

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 053**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2014 PCT/JP2014/000527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14119334**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2014 E 14745765 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2952577**

54 Título: **Método para separar células de tejido biológico**

30 Prioridad:

01.02.2013 JP 2013018774

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2019

73 Titular/es:

**TOHOKU UNIVERSITY (33.3%)
2-1-1, Katahira, Aoba-ku
Sendai-shi, Miyagi 980-8577, JP;
MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (33.3%) y
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO
UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND
TECHNOLOGY (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GOTO, MASAFUMI;
MURAYAMA, KAZUTAKA;
YAMAGATA, YOUHEI y
WATANABE, KIMIKO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 736 053 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para separar células de tejido biológico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para separar células de un tejido biológico, y particularmente a un método para separar de manera eficaz y estable células que tienen una alta actividad biológica controlando la cantidad de enzima de degradación de proteínas que va a usarse.

10

Antecedentes de la técnica

El aislamiento enzimático de células o agregados de células (agrupaciones de células), que están presentes en diversos órganos y tejidos tales como hígado, páncreas, riñón, tejido periodontal, piel, cartílago, hueso y tejido nervioso de animales multicelulares tales como mamíferos, aves, reptiles y peces, así como en un tejido de células madre embrionarias y en un tejido de células de fibroblastos que sirve como material para células madre pluripotentes inducibles (células iPS), es útil en una gran variedad de usos que incluyen el trasplante celular, el establecimiento de cepas celulares, la terapia, el diagnóstico y el examen. Por ejemplo, la diabetes se trata mediante un procedimiento médico en el que se aíslan islotes pancreáticos de un páncreas y se trasplantan a un paciente. Para el trasplante de islotes pancreáticos, es esencial separar un agregado celular denominado islotes pancreáticos presente en el tejido pancreático. En este momento, es necesario separar los islotes pancreáticos mediante la degradación del tejido pancreático sin dañar los islotes pancreáticos. Además, la insuficiencia hepática y similares se tratan separando las células hepáticas de un hígado y trasplantándolas a un paciente.

Para disociar un tejido biológico y separar las células o agregados de células contenidos en el tejido biológico, es necesario separar las células o similares a un nivel deseado y separar las células de la otra porción del tejido biológico. Al separar células o similares de un tejido biológico mediante aislamiento enzimático, es necesario tratar la matriz intercelular con una enzima de degradación de proteínas tal como la colagenasa.

Un tejido biológico está constituido por células y matriz intercelular (sustancia intercelular). La sustancia intercelular es una sustancia que ancla células e incluye un material estructural y un material no estructural. Los ejemplos del material estructural incluyen fibras tales como una fibra de colágeno, una fibra elástica y una fibra retiniana fina. Los ejemplos del material no estructural, que es un componente que rellena el espacio entre fibras, denominado sustrato, y se refiere a una sustancia sol o gel, incluyen una proteína de azúcar y un proteoglicano.

Una sustancia intercelular típica es una proteína denominada colágeno que representa aproximadamente 1/3 del peso de proteína total *in vivo*. El colágeno tiene una estructura de fibra y se denomina oficialmente fibra de colágeno o fibra colagenosa.

Los tejidos se clasifican aproximadamente en cuatro categorías: tejido epitelial, tejido de soporte, tejido muscular y tejido nervioso. El tejido epitelial es un tejido que cubre la superficie de un cuerpo u órganos, y consiste en células muy densas sin la sustancia intercelular interpuesta entre ellas. El tejido de soporte, que desempeña un papel en el soporte por ejemplo, cuerpo, órganos y células, incluye un tejido conjuntivo, un tejido cartilaginoso, un tejido óseo, sangre y linfa. El tejido muscular está formado íntegramente de células diferenciadas con el propósito de movimiento de contracción, en el que la razón ocupada por la sustancia intercelular es extremadamente baja. El tejido muscular está constituido por células musculares, un tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y nervios; sin embargo, una estructura importante del mismo es una fibra muscular. El tejido nervioso está constituido principalmente por el endoneuro y el perineuro, cada uno de los cuales contiene una gran cantidad de sustancia intercelular (colágeno).

El tejido conjuntivo, que es un tipo de tejido de soporte, se refiere a un tejido adiposo y a un tejido conectivo fibroso. Como componentes estructurales del tejido conjuntivo fibroso, se mencionan una fibra de colágeno y una fibra elástica. Los tejidos conjuntivos fibrosos se dividen aproximadamente en tejido conjuntivo hidrófobo y tejido conjuntivo denso. El tejido conjuntivo hidrófobo se refiere a un tejido conjuntivo fibroso que tiene fibras de colágeno dispuestas irregularmente en el mismo y distribuidas en, por ejemplo, un tejido subcutáneo, un tejido de membrana mucosa, nervio, adventicia, y un tejido interlobular.

Una cadena peptídica de colágeno tiene característicamente una estructura primaria en la que la glicina aparece repetidamente cada tercer residuo, como "glicina-aminoácido X-aminoácido Y". Se sabe que existen aproximadamente 30 tipos de especies de moléculas en el colágeno humano. El colágeno más abundantemente presente en un cuerpo es colágeno tipo I fibroso. El colágeno IV no fibroso también está contenido en abundancia. Las fibras de colágeno IV están unidas entre sí a través de un enlace disulfuro intermolecular y participan en la formación de un tejido reticular (bibliografía no de patente 1). Se ha informado que el colágeno VI está presente entre los islotes pancreáticos y el tejido endocrino (bibliografías no de patente 2 y 3).

En cuanto a las enzimas para degradar tejido, diversos tipos de colagenasas brutas derivadas de *Clostridium histolyticum* contienen no solo colagenasa sino también diversas proteasas (que tienen actividad de degradación de

colágeno y actividad de degradación de proteínas no específica) y componentes no proteasa (por ejemplo, fosfolipasa). En virtud de la colagenasa bruta, las células y las poblaciones celulares se separan enzimáticamente de casi todos los tejidos biológicos.

5 Se sabe que un tejido de islote pancreático también se degrada por una enzima de degradación de proteínas seleccionada del grupo que consiste en dos tipos de colagenasas (ColG y ColH) derivadas de *Clostridium histolyticum*, una proteasa (termolisina, dispaasa o proteasa neutra (NP) derivadas de *Clostridium histolyticum*) (bibliografías de patente 1 y 2). Por ejemplo, se conoce que se usan preferiblemente dos tipos de colagenasas y una metaloproteasa neutra producida por *Clostridium histolyticum* (bibliografía no de patente 4). En las células que se separan enzimáticamente o similares de un tejido biológico, se informa que dos tipos de colagenasas desempeñan funciones importantes para lograr el rendimiento y mantener la actividad biológica de las células o similares que van a separarse (bibliografía no de patente 5).

15 También se informa que el número de islotes pancreáticos separados de un páncreas humano aumenta en proporción a la actividad de degradación del clorhidrato de éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE), que presenta una mezcla de enzimas (bibliografía de patente 1 y bibliografía no de patente 6). Como enzima que tiene una actividad de degradación de BAEE, se conoce clostripaína (CP) producida por *Clostridium histolyticum*.

