti6/V5-Dest, vector pAd/CMV/V5-DEST, vector pDON-AI-2/neo y vector pMEI-5/neo (vector plasmídico), etc. Como ejemplos del "vector indicador", se incluyen vector pGL2, vector pGL3, vector pGL4.10, vector pGL4.11, vector pGL4.12, vector pGL4.70, vector pGL4.71, vector pGL4.72, vector pSLG, vector pSLO, vector pSLR, vector pEGFP, vector pAcGFP, vector pDsRed, etc. Se pueden utilizar estos vectores según sea apropiado mediante referencia a la antes mencionada referencia Molecular Cloning.

Como técnica para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula en la presente invención, por ejemplo, se pueden mencionar transformación, transducción, transfección, etc. Como tal técnica de introducción, se pueden mencionar específicamente, por ejemplo, los métodos descritos en Ausubel F. A. *et al.* ed. (1988), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, NY; Sambrook J. *et al.* (1987), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. y 3ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; publicación extra, Experimental Medicine "transgene & expression analysis experiment method" YODOSHA CO., LTD., 1997, etc. Como técnica para confirmar la introducción intracelular de un gen, por ejemplo, se pueden mencionar el análisis de transferencia Northern, el análisis de transferencia Western y otras técnicas convencionales bien conocidas, etc.

En la presente invención, la "célula madre" se refiere a una célula que mantiene la misma capacidad de diferenciación incluso tras la división celular, y un tejido de la misma puede regenerarse cuando se lesiona el tejido. Aquí, la célula madre puede ser una célula madre embrionaria (célula ES) o una célula madre de tejido (también llamada célula madre tisular, célula madre específica de tejido o célula madre somática), o una célula madre pluripotente artificial (célula iPS: célula madre pluripotente inducida), pero no se limita a éstas. Como se aprecia por el hecho de que la célula de tejido derivada de célula madre antes mencionada puede regenerar un tejido, se sabe que la célula madre puede diferenciarse en una célula normal próxima a una en un organismo vivo.

Se pueden adquirir células madre de organizaciones dadas, o también se puede comprar un producto comercializado. Se puede adquirir la célula EB5, que es una célula madre embrionaria de ratón, de RIKEN, y se puede adquirir la línea celular D3 de ATCC.

Se pueden mantener las células madre cultivando según un método conocido *per se*. Por ejemplo, se pueden mantener las células madre mediante cultivo libre de células alimentador suplementado con suero fetal de ternera (FCS), Reemplazo de Suero Knockout (KSR) y LIF.

En la presente invención, la "célula madre pluripotente" se refiere a una célula madre que puede cultivarse *in vitro* y que tiene capacidad de diferenciarse en cualquier célula (tejido derivado de triploblastos (ectodermo, mesodermo, endodermo)) que constituya un organismo vivo, a excepción de la placenta (pluripotencia de diferenciación), incluyendo una célula madre embrionaria (célula ES). También incluye una célula que tiene pluripotencia de diferenciación artificial similar a la de las células madre embrionarias, después de introducir varios tipos de genes en una célula somática (también llamada célula madre pluripotente artificial). Se puede producir la célula madre pluripotente mediante un método conocido *per se*. Como ejemplos del método de producción, se incluyen los métodos descritos en Cell 131(5) pp. 861-872, Cell 126(4) pp. 663-676, etc.

En la presente invención, la "célula madre embrionaria (célula ES)" se refiere a una célula madre que tiene una capacidad de autorreplicación y multipotencia (es decir, "pluripotencia"), que es una célula madre pluripotente. Se estableció por primera vez la célula madre embrionaria en 1981, y se ha aplicado también a la generación de ratones knockout desde 1989. En 1998, se estableció una célula madre embrionaria humana, que también se está utilizando para medicina regenerativa.

En la presente invención, la "célula madre pluripotente artificial" se refiere a una célula inducida para tener multipotencia reprogramando directamente una célula diferenciada, tal como un fibroblasto, etc. mediante la expresión de varios tipos de genes, tales como Oct3/4, Sox2, Klf4 y Myc, que establecieron Yamanaka *et al.* en células de ratón en 2006 (Takahashi K, Yamanaka S. Cell. 2006, 126(4), pp. 663-676). En 2007, se estableció también en fibroblastos humanos, y tiene una multipotencia similar a la de las células madre embrionarias (Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Cell. 2007, 131(5), pp. 861-872.; Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA., Science. 2007, 318(5858), pp. 1917-1920.; Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Nat Biotechnol., 2008, 26(1), pp. 101-106).

Se puede producir una célula madre pluripotente genéticamente modificada, por ejemplo, usando una técnica de recombinación homóloga. Como ejemplos del gen sobre el cromosoma, que se ha de modificar para la producción de una célula madre pluripotente modificada, se incluyen un gen de antígeno de histocompatibilidad, un gen relacionado con una enfermedad debida a un trastorno de células del sistema nervioso, etc. Se puede modificar un gen diana sobre el cromosoma mediante 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 at Oxford University Press (1993); Bio Manual series 8, gene targeting, Production of mutant mouse by using ES cells, YODOSHA CO., LTD. (1995), etc.

5 Para ser específicos, por ejemplo, se aísla el gen genómico de un gen diana que se ha de modificar (por ej., gen de antígeno de histocompatibilidad, gen relacionado con enfermedad, etc.), y se produce un vector diana usado para recombinación homóloga del gen diana usando el gen genómico aislado. Se introduce el vector diana producido en células madre, y se seleccionan las células que muestran recombinación homóloga entre el gen diana y el vector diana, mediante lo cual se pueden producir células madre que tienen gen modificado sobre el cromosoma.

10 Como método para aislar el gen genómico del gen diana, se pueden mencionar métodos 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), etc. Además, se puede aislar el gen genómico del gen diana usando un sistema de cribado de biblioteca de ADN genómico (fabricado por Genome Systems), Kits Universal GenomeWalker (fabricados por CLONTECH), etc.

15 Se puede producir un vector diana usado para recombinación homóloga del gen diana, y se puede seleccionar eficazmente un recombinante homólogo según los métodos descritos en Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Bio Manual series 8, gene targeting, Production of mutant mouse by using ES cells, YODOSHA CO., LTD. (1995), etc. El vector diana puede ser de tipo reemplazo o de tipo inserción, y el método de selección puede ser selección positiva, selección de promotor, selección negativa, selección poliA, etc.

20 Como método para seleccionar un recombinante homólogo objeto de las líneas celulares seleccionadas, se pueden mencionar el método de hibridación Southern, el método de PCR, etc. para ADN genómico.

En la presente invención, el "tejido" se refiere a una estructura de una población celular, que tiene una conformación en la cual más de un tipo de célula diferentes en forma y propiedad están estéricamente configurados en un patrón dado.

25 En la presente invención, el "tejido retiniano" significa un tejido retiniano en donde al menos dos o más tipos de células, tales como fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células de los ganglios retinianos, sus células precursoras o sus células progenitoras retinianas, que constituyen las respectivas capas retinianas en la retina viva, se disponen estéricamente en capas. Con respecto a cada célula, se puede confirmar qué célula constituye qué capa retiniana mediante un método conocido, por ejemplo, la expresión de un marcador celular.

30 Como ejemplos del marcador de células de la retina, se incluyen, aunque sin limitación, Rax (célula progenitora de la retina), PAX6 (célula progenitora), nestina (expresada en las células progenitoras de las neuronas del hipotálamo, pero no expresada en las células progenitoras de la retina), Sox1 (expresado en el neuroepitelio del hipotálamo, pero no expresado en la retina), Crx (célula precursora de los fotorreceptores), etc. En particular, como ejemplos del marcador de la neurona específica de la capa retiniana antes mencionada, se incluyen, aunque sin limitación, Chx10 (célula bipolar), L7 (célula bipolar), Tuj1 (célula ganglionar), Brn3 (célula ganglionar), Calretinina (célula amacrina), Calbindina (célula horizontal), Rodopsina (fotorreceptor), Recoverina (fotorreceptor), RPE65 (epitelio pigmentario), Mitf (epitelio pigmentario), Nrl (bastón), Rxr-gamma (cono), etc.

35 En la presente invención, la "estructura de tipo copa óptica" se refiere a una estructura que tiene una forma similar a la de la copa óptica en el proceso de desarrollo del embrión. En el proceso de desarrollo del embrión, el primordio de la retina se desarrolla desde la cara lateral del diencéfalo, y se forma como una bolsa que sobresale del diencéfalo. La estructura epitelial de tipo bolsa se llama vesícula óptica. La parte más externa de la vesícula óptica (que será la retina neural en el futuro) se invagina gradualmente hacia el interior de la vesícula óptica, y forma una copa óptica, que es un tejido de tipo copa compuesto por dos capas interna y externa de epitelio. La copa óptica crece a continuación y forma la retina con un tejido retiniano. Los expertos en la técnica pueden confirmar si es una estructura de tipo copa óptica por observación con un microscopio, una lente de aumento, etc.

45 La estructura de tipo copa óptica que se ha de producir en la presente invención muestra no sólo una protrusión de tipo copa óptica morfológicamente, sino también una expresión altamente frecuente de Rax, que es un marcador de las células progenitoras retinianas, en las células que constituyen la estructura de tipo copa óptica. Además, la capa externa de la estructura de tipo copa óptica también muestra una capa de epitelios pigmentarios retinianos que expresan Mitf, y la capa interna muestra células que constituyen tejidos retinianos, tales como células progenitoras retinianas que expresan Chx10. Dicha estructura de tipo copa óptica se asemeja mucho a la estructura de tejidos de copa óptica en el desarrollo de un organismo vivo.

50 La "capa retiniana" en la presente invención significa cada capa que constituye la retina. Como ejemplos específicos de la misma, se incluyen la capa epitelial pigmentaria retiniana, la capa de fotorreceptores, la membrana limitante externa, la capa nuclear externa, la capa plexiforme externa, la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna, la capa de células ganglionares, la capa de fibras nerviosas y la membrana limitante interna.

55 La "célula neural específica de la capa retiniana" en la presente invención significa una célula neural que constituye una capa retiniana y que es específica de la capa retiniana.

La "célula progenitora retiniana" en la presente invención se refiere a una célula progenitora que puede diferenciarse en cualquier célula retiniana madura de un fotorreceptor, una célula horizontal, una célula bipolar, una célula amacrina y una célula de ganglio retiniano.

5 Por otro lado, el precursor de los fotorreceptores, la célula precursora horizontal, la célula precursora bipolar, la célula precursora amacrina y la célula precursora de ganglio retiniano son células precursoras determinadas para diferenciarse en un fotorreceptor, una célula horizontal, una célula bipolar, una célula amacrina y una célula de ganglio retiniano, respectivamente.

