

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 309**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071	(2010.01)	A61L 27/38	(2006.01)
A61K 35/44	(2015.01)		
A61L 27/00	(2006.01)		
A61P 27/02	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
A61K 35/30	(2015.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61L 27/36	(2006.01)		
G01N 33/50	(2006.01)		
C12N 5/079	(2010.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2014 PCT/JP2014/077602**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15087614**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2014 E 14869571 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3081637**

54 Título: **Método para fabricar una estructura semejante a zona marginal ciliar**

30 Prioridad:

11.12.2013 JP 2013255836

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

10.02.2020

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:

**KUWAHARA, ATSUSHI y
SASAI, YOSHIKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 741 309 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 fabricar una estructura semejante a zona marginal ciliar

5 Campo técnico

La presente invención está relacionada con un método para producir una estructura semejante a zona marginal ciliar, etc.

Antecedentes de la técnica

10 Se sabe que la zona marginal ciliar (CMZ, del inglés *ciliary marginal zone*) de la retina in vivo realiza importantes funciones para la formación estructural y el mantenimiento de tejidos retinales (véase, por ejemplo, documento no de patente 1) y, por ejemplo, se conoce gen *Rdh10* (documento no de patente 2) y gen *Otx1* (documento no de patente 1) como marcadores de genes de la zona marginal ciliar.

15 [Lista de documentos]

[documentos no de patente]

documento no de patente 1: DEVELOPMENTAL DYNAMICS, volumen: 239, páginas: 2066-2077 (2010)

documento no de patente 2: Development, volumen: 136, páginas: 1823-1833 (2009)

20

[COMPENDIO DE LA INVENCION]

[Problemas a resolver por la Invención]

25 Ha existido el deseo de desarrollar un método para producir con alta eficiencia una estructura semejante a zona marginal ciliar. Medios para resolver los problemas

La presente invención proporciona un método para producir una estructura semejante a zona marginal ciliar a partir de un agregado celular que comprende un tejido retinal, etc.

30 Específicamente, la presente invención proporciona:

1. un método para producir un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar, que comprende una etapa de cultivar un agregado celular que es preparado de una célula madre pluripotente y que comprende un tejido retinal en el que hay presentes células positivas *Chx10* en una proporción del 20 % o más y el 100 % o menos del tejido en un medio libre de suero o medio que contiene suero, que contienen, cada uno, una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal *Wnt* que puede mejorar la transducción de señal mediada por *Wnt* y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal *FGF* únicamente durante un periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen *RPE65*, seguida por cultivar el "agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen *RPE65*" resultante en un medio libre de suero o medio que contiene suero, cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal *Wnt* (más adelante en esta memoria, a veces se le hace referencia como el método de producción de la presente invención);

35

2. el método de producción del 1 mencionado anteriormente, en donde el agregado celular resultante en el que no aparece una célula que expresa el gen *RPE65* es un agregado celular en el que hay presentes células positivas *Chx10* en el tejido retinal en una proporción dentro del 30 % al 0 % del tejido;

40

3. el método de producción del 1 o 2 mencionados anteriormente, en donde el "agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen *RPE65*" resultante se cultiva en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal *Wnt* hasta que la proporción de células positivas *Chx10* presentes en el tejido retinal alcanza el 30 % o más del tejido;

50

4. el método de producción según 1 a 3 mencionados anteriormente, en donde el agregado celular se prepara de una célula madre pluripotente y que comprende un tejido retinal en el que hay presentes células positivas *Chx10* en una proporción del 20 % o más y el 100 % o menos del tejido es un agregado celular que se prepara mediante el método que comprende las siguientes etapas (A) y (B):

55

(A) una etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo flotante en un medio libre de suero para formar un agregado de células madre pluripotentes, y

(B) una etapa de realizar cultivo flotante del agregado formado en la etapa (A) en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que puede mejorar la transducción de señal mediada por *Sonic hedgehog* y que contiene una sustancia que puede mejorar la transducción de señal mediada por *BMP* para dar un agregado celular que comprende una célula progenitora retinal;

60

5. el método de producción según el 4 mencionado anteriormente, en donde la sustancia que puede mejorar la transducción de señal mediada por *BMP* se selecciona de un grupo que consiste en proteínas *BMP*, *BMP2*, *BMP4*, *BMP7*, proteínas *GDF*, *GDF7*, anticuerpo de receptores anti-*BMP* y péptido parcial *BMP*.

65

6. el método de producción de uno cualquiera del 1 a 5 mencionados anteriormente, en donde el tejido retinal se deriva de una célula madre pluripotente humana;
7. el método de producción según el 1 a 6 mencionados anteriormente, en donde la sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt que puede mejorar la transducción de señal mediada por Wnt es una proteína perteneciente a la familia Wnt, receptor Wnt, agonista de receptores Wnt, o inhibidor GSK3p.
8. el método de producción según el 1 a 7 mencionados anteriormente, en donde la sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt que puede mejorar la transducción de señal mediada por Wnt es CHIR99021.
9. el método de producción según el 1 a 8 mencionados anteriormente, en donde la sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF es un receptor FGF, inhibidor de receptores FGF, sustancia inhibidora de cascada de quinasa MAP, inhibidor de quinasa PI3, o inhibidor de Akt.
10. el método de producción según el 1 a 9 mencionados anteriormente, en donde la sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF es SU5402.
11. el método de producción según el 1 a 10 mencionados anteriormente, en donde el periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65 es en menos de 14 días.
12. el método de producción según el 1 a 11 mencionados anteriormente, en donde el periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65 es menos de 3 días a 6 días.
13. un método para producir un tejido retinal, que comprende producir un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar mediante el método de producción según una cualquiera del 1 a 12 mencionados anteriormente, y cortar físicamente un tejido retinal del agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar producido así.

Efecto de la Invención

Según el método de producción de la presente invención, se puede producir con alta eficiencia una estructura semejante a zona marginal ciliar. En un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar producida mediante el método de producción de la presente invención, la estructura semejante a zona marginal ciliar funciona como zona de progreso, y se puede formar con alta frecuencia una retina neural continua que tiene una estructura de capa adyacente a la estructura semejante a zona marginal ciliar.

[Breve descripción de los dibujos]

La figura 1 muestra imágenes teñidas de una criosección de agregados celulares que contienen un tejido retinal (el día 18 desde el inicio del cultivo flotante). "A" es una imagen de fluorescencia GFP de célula que expresa el gen Rax, "B" es una imagen inmunoteñida de la célula positiva Chx10, y "C" es una imagen teñida DAPI del núcleo celular.

La figura 2 muestra imágenes teñidas de una criosección de agregados celulares obtenidos por cultivo flotante de agregados celulares que contienen un tejido retinal (el día 18 desde el inicio del cultivo flotante) en un medio de suero libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 6 días, es decir, hasta el día 24 desde el inicio del cultivo flotante (A,B), o 17 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante (C,D). "A" y "C" muestran imágenes inmunoteñidas de células positivas Chx10, y "B" y "D" muestran imágenes inmunoteñidas de células positivas MITF.

La figura 3 muestra imágenes teñidas de una criosección de agregados celulares obtenidos por cultivo flotante de agregados celulares que contienen un tejido retinal (el día 18 desde el inicio del cultivo flotante) en un medio libre de suero que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 6 días, es decir, hasta el día 24 desde el inicio del cultivo flotante (A,B), y un agregado celular obtenido por cultivo flotante adicional del agregado celular mencionado anteriormente (el día 24 desde el inicio del cultivo flotante) en un medio que contiene suero que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y libre de una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 11 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante (C,D). "A" y "C" son imágenes inmunoteñidas de células positivas Chx10, y "B" y "D" son imágenes inmunoteñidas de células positivas MITF.

La figura 4 muestra imágenes teñidas de una criosección de agregados celulares obtenidos por cultivo flotante de agregados celulares que contienen un tejido retinal (el día 18 desde el inicio del cultivo flotante) en un medio libre de suero que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 6 días, es decir, hasta el día 24 desde el inicio del cultivo flotante (A,B), y un agregado celular obtenido por cultivo flotante adicional del agregado celular mencionado anteriormente (el día 24 desde el inicio del cultivo flotante) en un medio que contiene suero libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y de una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 11 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante (C,D). "A" y "C" son imágenes inmunoteñidas de células positivas Chx10, y "B" y "D" son imágenes inmunoteñidas de células positivas MITF.

La figura 5 muestra imágenes teñidas de una criosección de agregados celulares obtenidos por cultivo flotante de agregados celulares que contienen un tejido retinal (el día 18 desde el inicio del cultivo flotante) en un medio libre de suero que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 6 días, y cultivo flotante adicional en un suero que contiene medio libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe

la trayectoria de señal FGF durante 39 días, es decir, hasta el día 63 desde el inicio del cultivo flotante. "A"(Rx) es una imagen de fluorescencia GFP de célula que expresa el gen Rax, "B" es una imagen inmunoteñida de célula positiva Otx1, y "C" es una imagen inmunoteñida de célula positiva Rdh10.

La figura 6 es una gráfica que muestra la proporción de un agregado celular que contiene retina neural sola (gráfica de barras grises), proporción de un agregado celular que contiene retina neural formada continuamente a partir de la estructura semejante a zona marginal ciliar (gráfica de barras negras), y proporción de un agregado celular libre de retina neural y que contiene epitelio de pigmento retinal y otros tejidos (gráfica de barras blancas), en agregados celulares el día 35 desde el inicio del cultivo flotante, que fueron obtenidos por cultivo flotante de agregados celulares que contienen un tejido retinal (el día 18 desde el inicio del cultivo flotante) en las tres condiciones (A,B,C) descritas en el Ejemplo 4.

La figura 7 muestra imágenes teñidas de una criosección de agregados celulares obtenidos por cultivo flotante de agregados celulares que contienen un tejido retinal (el día 18 desde el inicio del cultivo flotante) en un medio libre de suero que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 6 días, es decir, hasta el día 24 desde el inicio del cultivo flotante (A,B). "A" es una imagen teñida DAPI del núcleo celular, y "B" es una imagen inmunoteñida de célula positiva RPE65.

Descripción de realizaciones

El modo para llevar a cabo la presente invención se explica en detalle más adelante.

En la presente invención, ejemplos de la "célula madre" incluyen una célula que mantiene la misma capacidad de diferenciación incluso tras división celular y puede regenerar un tejido cuando está lesionado. Aquí, la "célula madre" puede ser una célula madre embrionaria no humana (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 las mismas. Como se aprecia del hecho de que la célula tisular derivada de célula madre puede regenerar un tejido, se sabe que la célula madre puede diferenciarse en una célula normal cerca de una en un cuerpo vivo.