20 El estado de la matriz intercelular en un tejido biológico (particularmente, el contenido de colágeno) varía dependiendo de la especie de organismo, edad, sexo, tejido, entorno de vida, etc. Todavía no se ha dilucidado cuánto colágeno está contenido en qué estado de la matriz de qué tejido. El colágeno está presente en una gran variedad de especies, desde mamíferos hasta peces, y aún no se ha dilucidado la diferencia en el colágeno constituyente entre especies.

25 Parece posible que se determine si un tipo específico de colágeno está presente o no en la matriz de un tejido biológico mediante tinción inmunológica usando anticuerpos contra tipos individuales de colágenos. Sin embargo, dado que muchos tipos de colágeno están presentes, y los colágenos están presentes en una gran variedad de animales multicelulares, es difícil producir anticuerpos. Debido a estos problemas, es difícil realizar la identificación del tipo específico de colágeno.

30

Lista de referencias

Bibliografía de patentes

35 Bibliografía de patente 1: Publicación internacional nº. 1996/00283

Bibliografía de patente 2: Publicación internacional nº. 1998/24889

Bibliografía no de patentes

40

Bibliografía no de patente 1: Inoue *et al.*, J Cell Biol, 97, 1524-1539 (1983)

Bibliografía no de patente 2: SJ Hughes, P McShane, Transplant Proceedings, 37, 3444-34445 (2005)

45 Bibliografía no de patente 3: SJ Hughes, A Clark, P McShane, Transplantation, 81(3) 423-426 (2006)

Bibliografía no de patente 4: E Linetsky *et al.*, Diabetes, 46, 1120-1123 (1997)

50

Bibliografía no de patente 5: D Brandhorst *et al.*, Transplantation Proceedings, 37(8), 3450-3451 (2005)

Bibliografía no de patente 6: H Brandhorst *et al.*, Transplantation, 87(3), 370-375 (2009)

Sumario de la invención

55 Problema técnico

Al separar las células o agregados de células de un tejido biológico, no es fácil degradar solamente diversas proteínas estructurales que constituyen la matriz intercelular del tejido biológico y los órganos con una enzima de degradación de proteínas sin degradar y dañar la superficie de las células diana o similares que van a separarse. Tal como se describió anteriormente, el estado (particularmente, el contenido de colágeno) de la matriz intercelular en un tejido biológico varía dependiendo de la especie de organismo, edad, sexo, tejido, entorno de vida, etc. Particularmente, el colágeno cambia significativamente las propiedades físicas según el envejecimiento.

65 Se sabe que un órgano humano actúa de forma diferente en respuesta a una enzima de degradación de proteínas dependiendo de por ejemplo, la edad, el sexo, el hábito y los antecedentes médicos; sin embargo, hasta ahora no se ha desarrollado un medio para determinar el tipo y la cantidad de enzima de degradación de proteínas óptima. En la

presente situación, el aislamiento tenía que realizarse mediante la determinación empírica del tipo de enzima y del tiempo de reacción de la misma. Los islotes pancreáticos se separan según un protocolo, más específicamente, el trabajador médico trata un páncreas con una cantidad predeterminada de enzima solo variando el tiempo de degradación mientras controla visualmente el grado de degradación del páncreas. Por esta razón, la cantidad y la calidad de los islotes pancreáticos que van a obtenerse varían de forma inevitable dependiendo del estado de un páncreas diana.

En vista de la circunstancia anterior, un objeto principal de la presente invención es proporcionar un método de separación de células mediante el cual las células que tienen una alta actividad biológica pueden separarse de manera eficaz y estable de un tejido biológico.

Solución al problema

Para resolver los problemas mencionados anteriormente, la presente invención proporciona los siguientes métodos:

[1] Un método para separar islotes pancreáticos de un tejido pancreático, usando una composición de enzima de degradación, que se prepara añadiendo colagenasa H y colagenasa G derivadas de *Clostridium sp.* en una cantidad suficiente para degradar el colágeno I y/o el colágeno III, y según la composición de colágeno I y/o de colágeno III del tejido pancreático, a una cantidad predeterminada de una proteasa neutra y/o una proteasa derivada de *Clostridium sp.*, en el que la colagenasa H degrada el colágeno I y el colágeno III, y en el que la razón en peso (H/G) de colagenasa H y colagenasa G en la composición de la enzima de degradación es 0,35 o más.

[2] El método según [1], en el que la proteasa neutra es termolisina o una proteasa neutra derivada de *Clostridium sp.*

[3] El método según [2], en el que la composición de enzima de degradación contiene termolisina 0,3 mg/10 ml, colagenasa G 2 mg/10 ml y colagenasa H 1,1 mg/10 ml.

[4] El método según [2], en el que la composición de enzima de degradación contiene termolisina 0,3 mg/10 ml, colagenasa G 8,4 mg/10 ml y colagenasa H 2,9 mg/10 ml.

[5] El método según [1], en el que la composición de enzima de degradación contiene una proteasa neutra derivada de *Clostridium sp.*, como la proteasa neutra, y una proteasa que tiene actividad de degradación del clorhidrato de éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE), como la proteasa derivada de *Clostridium sp.*

También se divulgan los siguientes métodos:

[1] Un método para separar células de un tejido biológico, usando una composición de enzima de degradación, que se prepara añadiendo una enzima para degradar una proteína principal del tejido biológico en una cantidad determinada dependiendo de la composición de la proteína principal a una cantidad predeterminada de una proteasa neutra y/o una proteasa derivada de *Clostridium sp.*

[2] El método según [1], que incluye una etapa para determinar la composición de la proteína principal del tejido biológico; una etapa para preparar una composición de enzima de degradación añadiendo una enzima para degradar la proteína principal en una cantidad determinada dependiendo de la composición determinada a la cantidad predeterminada de una proteasa neutra y/o una proteasa derivada de *Clostridium sp.*; y una etapa para tratar el tejido biológico con la composición de enzima de degradación preparada.

Según este método, el tipo y la cantidad de enzima de degradación de proteínas que van a usarse para aislar células puede determinarse basándose en la composición de la proteína principal de un tejido biológico. Por tanto, las células que tienen una alta actividad biológica pueden separarse de manera eficaz controlando la cantidad de enzima de degradación de proteínas que va a usarse.

[3] El método según [1] ó [2], en el que la enzima para degradar la proteína principal es colagenasa H y/o colagenasa G de *Clostridium sp.*

[4] El método según cualquiera de [1] a [3], en el que la proteína principal es colágeno I y/o colágeno III.

[5] El método según [4], en el que la razón de cantidad de colagenasa H y/o colagenasa G que va a añadirse a la composición de enzima de degradación se determina según la composición de colágeno I y/o colágeno III.