10 El "epitelio pigmentario retiniano" en la presente invención significa una célula epitelial presente sobre el lado externo del tejido retiniano neural en la retina de un organismo vivo. Los expertos en la técnica pueden confirmar fácilmente si es o no un epitelio pigmentario retiniano por, por ejemplo, expresión de un marcador celular (RPE65 (epitelio pigmentario), Mitf (epitelio pigmentario), etc.), la presencia de gránulos de melanina, la forma celular poligonal característica, etc.

15 Se puede preparar el medio para uso en la presente invención a partir de un medio utilizado para cultivo de células animales como medio basal. Como ejemplos del medio basal, se incluyen medio BME, medio BGJb, medio CMRL1066, medio Glasgow MEM, medio MEM Zinc Option Mejorado, medio IMDM, medio Medium199, medio Eagle MEM, medio α MEM, medio DMEM, medio Ham, medio RPMI1640, medio de Fischer y un medio mixto de los mismos, y el medio no está particularmente limitado, siempre que se pueda usar para cultivar células animales.

20 El "medio libre de suero" en la presente invención significa un medio libre de suero no ajustado o no purificado. Se considera un medio que contiene componentes derivados de la sangre y componentes derivados de tejidos animales purificados (por ej., factor de crecimiento) un medio libre de suero a menos que contenga suero no ajustado o no purificado.

25 El medio no está particularmente limitado en la medida en que sea como se ha definido anteriormente. Sin embargo, para evitar una preparación complicada, se puede usar un medio libre de suero (GMEM o DMEM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, Mezcla de aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM) al que se ha añadido una cantidad apropiada (por ej., 1-20%) de KSR comercial como medio libre de suero.

30 Además, el medio libre de suero puede contener un reemplazo de suero. El reemplazo de suero puede contener apropiadamente, por ejemplo, albúmina, transferrina, ácido graso, precursor de colágeno, elementos traza, 2-mercaptoetanol o 3' tioglicerol, un equivalente de los mismos, etc. Se puede preparar dicho reemplazo de suero mediante, por ejemplo, el método descrito en WO98/30679. Además, para realizar el método de la presente invención más convenientemente, el reemplazo de suero puede ser un producto comercial. Como ejemplos de dicho reemplazo de suero comercial, se incluyen Chemically-defined Lipid concentrado (fabricado por Gibco) y Glutamax (fabricado por Gibco).

35 El medio libre de suero para uso en cultivo de flotación puede contener ácido graso o lípido, aminoácido (por ej., aminoácido no esencial), vitamina, factor de crecimiento, citoquina, antioxidante, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agente tampón, sales inorgánicas, etc.

40 El "medio que contiene suero" en la presente invención significa un medio que contiene suero no ajustado o no purificado. El medio no está particularmente limitado, siempre que sea como se ha definido anteriormente. Además, el medio que contiene suero puede contener ácido graso o lípido, aminoácido (por ej., aminoácido no esencial), vitamina, factor de crecimiento, citoquina, antioxidante, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agente tampón, sales inorgánicas, etc.

El "cultivo en flotación" en la presente invención significa cultivar en condiciones que prohíben la adhesión de células o masas celulares a un material de recipiente de cultivo celular, etc.

45 El recipiente de cultivo celular para uso en cultivo de flotación no está particularmente limitado siempre que permita el "cultivo de flotación", y los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente el mismo. Como ejemplos de dicho recipiente de cultivo celular, se incluyen matraz, matraz de cultivo de tejidos, placa, placa de Petri, placa de cultivo de tejidos, multiplaca, microplaca, placa de micropocillos, microporo, multiplaca, placa de múltiples pocillos, portaobjetos de cámara, platillo, tubo, bandeja, bolsa de cultivo y botella rodante. Dado que estos recipientes de cultivo celular se usan para cultivo en flotación, son preferiblemente no adhesivos para células. Como recipiente no adhesivo para células, se puede usar uno que tenga su superficie no artificialmente tratada para mejorar la adhesividad celular (por ej., tratamiento de revestimiento con matriz extracelular, etc.), etc.

Los "primates" en la presente invención significa mamíferos pertenecientes a los primates. Como ejemplos de los primates, se incluyen Strepsirrhini, tales como lemur, loris y Tsubai, y Haplorhini, tales como mono, simio antropoide y humano.

<Método de producción de tejido retiniano>

55 El primer aspecto de la presente invención es un método para producir un tejido retiniano, que comprende las

siguientes etapas (1) a (3):

(1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt para formar un agregado de células madre pluripotentes;

5 (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales, y

(3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero.

(1) Primera etapa

10 Se explica la primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt para formar un agregado de células madre pluripotentes.

15 La sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt no está particularmente limitada, siempre que pueda suprimir la transducción de señal mediada por Wnt. Como ejemplos de la sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, se incluyen Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de los receptores de Wnt, receptor de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e), IWP-2, etc.

20 La concentración de la sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt para uso en la presente invención sólo necesita ser una concentración a la cual se forman agregados de células madre pluripotentes. Por ejemplo, se añade una sustancia común inhibidora de la ruta de señalización de Wnt, tal como IWR1e, a una concentración de aproximadamente 0,1 μ M a 100 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a 10 μ M, más preferiblemente de aproximadamente 3 μ M.

25 Se puede añadir una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt a medio libre de suero antes del inicio del cultivo de flotación, o añadir a un medio libre de suero en el plazo de varios días desde el inicio del cultivo de flotación (por ej., en el plazo de 5 días). Preferiblemente, se añade una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt a un medio libre de suero en el plazo de 5 días, más preferiblemente en el plazo de 3 días, tras el inicio del cultivo de flotación, lo más preferiblemente simultáneamente al inicio del cultivo de flotación. Además, se realiza el cultivo de flotación hasta el día 18, más preferiblemente el día 12, desde el inicio del cultivo de flotación con la adición de una
30 sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt.

Se pueden determinar apropiadamente las condiciones de cultivo, tales como la temperatura de cultivo y la concentración de CO₂ en la primera etapa. Aunque la temperatura de cultivo no está particularmente limitada, es, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 40°C, preferiblemente de aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente un 1 a un 10%, preferiblemente de aproximadamente un 5%.

35 El "agregado" en la presente invención se refiere a una masa de las células dispersas en el medio pero reunidas para formar la misma. El "agregado" en la presente invención incluye un agregado formado por las células dispersas al inicio del cultivo de flotación y un agregado ya formado al inicio del cultivo de flotación.

40 Cuando las células se agregan para formar agregados celulares y se someten los agregados a cultivo de flotación, "formar agregados" significa "agregar rápidamente un número dado de células madres dispersas" para formar agregados celulares cualitativamente homogéneos.

Como ejemplos de la operación experimental para formar un agregado, se incluyen un método que conlleva mantener las células en un pequeño espacio usando una placa con pequeños pocillos (placa de 96 pocillos), micropore, etc., un método que conlleva agregar células por centrifugación durante un tiempo breve usando un pequeño tubo de centrifugación, etc.

45 Los expertos en la técnica pueden determinar la concentración de las células madre pluripotentes en la primera etapa según sea apropiado para formar agregados de células madre pluripotentes más uniforme y eficazmente. La concentración de las células madre pluripotentes cuando forman agregados no está particularmente limitada, siempre que permita la formación de agregados uniformes de células madre. Por ejemplo, cuando se someten células ES humanas a cultivo de flotación usando una placa de micropocillos de 96 pocillos, se añade un líquido preparado a una
50 concentración de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 5×10^4 células, preferiblemente de aproximadamente 3×10^3 a aproximadamente 3×10^4 células, más preferiblemente de aproximadamente 5×10^3 a aproximadamente 2×10^4 células, lo más preferiblemente de aproximadamente 9×10^3 células, por pocillo, y se deja la placa en reposo para formar agregados.

Se puede determinar el tiempo de cultivo de flotación necesario para formar agregados según sea apropiado según la

célula madre pluripotente que se ha de usar, siempre que las células puedan agregarse rápidamente. Para formar agregados uniformes, es deseablemente lo más corto posible. Por ejemplo, en el caso de células ES humanas, se forman agregados deseablemente preferiblemente en 24 h, más preferiblemente en 12 h. Los expertos en la técnica pueden ajustar apropiadamente el tiempo para la formación de agregados controlando las herramientas para agregar las células, las condiciones de centrifugación, etc.

Los expertos en la técnica pueden determinar si se han formado agregados de células madre pluripotentes, en base al tamaño y al número de células de los agregados, a la morfología macroscópica, a la morfología microscópica por análisis de tinción tisular y uniformidad de los mismos, a la expresión de marcadores de diferenciación y no diferenciación y uniformidad de los mismos, al control de la expresión de marcadores de diferenciación y sincronización de los mismos, a la reproducibilidad de la eficacia de diferenciación entre agregados, etc.

(2) Segunda etapa

Se explica la segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales.

La "preparación de membranas basales" se refiere a una que contiene componentes constitutivos de membranas basales que tienen una función de control de la forma, diferenciación, crecimiento, motilidad, expresión de función, etc. de la célula, que son similares a los de la célula epitelial, cuando se plaquean sobre ella y se cultivan células de interés capaces de formar una membrana basal. Aquí, el "componente constitutivo de la membrana basal" se refiere a una molécula de la matriz extracelular en forma de una delgada membrana presente entre la capa de células epiteliales y la capa de células intersticiales, etc. en tejidos animales. Se puede producir una preparación de membranas basales, por ejemplo, eliminando las células capaces de formar una membrana basal, que se adhieren sobre un soporte mediante una membrana basal, con una solución capaz de disolver el lípido de las células, una solución alcalina, etc. Como ejemplos de preparación preferible de membranas basales, se incluyen productos comercializados como componentes de membranas basales (por ej., Matrigel (al que de aquí en adelante a veces se hará referencia como Matrigel)) y moléculas de la matriz extracelular conocidas como componentes de las membranas basales (por ej., laminina, colágeno de tipo IV, sulfato de heparano proteoglicano, entactina, etc.).

Matrigel es un producto preparado a partir de una membrana basal derivada del sarcoma murino Engelbreth Holm Swarn (EHS). Los principales componentes de Matrigel son el colágeno de tipo IV, la laminina, el sulfato de heparano proteoglicano y la entactina. Además de éstos, contiene TGF- β , factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), activador tisular del plasminógeno y un factor de crecimiento producido de manera natural por el tumor EHS. El "producto reducido en factor de crecimiento" de Matrigel tiene una menor concentración de factor de crecimiento que el Matrigel común, y su concentración estándar es <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, se usa preferiblemente "producto reducido en factor de crecimiento".