Ejemplos de la "célula madre pluripotente" en la presente invención incluyen una célula madre que se puede cultivar in vitro y tiene capacidad de diferenciarse en cualquier célula (tejido derivado de triploblasto (ectodermo, mesodermo, endodermo)) que constituye un cuerpo vivo excepto por placenta (pluripotencia), que incluye una célula madre embrionaria no humana (célula ES). La "célula madre pluripotente" se obtiene de huevo fertilizado no humano, embrión de clon no humano, célula madre reproductiva y célula madre en un tejido. También incluye una célula que tiene pluripotencia inducida similar a la de células madre embrionarias, tras introducir varias clases de genes en una célula somática (también llamada célula madre pluripotente artificial). Célula madre pluripotente se puede producir mediante un método conocido per se. Ejemplos del método de producción de la célula madre pluripotente incluyen los métodos descritos en Cell 131(5) págs. 861-872 (2007), Cell 126(4) págs. 663-676 (2006), etc.

Ejemplos de la "célula madre embrionaria (célula ES)" incluyen una célula madre que tiene capacidad de auto-replicación y multipotencia (particularmente, "pluripotencia"), que es una célula madre pluripotente derivada de un embrión prematuro. Célula madre embrionaria se estableció por primera vez en 1981, y también se ha aplicado a la generación de ratón knockout desde 1989. En 1998 se estableció una célula madre embrionaria humana de referencia, que también se está utilizando para medicina regenerativa.

Ejemplos de la "célula madre pluripotente artificial" en la presente invención incluyen una célula inducida para tener pluripotencia al reprogramar directamente una célula diferenciada tal como fibroblasto etc. por la expresión de varias clases de genes tales como Oct3/4, Sox2, Klf4, y Myc, que fue establecido por el grupo de Yamanaka, en célula de ratón en 2006 (Takahashi K y Yamanaka S. Cell. 2006, 126(4), págs. 663-676). En 2007, la célula madre pluripotente artificial también fue establecida en fibroblasto humano, y tiene pluripotencia similar a la de células madre embrionarias (Cell, 2007, 131(5), págs. 861-872; Science, 2007, 318(5858), págs. 1917-1920; Nat Biotechnol., 2008, 26(1), págs. 101-106).

Células madre pluripotentes están disponibles de organizaciones dadas, o se puede adquirir un producto disponible comercialmente. Por ejemplo, células madre embrionarias humanas de referencia, KhES-1, KhES-2 y KhES-3, están disponibles en el Institute for Frontier Medical Sciences de la Universidad de Kioto. Célula EB5, que es una célula madre embrionaria de ratón, está disponible en Incorporated Administrative Agency RIKEN, y línea de célula D3 está disponible en ATCC, respectivamente.

Célula madre pluripotente se puede mantener mediante cultivo según un método conocido per se. Por ejemplo, célula madre humana puede ser mantenida mediante cultivo usando sustitución de suero Knockout™ (KSR). Por ejemplo, célula madre de ratón puede ser mantenida mediante cultivo con adición de suero bobino fetal (FBS) y un factor inhibidor de leucemia (LIF), y sin célula alimentadora.

Ejemplos del "agregado" en la presente invención incluyen una masa de las células dispersadas en el medio pero

reunidas para formar el mismo. El "agregado" en la presente invención incluye un agregado formado por las células dispersadas en el inicio del cultivo flotante y un agregado ya formado en el inicio del cultivo flotante.

5 Cuando se reúnen células para formar agregados celulares y los agregados se someten a cultivo flotante, "formar agregado" significa "agregar rápidamente un número dado de células madre dispersadas" para formar agregados celulares cualitativamente uniformes. Por ejemplo, cuando células madre pluripotentes se reúnen rápidamente para permitir la formación de un agregado de las células madre pluripotentes, se puede formar una estructura semejante a epitelio con buena reproducibilidad en las células inducidas para diferenciarse del agregado formado.

10 Ejemplos de la operación experimental para formar un agregado incluyen un método que implica mantener las células en un espacio pequeño usando una placa con pocetas pequeñas (placa de 96 pocetas), microporo, etc., un método que implica agregar células por centrifugación durante poco tiempo usando un pequeño tubo de centrifugación, etc.

15 Ejemplos del "tejido" en la presente invención incluyen una estructura de una población celular, que tiene una conformación en donde más de un tipo de célula diferente en forma y propiedad se configuran estéricamente en un patrón dado.

20 En la presente invención, ejemplos del "tejido retinal" incluyen un tejido retinal etc. en donde al menos dos o más tipos de células tales como fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrina, células de ganglión retinales, sus células progenitoras, células progenitoras retinales de las mismas, etc., que constituyen capas retinales respectivas en retina in vivo, se disponen estéricamente en capas. Con relación a cada célula, qué célula constituye qué capa retinal puede ser confirmado por un método conocido, por ejemplo, presencia o ausencia de la expresión de un marcador de célula o el nivel del mismo, etc.

25 Como "tejido retinal" en la presente invención, también se puede mencionar un tejido epitelial que contiene una célula progenitora retinal o progenitor retinal neural, que se puede formar sobre una superficie de un agregado celular de células madre pluripotentes por cultivo flotante del agregado en condiciones adecuadas para diferenciación hasta retina.

30 La "capa retinal" en la presente invención significa cada capa que constituye la retina. Ejemplos específicos de los mismos incluyen capa epitelial de pigmento retinal, capa fotorreceptora, membrana limitadora externa, capa nuclear exterior, capa plexiforme exterior, capa nuclear interior, capa plexiforme interior, capa celular de ganglión, capa de fibra nerviosa y membrana limitadora interior.

35 Como "célula progenitora retinal" en la presente invención, se puede mencionar una célula progenitora que puede diferenciarse hasta cualquier célula de retina madura que constituye la retina neural y el epitelio de pigmento retinal.

40 Como "progenitor retinal neural", se puede mencionar una célula progenitora que es una célula destinada a formar una capa interior de la copa óptica y que puede diferenciarse hasta cualquier célula madura que constituya la retina neural.

45 Ejemplos del marcador de célula retinal incluyen Rax y PAX6 expresados en célula progenitora retinal, Chx10 expresado en célula progenitora retinal neural, Nkx2.1 expresado en célula progenitora de neurona de hipotálamo pero no expresado en célula progenitora retinal, Sox1 expresado en neuroepitelio de hipotálamo pero no expresado en retina, Crx expresado en célula progenitora de célula fotorreceptora, etc. Ejemplos del marcador de la neurona específica de capa incluyen Chx10 y L7 expresado en célula bipolar, TUJI y Brn3 expresado en célula de ganglión, Calretinina expresada en célula amacrina, Calbindina expresada en célula horizontal, Rhodopsin y Recoverin expresados en célula fotorreceptora, RPE65 y Mitf expresados en célula de epitelio de pigmento, Nrl expresado en bastón, Rxr-gamma expresado en célula de cono, etc.

50 Ejemplos de la "zona marginal ciliar (CMZ)" en la presente invención incluyen un tejido presente en la región fronteriza de tejido retinal (específicamente, retina neural) y epitelio de pigmento retinal en la retina in vivo, que es una región que incluye una célula madre tisular de retina (célula madre retinal). Zona marginal ciliar también se llama margen ciliar o margen retinal, y la zona marginal ciliar, margen ciliar y margen retinal son tejidos equivalentes. Se sabe que la zona marginal ciliar juega un papel importante en el suministro de células progenitoras retinales y células diferenciadas a tejidos retinales, mantenimiento de estructura tisular retinal, etc. Ejemplos del gen marcador de la zona marginal ciliar incluyen gen Rdh10 (positivo), gen Otx1 (positivo), etc.

55 Ejemplos de la "zona de progreso" en la presente invención incluyen una población de células no diferenciadas localizada en una parte de un tejido, y ejemplos del mismo incluyen una población de células que tiene propiedades para crecer continuamente en el proceso de desarrollo y regeneración para contribuir al crecimiento de un tejido como conjunto y/o propiedades para contribuir al crecimiento de los tejidos circundantes al secretar un factor de crecimiento etc. Ejemplos específicos de la zona de progreso incluyen una población de células no diferenciadas en la punta de un brote de extremidad.

El "medio" que va a ser usado en la presente invención se puede preparar de un medio usado para cultivo de célula animal como medio basal. Ejemplos del medio basal incluyen medios que se pueden usar para cultivar células animales tales como medio BME, medio BGJb, medio CMRL1066, medio Glasgow MEM, medio mejorado Opción MEM Cinc, medio IMDM, medio Medium199, medio Eagle MEM, medio α MEM, medio DMEM, medio de jamón, medio F-12, medio DMEM/F-12, medio RPMI1640, medio de Fischer, y medio mezclado de los mismos, etc.

Ejemplos del "medio libre de suero" en la presente invención incluyen un medio libre de suero no ajustado o no purificado. En la presente invención, un medio que contiene componentes derivados de sangre purificada y componentes derivados de tejido animal (p. ej., factor de crecimiento) también se incluyen en un medio libre de suero a menos que en el mismo esté contenido suero no ajustado o no purificado.

El medio libre de suero puede contener una sustitución de suero. Ejemplos de la sustitución de suero incluyen albumina, transferrina, ácido graso, precursor de colágeno, elemento de rastro, 2-mercaptoetanol o 3' tioglicerol, uno que contiene apropiadamente equivalentes de estos, etc. Tal sustitución de suero puede ser preparada, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento WO98/30679 etc. Adicionalmente, la sustitución de suero puede ser un producto disponible comercialmente. Ejemplos de tal sustitución de suero disponible comercialmente incluyen sustitución de suero Knockout™ (Invitrogen: más adelante en esta memoria a veces se indicará como KSR), Concentrado de Lípido Definido Químicamente (fabricado por Gibco) y Glutamax (fabricado por Gibco).

El "medio libre de suero" que va a ser usado para cultivo flotante puede contener ácido graso, lípido, aminoácido (p. ej., aminoácido no esencial), vitamina, factor de crecimiento, citoquina, antioxidante, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agente tampón, sales inorgánicas, etc.

Para evitar una preparación complicada, un medio libre de suero (medio de GMEM o DMEM, suplementado con mezcla de 0,1 mM de 2-mercaptoetanol, 0,1 mM de aminoácido no esencial y 1 mM de piruvato de sodio; o una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM suplementado con 450 μ M de 1-monotioglicerol etc.) suplementado con una cantidad apropiada (p. ej., aproximadamente 1-aproximadamente 20 %) de KSR disponible comercialmente se puede mencionar preferiblemente como medio libre de suero.

Ejemplos del "medio que contiene suero" en la presente invención incluyen un medio que contiene suero no ajustado o no purificado. El medio puede contener ácido graso, lípido, aminoácido (p. ej., aminoácido no esencial), vitamina, factor de crecimiento, citoquina, antioxidante, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agente tampón, sales inorgánicas, etc.

Ejemplos del "suero" que va a ser añadido al medio en la presente invención incluyen sueros de mamífero tales como suero bobino, suero de ternero, suero bobino fetal, suero de caballo, suero de potro, suero de caballo fetal, suero de conejo, suero de lebrato, suero de conejo fetal, y suero humano, etc.

En la presente invención, el "medio que contiene sustancia X" es un medio suplementado con una sustancia exógena X o un medio que contiene una sustancia exógena X, y el "medio libre de sustancia X" es un medio no suplementado con una sustancia exógena X o un medio libre de una sustancia exógena X. Como se emplea en esta memoria, la "sustancia exógena X" significa sustancia X exógena a la célula o tejido cultivados en el medio, y excluye sustancia endógena X producida por la célula o el tejido.