[6] El método según cualquiera de [1] a [5], en el que la proteasa neutra es termolisina o una proteasa neutra derivada de *Clostridium sp.*

[7] El método según cualquiera de [1] a [6], en el que la proteasa derivada de *Clostridium sp.* es una proteasa que tiene una actividad de degradación del clorhidrato de éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE).

[8] El método según cualquiera de [1] a [7], en el que la composición de proteína del tejido biológico se determina mediante un inmunoensayo enzimático.

5 [9] Un método para separar islotes pancreáticos de un tejido pancreático, usando una composición de enzima de degradación, que se prepara añadiendo colagenasa H y/o colagenasa G derivadas de *Clostridium sp.* en una cantidad suficiente para degradar colágeno I y/o colágeno III y según una composición de colágeno I y/o colágeno III del tejido pancreático, a una cantidad predeterminada de una proteasa neutra y/o una proteasa derivada de *Clostridium sp.*

10 [10] El método según [9], en el que la razón en peso (H/G) de colagenasa H y colagenasa G en la composición de enzima de degradación es 0,35 o más.

15 [11] El método según [9] ó [10], en el que la composición de enzima de degradación contiene una proteasa neutra derivada de *Clostridium sp.* como la proteasa neutra, y una proteasa que tiene una actividad de degradación del clorhidrato de éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE) como la proteasa derivada de *Clostridium sp.*

20 [12] Un método para separar células hepáticas de un tejido hepático, usando una composición de enzima de degradación, que se prepara añadiendo colagenasa H y/o colagenasa G de *Clostridium sp.* en una cantidad suficiente para degradar colágeno I y/o colágeno III y según una composición de colágeno I y/o colágeno III del tejido hepático, a una cantidad predeterminada de una proteasa neutra y/o una proteasa derivada de *Clostridium sp.*

25 [13] El método según [11], en el que la razón en peso (H/G) de colagenasa H y colagenasa G en la composición de enzima de degradación es 0,25 o menos.

[14] Un método para separar islotes pancreáticos de un tejido pancreático, usando una composición de enzima de degradación que contiene una proteasa neutra derivada de *Clostridium sp.* y una proteasa que tiene una actividad de degradación del clorhidrato de éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE).

30 [15] El método según [14], en el que la proteasa que tiene la actividad de degradación de BAEE es clostripaína.

35 En la presente divulgación, el “tejido biológico” incluye, pero no se limita particularmente a, diversos órganos y tejidos de animales multicelulares tales como mamíferos, aves, reptiles y peces. Los ejemplos de los mismos pueden incluir hígado, páncreas, riñón, tejido periodontal, piel, cartílago, hueso y tejido nervioso. Además, un tejido de células madre embrionarias y un tejido de células de fibroblastos que sirven como material para células madre pluripotentes inducibles (células iPS) se incluyen en el “tejido biológico”.

40 Las “células” incluyen células y agregados de células, y pueden incluirse todos los tipos de células presentes en los tejidos biológicos anteriores. Los ejemplos de las “células” pueden incluir hepatocitos, islotes pancreáticos y glomérulos.

Efectos ventajosos de la invención

45 Debido a la presente invención, se proporciona un método para separar células de manera eficaz y estable que tienen una alta actividad biológica de un tejido biológico.

Breve descripción de los dibujos

50 [Figura 1] La figura 1 es un gráfico que muestra el rendimiento de los islotes pancreáticos (ejemplo de referencia 1).

[Figura 2] La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de medición del valor de ADP/ATP de los islotes pancreáticos separados (ejemplo de referencia 1).

55 [Figura 3] La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de medición del valor de ATP/ADN de los islotes pancreáticos separados (ejemplo de referencia 1).

[Figura 4] La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de medición del valor de insulina/ADN de los islotes pancreáticos separados (ejemplo de referencia 1).

60 [Figura 5] La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de evaluación del índice de estimulación de los islotes pancreáticos separados en la prueba SGS (ejemplo de referencia 1).

[Figura 6] La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de medición de la cantidad de TMPP unida al colágeno I y al colágeno III degradados por la colagenasa H (ejemplo de referencia 2).

65

Descripción de las realizaciones

Ahora, se describirá a continuación una realización preferida para llevar a cabo la presente invención. Obsérvese que la realización descrita a continuación es una realización típica de la presente invención y no debe interpretarse como limitante del alcance de la presente invención.

5 Los presentes inventores encontraron que, de diversas enzimas de degradación de colágeno, la colagenasa H (ColH) es una enzima muy importante para degradar un tejido biológico (véase el ejemplo de referencia 1 descrito más adelante). Dado que se ha considerado en la técnica que la colagenasa G (ColG) es más importante para
10 degradar un tejido biológico (véanse la bibliografía de patentes y bibliografía no de patentes en la sección anterior), el hallazgo es una cuestión de sorpresa. Los presentes inventores también han encontrado que ColH degrada el colágeno I y el colágeno III, que son proteínas principales en un tejido biológico (véase el ejemplo de referencia 2 descrito más adelante).

15 Los presentes inventores también han revelado que si se mide la abundancia de colágeno I y colágeno III, las cuales son proteínas principales que ColH degrada, en un tejido biológico, la cantidad de enzima de degradación de proteínas usada adecuadamente para separar células del tejido biológico puede determinarse previamente, con los resultados de que las células pueden separarse sin ser excesivamente dañadas (véase el ejemplo 1). Los presentes inventores además han encontrado que una proteasa neutra (NP) de *Clostridium sp.* que sirve como una proteasa neutra y una proteasa que tiene una actividad de degradación de BAAE trabajan de manera sinérgica para mejorar
20 la eficacia de la separación de islotes pancreáticos de un tejido pancreático (véase el ejemplo 2).

De esta manera, se concibió un método para separar células de un tejido biológico usando una composición de enzima de degradación, que se prepara añadiendo una enzima de degradación de proteínas principal del tejido biológico en una cantidad determinada dependiendo de la composición de la proteína principal. Según el método
25 para separar células, es posible determinar el tipo y la cantidad de enzima de degradación de proteínas que va a usarse para aislar células basándose en la composición de la proteína principal del tejido biológico. Por tanto, las células que tienen una alta actividad biológica pueden separarse de forma eficaz mientras se reduce la cantidad de enzima de degradación de proteínas que va a usarse.

30 [Proteína principal]

En el método para separar células según la presente invención, la proteína principal es una proteína que constituye una matriz intercelular y posiblemente puede variar dependiendo del tejido biológico diana. Los ejemplos de colágeno incluyen colágeno I, colágeno II, colágeno III, colágeno IV, colágeno V, laminina, fibronectina y vitronectina.
35 Por ejemplo, cuando las células se separan de un tejido pancreático y un tejido hepático, la proteína principal preferiblemente incluye colágeno I y colágeno III.