Aunque la concentración de la preparación de membranas basales que se ha de añadir a un medio libre de suero para el cultivo de flotación en la segunda etapa no está particularmente limitada, siempre que la estructura epitelial del tejido neural (por ejemplo, tejido retiniano) se mantenga de manera estable, por ejemplo, es preferiblemente de 1/20 a 1/200 en volumen, más preferiblemente de aproximadamente 1/100 en volumen, del medio de cultivo cuando se usa Matrigel. Aunque se pueda haber añadido ya la preparación de membranas basales al medio cuando se inicia el cultivo de células madre, se añade preferiblemente al medio libre de suero en el plazo de 5 días, más preferiblemente en el plazo de 2 días, tras el inicio del cultivo de flotación.

Como medio libre de suero para uso en la segunda etapa, se puede usar directamente el medio libre de suero usado en la primera etapa, o se puede reemplazar con un medio libre de suero fresco.

Cuando se usa directamente el medio libre de suero utilizado en la primera etapa para esta etapa, se puede añadir la "preparación de membranas basales" al medio.

El medio libre de suero usado para el cultivo de flotación en la primera etapa y la segunda etapa no está particularmente limitado, siempre que sea como se ha definido anteriormente. Sin embargo, para evitar una preparación complicada, se usa preferiblemente un medio libre de suero (GMEM o DMEM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, Mezcla de aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM) al que se ha añadido una cantidad apropiada de KSR (Knockout Serum Replacement) comercial como medio libre de suero. La cantidad de KSR que se ha de añadir al medio libre de suero no está particularmente limitada y, por ejemplo, es generalmente del 1 al 20%, preferiblemente del 2 al 20%, en el caso de las células ES humanas.

Se pueden determinar apropiadamente las condiciones de cultivo, tales como la temperatura de cultivo y la concentración de CO₂, en la segunda etapa. Aunque la temperatura de cultivo no está particularmente limitada, es, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 40°C, preferiblemente de aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 al 10%, preferiblemente de aproximadamente el 5%.

(3) Tercera etapa

Se explica la tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero.

5 Como medio que contiene suero para uso en la tercera etapa, se puede usar el medio libre de suero utilizado en el cultivo de la segunda etapa al que se añade directamente un suero, o uno reemplazado por un medio que contiene suero fresco.

Como suero para añadir a un medio en la tercera etapa, por ejemplo, se puede usar suero de mamífero, tal como suero bovino, suero de ternera, suero fetal de ternera, suero de caballo, suero de potro, suero fetal de caballo, suero de conejo, suero de lebrato, suero fetal de conejo y suero humano, etc.

10 Se añade el suero el o después del día 7, más preferiblemente el o después del día 9, lo más preferiblemente el día 12, tras el inicio del cultivo de flotación. La concentración del suero que se ha de añadir es de aproximadamente el 1 al 30%, preferiblemente de aproximadamente el 3 al 20%, más preferiblemente de aproximadamente el 10%.

15 El medio que contiene suero para uso en la tercera etapa no está particularmente limitado, siempre que sea como se ha definido anteriormente. Se usa preferiblemente el medio libre de suero antes mencionado (GMEM o DMEM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, Mezcla de aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM) al que se añade un suero.

Como tal medio que contiene suero, también se puede usar uno al que se añade una cantidad apropiada de KSR (Knockout Serum Replacement) comercial.

20 En la tercera etapa, se puede aumentar la eficacia de producción de tejido retiniano añadiendo una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh además del suero.

La sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh no está particularmente limitada, siempre que pueda aumentar la transducción de señal mediada por Shh. Como ejemplos de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh, se incluyen proteínas pertenecientes a la familia Hedgehog (por ej., Shh), el receptor de Shh, un agonista del receptor de Shh, Purmorfamina, SAG, etc.

25 La concentración de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh usada en esta etapa es, por ejemplo, en el caso de la sustancia común que actúa sobre la ruta de señalización de Shh, tal como SAG, de aproximadamente 0,1 nM a 10 μ M, preferiblemente de aproximadamente 10 nM a 1 μ M, más preferiblemente de aproximadamente 100 nM.

30 El tejido retiniano así producido está presente para cubrir la superficie del agregado. Se puede confirmar si se produce un tejido retiniano mediante el método de producción de la presente invención por dicho método de inmunotinción como se describe en el siguiente punto (4).

Es también posible extraer físicamente el tejido retiniano presente sobre la superficie de agregados con pinzas, etc. En este caso, como puede formarse un tejido neural distinto de un tejido retiniano sobre la superficie de cada agregado, se corta una parte del tejido neural extraído del agregado y se confirma por dicho método de inmunotinción como se describe en (4), mediante lo cual se confirma que el tejido es un tejido retiniano.

35 (4) Método de confirmación de tejido retiniano

Se puede producir un tejido retiniano mediante la primera etapa a la tercera etapa antes mencionadas. Además, se puede confirmar la producción de un tejido retiniano mediante la primera etapa a la tercera etapa mediante el método siguiente.

40 Se somete el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero. Como ejemplos del recipiente de cultivo celular usado para cultivo de flotación, se incluyen los mencionados anteriormente. Se pueden determinar apropiadamente las condiciones de cultivo, tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂ y la concentración de O₂ del cultivo de flotación. Aunque la temperatura de cultivo no está particularmente limitada, es, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 40°C, preferiblemente de aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 al 10%, preferiblemente de aproximadamente el 5%. La concentración de O₂ es, por ejemplo, del 20 al 70%, preferiblemente del 20 al 60%, más preferiblemente del 30 al 50%.

Aunque el período de cultivo en esta etapa no está particularmente limitado, es generalmente no inferior a 48 h, preferiblemente no inferior a 7 días.

50 Se puede confirmar el tejido retiniano, tras completarse el cultivo de flotación, fijando los agregados con un fijador, tal como una solución de paraformaldehído, preparando una sección congelada y confirmando la formación de una estructura de capa mediante un método de inmunotinción, etc. Como las capas respectivas de tejido retiniano están compuestas por diferentes células progenitoras retinianas (fotorreceptor, célula horizontal, célula bipolar, célula amacrina, célula de ganglio retiniano), se puede confirmar la formación de una estructura de capa mediante un método

de inmunotinción usando anticuerpos contra los marcadores antes mencionados expresados en estas células.

<Método de producción de estructura de tipo copa óptica>

El segundo aspecto de la presente invención es un método de producción de una estructura de tipo copa óptica, que comprende una etapa de someter el tejido retiniano obtenido mediante el <método de producción de tejido retiniano> antes mencionado a cultivo de flotación en un medio libre de suero o un medio que contiene suero, conteniendo cada uno de ellos una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt. Como tejido retiniano obtenido en el <método de producción de tejido retiniano> antes mencionado, se puede usar un agregado que contenga el tejido retiniano cultivado en la tercera etapa del <método de producción de tejido retiniano> antes mencionado. Como realización de la segunda invención, se puede mencionar un método para producir una estructura de tipo copa óptica, que comprende las siguientes etapas (1) a (4):

(1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt para formar un agregado de células madre pluripotentes;

(2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;

(3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, y

(4) una cuarta etapa de someter el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero o medio que contiene suero, conteniendo cada uno de ellos una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt.

Aquí, la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh no está particularmente limitada, siempre que pueda aumentar la transducción de señal mediada por Shh. Como ejemplos de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh, se incluyen proteínas pertenecientes a la familia Hedgehog (por ej., Shh), receptor de Shh, agonista del receptor de Shh, Purmorfamina, SAG, etc.

La concentración de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh para uso en el segundo aspecto de la presente invención es, por ejemplo, en el caso de una sustancia común que actúa sobre la ruta de señalización de Shh, tal como SAG, de aproximadamente 0,1 nM a 10 μ M, preferiblemente de aproximadamente 10 nM a 1 μ M, más preferiblemente de aproximadamente 100 nM.

Como ejemplos de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt, se incluyen proteínas pertenecientes a la familia Wnt, receptor de Wnt, agonista del receptor de Wnt, inhibidor de GSK3 β (por ej., 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021, Kenpaulona), etc.

La concentración de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt para uso en el segundo aspecto de la presente invención es, por ejemplo, en el caso de una sustancia común que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt, tal como CHIR99021, de aproximadamente 0,1 μ M a 100 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a 30 μ M, más preferiblemente de aproximadamente 3 μ M.

Se añaden la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh y la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt el o después del día 12 y el o antes del día 25, preferiblemente el o después del día 15 y el o antes del día 18, tras el inicio del cultivo de flotación. En este caso, se usa preferiblemente un medio libre de la sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt añadida en la etapa de formación del agregado.

Se produce una estructura de tipo copa óptica en forma de una protrusión a partir de un agregado el o después del día 18 tras el inicio del cultivo de flotación. Los expertos en la técnica pueden confirmar si es una estructura de tipo copa óptica por observación con un microscopio, una lente de aumento, etc.

La estructura de tipo copa óptica así producida se forma en una estructura de dos capas de capa externa y capa interna. Dado que están presentes epitelios pigmentarios retinianos en la capa externa y que están presentes las células progenitoras retinianas en la capa interna, se pueden observar las células progenitoras retinianas y el epitelio pigmentario retiniano, por ejemplo, preparando una sección congelada de la estructura de tipo copa óptica y realizando inmunotinción.

Además, como la estructura de tipo copa óptica producida por el método de la presente invención se forma en forma de una protrusión a partir de un agregado, es también posible obtener una célula progenitora de la retina altamente pura separando física y morfológicamente la protrusión del agregado, seguido de aplicación de las estructuras de tipo copa óptica resultantes a un tratamiento de dispersión (por ej., tratamiento con tripsina/EDTA) y clasificación por FACS. El método para separar la estructura de tipo copa óptica no está particularmente limitado, y se puede separar fácilmente de un agregado de células madre usando pinzas finas, etc.

<Método de producción de células neurales específicas de la capa retiniana>

El tercer aspecto de la presente invención es un método de producción de una célula neural específica de la capa retiniana, que comprende poner en contacto una célula progenitora de la retina contenida en un tejido retiniano derivado de una célula madre pluripotente de primate con una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Notch. Según el método de la presente invención, se puede producir una célula neural específica de la capa retiniana a partir de una célula progenitora retiniana.

(Método de producción de tejido retiniano derivado de células madre pluripotentes de primate)

Se explica el "tejido retiniano derivado de células madre pluripotentes de primate" usado en el método de producción de la célula neural específica de la capa retiniana.

Como tejido retiniano derivado de células madre pluripotentes de primate, se pueden usar, por ejemplo, el tejido retiniano obtenido mediante el <método de producción de tejido retiniano> antes mencionado, o el tejido retiniano producido a partir de la estructura de tipo copa óptica obtenida mediante el <método de producción de estructura de tipo copa óptica> antes mencionado.

En este último caso, se puede producir el tejido retiniano sometiendo la estructura de tipo copa óptica formada en la cuarta etapa del <método de producción de estructura de tipo copa óptica> antes mencionado a otro cultivo de flotación.

