

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 553**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2012 PCT/JP2012/080365**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13077424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2012 E 12851379 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2784154**

54 Título: **Método de crioconservación de tejido nervioso craneal originado a partir de células madre pluripotenciales**

30 Prioridad:

25.11.2011 JP 2011258208

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

19.02.2020

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:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 553 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de crioconservación de tejido nervioso craneal originado a partir de células madre pluripotenciales

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método de crioconservación de tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial.

Antecedentes de la técnica

El tejido es una estructura de una población de células que presenta una conformación en la que distintos tipos de células que tienen formas y propiedades diferentes se configuran estéricamente en un patrón concreto.

10 Por ejemplo, el tejido retiniano, que es uno de los elementos constituyentes del globo ocular, es un tejido similar a una membrana que cubre la pared interna de la parte posterior del globo ocular, y el tejido retiniano tiene una estructura de capas en la que las células nerviosas se alinean de modo regular. La retina contiene cinco tipos de células nerviosas que a grandes rasgos se dividen en células visuales, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, y células ganglionares. La luz es convertida en señales eléctricas por las células visuales, y la información se transmite a las células bipolares y células horizontales a través de sinapsis químicas. Las células
15 bipolares forman una conexión sináptica con las células amacrinas y las células ganglionares, y el axón de las células ganglionares, en forma de nervio óptico, se comunica con el centro visual en el cerebro. Por tanto, para el tratamiento de los trastornos retinianos, deben realizarse estudios de etiología, estudios de eficacia y seguridad durante el descubrimiento de fármacos, tratamientos de trasplante de células y similares. Sin embargo, el tejido retiniano, que tiene una estructura de capas que refleja el tejido biológico humano, el material para dichos estudios, resulta difícil de obtener.
20

En años recientes, se ha indicado la producción de un tejido retiniano comparable al tejido retiniano en un cuerpo vivo induciendo la diferenciación de células madre pluripotenciales, tales como células ES (documento que no es patente 1). Para utilizar un tejido obtenido mediante la diferenciación de células madre pluripotenciales para la medicina regenerativa, los estudios de seguridad y similares, es fundamental un suministro estable de una gran
25 cantidad de tejido con una calidad uniforme. Por otra parte, la producción de diversos tejidos mediante la diferenciación de células madre pluripotenciales requiere un periodo concreto o más largo de inducción de la diferenciación, por ejemplo, un periodo no menor que 3 semanas para la producción de tejido retiniano a partir de células ES humanas. Además, la eficacia de la inducción de la diferenciación a menudo cambia dependiendo del tratamiento para la inducción de la diferenciación. Por tanto, la puesta en práctica real resulta difícil cuando dicho tejido se prepara de manera individual en el momento de su utilización, y se ha deseado una técnica para conservar dicho tejido en un estadio del proceso de inducción de la diferenciación.
30

El documento que no es patente 2 describe un método para crioconservar y trasplantar una retina de rata inmadura a una retina de rata adulta.

Lista de documentos

35 *Documentos que no son patentes*

Documento que no es patente 1: M. Eiraku *et al.*, Nature, 472, pp. 51-56 (2011), Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture.

Documento que no es patente 2: R. Aramant *et al.*, Developmental Brain Research, pp. 151-159 (1991), Cryopreservation and transplantation of immature rat retina into adult rat retina.

40 Sumario de la invención*Problemas que se van a solucionar mediante la invención*

Para un suministro estable de una gran cantidad de un tejido nervioso craneal originado a partir de células madre pluripotenciales para su uso en la medicina regenerativa y la evaluación de la seguridad y la eficacia se necesita con urgencia desarrollar un método de conservación del tejido.

45 Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han realizado estudios a fondo a la vista de esta situación, y han descubierto un método para conservar de modo estable un tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial, lo cual ha producido la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente.