[Composición de la proteína principal]

40 En el método para separar células según la presente invención, la composición de la proteína principal se refiere a la razón de la proteína principal en las proteínas que constituyen la matriz intercelular o la cantidad de las mismas. Cuando las células se separan de un tejido pancreático y un tejido hepático, la composición de proteína principal se refiere a las razones o cantidades de colágeno I, colágeno II, colágeno III, colágeno IV, colágeno V, colágeno VI, laminina, fibronectina y vitronectina; y particularmente se refiere a las razones o cantidades de colágeno I y colágeno
45 III.

La composición de la proteína principal puede determinarse mediante inmunoensayo enzimático usando un anticuerpo específico contra la proteína principal y un péptido inhibidor específico de la misma. Más específicamente, un anticuerpo marcado o un péptido inhibidor se deja reaccionar con un corte de tejido biológico,
50 por ejemplo, mediante un enfoque inmunohistológico. A continuación, se verifica visualmente la intensidad de una señal del marcador adherido al anticuerpo o péptido inhibidor unido a la proteína principal mediante observación con un microscopio o se detecta mediante un aparato. De esta manera, se cuantifica la proteína principal y se determina la composición. La composición de la proteína principal también puede determinarse rápidamente mediante por ejemplo, una reacción de sedimentación en gel, inmunolectroforesis, un método inmuno-turbidimétrico o un
55 inmunoensayo enzimático usando un anticuerpo.

[Enzima de degradación de proteínas principal]

60 En el método para separar células divulgado en el presente documento, una enzima de degradación de proteínas principal puede variar posiblemente dependiendo del tejido biológico diana. Cuando las células se separan de un tejido pancreático y un tejido hepático, las enzimas de degradación para una proteína principal son ColH y ColG. Cuando los islotes pancreáticos de un tejido de islote pancreático, la ColH es importante como una enzima de degradación de proteínas principal; mientras que cuando las células hepáticas se separan de un tejido hepático, la ColG es importante como una enzima de degradación de proteínas principal.

65 [Composición de la enzima de degradación]

La composición de enzima de degradación que va a usarse se prepara preferiblemente añadiendo la enzima de degradación de proteínas principal mencionada anteriormente a una cantidad predeterminada de una proteasa neutra y/o una proteasa derivada de *Clostridium sp.*

5 Como la proteasa neutra, por ejemplo, se menciona termolisina o una proteasa neutra (NP) derivada de *Clostridium sp.*

10 Como la proteasa derivada de *Clostridium sp.*, se menciona una proteasa que tiene una actividad de degradación del clorhidrato de éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE). La proteasa que tiene una actividad de degradación de BAEE es preferiblemente clostripaína (CP). Dado que la cepa de *Clostridium sp.* produce diversos tipos de proteasas, se usa deseablemente una enzima producida como una proteína recombinante como la proteasa derivada de la cepa de *Clostridium sp.*

15 La composición de enzima de degradación que va a usarse para separar islotes pancreáticos de un tejido pancreático preferiblemente contiene tanto una proteasa neutra (NP) derivada de *Clostridium sp.* como una proteasa neutra, como una proteasa que tiene una actividad de degradación de BAEE como la proteasa derivada de *Clostridium sp.* La NP y la proteasa que tiene una actividad de degradación de BAEE trabajan de manera sinérgica para ejercer un efecto de aumento del número de islotes pancreáticos que van a separarse de un tejido pancreático.

20 La cantidad de una proteasa neutra y/o una proteasa derivada de *Clostridium sp.* en una composición de enzima de degradación, la cual no se limita particularmente, es, por ejemplo, de 0,3 a 0,5 mg por composición (10 ml). Obsérvese que el contenido de la enzima en una composición de enzima de degradación también puede controlarse adecuadamente según el peso del tejido biológico diana que va a tratarse.

25 La cantidad de enzima de degradación de proteínas principal añadida a una composición de enzima de degradación se determina basándose en la composición de la proteína principal mencionada anteriormente. Más específicamente, la cantidad de enzima de degradación de proteínas principal se determina basándose en la razón o cantidad de proteína principal en las proteínas que constituyen la matriz intercelular. Más específicamente, por ejemplo, si las proteínas que constituyen la matriz intercelular son colágeno III y colágeno I, las cantidades de ColH y ColG que van a usarse se determinan basándose en las razones o cantidades de colágeno III y colágeno I. En particular, favorablemente, las razones de la cantidad de ColH y ColG que va a usarse en la composición de enzima de degradación se determinan basándose en las razones o cantidades de colágeno III y colágeno I.

35 Cuando los islotes pancreáticos se separan de un tejido pancreático en el que las razones de colágeno III y colágeno I en las proteínas que constituyen la matriz intercelular son altas (las cantidades son grandes), la cantidad de ColH que va a usarse es preferiblemente 0,35 veces o más tan grande como la de colagenasa G. Obsérvese que los islotes pancreáticos puede separarse usando una composición de enzima de degradación que contiene solo colagenasa H (de colagenasa G y colagenasa H) aunque la eficacia de separación disminuye. Por el contrario, se divulga que, cuando las células hepáticas se separan de un tejido hepático en el que el contenido de colágeno III y colágeno I es pequeño, la cantidad de ColH que va a usarse es preferiblemente 0,25 veces o menos tan pequeña como la de colagenasa G.

45 Por ejemplo, cuando los islotes pancreáticos se separan de un tejido pancreático, puede prepararse una composición de enzima de degradación añadiendo, a termolisina (0,3 mg), ColG (2 mg) y ColH (1,1 mg) de alta pureza (0,55 veces tan grande como colagenasa G) producida por recombinación por composición (10 ml). Además, se divulga que, cuando las células hepáticas se separan de un tejido hepático, puede prepararse una composición de enzima de degradación añadiendo, a termolisina (0,5 mg), ColG (14,4 mg) y ColH (3,6 mg) de alta pureza (0,25 veces tan grande como colagenasa G) por composición (10 ml).

50 [Tratamiento enzimático]

Un tejido biológico puede tratarse con una composición de enzima de degradación de la misma manera que en un método convencional. La composición de enzima de degradación contiene una enzima de degradación de proteínas principal en una cantidad (la cantidad mínima requerida) requerida para la degradación del tejido biológico basándose en la composición de la proteína principal del tejido biológico. Por tanto, las células deseadas pueden separarse de un tejido biológico sin producir un problema tal como una reducción de la actividad fisiológica de las células separadas, y una reducción del rendimiento provocada por un contenido de enzima excesivo o insuficiente en una composición de enzima de degradación.

60 Tal como se describió anteriormente, según el método para separar células según la presente invención, las células que tienen una alta actividad biológica pueden separarse de manera eficaz y estable de un tejido biológico mediante la determinación de la composición de la proteína principal en un tejido biológico y preparando una composición de enzima de degradación añadiendo la enzima para degradar la proteína principal en una cantidad requerida. En resumen, según este método, las células de alta calidad pueden separarse con un alto rendimiento aplicando un tratamiento enzimático óptimo a cualquier tejido biológico diana.