Por ejemplo, el "medio que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt" es un medio suplementado con una sustancia exógena que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt o un medio libre de una sustancia exógena que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt. El "medio libre de una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF" es un medio no suplementado con una sustancia exógena que inhibe la trayectoria de señal FGF o un medio libre de una sustancia exógena que inhibe la trayectoria de señal FGF.

Ejemplos del "cultivo flotante" en la presente invención incluyen cultivo de agregados celulares en un medio en condiciones no adhesivas a un recipiente de cultivo celular, etc.

El recipiente de cultivo celular que va a ser usado en cultivo flotante no está limitado particularmente siempre que permita cultivo flotante de las células. Ejemplos de tal recipiente de cultivo celular incluyen frasco, frasco de cultivo de tejido, plato, plato petri, plato de cultivo de tejido, multiplato, microplaca, placa de micropocetas, microporo, multiplaca, placa multipoceta, cámara deslizar, schale, tubo, bandeja, bolsa de cultivo, botella de rodillo, etc. Un recipiente preferible es un recipiente no adhesivo a células.

Como recipiente no adhesivo a células, se puede usar uno que tiene su superficie no tratada artificialmente para mejorar la adhesión a células (p. ej., tratamiento de recubrimiento con matriz extracelular, etc.) etc. Como recipiente no adhesivo a células, se puede usar un recipiente que tiene una superficie tratada artificialmente para bajar la adhesión a las células (p. ej., tratamiento superhidrofóbico) etc.

El método de producción de la presente invención incluye característicamente una etapa de cultivar un agregado celular que comprende un tejido retinal en el que hay presentes células positivas Chx10 en una proporción del 20 % o más y el 100 % o menos del tejido en un medio libre de suero o medio que contiene suero que cada uno contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante únicamente un periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65, seguida por cultivar el "agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65" resultante en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt. El "agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar" producido mediante el método de producción de la presente invención es útil como reactivo para uso para la evaluación de toxicidad o eficacia como fármaco de sustancia químicas, etc., o un material para uso para las pruebas o tratamientos dirigidos a terapia de células, etc.

El "agregado celular que comprende un tejido retinal" que va a ser usado como material de inicio en el método de producción de la presente invención es un agregado celular en el que hay presentes células positivas Chx10 en el tejido retinal en una proporción del 20 % o más y el 100 % o menos del tejido. La "proporción de células positivas Chx10" mencionada anteriormente es, por ejemplo, preferiblemente el 40 % o más, más preferiblemente el 60 % o más particularmente preferiblemente el 70 % o más.

El "agregado celular que comprende un tejido retinal" que va a ser usado como material de inicio en el método de producción de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, de una célula madre pluripotente (preferiblemente célula madre pluripotente humana). Como célula madre pluripotente, se pueden mencionar células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas.

El "agregado celular que comprende un tejido retinal" que se va a usar como material de inicio en el método de producción de la presente invención se puede preparar específicamente, por ejemplo, mediante un método que incluye las siguientes etapas (A) y (B):

(A) una etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo flotante en un medio libre de suero para formar un agregado de células madre pluripotentes, y

(B) una etapa de realizar cultivo flotante del agregado formado en la etapa (A) en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP para dar un agregado celular que comprende una célula progenitora retinal.

Se explica la etapa (A) para formar un agregado de células madre pluripotentes por cultivo flotante de células madre pluripotentes en un medio libre de suero.

El medio libre de suero usado en la etapa (A) no está limitado particularmente siempre que sea como se ha mencionado anteriormente. Por ejemplo, se puede mencionar un medio libre de suero suplementado con una cantidad apropiada de una sustitución de suero disponible comercialmente tal como KSR, etc. (p. ej., medio de mezcla 1:1 de IMDM y F-12 suplementado con el 10 % de KSR, 450 μ M de 1-monotioglicerol y 1x Concentrado de Lípido Definido Químicamente). La cantidad de KSR a añadir a un medio libre de suero en caso de células ES humanas es generalmente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 %, preferiblemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 20 %.

Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂, etc. en la etapa (A) se pueden determinar apropiadamente. La temperatura de cultivo es, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente 1 % a aproximadamente el 10 %, preferiblemente aproximadamente el 5 %.

La concentración de las células madre pluripotentes en la etapa (A) se puede determinar según sea apropiado para formar agregados de células madre pluripotentes más uniforme y eficientemente. Por ejemplo, cuando se someten células ES humanas a cultivo flotante usando una placa de 96 micropocetas, a la poceta se añade un líquido preparado de aproximadamente 1x10³ a aproximadamente 1x10⁵ células, preferiblemente de aproximadamente 3x10³ a aproximadamente 5x10⁴ células, más preferiblemente de aproximadamente 5x10³ a aproximadamente 3x10⁴ células, lo más preferiblemente aproximadamente 1,2x10⁴ células, por poceta, y la placa se dejan reposar para formar agregados celulares.

El tiempo de cultivo flotante necesario para formar agregados celulares se puede determinar según sea apropiado según la célula madre pluripotente que se va a usar, de modo que las células se puedan agregar uniformemente. Para formar agregados celulares uniformes, es deseablemente lo más corto posible. Por ejemplo, en caso de células ES humanas, se forman agregados preferiblemente en menos de aproximadamente 24 h., más preferiblemente en menos de aproximadamente 12 h. El tiempo para formación de agregado celular se puede ajustar apropiadamente controlando las herramientas para agregar las células, condiciones de centrifugación, etc.

La formación de agregados de células madre pluripotentes se puede determinar sobre la base del tamaño y el número de células de agregados celulares, morfología macroscópica, morfología microscópica mediante análisis de teñido tisular y uniformidad del mismo, expresión de diferenciación y marcadores de no diferenciación y uniformidad de los mismos, control de expresión de marcador de diferenciación y sincronismo de los mismos, reproducibilidad de eficiencia de diferenciación entre agregados celulares, etc.

Se explica la etapa (B) para obtener un agregado celular que comprende una célula progenitora retinal por cultivo flotante del agregado celular formado en la etapa (A) en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP.

El medio que va a ser usado en la etapa (B) es un medio libre de suero o medio que contiene suero no suplementado con una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de Sonic hedgehog y suplementado con una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP, que no requiere adición de una preparación de membrana basal.

Un medio libre de suero o medio que contiene suero que va a ser usado para tal medio no está limitado particularmente siempre que sea como se ha mencionado anteriormente. Por ejemplo, se puede mencionar un medio libre de suero suplementado con una cantidad apropiada de una sustitución de suero disponible comercialmente tal como KSR, etc. (p. ej., medio de mezcla 1:1 de IMDM y F-12 suplementado con el 10 % de KSR, 450 μ M de 1-monotioglicerol y 1x Concentrado de Lípido Definido Químicamente). La cantidad de KSR a añadir a un medio libre de suero en caso de células ES humanas es generalmente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 %, preferiblemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 20 %.

Como medio libre de suero que va a ser usado en la etapa (B), se puede usar directamente el medio libre de suero usado en la etapa (A), o puede ser sustituido por un nuevo medio libre de suero. Cuando el medio libre de suero usado en la etapa (A) se usa directamente para la etapa (B), al medio se puede añadir una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP.

La sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de Sonic hedgehog (más adelante en esta memoria a veces se indicará como Shh) es una sustancia que puede mejorar la transducción de señal mediada por Shh. Ejemplos de la sustancia que actúa en la trayectoria de transducción de señal Shh incluyen proteína perteneciente a la familia Hedgehog (p. ej., Shh), receptor Shh, agonista de receptor Shh, Purmorfamina, o SAG, etc.

La sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal BMP es una sustancia que puede mejorar la transducción de señal mediada por BMP. Ejemplos de la sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP incluyen proteínas BMP tales como BMP2, BMP4, BMP7 etc., proteínas GDF tales como GDF7 etc., anticuerpo de receptores anti-BMP, péptido parcial BMP, etc. Proteína BMP2, proteína BMP4 y proteína BMP7 están disponibles de, por ejemplo, R&D Systems, y proteína GDF7 está disponible de, por ejemplo, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

La concentración de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP únicamente tiene que estar en una concentración en la que se puede inducir diferenciación de las células, que forman un agregado de células madre pluripotentes, hasta células retinales. Por ejemplo, en caso de BMP4, se añade al medio en una concentración de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 1 μ M, preferiblemente de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 100 nM, más preferiblemente aproximadamente 1,5 nM.

Una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP únicamente tiene que ser añadida después de aproximadamente 24 h. desde el inicio del cultivo flotante en la etapa (A), y se puede añadir a un medio en menos de varios días (p. ej., menos de 15 días) desde el inicio del cultivo flotante. Preferiblemente, una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP se añade a un medio entre el día 1 y el día 15, más preferiblemente entre el día 1 y el día 9, más preferiblemente el día 6, desde el inicio del cultivo flotante.

Tras adición de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP al medio, y tras el inicio de la inducción de diferenciación de las células que forman un agregado de células madre pluripotentes hasta células retinales, no es necesaria adición de la sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP al medio, y el medio puede ser intercambiado por un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP. De esta manera, se puede suprimir el coste de medio. Las células que iniciaron la inducción de diferenciación hasta células retinales se puede confirmar, por ejemplo, al detectar la expresión de gen Rax en las células. El agregado celular formado en la etapa (A) usando células madre pluripotentes knocked-in con un gen de proteína informadora de fluorescencia tal como GFP, etc. hasta que el locus de gen Rax se somete a cultivo flotante en presencia de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP en una concentración necesaria para inducción de diferenciación hasta célula retinal, y se detecta fluorescencia emitida desde la proteína informante de fluorescencia expresada, por lo que se puede confirmar el periodo de tiempo cuando se inició la inducción de diferenciación hasta

célula retinal. Una realización de la etapa (B) es una etapa para obtener un agregado celular que comprende célula progenitora retinal, por cultivo flotante del agregado celular formado en la etapa (A) en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de Sonic hedgehog pero que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP en una concentración necesaria para inducción de diferenciación hasta célula retinal, hasta que empieza a aparecer una célula que expresa gen Rax.

Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂, etc. en la etapa (A) se pueden determinar apropiadamente. La temperatura de cultivo es, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente 1 % a aproximadamente el 10 %, preferiblemente aproximadamente el 5 %.

Que se ha obtenido un agregado celular que comprende una célula progenitora retinal puede ser confirmado, por ejemplo, al detectar la presencia de una célula que expresa Rax o PAX6, que es un marcador de célula progenitora retinal, en el agregado. El "agregado celular que comprende una célula progenitora retinal" obtenido mediante el método que incluye las etapas (A) y (B) mencionadas anteriormente se puede usar como "agregado celular que comprende un tejido retinal" como material de inicio en el método de producción de la presente invención.

El "agregado celular que comprende un tejido retinal" que va a ser usado como material de inicio en el método de producción de la presente invención también se puede preparar específicamente, por ejemplo, mediante un método que incluye las siguientes etapas (C), (D) y (E):

- (C) una etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo flotante en un medio libre de suero que contiene una sustancia que inhibe la trayectoria de señal Wnt para formar un agregado de células madre pluripotentes,
- (D) una etapa de someter el agregado celular formado en la etapa (C) a cultivo flotante en un medio libre de suero que contiene una preparación de membrana basal, y
- (E) una etapa de someter el agregado celular cultivado en la etapa (D) a cultivo flotante en un medio que contiene suero.