Como se forma una estructura de tipo copa óptica en forma de una protrusión a partir de un agregado, como se ha mencionado anteriormente, se puede obtener un tejido retiniano altamente puro separando física y morfológicamente la protrusión del agregado, seguido de separación y cultivo. El método para separar la estructura de tipo copa óptica no está particularmente limitado, y se puede separar fácilmente de un agregado de células madre usando pinzas finas, etc.

El tejido retiniano y la estructura de tipo copa óptica producidos como se ha mencionado anteriormente contienen células progenitoras retinianas, y se pueden producir células neurales específicas de la capa retiniana a partir de células progenitoras retinianas poniendo en contacto las células progenitoras retinianas antes mencionadas con una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Notch.

<Sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Notch>

A continuación, se explica la sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Notch usada en el método de producción de la célula neural específica de la capa retiniana.

La sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Notch no está particularmente limitada, siempre que pueda inhibir la transducción de señal mediada por Notch. Como ejemplos de la sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Notch, se incluyen anticuerpo Notch, antagonista de los receptores de Notch, inhibidor de ADAM, inhibidor de la gamma secretasa, etc.

Como ejemplos del inhibidor de la gamma secretasa, se incluye éster t-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina (DAPT).

La concentración del inhibidor de la gamma secretasa no está particularmente limitada, siempre que pueda aumentar la diferenciación de la célula progenitora de la retina en célula precursora de fotorreceptor o fotorreceptor. La concentración es, por ejemplo, en el caso de inhibidores comunes de la gamma secretasa, de aproximadamente 0,1 a 1.000 μM , preferiblemente de aproximadamente 1 a 100 μM , más preferiblemente de aproximadamente 10 μM .

Se añade el inhibidor de la gamma secretasa el o después del día 15 y el o antes del día 200 desde el inicio del cultivo de flotación de células madre pluripotentes de primate, para los tejidos retinianos producidos a partir de células madre pluripotentes de primate. Preferiblemente, se añade un inhibidor de la gamma secretasa al medio el o después del día 20 y el o antes del día 150, más preferiblemente el o después del día 25 y el o antes del día 100, de inducción de la diferenciación.

El período del cultivo de adhesión en presencia del inhibidor de la gamma secretasa puede ser de una duración que permita una producción más eficaz de la célula precursora de fotorreceptor o del fotorreceptor. La duración de dicho período puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 3 días o más, preferiblemente de aproximadamente 5 a 100 días, más preferiblemente de aproximadamente 7 a 30 días.

(Método de confirmación de la célula neural específica de la capa retiniana)

Se explica un método para confirmar una célula neural específica de la capa retiniana producida como se ha mencionado anteriormente haciendo referencia al caso en el que la célula neural específica de la capa retiniana es un fotorreceptor, un precursor de fotorreceptor o una célula ganglionar.

Se puede confirmar si la célula neural específica de la capa retiniana producida es una célula precursora de

fotorreceptor por un método conocido, por ejemplo, expresión de un marcador de célula precursora de fotorreceptor. Como ejemplos del marcador de célula precursora de fotorreceptor, se incluye Crx.

5 El fotorreceptor contiene bastones y conos. Se puede confirmar si la célula producida es un fotorreceptor por un método conocido *per se*, por ejemplo, expresión de un marcador de fotorreceptor. Como ejemplos del marcador de fotorreceptor, se incluyen rodopsina (bastón), opsina roja/verde (cono), opsina azul (cono), recoverina (bastón, cono), etc.

Además, se puede confirmar si la célula neural específica de la capa retiniana producida es una célula ganglionar por un método conocido, por ejemplo, expresión de un marcador de células ganglionares. Como ejemplos del marcador de células ganglionares, se incluye Brn3.

10 Tras completarse el cultivo de adhesión, se puede aislar una célula precursora de fotorreceptor o un fotorreceptor del tejido retiniano. Se puede realizar dicho aislamiento por un método conocido *per se* (clasificador celular, etc.) y usando un anticuerpo contra el marcador superficial de una célula precursora de fotorreceptor o un fotorreceptor, etc. Además, tras completarse el cultivo, se puede aislar una célula ganglionar del tejido retiniano. Se puede realizar dicho aislamiento por un método conocido *per se* (clasificador celular, etc.) y usando un anticuerpo contra el marcador superficial de una célula ganglionar, etc. De manera alternativa, usando, como célula madre pluripotente, una célula en donde se ha insertado un gen marcado (por ej., proteína fluorescente, tal como GFP) en marco en un gen codificante de un marcador (por ej., Crx) de una célula precursora de fotorreceptor o un marcador (por ej., recoverina) de un fotorreceptor o un marcador (Brn3) de una célula ganglionar, se puede aislar cada célula por un método conocido *per se* (clasificador celular, etc.) usando la expresión del gen marcado como un indicador.

<Método de producción de epitelio pigmentario retiniano>

20 El cuarto aspecto de la presente invención es un método de producción de un epitelio pigmentario retiniano, que comprende una etapa de someter el tejido retiniano obtenido mediante el <método de producción de tejido retiniano> antes mencionado a cultivo de flotación en un medio libre de suero o un medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt (pero no conteniendo una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Sonic hedgehog). Como tejido retiniano obtenido en el <método de producción de tejido retiniano> antes mencionado, se puede usar un agregado que contenga el tejido retiniano cultivado en la tercera etapa del <método de producción de tejido retiniano> antes mencionado. Como realización de la cuarta invención, se puede mencionar un método de producción de un epitelio pigmentario retiniano, que comprende las siguientes etapas (1) a (4):

30 (1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt para formar un agregado de células madre pluripotentes;

(2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;

(3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, y

35 (4) una cuarta etapa de someter el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero o medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt, en donde el medio libre de suero y el medio que contiene suero antes mencionados están libres de una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Sonic hedgehog.

40 Aquí, como ejemplos de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt, se incluyen proteínas pertenecientes a la familia Wnt, receptor de Wnt, agonista del receptor de Wnt, inhibidor de GSK3 β (por ej., 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021, Kenpaulona), etc.

45 La concentración de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt para uso en el cuarto aspecto de la presente invención es, por ejemplo, en el caso de una sustancia común que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt, tal como CHIR99021, de aproximadamente 0,1 μ M a 100 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a 30 μ M, más preferiblemente de aproximadamente 3 μ M.

Se añade la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt el o después del día 12, lo más preferiblemente el día 15, cuando, por ejemplo, se usan células ES humanas. En este caso, se usa preferiblemente un medio libre de la sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt añadida en la primera etapa y la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh añadida en la tercera etapa.

50 En el cuarto aspecto de la presente invención, se cultiva el tejido retiniano o el agregado que contiene un tejido retiniano, que se obtiene mediante el <método de producción de tejido retiniano> antes mencionado, preferiblemente en un medio libre de suero o un medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de la Activina.

La sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de la Activina no está particularmente limitada, siempre que

pueda aumentar la transducción de señal mediada por Activina. Como ejemplos de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de la Activina, se incluyen proteínas pertenecientes a la familia de la Activina (por ej., Activina A, Activina B, Activina C y Activina AB, etc.), receptor de Activina, agonista del receptor de Activina, etc.

5 La concentración de la sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de la Activina para uso en esta etapa es, por ejemplo, en el caso de una sustancia común que actúa sobre la ruta de señalización de Activina, tal como Activina A Humana/de Ratón/de Rata Recombinante (R&D systems #338-AC), de 1 ng/ml a 10 ug/ml, preferiblemente de aproximadamente 10 ng/ml a 1 ug/ml, más preferiblemente de aproximadamente 100 ng/ml.

10 Dado que el epitelio pigmentario retiniano así producido está presente sobre la superficie de agregados, puede ser observado fácilmente por observación microscópica, etc. Es también posible obtener un epitelio pigmentario retiniano altamente puro sometiendo un agregado que contiene el epitelio pigmentario retiniano a, por ejemplo, un tratamiento de dispersión (por ej., tratamiento con tripsina/EDTA), seguido de clasificación por FACS. Es también posible separar físicamente el epitelio pigmentario retiniano de los agregados con pinzas, etc., seguido de cultivo. Se puede cultivar el epitelio pigmentario retiniano tras dispersión o separación en condiciones de adhesión. En el caso del cultivo de adhesión, se usa preferiblemente un recipiente de cultivo adhesivo celular, por ejemplo, un recipiente de cultivo después de un tratamiento de revestimiento con una matriz extracelular, etc. (por ej., poli-D-lisina, laminina, fibronectina). Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las condiciones de cultivo del cultivo de adhesión, tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂ y concentración de O₂. En este caso, se puede realizar el cultivo en presencia de un suero, un factor de crecimiento conocido, un aditivo y una sustancia química que promueven el crecimiento. Como ejemplos del factor de crecimiento conocido, se incluyen EGF, FGF, etc. Como ejemplos del aditivo que promueve el crecimiento, se incluyen suplemento N2 (Invitrogen), suplemento B27 (Invitrogen), etc.

<Uso de tejido retiniano como reactivo para evaluar la toxicidad o la eficacia de fármacos>

25 También se pueden usar el tejido retiniano, la estructura de tipo copa óptica, la célula neural específica de la capa retiniana y el epitelio pigmentario retiniano producidos mediante el primer al cuarto aspectos de la presente invención para el tamizado de un fármaco terapéutico para una enfermedad debida a un trastorno del tejido retiniano o de la célula relacionada con la retina, o un material de trasplante para tratamiento celular, un material para el estudio de enfermedades o un material de descubrimiento de fármacos para un fármaco terapéutico para una lesión celular debida a otra etiología. Además, se pueden utilizar para el estudio, ensayo, etc. de toxicidad tal como fototoxicidad en la evaluación de la toxicidad y la eficacia de fármacos de sustancias químicas, etc.

30 Como ejemplos de la enfermedad debida a un trastorno del tejido retiniano o de la célula relacionada con la retina, se incluyen envenenamiento por mercurio orgánico, retinopatía por cloroquina, retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinopatía diabética, retinopatía neonatal, etc.

<Uso del tejido retiniano, de la estructura de tipo copa óptica, de la célula neural específica de la capa retiniana y del epitelio pigmentario retiniano como materiales biológicos para trasplante>

35 Se pueden usar el tejido retiniano, la estructura de tipo copa óptica, la célula neural específica de la capa retiniana y el epitelio pigmentario retiniano producidos mediante el primer al cuarto aspectos de la presente invención como materiales biológicos para trasplante usado para suplementar una célula dañada o un tejido desordenado que está él mismo en un estado de daño celular (por ej., usados para una operación de trasplante), etc. Como ejemplos del método de trasplante, se incluyen, aunque sin limitación, los métodos descritos en los Ejemplos que se mencionan a continuación.