65

Ejemplos

<Ejemplo de referencia 1: Identificación de la enzima de degradación de proteínas principal que va a usarse en la separación de células o similares de tejido biológico>

5 [Identificación de la enzima para su uso en la separación de islotes pancreáticos del tejido pancreático de rata]

10 Se usó una rata Lewis macho (de 10 a 13 semanas de edad). Antes de extirpar el páncreas, se sujetó el duodeno. Se inyectó a través del conducto biliar una composición de enzima de degradación (10 ml, solución salina equilibrada de Hank fría (HBSS)), la cual contiene al menos una de las enzimas de degradación de proteínas: colagenasa G (8,4 mg) y colagenasa H (2,9 mg) recombinantes, y una proteasa neutra: termolisina (0,3 mg). Después de realizar un tratamiento a 37°C durante 14 minutos, se realizó una centrifugación en gradiente de densidad para obtener una fracción de islotes pancreáticos.

15 Se evaluaron el caso (grupo GH) en el que se añadieron simultáneamente termolisina, colagenasa G y colagenasa H, el caso (G grupo) en el que se añadieron termolisina y colagenasa G solo, y el caso (grupo H) en el que se añadieron termolisina y colagenasa H solo, para determinar el rendimiento y la actividad biológica de islotes pancreáticos. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 5. En la prueba SGS (Figura 5), se obtuvo la razón de volumen de insulina secretada en el momento de la exposición a glucosa de alta concentración (16,7 mM) e insulina secretada en el momento de la exposición a glucosa de baja concentración (1,67 mM) y se usó como índice de estimulación para la evaluación.

20 Tal como se muestra en la figura 1, el rendimiento del islote pancreático (equivalentes de islote (IEQ)) del grupo H fue el 70% del del grupo GH. Por el contrario, en el grupo G, no se separó ninguno de los islotes pancreáticos fueron. Tal como es evidente a partir del valor de ADP/ATP de islotes pancreáticos (figura 2), del valor de ATP/ADN de los mismos (figura 3), del valor de insulina/ADN de los mismos (figura 4) y del índice de estimulación (figura 5) en la prueba SGS, los islotes pancreáticos obtenidos en el grupo H presentaban la misma actividad fisiológica que aquellos de los islotes pancreáticos obtenidos en el grupo GH. A partir de estos resultados, se identificó la colagenasa H como la enzima de degradación de proteínas principal que va a usarse en la separación de islotes pancreáticos de un tejido pancreático.

25 [Identificación de la enzima para su uso en la separación células hepáticas de tejido hepático de rata]

35 Se preparó una composición de enzima de degradación (10 ml, HBSS), la cual contiene al menos una de las enzimas de degradación de proteínas: colagenasa G (14,4 mg) y colagenasa H (3,6 mg) recombinantes, y una proteasa neutra: termolisina (0,5 mg). Se trató el tejido hepático (de 10 a 12 g) con la composición de enzima de degradación preparada a 37°C durante 7 minutos y luego se sometió a centrifugación en gradiente de densidad para separar las células hepáticas.

40 En el caso (grupo GH) en el que se usó una composición de enzima de degradación preparada mezclando colagenasa G y colagenasa H con termolisina, se separaron ventajosamente $5,02 \pm 2,11 \times 10^8$ células hepáticas. En el caso (grupo G) en el que se usó una composición de enzima de degradación preparada añadiendo colagenasa G a termolisina, se separaron ventajosamente $0,81 \pm 0,11 \times 10^6$ células hepáticas. Por el contrario, en el caso (grupo H) en el que se usó una composición de enzima de degradación preparada añadiendo colagenasa H a termolisina, las células hepáticas no pudieron separarse. A partir de estos resultados, se identificó la colagenasa G como la enzima de degradación de proteínas principal que va a usarse en la separación de células hepáticas de un tejido hepático.

45 <Ejemplo de referencia 2: Identificación del sustrato para la enzima de degradación de proteínas principal>

50 [Identificación del sustrato para colagenasa H]

55 Se trataron las porciones de tejido pancreático (100 mg) de una rata Lewis con HEPES 20 mM (pH 8,0) que contiene un cóctel inhibidor de proteasa (Roche) y CaCl_2 1 mM a 37°C durante la noche. Después de eso, se lavaron las porciones de tejido con un tampón y se sometieron a degradación enzimática con un tampón que contiene colagenasa H (0,1 mg/ml) durante 10 horas a 37°C.

60 Después de la degradación enzimática, se realizó la incubación en acetonitrilo al 50% que contiene TMPP 100 mM (Sigma-Aldrich) (10 μ l) durante 30 minutos. Luego, se realizó la precipitación de acetona con acetona fría y después se realizó la centrifugación. Se secó el precipitado resultante y se digirió con tripsina (10 μ l/mg) en una disolución de carbonato de amonio 100 mM, durante la noche.

65 Después de tratar el digesto con ZipTip (Millipore), se eluyeron los péptidos resultantes por gradiente de concentración con el 2,5-40% de acetonitrilo en ácido fórmico al 10% y se sometieron a análisis de masas mediante un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Terumo Fisher Scientific Inc). Se buscó la base de datos usando el programa MASCOT software 1.

Usando el marcador TMPP unido al extremo N-terminal de la proteína escindida (fragmento) como índice, puede identificarse qué proteína se degrada por la colagenasa H. La figura 6 muestra la razón de modificación de TMPP de fragmentos de colágeno I y de colágeno III escindidos con colagenasa H. En la figura, los datos relativos al colágeno III se representaron dentro del círculo de línea de puntos superior; mientras que los datos relativos al colágeno I se representaron dentro del círculo de línea de puntos inferior.

Se reveló que la colagenasa H degrada el 70% de colágeno III y el 20% de colágeno I. Por esto, se demostró que las proteínas principales, es decir, los sustratos para colagenasa H, son colágeno III y colágeno I.

<Ejemplo 1: Separación de células dependiendo de la composición de proteína principal del tejido biológico>

[Cuantificación de colágeno III y colágeno I en tejido pancreático y tejido hepático de rata]

Se prepararon porciones de tejido de una rata Lewis (de 10 a 13 semanas de edad). Se realizó un inmunoensayo enzimático usando anticuerpos marcados (Chemicon Merck Millipore) contra colágeno III y colágeno I para comprar la expresión de colágeno III y colágeno I en el tejido pancreático y en el tejido hepático. Como resultado, el número de tinción positiva obtenido mediante la inmunohistotinción de colágeno III y colágeno I en el tejido hepático fue significativamente menor que en el tejido pancreático.

[Separación de células de tejido pancreático y tejido hepático de rata]

Se predijo que la proteína principal de un tejido hepático puede ser una proteína distinta del colágeno III y del colágeno I, y por tanto la cantidad de colagenasa H en la composición de enzima de degradación para la separación de células hepáticas puede ser baja en comparación con la separación de islotes pancreáticos.