Una sustancia que inhibe la trayectoria de señal Wnt que va a ser usada en la etapa (C) no está limitada particularmente siempre que pueda suprimir la transducción de señal mediada por Wnt. Ejemplos de la sustancia que inhibe la trayectoria de señal Wnt incluyen Dkk1, proteína Cerberus, inhibidor de receptor Wnt, receptor Wnt tipo soluble, anticuerpo Wnt, inhibidor de quinasa caseína, proteína Wnt negativa dominante, CKI-7 (N-(2-aminoetil)-5-cloro-isoquinolina-8-sulfonamida), D4476 (4-(4-(2,3-dihidrobenczo[1,4]dioxin-6-yl)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida), IWR-1-en-do (IWR1e), IWP-2 etc. La concentración de la sustancia que inhibe la trayectoria de señal Wnt únicamente tiene que estar en una concentración en la que se forman agregados de células madre pluripotentes. Por ejemplo, una sustancia común que inhibe la trayectoria de señal Wnt tal como IWR1e se añade en una concentración de aproximadamente 0,1 µM a aproximadamente 100 µM, preferiblemente de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 10 µM, más preferiblemente alrededor de 3 µM.

Una sustancia que inhibe la trayectoria de señal Wnt puede ser añadida a medio libre de suero antes del inicio del cultivo flotante, o añadirse a un medio libre de suero en menos de varios días desde el inicio del cultivo flotante (p. ej., menos de 5 días). Preferiblemente, una sustancia que inhibe la trayectoria de señal Wnt se añade a un medio libre de suero en menos de 5 días, más preferiblemente menos de 3 días, desde el inicio del cultivo flotante, lo más preferiblemente simultáneamente con el inicio del cultivo flotante. Adicionalmente, el cultivo flotante se realiza hasta el día 18, más preferiblemente el día 12, desde el inicio del cultivo flotante con la adición de una sustancia que inhibe la trayectoria de señal Wnt.

Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo y concentración de CO₂ en la etapa (C) se pueden determinar apropiadamente. Si bien la temperatura de cultivo no está limitada particularmente, es, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente del 10 %, preferiblemente alrededor de aproximadamente el 5 %.

La concentración de las células madre pluripotentes en la etapa (C) se puede determinar según sea apropiado por expertos en la técnica para formar agregados de células madre pluripotentes más uniforme y eficientemente. La concentración de las células madre pluripotentes cuando forman agregados celulares no está limitada particularmente siempre que permita formación de agregados uniformes de células madre. Por ejemplo, cuando se someten células ES humanas a cultivo flotante usando una placa de 96 micropocetas, se añade un líquido preparado a aproximadamente 1x10³ a aproximadamente 1x10⁴ células, preferiblemente de aproximadamente 3x10³ células a aproximadamente 3x10⁴ células, más preferiblemente de aproximadamente 5x10³ células a aproximadamente 2x10⁴ células, lo más preferiblemente alrededor de 9x10⁴ células, por poceta, y la placa se deja reposar para formar agregados celulares.

El tiempo de cultivo flotante necesario para formar agregados celulares se puede determinar según sea apropiado según la célula madre pluripotente que se va a usar, siempre que las células se puedan agregar rápidamente. Para formar agregados celulares uniformes, es deseablemente lo más corto posible. Por ejemplo, en caso de células ES humanas, deseablemente los agregados celulares se forman preferiblemente en menos de 24 h., más preferiblemente en menos de 12 h. El tiempo para formación de agregado celular puede ser ajustado apropiadamente por expertos en la técnica controlando las herramientas para agregar las células, condiciones de centrifugación, etc.

Expertos en la técnica pueden determinar si se han formado agregados celulares de células madre pluripotentes, sobre la base del tamaño y el número de células de agregados celulares, morfología macroscópica, morfología microscópica mediante análisis de teñido tisular y uniformidad del mismo, expresión de diferenciación y marcadores de no diferenciación y uniformidad de los mismos, control de expresión de marcador de diferenciación y sincronismo de los mismos, reproducibilidad de eficiencia de diferenciación entre agregados celulares, etc.

La preparación de membrana basal que va a ser usada en la etapa (D) se refiere a una que contiene componentes que constituyen membrana basal que tienen una función para controlar morfología celular, diferenciación, crecimiento, motilidad, expresión de función, etc. que son similares a la de célula epitelial, cuando células pretendidas que pueden formar una membrana basal cubren los mismos y se cultivan. Aquí, el "componente que constituye membrana basal" se refiere a una molécula de matriz extracelular en la morfología de una membrana delgada presente entre capa celular epitelial y capa celular intersticial, etc. en tejidos animales. Una preparación de membrana basal puede ser producida, por ejemplo, retirando células que puedan formar una membrana basal, que se adhiere sobre un soporte por medio de una membrana basal, con una solución que puede disolver el lípido de las células, una solución alcalina, etc. Ejemplos de preparación preferible de membrana basal incluyen productos disponibles comercialmente como componentes de membrana basal (p. ej., Matrigel™ (fabricado por Becton, Dickinson and Company: más adelante en esta memoria, a veces se le hace referencia como Matrigel)), y moléculas de matriz extracelulares conocidas como componentes de membrana basal (p. ej., laminina, colágeno tipo IV, proteoglicano de sulfato de heparan, entactina, etc.).

Matrigel™ es un producto preparado a partir de una membrana basal derivada de sarcoma de ratón Engelbreth Holm Swarn (EHS). El componente principal de Matrigel™ es colágeno tipo IV, laminina, proteoglicano de sulfato de heparan, y entactina. Además de estos, se contiene TGF-β, factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), activador plasminógeno de tejido y un factor de crecimiento producido de manera natural por tumor EHS. El "producto de factor de crecimiento reducido (GFR, del inglés *growth factor reduced*)" de Matrigel™ tiene una menor concentración de factor de crecimiento que el Matrigel™ común. En la presente invención, preferiblemente se usa producto GFR.

Si bien la concentración de la preparación de membrana basal que se va a añadir a un medio libre de suero para el cultivo flotante en la etapa (D) no está limitado particularmente siempre que la estructura epitelial del tejido neural (p. ej., tejido retinal) se mantenga establemente, por ejemplo, es preferiblemente de 1/20 a 1/200 en volumen, más preferiblemente alrededor de 1/100 en volumen, del cultivo medio cuando se usa Matrigel™. Si bien la preparación de membrana basal puede haberse añadido ya al medio cuando se inicia el cultivo de célula madre, preferiblemente se añade al medio libre de suero en menos de 5 días, más preferiblemente en menos de 2 días, desde el inicio del cultivo flotante.

Como medio libre de suero que va a ser usado en la etapa (D), se puede usar directamente el medio libre de suero usado en la etapa (C), o puede ser sustituido con un nuevo medio libre de suero.

Cuando el medio libre de suero usado en la etapa (C) se usa directamente para esta etapa, la "preparación de membrana basal" se puede añadir al medio.

Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, y concentración de CO₂ en la etapa (C) se pueden determinar apropiadamente. Si bien la temperatura de cultivo no está limitada particularmente, es, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente del 10 %, preferiblemente alrededor de aproximadamente el 5 %.

Como medio que contiene suero que va a ser usado en la etapa (E), se puede usar el medio libre de suero usado en el cultivo de la etapa (D) al que se añade directamente un suero, o uno sustituido por un medio nuevo que contiene suero.

El suero se añade el día 7o después, más preferiblemente el día 9 o después, lo más preferiblemente el día 12, desde el inicio del cultivo flotante. La concentración del suero a añadir es aproximadamente del 1 % a aproximadamente el 30 %, preferiblemente aproximadamente del 3 % a aproximadamente el 20 %, más preferiblemente alrededor del 10 %.

En la etapa (E), la eficiencia de producción de tejido retinal se puede aumentar añadiendo una sustancia que actúa

sobre la trayectoria de señal Shh además del suero.

La sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Shh no está limitada particularmente siempre que pueda mejorar la transducción de señal mediada por Shh. Ejemplos de la sustancia que actúa en la trayectoria de señal Shh incluyen proteínas pertenecientes a la familia Hedgehog (p. ej., Shh), receptor Shh, agonista de receptor Shh, Purmorfamina, SAG, etc.

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

En los agregados celulares cultivados así, el tejido retinal está presente para cubrir la superficie del agregado celular. El tejido retinal puede ser confirmado mediante método de inmunotinción, etc. El agregado celular obtenido por el método mencionado anteriormente que incluye las etapas (C - D) y (E) se puede usar como "agregado celular que comprende un tejido retinal" para que sea un material de inicio en el método de producción de la presente invención.

La presencia de un tejido retinal en el agregado celular obtenido mediante el método mencionado anteriormente que incluye las etapas (A) y (B) o el método mencionado anteriormente que incluye las etapas (C - D) y (E) también puede ser confirmado de la siguiente manera. Por ejemplo, los agregados celulares obtenidos mediante el método mencionado anteriormente se someten a cultivo flotante en un medio que contiene suero. Ejemplos del recipiente de cultivo celular que va a ser usado para cultivo flotante incluyen los mencionados anteriormente. Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂ y concentración de O₂ del cultivo flotante se pueden determinar apropiadamente. Si bien la temperatura de cultivo no está limitada particularmente, es, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente del 10 %, preferiblemente aproximadamente el 5 %. La concentración de O₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 70 %, preferiblemente de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 60 %, más preferiblemente de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 %. Si bien el periodo de cultivo no está limitado particularmente, generalmente es durante 48 h o más preferiblemente 7 días o más.

Después de completarse el cultivo flotante, los agregados celulares se fijan con un fijador tal como solución de paraformaldehído, etc., y se prepara una criosección. La criosección obtenida se inmunotiñe, y se confirma la formación de una estructura de capa del tejido retinal. Como capas respectivas de un tejido retinal se componen de diferentes células progenitoras retinales (fotorreceptor, célula horizontal, célula bipolar, célula amacrina, célula de ganglión retinal), se puede confirmar la formación de una estructura de capa por inmunotinción usando anticuerpos contra los marcadores mencionados anteriormente expresados en estas células.

La "proporción de células positivas Chx10" en un tejido retinal contenido en el agregado celular preparado como se ha mencionado anteriormente se puede examinar, por ejemplo, mediante el siguiente método.

(1) Primero se prepara una criosección de "un agregado celular que comprende un tejido retinal".

(2) Entonces, se realiza inmunotinción de proteína Rax. Cuando se usa una célula recombinante de gen obtenida al alterar una célula que expresa el gen Rax para expresar una proteína de fluorescencia tal como GFP, la expresión de la proteína de fluorescencia mencionada anteriormente se observa usando un microscopio de fluorescencia, etc. Una región de tejido retinal que expresa gen Rax se especifica en las imágenes inmunoteñidas o imágenes microscópicas de fluorescencia obtenidas.