40 Se explica el método de producción de la presente invención con más detalle en lo que sigue haciendo referencia a Ejemplos Comparativos y Ejemplos. Los Ejemplos muestran simplemente una ejemplificación de la presente invención y no limitan el alcance de la presente invención en modo alguno.

Ejemplos de referencia

45 (Establecimiento de células ES humanas con inserción RAX)

Se produjo la línea celular ES humana con GFP insertado en el locus del gen RAX, que es uno de los genes marcadores de células progenitoras retinianas.

50 Se compró Nucleasa de Dedo de Zinc (ZFN), que escinde específicamente el gen RAX en el ADN genómico de la línea celular ES humana (KhES-1: línea celular ES humana establecida por la Kyoto University) a Sigma-Aldrich Co. LLC. Usando células ES humanas que se disociaron en células individuales y según el método de electroporación, se cotransfectaron ARNm codificante de ZFN y un vector de inserción portador de GFP y un gen de resistencia a neomicina, que es un gen de selección de fármacos, y se plaquearon sobre fibroblastos de ratón de resistencia a neomicina tratados con mitomicina C. A partir del día siguiente al plaqueado, se añadió G418 al medio y se realizó la selección de fármacos. Se recogió la colonia del clon resistente obtenido, se continuó con el cultivo y se seleccionaron las células con inserción por el método de PCR y el método de transferencia de Southern, mediante lo cual se estableció una línea de células ES humanas RAX::inserción de GFP.

Ejemplo Comparativo 1: Producción de tejido retiniano usando células ES humanas (condiciones de adición de Matrigel)

Se cultivaron células ES humanas con inserción RAX::GFP (derivadas de KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen) y se cultivaron por flotación en un medio libre de suero (100 μ l) a 37°C, con un 5% de CO₂ hasta 9×10³ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva a células (placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.). Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y Y27632 20 μ M a medio G-MEM. Durante el cultivo de flotación, se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 tras el inicio del cultivo de flotación. A continuación, se realizó regularmente la observación microscópica de fluorescencia mientras se continuaba con el cultivo de flotación.

Como resultado de la observación microscópica de fluorescencia hasta el día 25 tras el inicio del cultivo de flotación, se encontraron algunas células de expresión de GFP que mostraban inducción de las células progenitoras retinianas (Figs. 1A, B).

Ejemplo Comparativo 2: Producción de tejido retiniano usando células ES humanas (inhibidor de la ruta de señalización de Nodal y condiciones de adición de Matrigel)

Se cultivaron células ES humanas con inserción RAX::GFP (derivadas de KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y 5 -10 ng/ml de bFGF. Para la producción de tejido retiniano por cultivo de flotación, se disociaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen) y se cultivaron por flotación en un medio libre de suero (100 μ l) a 37°C, con un 5% de CO₂ hasta 9×10³ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.). Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μ M y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Nodal (SB431542 10 μ M) a medio G-MEM. Durante el cultivo de flotación, se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 tras el inicio del cultivo de flotación. A continuación, se continuó con el cultivo de flotación y se realizaron la observación microscópica de fluorescencia y la confirmación de la proporción de las células que expresaban GFP por FACS el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación.

Como resultado, se encontraron algunas células que expresaban GFP (Figs. 1C, D).

Ejemplo Comparativo 3: Producción de tejido retiniano usando células ES humanas (inhibidor de la ruta de señalización de Wnt y condiciones de adición de Matrigel)

Se cultivaron células ES humanas con inserción RAX::GFP (derivadas de KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Para la producción de tejido retiniano por cultivo de flotación, se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), y se cultivaron por flotación en un medio libre de suero (100 μ l) a 37°C, con un 5% de CO₂ hasta 9×10³ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.). Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μ M y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt (IWR1e 3 μ M) a medio G-MEM. Durante el cultivo de flotación, se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 tras el inicio del cultivo de flotación. A continuación, se continuó con el cultivo de flotación y se realizaron la observación microscópica de fluorescencia y la confirmación de la proporción de las células que expresaban GFP por FACS el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación.

Como resultado, las células que expresaban GFP claramente aumentaron (Figs. 1E, F) en comparación con los Ejemplos Comparativos 1 y 2.

Ejemplo de Referencia 1: Producción de tejido retiniano usando células ES humanas (inhibidor de la ruta de señalización de Wnt y condiciones de adición de Matrigel y suero)

Se cultivaron células ES humanas con inserción RAX::GFP (derivadas de KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Para la producción de tejido retiniano por cultivo de flotación, se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), y se cultivaron por flotación en un medio libre de suero (100 μ l) a 37°C, con un 5% de CO₂ hasta

9×10³ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.). Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μM y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt (IWR1e 3 μM) a medio G-MEM. Durante el cultivo de flotación, se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 tras el inicio del cultivo de flotación. Además, se añadió un suero fetal de ternera en una cantidad de 1/10 en volumen el día 12 tras el inicio del cultivo de flotación. A continuación, se continuó con el cultivo de flotación y se realizaron la observación microscópica de fluorescencia y la confirmación de la proporción de las células que expresan GFP por FACS el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación. Simultáneamente, se realizó también un experimento en las condiciones del Ejemplo Comparativo 3, que estaban libres de la adición de un suero.

Aunque la proporción de las células que expresan GFP en las condiciones del Ejemplo Comparativo 3 era del 3,2% (Figs. 2A, B, Fig. 3A), emergieron muchas células que expresan GFP en condiciones de adición de un suero (Figs. 2C, D). La proporción de las células positivas a GFP era mayor del 30% en el análisis por FACS (Fig. 3B).

Ejemplo de Referencia 2: Producción de tejido retiniano usando células ES humanas (condiciones de adición de inhibidor de la ruta de señalización de Wnt y Matrigel, suero y una sustancia que actúa sobre la señal de Shh)

Se cultivaron células ES humanas con inserción RAX::GFP (derivadas de KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Para la producción de tejido retiniano por cultivo de flotación, se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), y se cultivaron por flotación en un medio libre de suero (100 μl) a 37°C, con un 5% de CO₂ hasta 9×10³ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.). Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μM y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt (IWR1e 3 μM) a medio G-MEM. Durante el cultivo de flotación, se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 tras el inicio del cultivo de flotación. Se añadieron un suero fetal de ternera en una cantidad de 1/10 en volumen y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh (SAG 100 nM) el día 12 tras el inicio del cultivo de flotación. Se midió la proporción de las células que expresan GFP por FACS el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación.

Cuando se añadió una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh simultáneamente a un suero, emergió un número muy elevado de células que expresan GFP (Figs. 2E, F). Por el análisis realizado usando FACS, se vio que la proporción de las células que expresan GFP había alcanzado no menos del 70%.

Se vio que, en comparación con el Ejemplo Comparativo 3, la proporción de las células que expresan GFP aumentaba hasta aproximadamente 10 veces en las condiciones del Ejemplo 1, en donde se añadió un suero, y además la proporción de las células que expresan GFP aumentaba hasta aproximadamente 24 veces en las condiciones del Ejemplo 2, en donde se añadieron simultáneamente un suero y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh (Fig. 3D).

Ejemplo de Referencia 3: Confirmación de la formación de tejido retiniano

(Método)

Se confirmó la formación de tejido retiniano con los agregados que tenían células que expresan GFP, que se produjeron en los Ejemplos 2 y 3. Usando un medio que contiene suero obtenido añadiendo suplemento N2, suero fetal de ternera al 10% (v/v) y ácido retinoico 0,5 μM a medio DMEM/F12, se realizó un cultivo de flotación en condiciones de un 40% de O₂ desde el día 18 tras el inicio del cultivo de flotación. A continuación, se fijó la masa agregada con una solución al 4% de paraformaldehído, se preparó una sección congelada y se confirmó la estructura tisular por el método de inmunotinción.

Como resultado, se reveló el día 60 desde el inicio del cultivo de flotación que células ganglionares positivas a Brn3 y TuJ1 en la capa más inferior, células precursoras de fotorreceptores positivas a Crx y Recoverina en la capa más externa y la capa intermedia, y células progenitoras de interneuronas, tales como células bipolares positivas a Chx10 entre las células positivas a Brn3 en la capa más externa y las células positivas a Brn3 en la capa más inferior se disponían en capas de un modo ordenado (Figs. 4A, B, C). Además, cuando se continuó el cultivo de flotación hasta el día 126, se acumularon células precursoras de fotorreceptores positivas a Crx y Recoverina en la capa más externa, y se observaron las células que expresaban Nrl, que se expresa específicamente en los bastones, y las células que expresaban Rxr-gamma, que se expresa específicamente en los conos. Además, se observaron las células que expresaban Ptf1a, que es un marcador de células precursoras de célula horizontal y célula amacrina, en la capa intermedia (Figs. 4D, E, F, G, H, I). Gracias a estos resultados, se ha visto que se puede producir un tejido retiniano con elevada eficacia a partir de células ES humanas.

Ejemplo de Referencia 4: Trasplante al ojo de tejido retiniano producido a partir de célula ES humana

Tras incisión de la esclerótica de un globo ocular, se insertó una aguja de inyección desde la incisión de la esclerótica hacia el vítreo para reducir la presión intraocular. Se inyectó un líquido de perfusión intraocular desde la incisión de la esclerótica hacia el espacio subretiniano con una aguja de trasplante celular para formar artificialmente un estado de desprendimiento retiniano poco profundo. Se trasplanta el tejido retiniano con una aguja de trasplante celular o un dispositivo de trasplante de láminas celulares al espacio formado.

Ejemplo de Referencia 5: Producción de estructura de tipo copa óptica con alta eficacia usando células ES humanas (Método)

Usando células ES humanas con inserción RAX::GFP, se produjo una estructura de tipo copa óptica.

Se cultivaron células ES humanas con inserción RAX::GFP (derivadas de KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Para la formación de agregado por cultivo de flotación, se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), se suspendieron en un medio libre de suero (100 μ l) a 9×10^3 células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) para permitir la rápida formación de agregados, y se cultivaron por flotación a 37°C, con un 5% de CO₂. Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μ M y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt (IWR1e 3 μ M) a medio GMEM. Durante el cultivo de flotación, se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 tras el inicio del cultivo de flotación. Se transfirió el agregado de flotación a un medio libre de suero sin una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt el día 12 tras el inicio del cultivo de flotación, se añadió suero fetal de ternera en una cantidad de 1/10 en volumen y se cultivó el agregado. Además, se realizó el cultivo de flotación en un medio que contiene suero que contenía una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt (CHIR99021 3 μ M) y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh (SAG 100 nM) desde el día 15.