50 [1] Un método para crioconservar un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial, que comprende los

siguientes puntos (1) a (3):

(1) una primera etapa de poner en contacto un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial de 0 °C a 8 °C con una primera disolución, que es una disolución de protección de las células y que contiene sulfóxido y una cadena de poliol para un tratamiento de penetración,

5 (2) una segunda etapa de mantener, en una segunda disolución que es una disolución de crioconservación, el tejido originado a partir de la célula madre pluripotencial que se puso en contacto con la disolución de protección de las células en la primera etapa, y

10 (3) una tercera etapa de crioconservar, en presencia de un refrigerante, el tejido originado a partir de la célula madre pluripotencial que se mantuvo en la disolución de crioconservación en la segunda etapa, en el que la etapa de crioconservación se realiza inmediatamente después del inicio de la segunda etapa;

en el que el sulfóxido es sulfóxido de dimetilo y la cadena de poliol es etilenglicol, y el tejido es un tejido nervioso craneal.

15 [2] El método de crioconservación del punto [1] mencionado anteriormente, en el que la disolución de protección de las células que contiene sulfóxido y una cadena de poliol es una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido, una cadena de poliol y un oligosacárido.

[3] El método de crioconservación del punto [2] mencionado anteriormente, en el que la disolución de protección de las células tiene una concentración de sulfóxido del 5% al 15%, una concentración de cadena de poliol del 4% al 15%, y una concentración de oligosacárido del 5% al 20%.

20 [4] El método de crioconservación de los puntos [2] o [3] mencionados anteriormente, en el que el oligosacárido es sacarosa.

[5] El método de crioconservación de cualquiera de los puntos [1] a [4] mencionados anteriormente, en el que la célula madre pluripotencial mencionada anteriormente es una célula madre pluripotencial humana.

[6] El método de crioconservación de cualquiera de los puntos [1] a [5] mencionados anteriormente, en el que el tejido nervioso craneal es un tejido retiniano.

25 [7] El método de crioconservación de cualquiera de los puntos [1] a [6] mencionados anteriormente, en el que la tercera etapa se realiza a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 10 °C/min.

[8] El método de crioconservación de cualquiera de los puntos [1] a [7] mencionados anteriormente, en el que el refrigerante es nitrógeno líquido.

30 [9] El método de crioconservación de cualquiera de los puntos [1] a [8] mencionados anteriormente, en el que la disolución de crioconservación es una disolución de crioconservación que contiene sulfóxido de dimetilo, acetamida y propilenglicol.

[10] El método de crioconservación del punto [9] mencionado anteriormente, en el que la concentración de sulfóxido de dimetilo es de 1 a 4 M, y la concentración de acetamida es de 0,5 a 2 M, y la concentración de propilenglicol es de 1,5 a 6 M.

35 *Efecto de la invención*

La presente invención permite la conservación estable de un tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial.

Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 es una vista que muestra una imagen de campo de luz de tejidos retinianos generados en los agregados obtenidos mediante la inducción de la diferenciación de células ES humanas con proteína fluorescente verde (en lo sucesivo, denominada a veces GFP, "green fluorescent protein") introducida en RAX (RAX::proteína fluorescente verde).

La figura 2 es una vista que muestra una imagen de fluorescencia de agregados que contienen el tejido retiniano mostrado en la figura 1.

45 La figura 3 es una vista que muestra una imagen de campo de luz de tejidos retinianos cultivados después de la separación de los agregados.

La figura 4 es una vista que muestra una imagen de fluorescencia de los tejidos retinianos mostrados en la figura 3.

La figura 5 es una vista que muestran los resultados de la inmunotinción de secciones congeladas de tejidos retinianos cultivados después de la separación de los agregados con anticuerpo anti-GFP, anticuerpo anti-Chx10,

anticuerpo anti-Pax6 o anticuerpo anti-Brn3.

La figura 6 es una vista que muestra el estado de tejidos retinianos cultivados después de la separación de los agregados, que no se congelaron como control del experimento (A, B), congelados sin contacto con una disolución de protección de las células (C, D), congelados después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) (E, F), congelados después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) y etilenglicol al 5,55% (en p/v) (G, H), y congelados después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v), etilenglicol al 5,55% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v) (I, J).