(3) Se ha especificado el uso de la misma sección que la criosección en donde la región de tejido retinal que expresa gen Rax o una sección adyacente como muestra, el núcleo se tiñe con un reactivo de tinción nuclear tal como DAPI. Entonces, se cuenta el número de núcleos teñidos en la región de tejido retinal especificada anteriormente que expresa gen Rax, por lo que se mide el número de las células en la región de tejido retinal.

(4) Usando la misma sección que la criosección en donde se ha especificado la región de tejido retinal que expresa gen Rax o una sección adyacente como muestra, se inmunotiñe proteína Chx10. Se cuenta el número de células positivas Chx10 en la región de tejido retinal especificada anteriormente.

(5) Sobre la base de cada número de núcleos medido en (3) y (4) mencionados anteriormente, el número de núcleos en células positivas Chx10 se divide por el número de núcleos en la región de tejido retinal especificada anteriormente que expresa el gen Rax, por lo que se calcula la "proporción de células positivas Chx10".

En el método de producción de la presente invención, en primer lugar, un agregado celular que comprende un tejido retinal en el que hay presentes células positivas Chx10 en una proporción del 20 % o más y el 100 % o menos del tejido se cultiva en un medio libre de suero o medio que contiene suero que cada uno contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante únicamente un periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65.

Como cultivo preferible aquí, se puede mencionar cultivo flotante.

5 Como medio libre de suero, se puede mencionar un medio libre de suero que es un medio basal suplementado con N2 o KSR. Más específicamente, se puede mencionar un medio libre de suero que es un medio de DMEM/F-12 suplementado con suplemento N2 (N2, Invitrogen). Como medio que contiene suero, se puede mencionar un medio que contiene suero que es un medio basal suplementado con suero bobino fetal.

10 Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂ se pueden establecer apropiadamente. La temperatura de cultivo está, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente, por ejemplo, alrededor de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ está, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %, preferiblemente, por ejemplo, alrededor de aproximadamente el 5 %.

15 La sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt que va a ser contenida en un medio libre de suero o medio que contiene suero cuando el "agregado celular que comprende un tejido retinal" mencionado anteriormente se cultiva en el medio no está limitado particularmente siempre que pueda mejorar la transducción de señal mediada por Wnt. Ejemplos específicos de la sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt incluyen proteína perteneciente a la familia Wnt (p. ej., Wnt3a), receptor Wnt, agonista de receptores Wnt, inhibidor de GSK3β (p. ej., 6-bromindirubina-3'-oxima (BIO), CHIR99021, Kenpaullone) etc.

20 La concentración de la sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt que va a ser contenida en un medio libre de suero o medio que contiene suero en caso de una sustancia común que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt tales como CHIR99021 está, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM, preferiblemente, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 30 μM, más preferiblemente, por ejemplo, alrededor de 3 μM.

30 La sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF que va a ser contenida en un medio libre de suero o medio que contiene suero cuando el "agregado celular que comprende un tejido retinal" mencionado anteriormente se cultiva en el medio no está limitado particularmente siempre que pueda inhibir la transducción de señal mediada por FGF. Ejemplos de la sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF incluyen receptor FGF, inhibidor de receptores FGF (p. ej., SU-5402, AZD4547, BGJ398), sustancia inhibidora de cascada de quinasa MAP (p. ej., inhibidor MEK, inhibidor MAPK, inhibidor ERK), inhibidor de quinasa PI3, inhibidor de Akt, etc.

35 La concentración de una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF contenida en un medio libre de suero o medio de suero únicamente tiene que estar en una concentración en la que se puede inducir diferenciación de las células, que forman un agregado de células madre pluripotentes, hasta células retinales. Por ejemplo, en caso de SU-5402, se añade al medio en una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM, preferiblemente de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 30 μM, más preferiblemente aproximadamente 5 μM.

40 "Cultivar durante únicamente un periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65" en el método de producción de la presente invención significa cultivar en todo o en parte del periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65. Esto es, es suficiente cultivar en todo o en parte del periodo (cualquier periodo) durante el que se constituye el "agregado celular que comprende un tejido retinal" en el sistema de cultivo por células que no expresan sustancialmente gen RPE65. Al emplear dicho cultivo, parece no obtenerse un agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65. El "agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65" incluye un "agregado celular en el que no aparece en absoluto una célula que expresa el gen RPE65" y "agregado celular en el que no aparece sustancialmente una célula que expresa el gen RPE65". Como "agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65 sustancialmente", se puede mencionar un agregado celular que contiene células positivas RPE65 en una ratio de aproximadamente 1 % o menos en el tejido retinal contenido en el agregado celular.

55 Para determinar tal periodo particular, el "agregado celular que comprende un tejido retinal" se usa como muestra, y la presencia o ausencia de expresión de gen RPE65 contenido en la muestra únicamente tiene que ser medida por un método de ingeniería genética general o un método bioquímico. Específicamente, por ejemplo, la presencia o ausencia de expresión de gen RPE65 o el nivel del mismo se puede examinar sometiendo una criosección del "agregado celular que comprende un tejido retinal" mencionado anteriormente a un método de inmunotinción usando un anticuerpo contra proteína RPE65.

60 Un "periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65" es, por ejemplo, un periodo durante el que la ratio de células positivas Chx10 presentes en el tejido retinal mencionado anteriormente disminuye más que en el momento de inicio del cultivo del agregado celular mencionado anteriormente en un medio libre de suero o medio que contiene suero que cada uno contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF, y se encuentra dentro del intervalo del 30 % al 0 %. El "agregado

celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65" es un agregado celular en el que hay presentes células positivas Chx10 en el tejido retinal mencionado anteriormente en una proporción dentro del 30 % al 0 % del tejido.

5 Si bien el número de días del "periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65" varía dependiendo de la clase de la sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y la sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF, la clase del medio libre de suero o medio que contiene suero, otras condiciones de cultivo etc., está, por ejemplo, en menos de 14 días. Más específicamente, cuando se usa un medio libre de suero (p. ej., medio libre de suero que es un medio basal suplementado con N2), el periodo mencionado anteriormente es preferiblemente, por ejemplo, menos de 10 días, más preferiblemente, por ejemplo, de 3 días a 6 días. Cuando se usa un medio que contiene suero (p. ej., medio que contiene suero que es un medio basal suplementado con suero bobino fetal), el periodo mencionado anteriormente es preferiblemente, por ejemplo, menos de 12 días, más preferiblemente, por ejemplo, de 6 días a 9 días.

15 Entonces el "agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65" obtenido mediante cultivo como se ha mencionado anteriormente se cultiva en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt.

20 Como cultivo preferible aquí, se puede mencionar cultivo flotante.

Como medio libre de suero, se puede mencionar un medio que es un medio basal suplementado con N2 o KSR. Como medio que contiene suero, se puede mencionar un medio que es un medio basal suplementado con suero bobino fetal. Más específicamente, se puede mencionar un medio de suero que es un medio DMEM/F-12 suplementado con suero bobino fetal.

25 El medio mencionado anteriormente libre de suero o medio que contiene suero puede contener un factor de crecimiento, un aditivo y una sustancia química conocidas que promueven el crecimiento, etc. Ejemplos del factor de crecimiento conocido incluyen EGF, FGF, IGF, insulina, etc. Ejemplos del aditivo que promueve el crecimiento incluyen suplemento N2 (N2, Invitrogen), suplemento B27 (Invitrogen), KSR, etc. Ejemplos de la sustancia química que promueve el crecimiento incluyen retinoides (p. ej., ácido retinoico) y taurina.

30 Un periodo de cultivo preferible es, por ejemplo, un periodo de cultivo durante el que la ratio de células positivas Chx10 presentes en el tejido retinal mencionado anteriormente aumenta más que en el momento de inicio del cultivo del agregado celular mencionado anteriormente en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt, y alcanza el 30 % o más.

35 Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂ se pueden establecer apropiadamente. La temperatura de cultivo está, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente, por ejemplo, alrededor de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ está, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %, preferiblemente, por ejemplo, alrededor de aproximadamente el 5 %.

40 Si bien el número de la días de cultivo mencionados anteriormente hasta que se obtiene "un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar" varía dependiendo de la clase del medio libre de suero o medio que contiene suero, otras condiciones de cultivo, etc., es, por ejemplo, en menos de 100 días. El número de días de cultivo mencionado anteriormente es preferiblemente, por ejemplo, de 20 días a 70 días, más preferiblemente, por ejemplo, de 30 días a 60 días.

45 En el "agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar" producido así, un epitelio de pigmento retinal y un tejido retinal (específicamente, retina neural) están presentes adyacentes a la estructura semejante a zona marginal ciliar en la mismo agregado celular. La estructura se puede confirmar por observación microscópica, etc. Específicamente, por ejemplo, cuando se produce un agregado celular a partir de células madre pluripotentes en donde gen GFP es knocked hasta locus de gen Rax (célula knock-in RAX::GFP), la presencia de retina neural que es región positiva fuerte RAX::GFP, epitelio de pigmento retinal que es un tejido epitelial en el que pigmentación se puede observar con luz transmitida y, una estructura semejante a zona marginal ciliar en una región fronteriza entre retina neural y epitelio de pigmento retinal y que tiene una estructura característica se puede confirmar usando un microscopio estereoscópico de fluorescencia (p. ej., SZX16 fabricado por Olympus Corporation).

50 En el "agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar" producido así, se forma una estructura semejante a zona marginal ciliar en una región entre dos tejidos retinales neurales. Esto es, a veces se forma un tejido que contiene continuamente un tejido neural retinal, una estructura semejante a zona marginal ciliar y otro tejido neural retinal. En este caso, la presencia de una estructura semejante a zona marginal ciliar puede ser confirmada por observación microscópica dado que la estructura semejante a zona marginal ciliar es característicamente más delgada que el tejido neural retinal adyacente.

Un tejido retinal sumamente puro (específicamente, retina neural) se puede preparar cortando físicamente un tejido retinal (específicamente, retina neural) del "agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar" mencionado anteriormente con tenazas, etc. Un tejido retinal sumamente puro (específicamente, retina neural) se puede cultivar además continuamente (específicamente, cultivo de larga duración durante, por ejemplo, 60 días o más) mientras se mantiene la buena estructura de tejido que tiene. Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂, concentración de O₂ pueden ser las usadas generalmente para cultivo de tejido. En este caso, puede realizarse cultivo en presencia de un suero, un factor de crecimiento conocido, un aditivo y una sustancia química que promueven el crecimiento, etc. Ejemplos del factor de crecimiento conocido incluyen EGF, FGF, etc. Ejemplos del aditivo que promueve el crecimiento incluyen suplemento N2 (Invitrogen), suplemento B27 (Invitrogen), etc.

La presente descripción también incluye el uso de un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar producida mediante el método de producción de la presente invención como reactivo para la evaluación de la toxicidad o eficacia como fármaco, el uso de un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar producida mediante el método de producción de la presente invención como material biológico para trasplante, etc.