(Resultados)

Cuando se producía por el método antes mencionado, emergía una población de células positivas a GFP que mostraba expresión de RAX en una parte del agregado alrededor del día 14 desde el inicio del cultivo de flotación (Fig. 5A), que luego se elevó hacia el lado externo del agregado (Figs. 5B, C). Cuando se continuaba el cultivo de flotación, se formaba una protusión transparente (Fig. 5D). Además, cuando se continuaba el cultivo de flotación, se formaba una estructura de tipo copa óptica transparente sobre el agregado compuesto por las células positivas a GFP (células progenitoras retinianas) (Fig. 6). Esta estructura de tipo copa óptica podía reorganizarse claramente simplemente por observación microscópica del agregado (Fig. 6A). Cuando se observó la estructura de tipo copa óptica formada sobre el agregado en profundidad mediante un microscopio de dos fotones para ver que tenía una estructura de dos capas del exterior y el interior (Figs. 6C, D). Se preparó e inmunotizó una sección congelada de la estructura de tipo copa óptica. Como resultado, una capa de epitelios pigmentarios retinianos que expresaban Mitf estaba presente sobre el exterior, y células progenitoras retinianas neurales positivas a Chx10 estaban presentes en su interior (Fig. 7).

Ejemplo de Referencia 6: Trasplante al ojo de estructura de tipo copa óptica producida a partir de célula ES humana

Tras incisión de la esclerótica de un globo ocular, se insertó una aguja de inyección desde la incisión de la esclerótica hacia el vítreo para disminuir la presión intraocular. Se inyectó un líquido de perfusión intraocular desde la incisión de la esclerótica hacia el espacio subretiniano con una aguja de trasplante celular para formar artificialmente un estado de desprendimiento retiniano poco profundo. Se trasplanta la estructura de tipo copa óptica cultivada con una aguja de trasplante celular o un dispositivo de trasplante de láminas celulares al espacio formado.

Ejemplo de Referencia 7: Tratamiento de tejido retiniano derivado de células ES humanas con una sustancia que actúa sobre la señal de Notch

Se cultivaron células ES humanas con inserción CrX::GFP (derivadas de KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), y se cultivaron por flotación en un medio libre de suero (100 μ l) a 37°C, con un 5% de CO₂ hasta 9×10^3 células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.). Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μ M y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt (IWR1e 3 μ M) a medio GMEM. Se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 del cultivo de flotación y se realizó el cultivo de flotación. Se añadieron suero fetal de ternera en una cantidad de 1/10 en volumen y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh (SAG 100 nM) el día 12 del cultivo de flotación y se realizó el cultivo de flotación

para producir un tejido retiniano. Se añadió una sustancia que actúa sobre la señal de Notch (DAPT (inhibidor de la actividad gamma secretasa) 10 μ M) al tejido retiniano el día 29 tras el inicio del cultivo de flotación, se observó con un microscopio de fluorescencia el día 41 desde el inicio del cultivo de flotación (día 12 tras la adición) y se fijó con paraformaldehído al 4% el día 43 desde el inicio del cultivo de flotación (día 14 tras la adición), y se preparó una sección congelada. Se inmunotizó la sección congelada preparada para Recoverina, que es uno de los genes marcadores de fotorreceptor, y Brn3, que es uno de los genes marcadores de células ganglionares, y se compararon los resultados entre la presencia y ausencia de adición de DAPT.

Como resultado, las células que expresan GFP aumentaban de manera marcada cuando se añadía DAPT (Fig. 8B), en comparación con cuando no se añadía DAPT (Fig. 8A). Además, por los resultados de inmunotinción de la sección congelada, se reveló que las células positivas a Recoverina aumentaban de 3 a 5 veces cuando se añadía DAPT (Figs. 8C, D).

Estos resultados muestran un marcado aumento en los fotorreceptores. Además, se vio por los resultados de inmunotinción de Brn3 que las células ganglionares también aumentaban por la adición de DAPT (Figs. 8E, F).

Ejemplo de Referencia 8: Tratamiento de tejido retiniano derivado de células ES humanas tras congelar-descongelar con una sustancia que actúa sobre la señal de Notch

Se cultivaron células ES humanas con inserción RAX::GFP (derivadas de KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Para la producción de tejido retiniano por cultivo de flotación, se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), y se cultivaron por flotación en un medio libre de suero (100 μ l) a 37°C, con un 5% de CO₂ hasta 9x10³ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placa esferoidal SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.). Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μ M y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt (IWR1e 3 μ M) a medio G-MEM. Se usó un medio libre de suero al que se había añadido Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 tras el inicio del cultivo de flotación. Se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 del cultivo de flotación y se realizó el cultivo de flotación. Se añadieron suero fetal de ternera en una cantidad de 1/10 en volumen y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Shh (SAG 100 nM) el día 12 desde el inicio del cultivo de flotación y se realizó el cultivo de flotación para producir un tejido retiniano. Se congeló-descongeló el tejido retiniano producido el día 33 desde el inicio del cultivo de flotación, y se añadió una sustancia inhibidora de la acción de la señal de Notch (DAPT 10 μ M) al tejido retiniano el día 38 tras el inicio del cultivo de flotación. Se observó el tejido con un microscopio de fluorescencia el día 49 desde el inicio del cultivo de flotación (día 11 tras la adición), y se fijó con paraformaldehído al 4%, y se preparó una sección congelada. Se inmunotizó la sección congelada preparada para Recoverina, que es uno de los genes marcadores de fotorreceptor, y Brn3, que es uno de los genes marcadores de células ganglionares, y se compararon los resultados entre la presencia y ausencia de adición de DAPT.

Como resultado, se producían de manera marcada las células que expresan GFP cuando se añadía DAPT (Fig. 9B), en comparación con cuando no se añadía DAPT (Fig. 9A). Además, por los resultados de inmunotinción de la sección congelada, se reveló que se producían células positivas a Recoverina aproximadamente 5 veces más cuando se añadía DAPT (Figs. 9C, D). Estos resultados muestran una marcada producción de los fotorreceptores. Además, se vio por los resultados de inmunotinción de Brn3 que también se producían las células ganglionares por adición de DAPT (Figs. 9E, F).

Ejemplo de Referencia 9: Trasplante al ojo de célula neural específica de la capa retiniana producida a partir de célula ES humana

Tras incisión de la esclerótica de un globo ocular, se insertó una aguja de inyección desde la incisión de la esclerótica hacia el vítreo para disminuir la presión intraocular. Se inyectó un líquido de perfusión intraocular desde la incisión de la esclerótica hacia el espacio subretiniano con una aguja de trasplante celular para formar artificialmente un estado de desprendimiento retiniano poco profundo. Se trasplanta la célula neural específica de la capa retiniana con una aguja de trasplante celular o un dispositivo de trasplante de láminas celulares al espacio formado.

Ejemplo de Referencia 10: Producción de epitelio pigmentario retiniano con alta eficacia usando células ES humanas (Método)

Se cultivaron células ES humanas (KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Para la formación de tejido retiniano por cultivo de flotación, se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), se suspendieron en un medio libre de suero (100 μ l) a 9x10³ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células

(placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) para permitir la rápida formación de agregados, y se cultivaron por flotación a 37°C, con un 5% de CO₂. Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μM y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt (IWR1e 3 μM) a medio G-MEM. Se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 del cultivo de flotación y se realizó el cultivo de flotación. Se transfirió el agregado a un medio libre de suero que no contenía una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt el día 12 tras el inicio del cultivo de flotación, se añadió suero fetal de ternera en una cantidad de 1/10 en volumen y se cultivó. Se realizó el cultivo de flotación en un medio que contenía una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt (CHIR99021 3 μM) a partir del día 15.

10 (Resultados)

Cuando se producía por el método antes mencionado, emergía una población de epitelio pigmentario retiniano sobre casi todas las superficies de los agregados (Fig. 10).

Ejemplo de Referencia 11: Producción de epitelio pigmentario retiniano usando células ES humanas

(Método)

15 Se cultivaron células ES humanas (KhES-1) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.* PNAS 2006", "Watanabe, K. *et al.* Nat Biotech 2007" y se usaron para el experimento. Como medio, se usó medio DMEM/F12 (Invitrogen) al que se habían añadido un 20% de KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM y de 5 a 10 ng/ml de bFGF. Para la formación de tejido retiniano por cultivo de flotación, se dispersaron las células ES en células individuales usando un 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen), se suspendieron en un medio libre de suero (100 μl) a 9×10³ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placa esférica SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) para permitir la rápida formación de agregados, y se cultivaron por flotación a 37°C, con un 5% de CO₂. Como medio libre de suero en este caso, se usó un medio libre de suero obtenido añadiendo un 20% de KSR, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, ácido pirúvico 1 mM, Y27632 20 μM y una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Wnt (IWR1e 3 μM) a medio G-MEM. Durante el cultivo de flotación, se añadió Matrigel en una cantidad de 1/100 en volumen desde el día 2 tras el inicio del cultivo de flotación. Se transfirió el agregado a un medio libre de suero que no contenía una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt el día 12 tras el inicio del cultivo de flotación, se añadió suero fetal de ternera en una cantidad de 1/10 en volumen y se cultivó. Se realizó el cultivo de flotación en un medio que contenía una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt (CHIR99021 3 μM) y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de la Activina (Activina A recombinante Humana/Murina/de Rata (R&D systems #338-AC) 100 ng/ml) a partir del día 15.

30 (Resultados)

Cuando se producían por el método antes mencionado, emergían epitelios pigmentarios retinianos que adoptaban color negro sobre las superficies de casi todos los agregados. Además, casi todas las superficies de los agregados estaban cubiertas de epitelios pigmentarios retinianos (Fig. 11), y se produjeron epitelios pigmentarios retinianos sorprendentemente con una alta eficacia.

35 **Ejemplo de Referencia 12:** Trasplante al ojo de epitelio pigmentario retiniano producido a partir de células ES humanas

Tras incisión de la esclerótica de un globo ocular, se insertó una aguja de inyección desde la incisión de la esclerótica hacia el vítreo para disminuir la presión intraocular. Se inyectó un líquido de perfusión intraocular desde la incisión de la esclerótica hacia el espacio subretiniano con una aguja de trasplante celular para formar artificialmente un estado de desprendimiento retiniano poco profundo. Se trasplanta el epitelio pigmentario retiniano con una aguja de trasplante celular o un dispositivo de trasplante de láminas celulares al espacio formado.

Aplicabilidad industrial

45 Según la presente invención, se puede producir un tejido retiniano, una estructura de tipo copa óptica, una célula neural específica de la capa retiniana o un epitelio pigmentario retiniano con una elevada eficacia. El método de producción de la presente invención es altamente útil, ya que produce eficazmente un grupo de células (tales como fotorreceptor y nervio óptico) que constituyen un tejido retiniano, con fines de evaluación de la toxicidad o de la eficacia de fármacos de una sustancia química, etc., un tratamiento celular etc., y además produce eficazmente un tejido retiniano para ser un "material tisular" para uso en pruebas y tratamientos con fines de aplicación a una evaluación de la toxicidad o de la eficacia de fármacos usando un tejido retiniano con una estructura tisular, y a un material de trasplante para un tratamiento de trasplante de tejido retiniano.