La figura 7 es una vista que muestra el estado de tejidos retinianos cultivados después de la separación de los agregados, que no se congelaron como control del experimento (A, B), congelados después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sacarosa al 5% (en p/v) (C, D), congelados después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sacarosa al 10% (en p/v) (E, F), congelados después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sacarosa al 20% (en p/v) (G, H), congelados después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v) (I, J), congelados después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene etilenglicol al 5,55% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v) (K, L).

La figura 8 es una vista que muestra los resultados de una inmunotinción con anticuerpo anti-GFP (A, C, E), anticuerpo anti-Chx10 (B), anticuerpo anti-Chx10 y anti-Pax6 (D), anticuerpo anti-Chx10 y anti-TuJ1 (F) de secciones congeladas de los tejidos retinianos cultivados después de la separación de los agregados, que se congelaron después de un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) y etilenglicol al 5,55% (en p/v) (A, B), y un tratamiento de penetración con una disolución que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v), etilenglicol al 5,55% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v) (C, D, E, F).

Modos de realizar la invención

Los modos para realizar la presente invención se explican en detalle a continuación.

Tal como se emplea en la presente, el término "transformante" significa la totalidad o parte de la materia viva, tal como una célula, producida mediante transformación. Los ejemplos de transformantes incluyen células procariontas, levaduras, células animales, células vegetales y células de insecto. Dependiendo de la diana, el transformante también se denomina a veces célula transformada, tejido transformado u hospedante transformado. La célula usada en la presente invención también puede ser un transformante.

Los ejemplos de células procariontas usadas para la técnica de ingeniería genética relacionada con la presente descripción incluyen células procariontas que pertenecen al género *Escherichia*, al género *Serratia*, al género *Bacillus*, al género *Brevibacterium*, al género *Corynebacterium*, al género *Microbacterium* y al género *Pseudomonas*, de modo específico, *Escherichia* XL1-Blue, *Escherichia* XL2-Blue y *Escherichia* DH1. Estas células se describen específicamente, por ejemplo, en Molecular Cloning (3ª edición), de Sambrook, J. y Russell, D.W., apéndice 3 (volumen 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor, EE. UU., 2001).

Tal como se emplea en la presente, el término "vector", con relación a la presente descripción, significa un vector capaz de transferir una secuencia polinucleotídica deseada a una célula objetivo. Los ejemplos de dichos vectores incluyen los que son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedante, tal como una célula procarionta, levadura, célula animal, célula vegetal, célula de insecto, animal individual y planta individual, o que permiten su incorporación en un cromosoma, y que contienen un promotor en una posición adecuada para la transcripción del polinucleótido.

De estos vectores, un vector adecuado para la clonación a menudo se indica como "vector de clonación". Este vector de clonación en general contiene múltiples sitios de clonación que contienen una pluralidad de sitios de enzimas de restricción. En la actualidad existen muchos vectores que pueden usarse para la clonación de genes en el campo pertinente, y son comercializados por distribuidores con nombres diferentes, puesto que son ligeramente diferentes (por ejemplo, el tipo y la secuencia de las enzimas de restricción en los sitios de clonación múltiple). Por ejemplo, se describen ejemplos representativos (también se describen los distribuidores) en Molecular Cloning (3ª edición), de Sambrook, J. y Russell, D.W., apéndice 3 (volumen 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor, EE. UU., 2001), y los expertos en la técnica pueden usarlos según sea apropiado para el objetivo.

El "vector", con relación a la presente descripción, también incluye un "vector de expresión", un "vector indicador", y un "vector recombinante". Un "vector de expresión" significa una secuencia de ácido nucleico en la que diversos elementos reguladores, además de un gen estructural y un promotor que regula su expresión, están unidos operablemente en la célula hospedante. Los ejemplos del "elemento regulador" incluyen un terminador, un marcador de selección, tal como un gen de resistencia a fármacos, y un elemento que contiene un potenciador. Los expertos en la técnica saben que el tipo de vector de expresión de una materia viva (por ejemplo, animal) y el tipo de elemento regulador que se va a emplear pueden variar dependiendo de la célula hospedante.