<Uso de agregado celular que comprende estructura semejante a zona marginal ciliar como reactivo para evaluar toxicidad o eficacia como fármaco>

El agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar producida mediante el método de producción de la presente invención se puede usar para cribar un fármaco terapéutico para una enfermedad provocada por un trastorno de célula retinal, un material para el estudio de enfermedades o un material de descubrimiento de fármaco. El agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar producida mediante el método de producción de la presente invención también es utilizable para la evaluación de la toxicidad o eficacia como fármaco de una sustancia química etc., así como estudio de toxicidad tal como fototoxicidad, neurotoxicidad, etc., prueba de toxicidad, etc. Por ejemplo, un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar producida mediante el método de producción de la presente invención se lleva hasta el contacto con una sustancia de prueba, y se ensaya la influencia de la sustancia sobre la célula o el tejido, basada en la cual se evalúa la toxicidad o eficacia como fármaco de la sustancia.

<Uso de agregado celular que comprende estructura semejante a zona marginal ciliar como material biológico para trasplante>

El agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar producida mediante el método de producción de la presente invención se puede usar como material biológico para trasplante usado para suplementar un propio tejido trastornado en un estado de daño celular (p. ej., usado para operación de trasplante), etc. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar, que se produce mediante el método de producción de la presente invención, se trasplanta a un sujeto que necesita el trasplante, por lo que se trata una enfermedad debida a un trastorno de tejido retinal.

[Ejemplos]

La presente invención se explica más en detalle a continuación haciendo referencia a Ejemplos, que no se deben interpretar como limitativos.

Ejemplo de Referencia 1 (Ejemplo de Producción de agregado celular que comprende tejido retinal usando célula ES humana)

Se cultivaron células ES humanas knock-in RAX::GFP (derivadas de KhES-1; Nakano, T. et al. Cell Stem Cell 2012, 10(6), 771-785) según los métodos descritos en "Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559" y "Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como medio, se usó un medio DMEM/F12 (Sigma) suplementado con el 20 % de KSR (sustitución de Knockout Serum™; Invitrogen), 0,1 mM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 1x aminoácido no esencial, 8 ng/ml de bFGF. Las células ES cultivadas mencionadas anteriormente fueron dispersadas individualmente en TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas individualmente flotaban en 100 µl de medio libre de suero a 1,2X10⁴ células por poceta de una placa de cultivo de 96 pocetas no adhesivas a células (placa esferoide SUMILON, SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) para permitir formación rápida de un agregado, que fue sometido a cultivo flotante a 37 °C, 5 % de CO₂. El medio libre de suero usado entonces era un medio libre de suero que era una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM añadidos con 10 % de KSR, 450 µM de 1-monotioglicerol, 1x Concentrado de Lípido Definido Químicamente, 20 µM de Y27632. Se añadió BMP4 en una concentración final de 1,5 nM el día 6 desde el inicio del cultivo flotante, y se continuó el cultivo flotante. Una media cantidad del cultivo medio en la poceta fue intercambiada cada 3 días con el medio mencionado anteriormente libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP.

El agregado celular producido así fue fijado el día 18 desde el inicio del cultivo flotante con el 4 % paraformaldehído para preparar una criosección. La criosección preparada fue sometida a observación microscópica de fluorescencia de una imagen de fluorescencia GFP (figura 1A), inmunotinción con Chx10 que es un de marcadores de célula progenitora retinal neural (figura 1B) o tinción DAPI para teñir núcleo celular (figura 1C). De la comparación de la

figura 1A que muestra la presencia de las células completas de tejido retinal, y la figura 1B que muestra la presencia de célula positiva Chx10, el tejido retinal contenido en el agregado celular producido como se ha mencionado anteriormente contenía células positivas Chx10 en aproximadamente el 80 % del tejido (véase la figura 1).

5 Ejemplo Comparativo 1 (Cultivo de agregado celular que comprende tejido retinal en medio que contiene suero libre de una sustancia que actúa sobre trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF)
 Un agregado celular que comprende un tejido retinal el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, que fue producido mediante el método descrito en el Ejemplo 1, se sometió a cultivo flotante en un medio que contiene suero libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF
 10 (medio que era medio DMEM/F-12 suplementado con el 10 % de suero bobino fetal, 1 % de suplemento N2, 0,5 µM de ácido retinoico, y 100 µM de taurina) durante 6 días, es decir, hasta el día 24 desde el inicio del cultivo flotante (figura 2A,B), o 17 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante (figura 2C,D).

15 El agregado celular obtenido fue fijado con un 4 % de paraformaldehído para preparar una criosección. La criosección preparada fue sometida a inmunotinción con Chx10 que es uno de los marcadores de célula progenitora retinal neural (Figura 2A,C), o inmunotinción con MITF que es uno de los marcadores de célula epitelial de pigmento retinal (Figura 2B,D). Se encontró que aproximadamente el 80 % del tejido retinal contenido en el agregado celular eran células positivas Chx10 (figura 2A,C), y la ratio de células positivas MITF presentes en el mismo no era más del 3 % (figura 2B,D), tanto el día 24 desde el inicio del cultivo flotante como el día 35 desde el inicio del cultivo flotante.

20 Ejemplo de Referencia 2 (Cultivo de agregado celular que comprende tejido retinal en medio libre de suero que contiene una sustancia que actúa sobre trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF)

25 Un agregado celular que comprende un tejido retinal el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, que fue producido mediante el método descrito en el Ejemplo 1, fue sometido a cultivo flotante en un medio libre de suero (medio que era medio DMEM/F-12 suplementado con un 1 % de suplemento N2) que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt (3 µM de CHIR99021) y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF (5 µM de SU5402) durante 6 días, es decir, hasta el día 24 desde el inicio del cultivo flotante (figura 3A,B) y además en un medio que contiene suero (medio que era medio DMEM/F-12 suplementado con un 1 % suero de ternero fetal y 1 % de suplemento N2) que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt (3 µM de CHIR99021) y libre de una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 11 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante (figura 3C,D).

35 El agregado celular obtenido fue fijado con un 4 % de paraformaldehído para preparar una criosección. La criosección preparada fue sometida a inmunotinción con Chx10 que es uno de los marcadores de célula progenitora retinal neural (Figura 3A,C), o inmunotinción con MITF que es uno de los marcadores de célula epitelial de pigmento retinal (Figura 3B,D). Se encontró que aproximadamente el 80 % del tejido retinal contenido en el agregado celular eran células positivas MITF (figura 3A,C), y la ratio de células positivas Chx10 presentes en el mismo no era más del 3 % (figura 3B,D), tanto el día 24 desde el inicio del cultivo flotante como el día 35 desde el inicio del cultivo flotante.

40 El agregado celular el día 24 desde el inicio del cultivo flotante no mostró apariencia de una célula que expresa el gen RPE65.

45 De la comparación de la figura 2 y la figura 3, se ha sugerido que en el tejido retinal contenido en el agregado celular ocurrió conversión de sino de retina neural positiva Chx10 a tejido semejante a epitelio de pigmento retinal (RPE) positivo MITF, debido a operación de cultivo en un medio libre de suero que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF.

Ejemplo de Referencia 3 (cultivo flotante de "Agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65" en medio que contiene suero libre de sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt" - 1)

50 Un agregado celular que comprende un tejido retinal el día 24 desde el inicio del cultivo flotante, que fue producido mediante el método descrito en el Ejemplo 2, fue sometido a cultivo flotante en un medio que contiene suero (medio que es medio DMEM/F-12 suplementado con el 10 % de suero bobino fetal, 1 % de suplemento N2, 0,5 µM de ácido retinoico, y 100 µM de taurina) libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF además durante 11 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante, o 39 días, es decir, hasta el día 63 desde el inicio del cultivo flotante en condiciones del 40 % de O₂, y el agregado celular obtenido fue fijado con el 4 % de paraformaldehído para preparar una criosección.

55 Las criosecciones preparadas a partir de los agregados celulares el día 24 desde el inicio del cultivo flotante (figura 4A,B), y los agregados celulares el día 35 (figura 4C,D) fueron sometidos a inmunotinción con Chx10 (figura 4A,C), e inmunotinción con MITF (figura 4B,D). Se encontró que los tejidos retinales contenidos en el agregado celular el día 24 desde el inicio del cultivo flotante tenían propiedades semejantes a epitelial de pigmento retina, dado que, el día 24 desde el inicio del cultivo flotante, aproximadamente el 80 % del tejido retinal contenido en el agregado celular eran células positivas MITF (figura 4B), y la ratio de células positivas Chx10 presentes en el mismo no era más del 3 % (figura 4A). El agregado celular el día 24 desde el inicio del cultivo flotante no mostró apariencia de una célula que expresa el gen RPE65. Se encontró que los tejidos retinales contenidos en el agregado celular el día 35 desde

el inicio del cultivo flotante tenían propiedades de retina neural positiva Chx10, dado que, el día 35 desde el inicio del cultivo flotante, aproximadamente el 80 % del tejido retinal contenido en el agregado celular eran células positivas Chx10 (figura 4C), y la ratio de células positivas MITF presentes en el mismo no era más del 3 % (figura 4D). Una comparación de la figura 3 y la figura 4 sugiere que en tejidos retinales contenidos en el agregado celular ocurrió conversión de sino de tejido semejante a epitelial de pigmento retinal a tejido semejante a retina neural entre el día 24 y el día 35 desde el inicio del cultivo flotante.

Las criosecciones (figura 5A,B,C) preparadas a partir del agregado celular el día 63 desde el inicio del cultivo flotante fueron sometidas a observación microscópica de fluorescencia de imágenes inmunoteñidas de fluorescencia Rax::GFP (figura 5A), inmunoteñidas con Otx1 que es uno de los marcadores de zona marginal ciliar (figura 5B), o inmunoteñidas con Rdh10 que es uno de los marcadores de zona marginal ciliar (figura 5C). Una comparación de la figura 5A,B revela que una parte de retina neural positiva Rax es co-positivo Otx1, y de la figura 5C está claro que hay presente célula positiva Rdh10. De la manera mencionada anteriormente, se podría confirmar en el agregado celular después de cultivo flotante durante 39 días en un medio que contiene suero libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt que las células positivas a tinción con uno o ambos de Otx1 y Rdh10 (esto es, células que expresan uno o ambos genes Otx1 y Rdh10 que es un gen marcador de estructura semejante a zona marginal ciliar) estaban presentes como región de grupo casi uniforme en el tejido presente en la región fronteriza de tejido retinal (específicamente, retina neural) y epitelio de pigmento retinal (véase la figura 5B,C), y se produjo con alta eficiencia un agregado celular que comprendía una estructura semejante a zona marginal ciliar.

Ejemplo de Referencia 4 (cultivo flotante de "Agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65" en medio que contiene suero libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt" - 2)
Agregados celulares que comprenden un tejido retinal se sometieron, cada uno, a cultivo flotante en las siguientes tres condiciones, y se prepararon agregados celulares el día 35 desde el inicio del cultivo flotante.

(condiciones de cultivo A) Un agregado celular que comprende un tejido retinal el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, que fue producido mediante el método descrito en el Ejemplo 1, fue sometido a cultivo flotante en un medio que contiene suero (medio que es medio DMEM/F-12 suplementado con el 10 % de suero bobino fetal, 1 % de suplemento N2, 0,5 µM de ácido retinoico, y 100 µM de taurina) libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 17 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante (figura 6A).