50

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un tejido retiniano, que comprende las siguientes etapas (1) a (3):

(1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de los receptores de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes;

(2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales, y

(3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado.

2. Un método para producir una estructura de tipo copa óptica, que comprende:

(1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de los receptores de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes;

(2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;

(3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado, y

(4) una cuarta etapa de someter el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero o un medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Sonic hedgehog seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Hedgehog, Shh, un receptor de Shh, un agonista del receptor de Shh, Purmorfamina y SAG, y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Wnt, un receptor de Wnt, un agonista del receptor de Wnt, un inhibidor de GSK3 β , 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021 y Kenpaulona.

3. Un método para producir un epitelio pigmentario retiniano, que comprende:

(1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor del receptor de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes;

(2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;

(3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado, y

(4) una cuarta etapa de someter el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero o un medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Wnt, un receptor de Wnt, un agonista del receptor de Wnt, un inhibidor de GSK3 β , 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021 y Kenpaulona, además en donde dichos medio libre de suero y medio que contiene suero están libres de una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Sonic hedgehog seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Hedgehog, Shh, un receptor de Shh, un agonista del receptor de Shh, Purmorfamina y SAG.

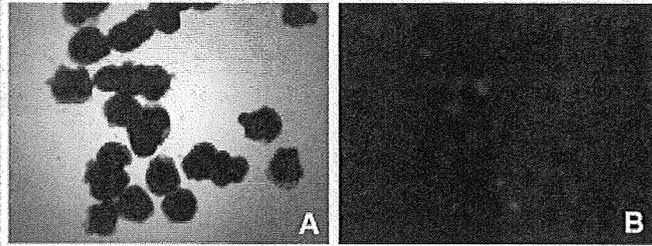
4. El método según la reivindicación 3, en donde dicho medio libre de suero o medio que contiene suero que contiene una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt comprende además una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de la Activina seleccionada de una proteína perteneciente a la familia de la Activina, Activina A, Activina B, Activina C y Activina AB, un receptor de Activina y un agonista del receptor de Activina.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas células madre pluripotentes son células madre pluripotentes de primate.

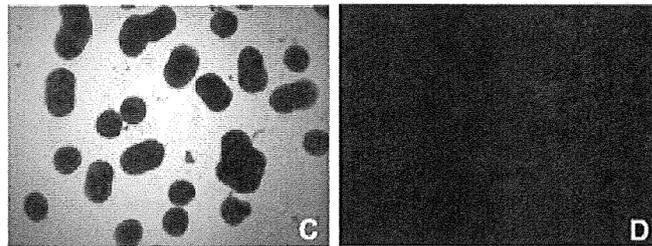
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas células madre pluripotentes son células madre pluripotentes humanas.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha preparación de membranas basales es al menos una molécula de la matriz extracelular seleccionada del grupo consistente en laminina, colágeno de tipo IV, sulfato de heparano proteoglicano y entactina.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichas primera etapa a tercera etapa se realizan en presencia de reemplazo de suero Knockout.
9. Un método para producir una célula neural específica de la capa retiniana, que comprende:
- (1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes de primate a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor del receptor de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes de primate;
- (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;
- (3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado, y
- (4) poner en contacto una célula progenitora de la retina contenida en un tejido retiniano obtenido en la tercera etapa con una sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Notch seleccionada de un anticuerpo Notch, un antagonista de los receptores de Notch, un inhibidor de ADAM y un inhibidor de la gamma secretasa.
10. El método según la reivindicación 9, en donde dicha sustancia inhibidora de la ruta de señalización de Notch es éster t-butilico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina.
11. El método según la reivindicación 9 ó 10, en donde dicho primate es humano.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la célula neural específica de la capa retiniana es un fotorreceptor.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la célula neural específica de la capa retiniana es una célula ganglionar.
14. Un método para producir una célula neural específica de la capa retiniana, que comprende:
- (1) una primera etapa de someter células madre pluripotentes de primate a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la ruta de señalización de Wnt seleccionada de Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor del receptor de Wnt, receptor de Wnt de tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de la caseína quinasa, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolino-8-sulfonamida), D4476 (4-{4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il}benzamida), IWR-1-endo (IWR1e) e IWP-2, para formar un agregado de células madre pluripotentes de primate;
- (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la primera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero que contiene una preparación de membranas basales;
- (3) una tercera etapa de someter el agregado cultivado en la segunda etapa a cultivo de flotación en un medio que contiene suero, permitiendo así que emerjan células progenitoras retinianas en el agregado;
- (4) una cuarta etapa de someter el agregado cultivado en la tercera etapa a cultivo de flotación en un medio libre de suero o medio que contiene suero, conteniendo cada uno una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Sonic hedgehog seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Hedgehog, Shh, un receptor de Shh, un agonista del receptor de Shh, Purmorfamina y SAG, y una sustancia que actúa sobre la ruta de señalización de Wnt seleccionada de una proteína perteneciente a la familia Wnt, un receptor de Wnt, un agonista del receptor de Wnt, un inhibidor de GSK3β, 6-bromindirrubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021 y Kenpaulona, para formar una estructura de tipo copa óptica, y
- (5) una etapa de someter la estructura de tipo copa óptica formada en la cuarta etapa a cultivo de flotación.