Se trató un tejido hepático (de 10 a 12 g) con una composición de enzima de degradación (10 ml de HBSS) que contiene enzima de degradación de proteínas: termolisina (0,5 mg), colagenasa G (14,4 mg) y colagenasa H (3,6 mg, que es 0,25 veces tan grande como colagenasa G) recombinantes a 37°C durante 7 minutos y luego se sometió a centrifugación en gradiente de densidad. Se separaron las células hepáticas ($5,02 \pm 2,11 \times 10^8$) favorablemente.

Se inyectó una composición de enzima de degradación (10 ml de HBSS) que contiene enzima de degradación de proteínas: termolisina (0,3 mg), colagenasa G (8,4 mg) y colagenasa H (2,9 mg, que es 0,35 veces tan grande como colagenasa G) recombinante, a través del conducto biliar y se realizó el tratamiento a 37°C durante 14 minutos, y luego, se realizó la centrifugación en gradiente de densidad. Se separaron los islotes pancreáticos (aproximadamente 4000 islotes) favorablemente.

Se encontró que, en la separación de islotes pancreáticos de un tejido pancreático donde las razones de colágeno III y colágeno I en proteínas que constituyen la matriz intercelular son altas (las cantidades son grandes), se usa preferiblemente una composición de enzima de degradación que contiene una cantidad mayor de colagenasa H (0,35 veces tan grande como colagenasa G); por el contrario, en la separación de células hepáticas de un tejido hepático en el que el contenido de colágeno III y colágeno I es pequeño, se usa preferiblemente una composición de enzima de degradación que contiene una cantidad relativamente pequeña de colagenasa H (0,25 veces tan grande como colagenasa G). Al medir previamente las razones o cantidades de proteínas principales (colágeno III y colágeno I) en proteínas que constituyen la matriz intercelular de un tejido, se determinó ventajosamente la cantidad de enzima de degradación de proteínas usada de forma adecuada para separar células del tejido, más específicamente, la razón de cantidad de colagenasa H y colagenasa G que va a usarse.

<Ejemplo 2: Efecto sinérgico de NP y CP en la separación de islotes pancreáticos de tejido de islote pancreático>

Se preparó una composición de enzima de degradación que contiene, además de colagenasa G (8,4 mg) y colagenasa H (2,9 mg), una o dos cualesquiera de termolisina, proteasa neutra (NP) derivada de *Clostridium sp.* y clostripaína (CP) en diversas cantidades que van a añadirse. Se separaron los islotes pancreáticos del tejido del islote pancreático usando la composición de enzima de degradación preparada de la misma manera que en el ejemplo de referencia 1, y se compararon los números de islotes pancreáticos.

Se obtuvieron NP y CP introduciendo un gen NP o un gen CP derivados de *Clostridium histolyticum* en *Bacillus subtilis* y expresándolos, seguido de una purificación y luego usándolos.

En el caso en el que se usó una composición de enzima de degradación que contiene NP y el caso en el que se usó una composición de enzima de degradación que contiene termolisina y CP, el número de islotes pancreáticos separados disminuyó en comparación con el caso en el que se usó una composición de enzima de degradación que contiene termolisina. Por el contrario, en el caso en el que se usó una composición de enzima de degradación que contiene NP y CP, el número de islotes pancreáticos separados aumentó significativamente en comparación con el caso en el que se usó una composición de enzima de degradación que contiene termolisina. Además, en el caso en

el que se usó una composición de enzima de degradación que contiene NP y CP, se encontró que el número de islotes pancreáticos separados aumentaba dependiendo de las cantidades de NP y CP usadas.

- 5 A partir de estos resultados, se reveló que la proteasa neutra (NP) derivada de *Clostridium sp.* y la proteasa (CP) que tiene una actividad de degradación de BAEE trabajan de manera sinérgica para ejercer un efecto de aumentar el número de islotes pancreáticos que van a separarse de un tejido de islote pancreático.

Aplicabilidad industrial

- 10 Según el método para separar células de la presente invención, las células que tienen una alta actividad biológica pueden separarse de manera eficaz y estable de un tejido biológico. Por consiguiente, el método para separar células es útil en una gran variedad de usos tales como el trasplante celular, el establecimiento de cepas celulares, la terapia, el diagnóstico y el examen de una enfermedad causada por células específicas.
- 15 Además, si se identifican sustratos específicos para componentes enzimáticos individuales presentes en un tejido y se preparan en forma de un kit, la separación celular puede optimizarse para el tejido del donante individual de manera personalizada. En la separación de islotes pancreáticos realizada hasta ahora en la técnica, debe aplicarse una herramienta que tiene una composición prefijada a diversos tejidos pancreáticos de donantes totalmente diferentes en composición de matriz. Sin embargo, si se preparan componentes enzimáticos muy puros, seguros y estables mediante la introducción de biotecnología y se identifican sustratos específicos para los componentes enzimáticos presentes en un tejido pancreático y se preparan en forma de un kit, los islotes pancreáticos que pueden adaptarse al páncreas de un donante pueden separarse de manera personalizada.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Método para separar islotes pancreáticos de un tejido pancreático, usando una composición de enzima de degradación, que se prepara añadiendo colagenasa H y colagenasa G derivada de *Clostridium sp.* en una cantidad suficiente para degradar colágeno I y/o colágeno III y según la composición de colágeno I y/o colágeno III del tejido pancreático, a una cantidad predeterminada de una proteasa neutra y/o una proteasa derivada de *Clostridium sp.*,
- 5
- en el que la colagenasa H degrada el colágeno I y el colágeno III, y
- 10
- en el que la razón en peso (H/G) de colagenasa H y colagenasa G en la composición de enzima de degradación es 0,35 o más.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteasa neutra es termolisina o una proteasa neutra derivada de *Clostridium sp.*
- 15
3. Método según la reivindicación 2, en el que la composición de enzima de degradación contiene termolisina 0,3 mg/10 ml, colagenasa G 2 mg/10 ml y colagenasa H 1,1 mg/10 ml.
- 20
4. Método según la reivindicación 2, en el que la composición de enzima de degradación contiene termolisina 0,3 mg/10 ml, colagenasa G 8,4 mg/10 ml y colagenasa H 2,9 mg/10 ml.
5. Método según la reivindicación 1, en el que la composición de enzima de degradación contiene una proteasa neutra derivada de *Clostridium sp.*, como la proteasa neutra, y una proteasa que tiene una actividad de degradación del clorhidrato de éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE), como la proteasa derivada de *Clostridium sp.*
- 25