(condiciones de cultivo B) Un agregado celular que comprende un tejido retinal el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, que fue producido mediante el método descrito en el Ejemplo 1, fue sometido a cultivo flotante en un medio libre de suero (medio que es medio DMEM/F12 suplementado con un 1 % de suplemento N2) que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt (3 µM de CHIR99021) y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF (5 µM de SU5402) durante 3 días, es decir, hasta el día 21 desde el inicio del cultivo flotante. El agregado celular el día 21 desde el inicio del cultivo flotante no mostró apariencia de una célula que expresa el gen RPE65. Además, el agregado celular el día 21 desde el inicio del cultivo flotante fue sometido a cultivo flotante en un medio que contiene suero (medio que era medio DMEM/F-12 suplementado con el 10 % de suero bobino fetal, 1 % de suplemento N2, 0,5 µM de ácido retinoico, y 100 µM de taurina) libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 14 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante (figura 6B).

(condiciones de cultivo B) Un agregado celular que comprende un tejido retinal el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, que fue producido mediante el método descrito en el Ejemplo 1, fue sometido a cultivo flotante en un medio libre de suero (medio que es medio DMEM/F12 suplementado con un 1 % de suplemento N2) que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt (3 µM de CHIR99021) y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF (5 µM de SU5402) durante 5 días, es decir, hasta el día 23 desde el inicio del cultivo flotante. El agregado celular el día 23 desde el inicio del cultivo flotante no mostró apariencia de una célula que expresa el gen RPE65. Además, el agregado celular el día 23 desde el inicio del cultivo flotante fue sometido a cultivo flotante en un medio que contiene suero (medio que era medio DMEM/F-12 suplementado con el 10 % de suero bobino fetal, 1 % de suplemento N2, 0,5 µM de ácido retinoico, y 100 µM de taurina) libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF durante 12 días, es decir, hasta el día 35 desde el inicio del cultivo flotante (figura 6B).

Los agregados celulares obtenidos el día 35 desde el inicio del cultivo flotante fueron observados, cada uno, con un microscopio estereoscópico de fluorescencia (SZX16 fabricado por Olympus Corporation). Se observó la presencia o ausencia de retina neural que es región positiva fuerte RAX::GFP, epitelio de pigmento retinal que es un tejido epitelial en el que se puede observar pigmentación con luz transmitida y, una estructura semejante a zona marginal ciliar en una región fronteriza entre retina neural y epitelio de pigmento retinal y que tiene una estructura característica, y se examinó la proporción de un agregado celular que contiene retina neural sola (figura 6, gráfica de barras grises), proporción de un agregado celular que contiene retina neural formada continuamente a partir de la estructura semejante a zona marginal ciliar (figura 6, gráfica de barras negras), y proporción de un agregado celular que contiene libre de retina neural y que contiene epitelio de pigmento retinal y otros tejidos (figura 6, gráfica de

barras blancas).

Como resultado, la proporción de masa de agregado que contiene retina neural formada continuamente a partir de la estructura semejante a zona marginal ciliar no era más del 3 % en condiciones de cultivo A, y aumentó al 30 % en condiciones de cultivo B y el 39 % en condiciones de cultivo C en el método de producción de la presente invención.

Ejemplo de Referencia 5 (Cultivo de agregado celular que comprende tejido retinal en medio libre de suero que contiene una sustancia que actúa sobre trayectoria de señal Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF)

Un agregado celular que comprende un tejido retinal el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, que fue producido mediante el método descrito en el Ejemplo 1, fue sometido a cultivo flotante en un medio libre de suero (medio que es medio DMEM/F-12 suplementado con un 1 % de suplemento N2) que contiene una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt (3 μ M de CHIR99021) y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF (5 μ M de SU5402) durante 6 días, es decir, hasta el día 24 desde el inicio del cultivo flotante.

El agregado celular obtenido fue fijado con un 4 % de paraformaldehído para preparar una criosección. Las criosecciones preparadas fueron sometidas a tinción DAPI para teñir núcleo celular (figura 7A), inmunotinción con RPE65 que es uno de los marcadores de célula epitelial de pigmento epitelial maduro (figura 7B), e inmunotinción con Mitf que es uno de los marcadores de célula epitelial de pigmento retinal. Se encontró que la proporción de células positivas RPE65 presentes en el tejido retinal contenido en el agregado celular no era más del 1 % el día 24 desde el inicio del cultivo flotante (figura 7A,B). En este caso, aproximadamente el 80 % de los tejidos retinales contenidos en el agregado celular eran células positivas MITF.

Ejemplo de Referencia 6 (Ejemplo de Producción de agregado celular que comprende tejido retinal usando células madre pluripotentes inducidas (células iPS))

La línea de célula iPS humana 201B7 (disponible de Incorporated Administrative Agency RIKEN BioResource Center o iPS Academia Japan, Inc.) se cultiva según los métodos descritos en "Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559", "Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como medio, se usa un medio que es medio DMEM/F-12 (Sigma) suplementado con el 20 % de KSR (sustitución de suero Knockout™; Invitrogen), 0,1 mM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 1x aminoácido no esencial, 5 ng/ml de bFGF. Las células iPS cultivadas mencionadas anteriormente fueron dispersadas individualmente usando TrypLE Express (Invitrogen), suspendido en 100 μ l de medio libre de suero en $1,2 \times 10^4$ células por poceta de una placa de cultivo no adhesivo en célula de 96 pocetas (placas esferoides SUMILON, SUMITOMO BAKELITE), y se realiza cultivo flotante a 37 °C, 5 % de CO₂. Como medio libre de suero, se usa un medio libre de suero que es una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM suplementado con el 10 % de KSR, 450 μ M de 1-monotioglicerol, 1x Concentrado de Lípido Definido Químicamente, 20 μ M de Y27632. En algún momento entre el día 1 y el día 15 desde el inicio del cultivo flotante, se añadió cualquier de recombinante humano BMP4 (R&D) en concentración final de 1,5 nM, BMP2 (R&D) en concentración final de 100 ng/ml, BMP7 (R&D) en concentración final de 100 ng/ml, y GDF7 (R&D) en concentración final de 100 ng/ml y se realizó cultivo flotante. Una media cantidad del cultivo medio en la poceta se intercambia cada 3 días con el medio mencionado anteriormente libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de transducción de señal de BMP. El día 18 desde el inicio del cultivo flotante, se recuperan parcialmente agregados, se fijan con 4 % de paraformaldehído para preparar criosecciones. Las criosecciones preparadas se someten a inmunotinción con Chx10 que es uno de los marcadores progenitores retinales neurales, sobre la base de que se examina la expresión de Chx10 en el tejido retinal contenido en el agregado celular producido como se ha mencionado anteriormente.

Un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar se puede producir mediante el método de producción de la presente invención usando el "agregado celular que comprende una célula progenitora retinal" así producido como "agregado celular que comprende un tejido retinal" para que sea el material de inicio.

Esta solicitud se basa en una solicitud de patente N.º 2013-255836 presentada en Japón (fecha de presentación: 11 de diciembre de 2013).

Aplicabilidad industrial

Según el método de producción de la presente invención, se puede producir con alta eficiencia una estructura semejante a zona marginal ciliar.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar, que comprende una etapa de cultivar un agregado celular que es preparado de una célula madre pluripotente y que comprende un tejido retinal en el que hay presentes células positivas Chx10 en una proporción del 20 % o más y el 100 % o menos del tejido en un medio libre de suero o medio que contiene suero, que contienen, cada uno, una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt que puede mejorar la transducción de señal mediada por Wnt y una sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF únicamente durante un periodo antes de la aparición de una
- 10 célula que expresa el gen RPE65, seguida por cultivar el "agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65" resultante en un medio libre de suero o medio que contiene suero, cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt.
- 15 2. El método de producción según la reivindicación 1, en donde el agregado celular resultante en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65 es un agregado celular en el que hay presentes células positivas Chx10 en el tejido retinal en una proporción de dentro del 30 % al 0 % del tejido.
- 20 3. El método de producción según la reivindicación 1 o 2, en donde el "agregado celular en el que no aparece una célula que expresa el gen RPE65" resultante se cultiva en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt hasta que la proporción de células positivas Chx10 presentes en el tejido retinal alcanza el 30 % o más del tejido.
- 25 4. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agregado celular se prepara de una célula madre pluripotente y que comprende un tejido retinal en el que hay presentes células positivas Chx10 en una proporción del 20 % o más y el 100 % o menos del tejido es un agregado celular que se prepara mediante el método que comprende las siguientes etapas (A) y (B):
- (A) una etapa de someter células madre pluripotentes a cultivo flotante en un medio libre de suero para formar un agregado de células madre pluripotentes, y
- 30 (B) una etapa de realizar cultivo flotante del agregado formado en la etapa (A) en un medio libre de suero o medio que contiene suero cada uno libre de una sustancia que pueda mejorar la transducción de señal mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede mejorar la transducción de señal mediada por BMP para dar un agregado celular que comprende una célula progenitora retinal.
- 35 5. El método de producción según la reivindicación 4, en donde la sustancia que puede mejorar la transducción de señal mediada por BMP se selecciona de un grupo que consiste en proteínas BMP, BMP2, BMP4, BMP7, proteínas GDF, GDF7, anticuerpo de receptores anti-BMP y péptido parcial BMP.
- 40 6. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el tejido retinal se deriva de una célula madre pluripotente humana.
- 45 7. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt que puede mejorar la transducción de señal mediada por Wnt es una proteína perteneciente a la familia Wnt, receptor Wnt, agonista de receptores Wnt, o inhibidor GSK3p.
- 50 8. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la sustancia que actúa sobre la trayectoria de señal Wnt que puede mejorar la transducción de señal mediada por Wnt es CHIR99021.
9. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF es un receptor FGF, inhibidor de receptores FGF, sustancia inhibidora de cascada de quinasa MAP, inhibidor de quinasa PI3, o inhibidor de Akt.
- 55 10. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la sustancia que inhibe la trayectoria de señal FGF es SU5402.
- 60 11. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65 es menos de 14 días.
12. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el periodo antes de la aparición de una célula que expresa el gen RPE65 está dentro de 3 días a 6 días.
- 65 13. Un método para producir un tejido retinal, que comprende producir un agregado celular que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar mediante el método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y cortar físicamente un tejido retinal del agregado celular producido así que comprende una estructura semejante a zona marginal ciliar.