Los ejemplos de "vector recombinante", con relación a la presente descripción, incluyen (a) vector lambda FIX

(vector de fago) para seleccionar un banco de genoma, (b) vector lambda ZAP (vector de fago) para seleccionar para un ADNc, y (c) vector pBluescript II SK+/-, vector pGEM, vector pCR2.1 (vector plasmídico) para la clonación del ADN genómico. Los ejemplos de "vector de expresión" incluyen vector pSV2/neo, vector pcDNA, vector pUC18, vector pUC19, vector pRc/RSV, vector pLenti6/V5-Dest, vector pAd/CMV/V5-DEST, vector pDON-AI-2/neo y vector pMEI-5/neo (vector plasmídico). Los ejemplos de "vector indicador" incluyen vector pGL2, vector pGL3, vector pGL4.10, vector pGL4.11, vector pGL4.12, vector pGL4.70, vector pGL4.71, vector pGL4.72, vector pSLG, vector pSLO, vector pSLR, vector pEGFP, vector pAcGFP y vector pDsRed. Estos vectores pueden utilizarse según sea apropiado remitiéndose a la referencia bibliográfica de Molecular Cloning mencionada anteriormente.

Con relación a la presente descripción, los ejemplos de la técnica para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula incluyen la transformación, la transducción y la transfección. Como dichas técnicas de introducción pueden mencionarse específicamente, por ejemplo, los métodos descritos en Ausubel F. A. *et al.*, eds. (1988), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, Nueva York, NY; Sambrook J. *et al.* (1987), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. y 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, emisión especial; Experimental Medicine, "Transgene & expression analysis experiment method", YODOSHA CO., LTD., 1997. Los ejemplos de la técnica para confirmar la introducción intracelular de un gen incluyen análisis de la transferencia Northern, análisis de la transferencia Western u otras técnicas convencionales muy conocidas.

Con relación a la presente descripción, los ejemplos del método de introducción del vector incluyen transfección, transducción y transformación (por ejemplo, método de fosfato de calcio, método de liposomas, método de DEAE-dextrano, método de electroporación, método que emplea una pistola de partículas (pistola de genes), etc.).

El método de crioconservación de la presente invención es un método de crioconservación que se caracteriza por comprender los siguientes puntos (1) a (3):

(1) una primera etapa de poner en contacto un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial de 0 °C a 8 °C con una primera disolución, que es una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido y una cadena de poliol para un tratamiento de penetración,

(2) una segunda etapa de mantener, en una segunda disolución que es una disolución de crioconservación, el tejido originado a partir de la célula madre pluripotencial que se puso en contacto con la disolución de protección de las células en la primera etapa, y

(3) una tercera etapa de crioconservar, en presencia de un refrigerante, el tejido originado a partir de la célula madre pluripotencial que se mantuvo en la disolución de crioconservación en la segunda etapa, en el que la etapa de crioconservación se realiza inmediatamente después del inicio de la segunda etapa;

en el que el sulfóxido es sulfóxido de dimetilo y la cadena de poliol es etilenglicol, y el tejido es un tejido nervioso craneal.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "célula madre" se refiere a una célula que mantiene la misma capacidad de diferenciación incluso después de la división celular, y esta célula puede regenerar un tejido cuando el tejido se lesiona. En la presente, la célula madre puede ser una célula madre embrionaria ("embryonic stem", ES) o una célula madre de tejido (también denominada célula madre tisular, célula madre específica de tejido, o célula madre somática), o una célula madre pluripotencial artificial (célula iPS, célula madre pluripotencial inducida, "induced pluripotent stem cell"), pero no se limita a estas. Tal como se apreciará a partir del hecho de que el tejido originado a partir de las células madre mencionado anteriormente puede regenerar un tejido, se sabe que la célula madre puede diferenciarse en una célula normal parecida a una célula de un cuerpo vivo.

Las células madre pueden adquirirse en organizaciones concretas o también pueden comprarse como un producto disponible en el mercado. Los ejemplos de célula madre embrionaria de ratón incluyen células EB5.