FIG.1

sin inhibidor de Wnt
con Matrigel



con inhibidor Nodal
(SB431542)
(sin inhibidor de Wnt)
con Matrigel



con inhibidor de Wnt
con Matrigel

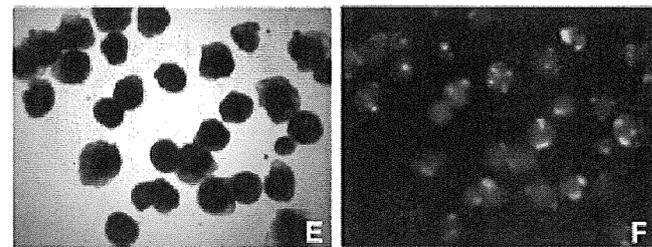


FIG.2

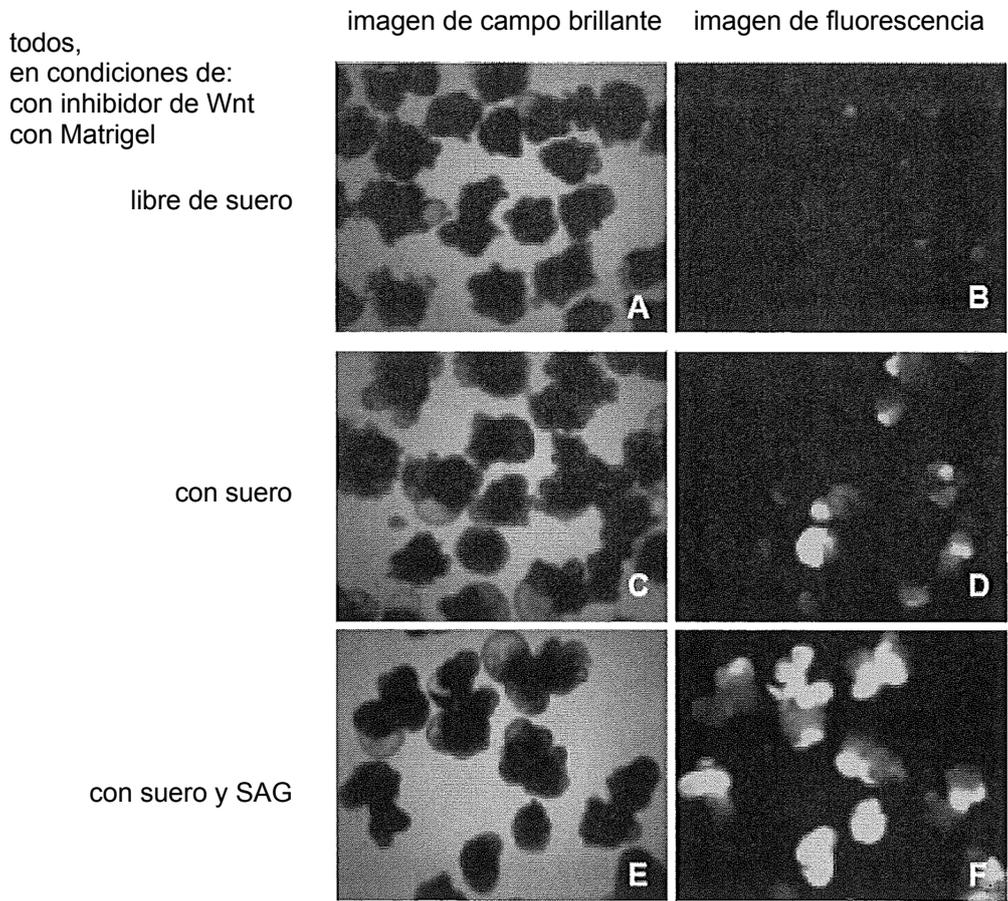


FIG.3

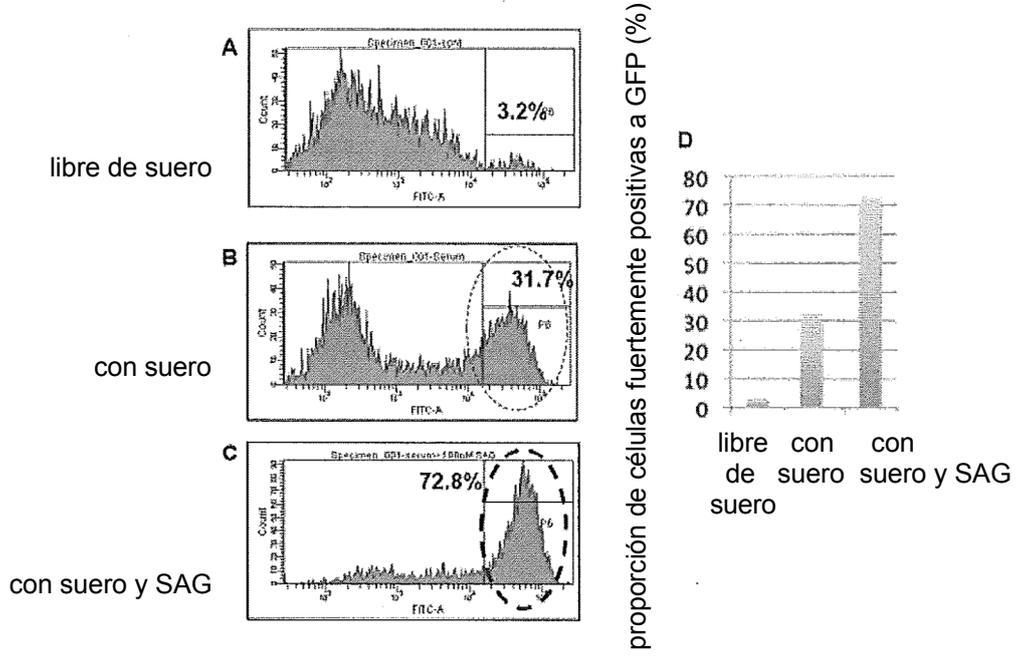


FIG.4

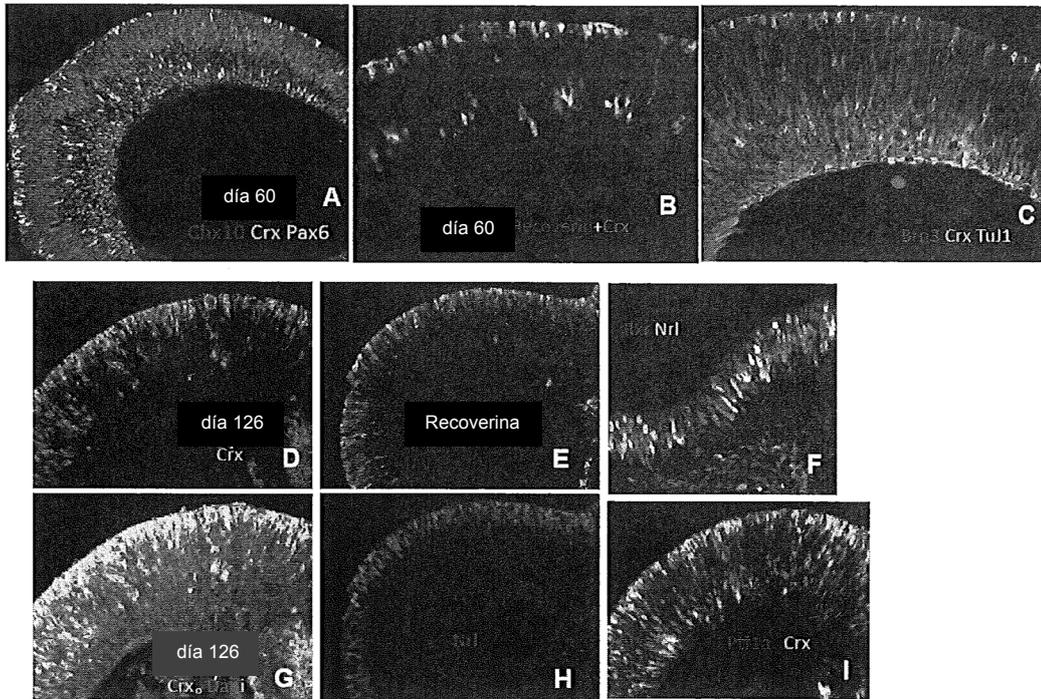


FIG.5

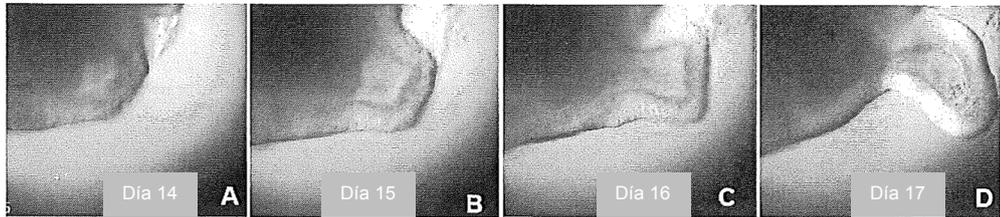


FIG.6

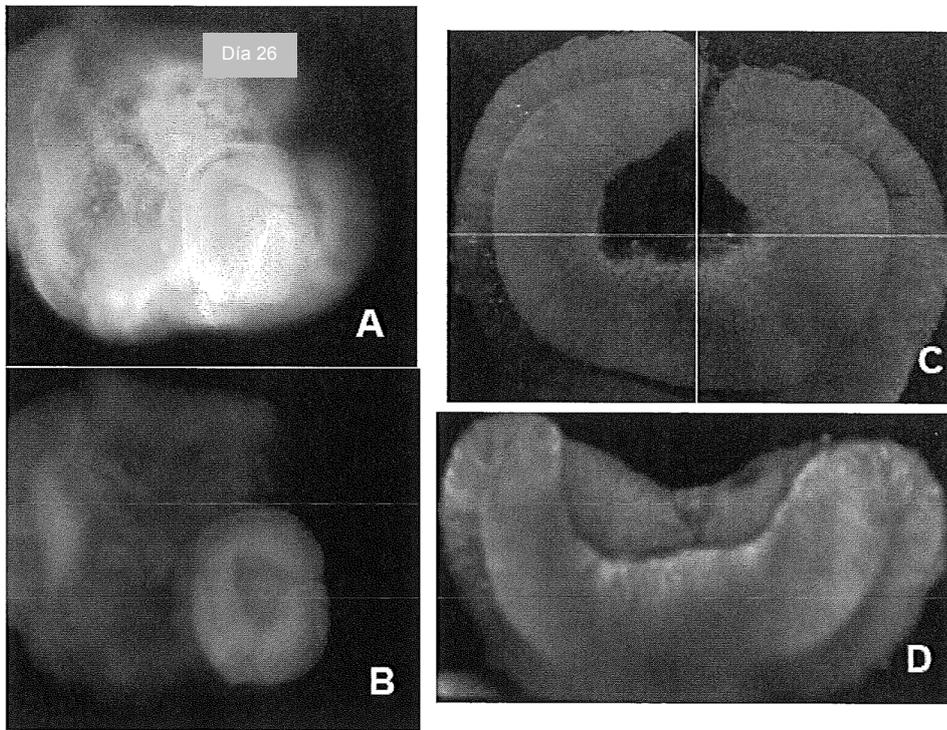


FIG.7

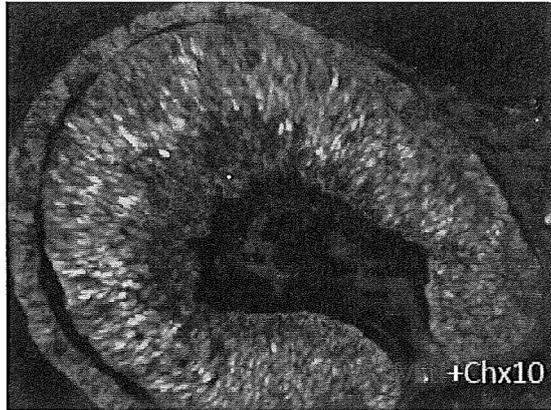


FIG.8

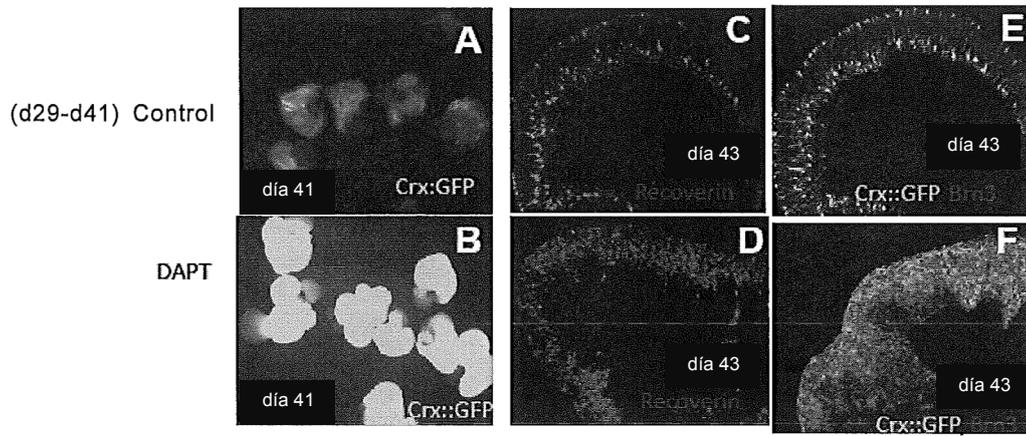


FIG.9

después de congelar-descongelar
tratamiento DAPT de tejido retiniano

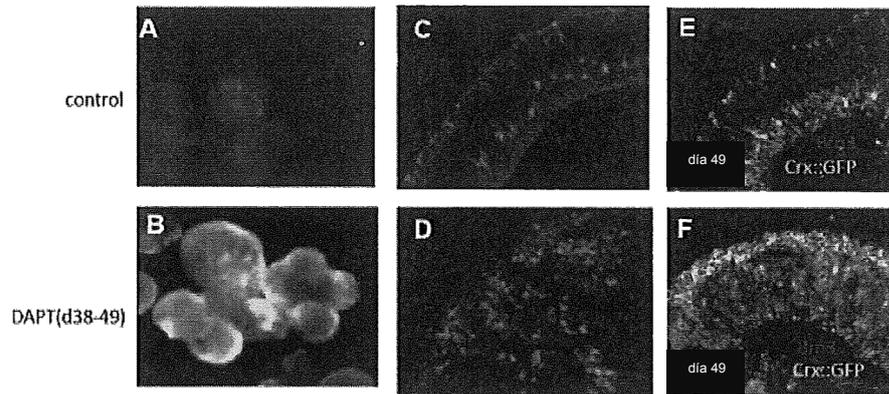


FIG.10

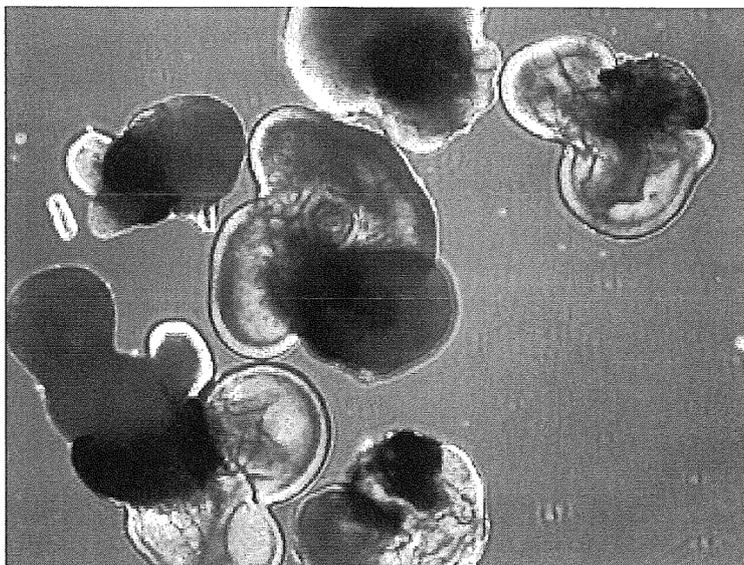


FIG.11