Fig. 1

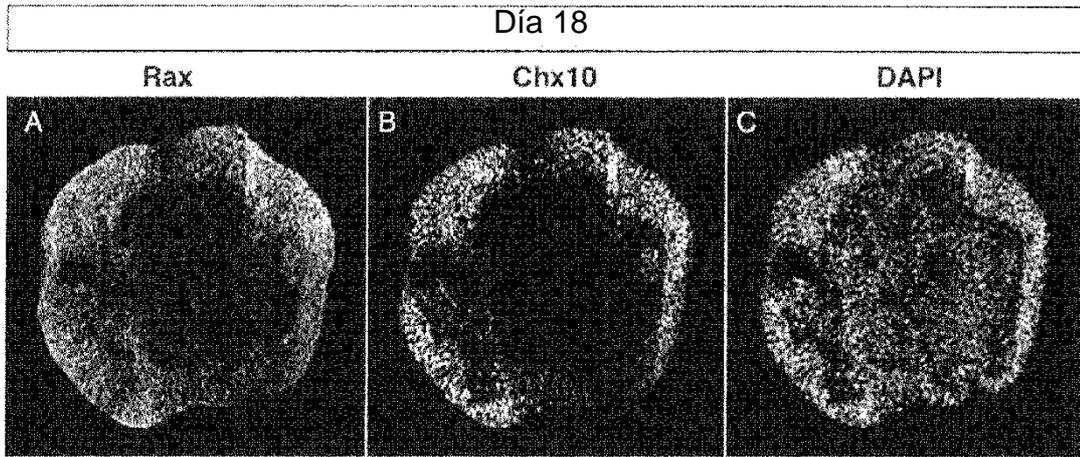


Fig. 2

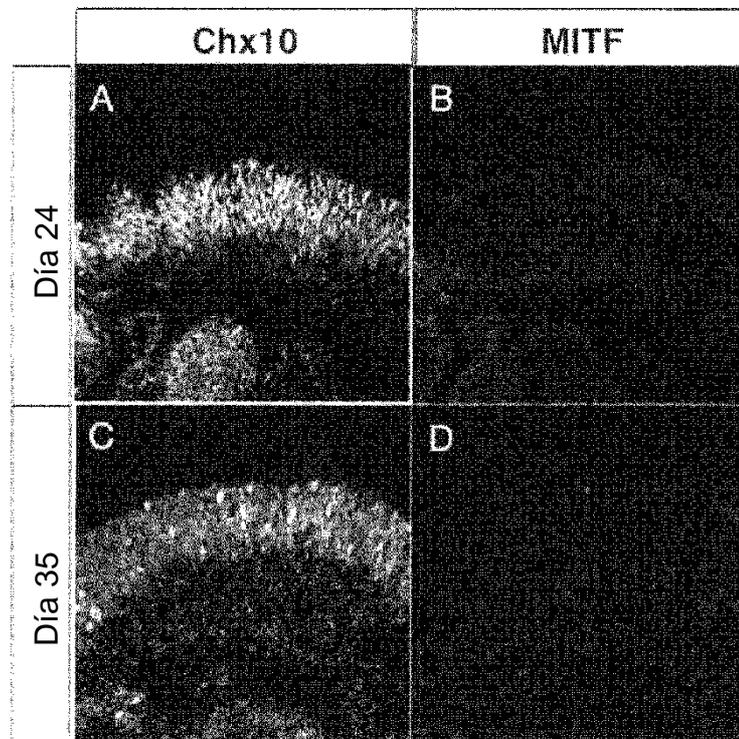


Fig. 3

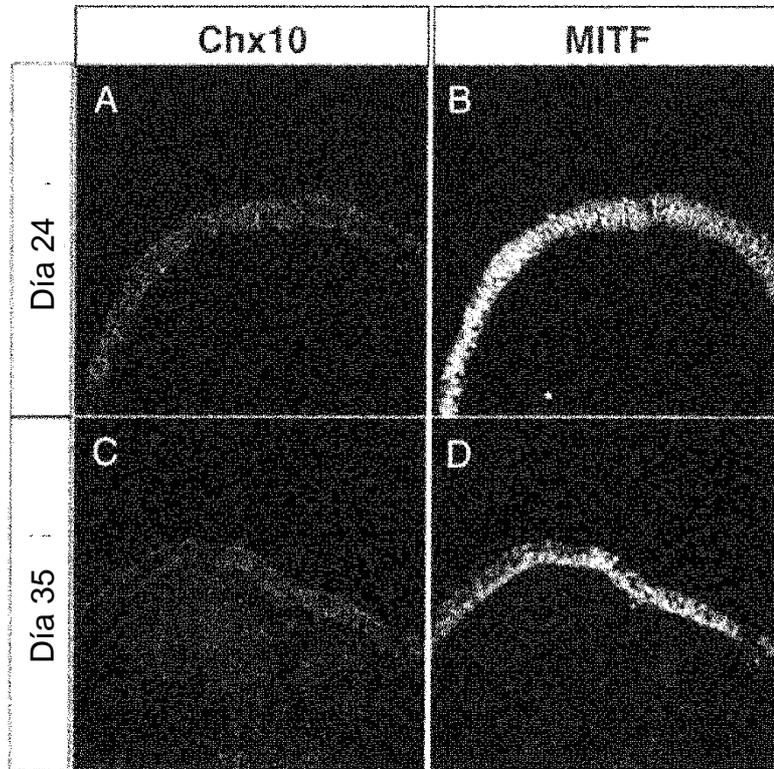


Fig. 4

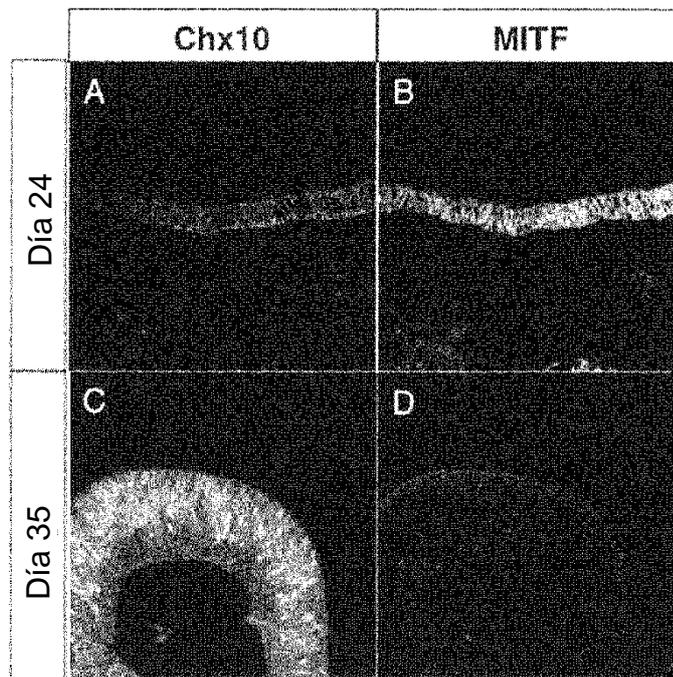


Fig. 5

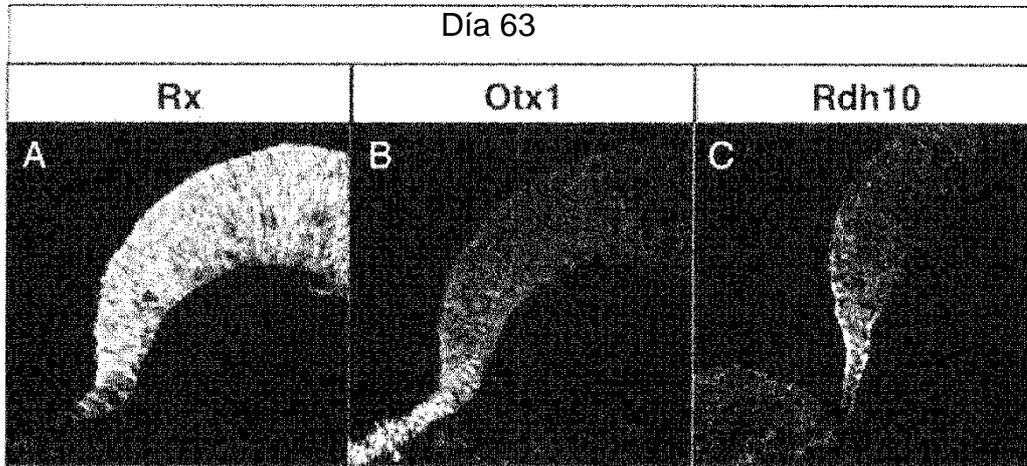


Fig. 6

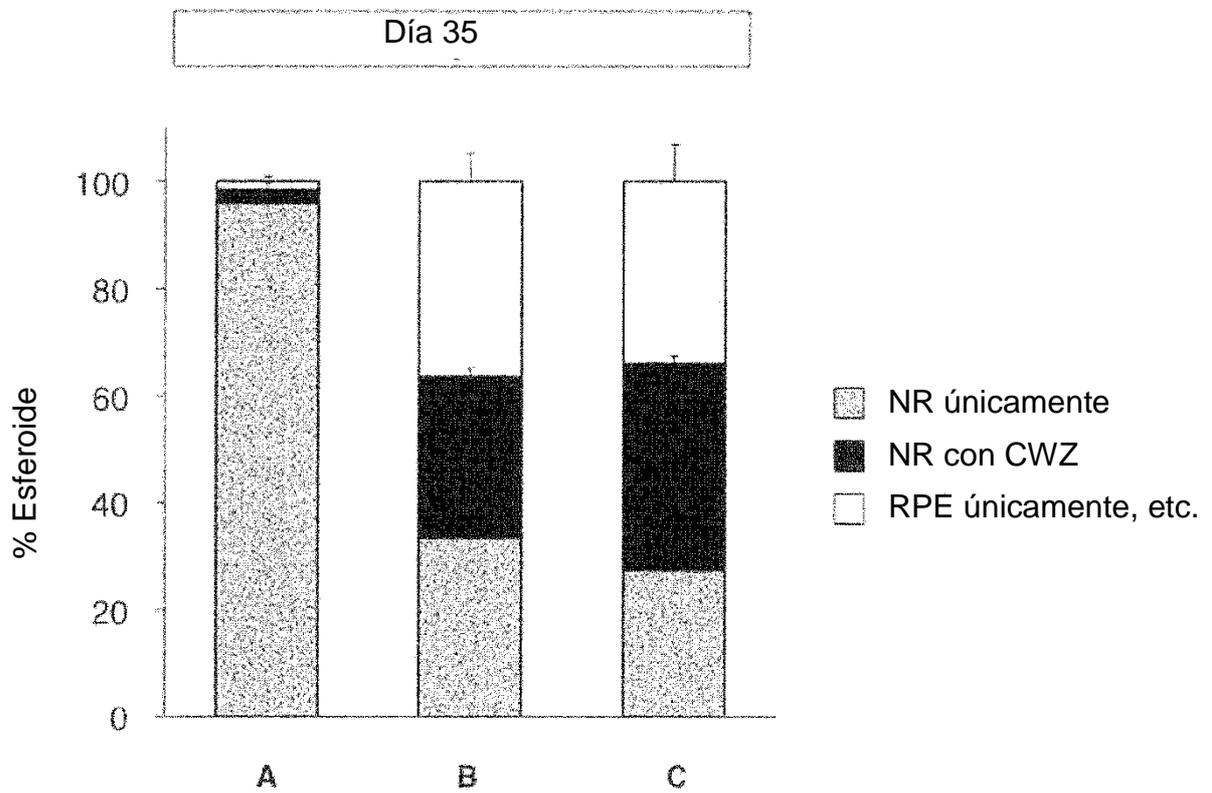


Fig. 7