Las células madre pueden mantenerse mediante un cultivo según métodos conocidos *per se*. Por ejemplo, las células madre pueden mantenerse mediante un cultivo sin células de soporte suplementado con suero de ternera fetal ("fetal calf serum", FCS), sustitución de suero inactivante ("Knockout Serum Replacement", KSR), y LIF.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "célula madre pluripotencial" se refiere a una célula madre que puede cultivarse *in vitro* y que tiene la capacidad de diferenciarse en cualquier célula (tejido originado a partir de triploblastos (ectodermo, mesodermo, endodermo)) que constituye un cuerpo vivo, excepto la placenta (pluripotencia), que incluye una célula madre embrionaria (célula ES). La "célula madre pluripotencial" puede obtenerse a partir de una célula madre reproductora o una célula madre en un tejido. También incluye una célula que tiene una pluripotencia artificial similar a la de las células madre embrionarias, después de introducir varios tipos de genes en una célula somática (también denominada célula madre pluripotencial artificial). Una célula madre pluripotencial puede producirse mediante un método conocido *per se*. Los ejemplos del método de producción incluyen los métodos descritos en Cell, 131(5), pp. 861-872 (2007); Cell, 126(4), pp. 663-676 (2006).

Tal como se emplea en la presente, la expresión "célula madre embrionaria (célula ES)" se refiere a una célula madre que tiene capacidad autorreplicativa y multipotencia (es decir, "pluripotencia"), que es una célula madre

pluripotencial derivada de un embrión temprano. Las células madre embrionarias fueron establecidas por primera vez en 1981, y también se han aplicado a la generación de ratones "knockout" desde 1989. En 1998, se establecieron las células madre embrionarias humanas, que también se están utilizando para la medicina regenerativa.

5 Tal como se emplea en la presente, la expresión "célula madre pluripotencial artificial" se refiere a una célula inducida para que presente multipotencia mediante la reprogramación directa de una célula diferenciada, tal como un fibroblasto, etc., mediante la expresión de varios tipos de genes, tales como Oct3/4, Sox2, Klf4 y Myc, lo cual fue establecido por Yamanaka *et al.* en células de ratón en 2006 (Takahashi K., Yamanaka S., Cell, 2006, 126(4), pp. 663-676). En 2007, también se establecieron en fibroblastos humanos, y estas tienen una multipotencia similar a la de las células madre embrionarias (Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., Cell, 2007, 131(5), pp. 861-872; Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A., Science, 2007, 318(5858), pp. 1917-1920; Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochizuki Y., Takizawa N., Yamanaka S., Nat. Biotechnol., 2008, 26(1), pp. 101-106).

15 Tal como se emplea en la presente, el término "diferenciación" se refiere a un fenómeno en el que dos o más tipos de células que tienen cualidades morfológica y/o funcionalmente diferentes se generan en una población de células hijas derivadas de la división de una única célula. Por tanto, el proceso mediante el cual una población de células (linaje de célula) derivada de una célula que no posee características especiales detectables por naturaleza, llega a mostrar características claras, tales como la producción de una proteína concreta, también se incluye en la diferenciación. En general, en la actualidad se considera que la diferenciación celular es un estado de un grupo de genes concretos en el genoma que se están expresando, y la diferenciación celular puede identificarse buscando una condición o un factor intracelular o extracelular que provoca dicho estado de expresión génica. En principio, el resultado de la diferenciación celular es estable, y la diferenciación en otro tipo de célula se produce solo excepcionalmente, en particular en células animales.

25 Tal como se emplea en la presente, el término "tejido" se refiere a una estructura de una población celular, que tiene una conformación en la que distintos tipos de células con formas y propiedades diferentes se configuran estéricamente en un patrón concreto, y el "tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial" en la presente invención se refiere a un agregado de células obtenido mediante la inducción de la diferenciación de una célula madre pluripotencial, que es una estructura de una población celular, que tiene una conformación en la que distintos tipos de células con formas y propiedades diferentes se configuran estéricamente en un patrón concreto.