FIG. 1

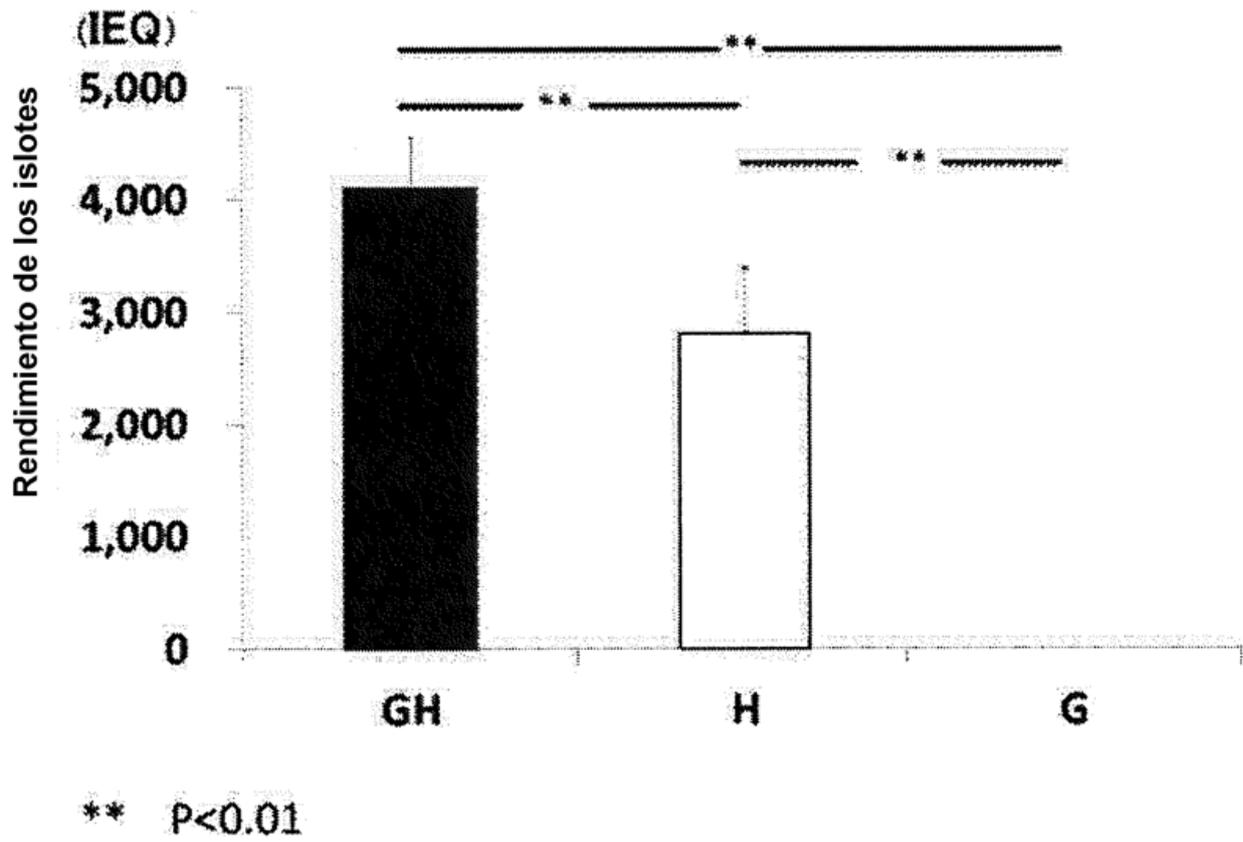


FIG. 2

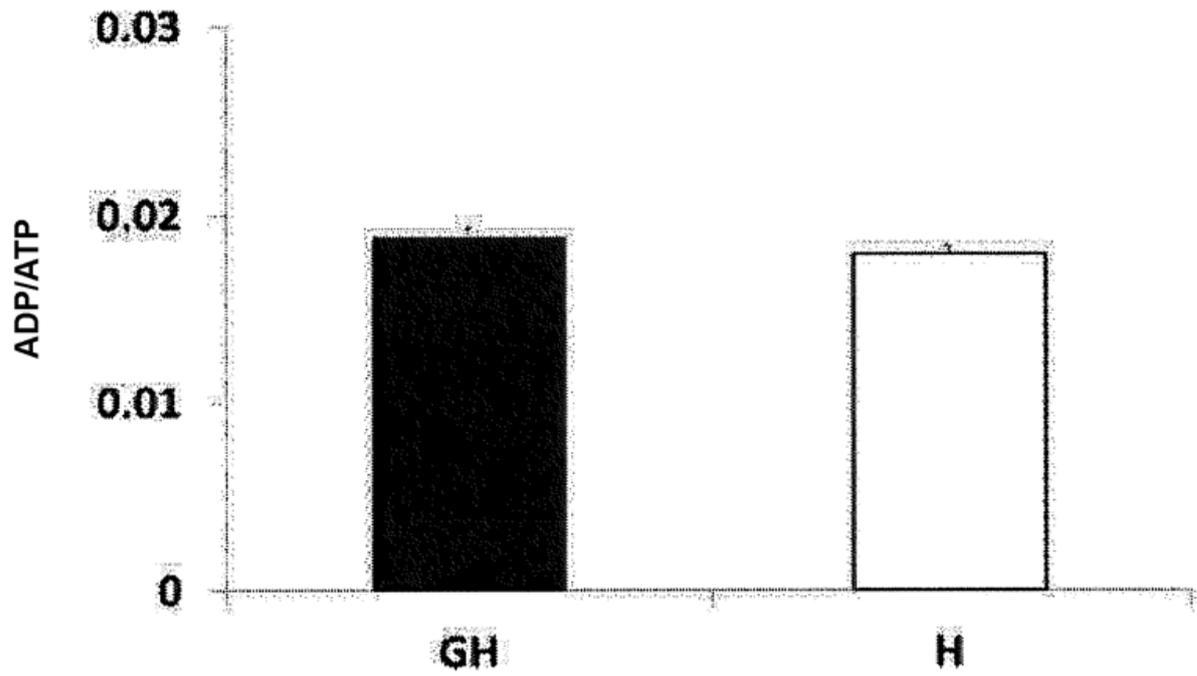


FIG. 3

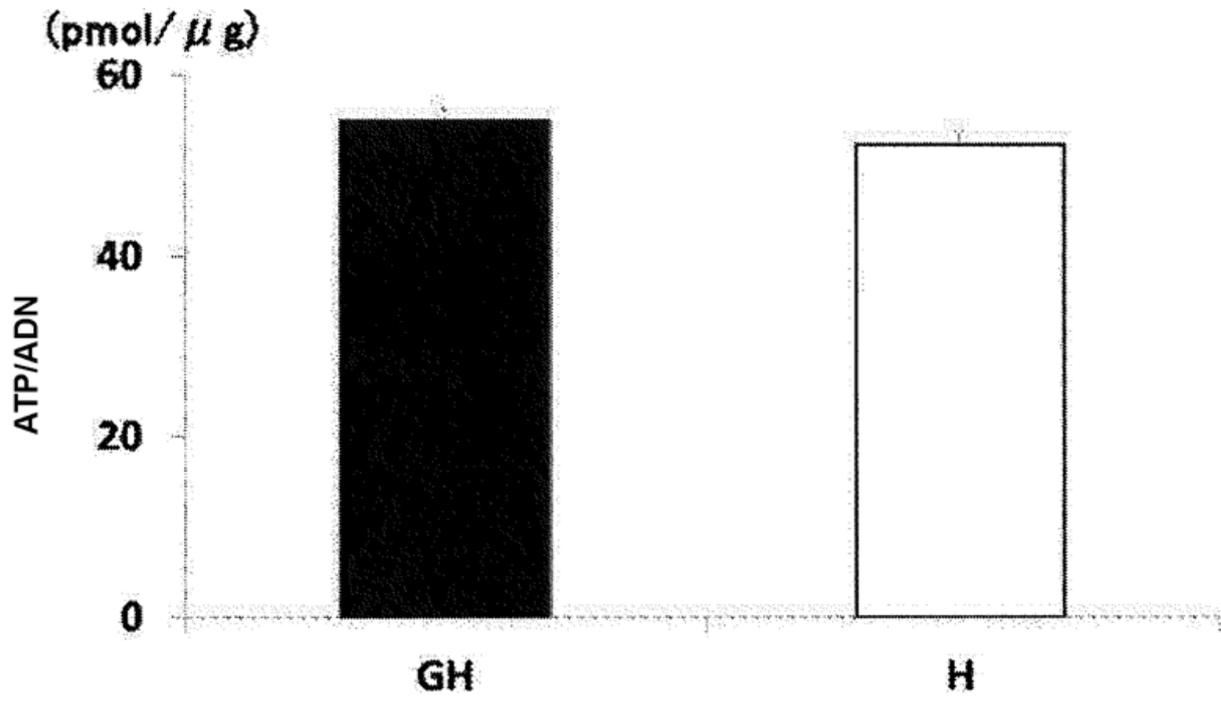