30 Los ejemplos de una célula obtenida mediante la inducción de la diferenciación de una célula madre pluripotencial incluyen células nerviosas cerebrales, células nerviosas diencefálicas, células nerviosas del hipotálamo, células nerviosas del núcleo basal, células nerviosas del cerebelo, células del tejido intestinal, miocitos cardíacos, células pancreáticas, células hepáticas, y sus células progenitoras. De modo específico, pueden producirse basándose en el documento WO 2009/148170, J. Neurosci., 2 de febrero de 2011, 31(5):1919-1933; Nat. Neurosci., octubre de 2010, 13(10):1171-1180; Cell Stem Cell, 6 de noviembre de 2008, 3(5):519-532; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 19 de agosto de 2008, 105(33):11796-11801; Nature, 3 de febrero de 2011, 470(7332):105-109; Nat. Biotechnol., marzo de 2011, 29(3):267-272; Cell Stem Cell, 4 de febrero de 2011, 8(2):228-240; Development, marzo de 2011, 138(5):861-871; Nat. Biotechnol., noviembre de 2006, 24(11):1402-1411.

40 En la presente invención, la expresión "tejido nervioso craneal" significa una estructura en la que, en el cerebro, diencefalo, mesencefalo, cerebelo y epencefalo de un cuerpo vivo, al menos varios tipos de células que constituyen cada capa nerviosa y sus células progenitoras (por ejemplo, en el caso del cerebro, células Tbr1-positivas específicas de la 6ª capa, células Crip2-positivas específicas de la 5ª capa, y células Brn2-positivas específicas de la 2ª-3ª capa) están estéricamente dispuestas en capas. Como parte del tejido nervioso craneal, puede mencionarse el tejido retiniano. El "tejido retiniano" significa un tejido retiniano en el que al menos varios tipos de células, tales como células visuales, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células retinianas ganglionares y sus células progenitoras, que constituyen las respectivas capas retinianas en la retina viva, se disponen estéricamente en capas. Con respecto a cada célula, el tipo de célula que constituye cada capa retiniana puede confirmarse mediante un método conocido, basado en la expresión, por ejemplo, de un marcador celular (tal como Chx10 (célula bipolar), L7 (célula bipolar), Tuj1 (célula ganglionar), Brn3 (célula ganglionar), calretinina (célula amacrina), calbindina (célula horizontal), recoverina (célula visual), rodopsina (célula visual), RPE65 (célula epitelial pigmentaria), y Mif (célula epitelial pigmentaria)).

Por ejemplo, el tejido retiniano puede producirse a partir de la diferenciación de células ES humanas, específicamente mediante los métodos descritos en Nature, 472, pp. 51-56 (2011), y el documento WO2011/055855.

55 En la presente invención, la "disolución de crioprotección" se refiere a una mezcla de un crioprotector y un disolvente. El "crioprotector" es una sustancia añadida para evitar diversos trastornos provocados por el congelamiento, para intentar mantener la función y la tasa de supervivencia de las células durante el mayor tiempo posible durante la crioconservación de las células. La disolución de crioprotección puede denominarse disolución de protección de las células y significa lo mismo, puesto que protege a las células durante la congelación.