FIG. 4

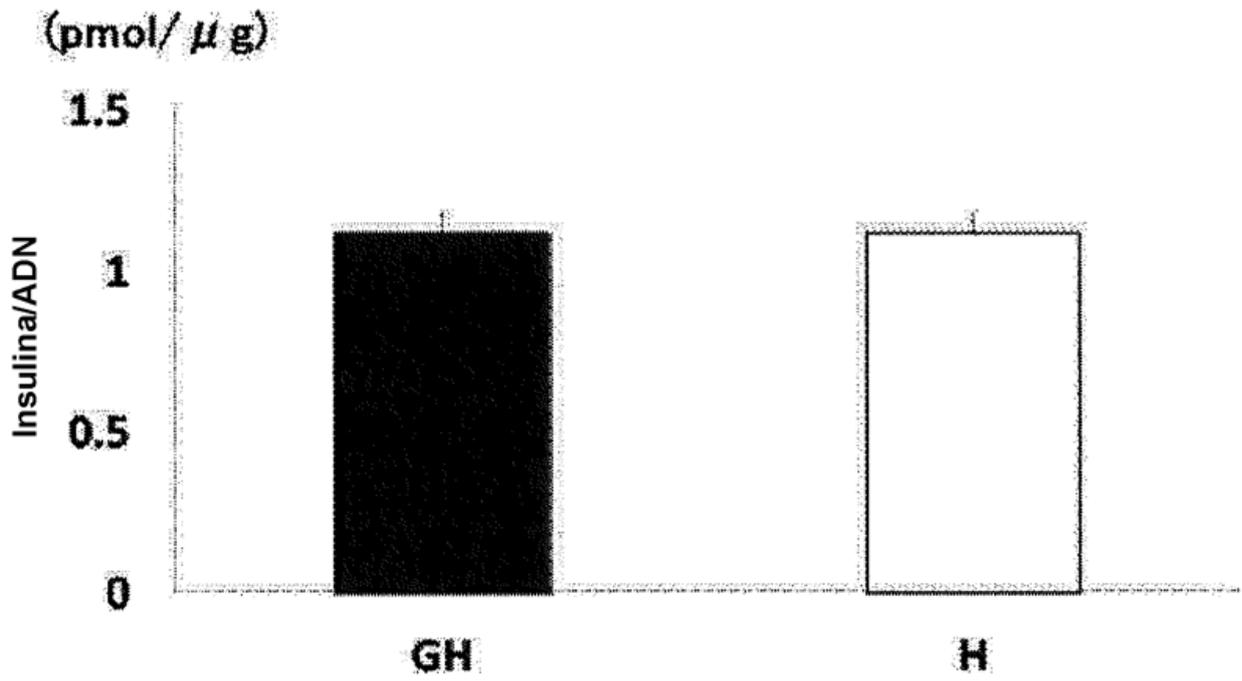


FIG. 5

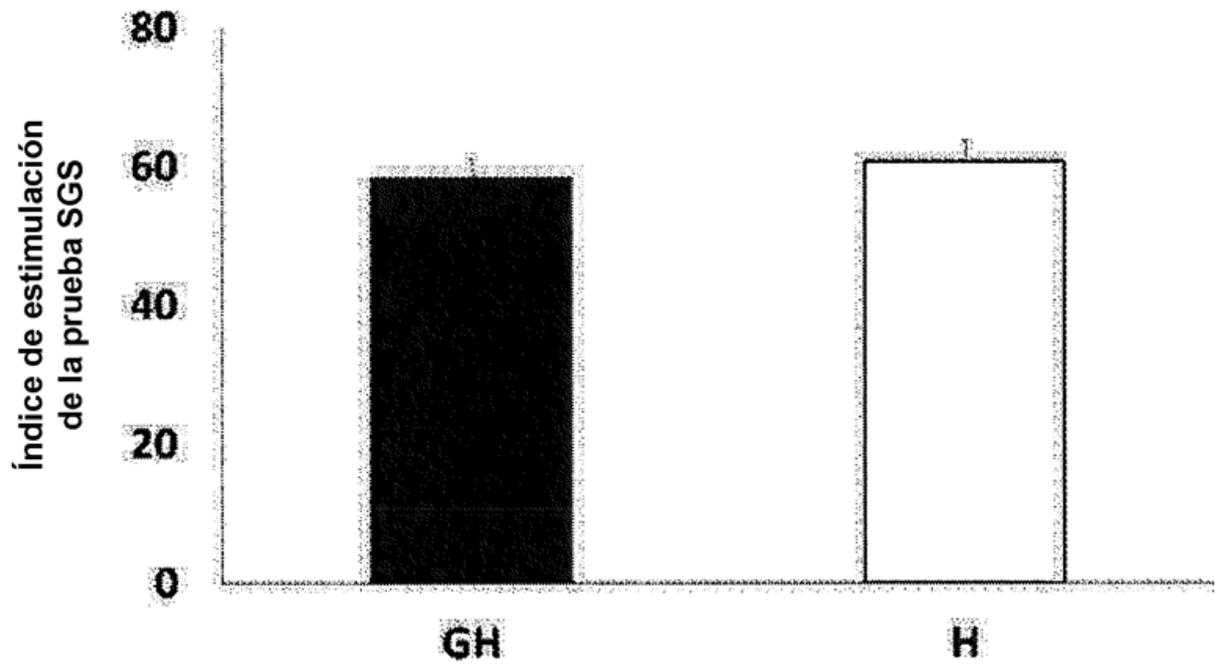


FIG. 6