- 5 En la presente invención, la disolución de protección de las células (disolución de crioprotección) contiene sulfóxido (concretamente, sulfóxido de dimetilo) y una cadena de poliol (concretamente, etilenglicol) como crioprotectores. Preferiblemente, la disolución de crioprotector contiene además un oligosacárido. Específicamente, por ejemplo, también contiene preferiblemente oligosacáridos, tales como sacarosa, trehalosa, lactosa o rafinosa. Cuando se desee, puede añadirse un compuesto de amida, tal como acetamida, Percoll, Ficoll 70, Ficoll 70000 o polivinilpirrolidona.
- Los ejemplos de disolventes incluyen tampones, tales como disolución salina, PBS, EBSS y HBSS, medios de cultivo para cultivar células y tejidos, tales como DMEM, GMEM y RPMI, suero, sustituto de suero (Knock Out Serum Replacement, Invitrogen) y sus mezclas.
- 10 En la presente invención, la concentración final de sulfóxido en una disolución de protección de las células (disolución de crioprotección) es, por ejemplo, del 5% al 15% (en p/v), preferiblemente del 9% al 13% (en p/v), más preferiblemente de aproximadamente 11% (en p/v).
- En la presente invención, la concentración final de la cadena de poliol en una disolución de protección de las células (disolución de crioprotección) es, por ejemplo, del 4% al 15% (en p/v), preferiblemente del 4,5% al 8% (en p/v), más preferiblemente de aproximadamente 5,5% (en p/v).
- 15 En la presente invención, la concentración final de oligosacárido en una disolución de protección de las células (disolución de crioprotección) es, por ejemplo, del 5% al 20% (en p/v), preferiblemente del 8% al 12% (en p/v), más preferiblemente de aproximadamente 10% (en p/v).
- En la presente invención, la "disolución de crioprotección" se refiere a un medio para la crioconservación de tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial. Como disolución de crioconservación, también pueden usarse productos disponibles en el mercado, tales como Cell BANKER 1, 1plus, 2, 3 (JUJI FIELD INC.), TC-Protector (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.), Freezing Medium para células ES/iPS humanas (Reprocell Incorporated), CryoScarless sin DMSO (BioVerde), StemCell Keep (BioVerde) o disolución EFS (NK System).
- 20 La disolución de crioprotección puede ser una mezcla de un crioprotector y un disolvente. Como crioprotector y disolvente, pueden mencionarse los descritos anteriormente.
- La disolución de crioconservación en la presente invención preferiblemente contiene sulfóxido de dimetilo, acetamida y propilenglicol.
- En la presente invención, la concentración de sulfóxido de dimetilo en la disolución de crioconservación es preferiblemente de 1 a 4 M, la concentración de acetamida es preferiblemente de 0,5 a 2 M, y la concentración de propilenglicol es preferiblemente de 1,5 a 6 M.
- 30 La primera etapa del método de crioconservación de la presente invención es una etapa de poner en contacto un tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial con una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido de dimetilo y etilenglicol antes de congelar.
- En la primera etapa mencionada anteriormente, un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial se pone en contacto con una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido de dimetilo y etilenglicol.
- 35 Para "poner en contacto un tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial con una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido de dimetilo y etilenglicol", un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial puede trasladarse a una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido de dimetilo y etilenglicol, o una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido de dimetilo y etilenglicol puede añadirse a un tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial.
- 40 El tiempo para poner en contacto un tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial con una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido de dimetilo y etilenglicol es, por ejemplo de 1 min a 180 min, preferiblemente 5 min a 60 min, más preferiblemente de 15 min a 30 min. La temperatura a la cual un tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial se pone en contacto con una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido de dimetilo y etilenglicol es de 0 °C a 8 °C.
- 45 La densidad del tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial en el sistema de contacto de la primera etapa mencionada anteriormente (por ejemplo, la densidad del tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial en la disolución de protección de las células) se basa, por ejemplo, en el número de agregados, aproximadamente de 1 a 1000 agregados/ml, preferiblemente de 1 a 100 agregados/ml. El número de células por agregado es de aproximadamente 10^3 a 10^6 células.
- 50 El recipiente de cultivo celular usado para poner en contacto una disolución de protección de las células no está particularmente limitado, y puede ser determinado de modo apropiado por los expertos en la técnica. Los ejemplos de dicho recipiente incluyen un matraz, matraz de cultivo de tejidos, placa, placa Petri, placa de cultivo de tejidos, multiplaca, microplaca, placa de micropocillos, microporos, placa de múltiples pocillos, portaobjetos con cámaras,

cáscara, tubo, bandeja, bolsa de cultivo y botella de rodillo.

La segunda etapa del método de crioconservación de la presente invención es una etapa de mantener el tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial, que se puso en contacto con la disolución de protección de las células, en una disolución de crioconservación.

- 5 En la segunda etapa mencionada anteriormente, el tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial, que se puso en contacto con la disolución de protección de las células en la primera etapa, se mantiene en una disolución de crioconservación.

- 10 La densidad del tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial en la disolución de crioconservación en la segunda etapa mencionada anteriormente se basa, por ejemplo, en el número de agregados, aproximadamente de 1 a 1000 agregados/ml, preferiblemente de 1 a 100 agregados/ml. El número de células por agregado es de aproximadamente 10^3 a 10^6 células.

La tercera etapa del método de crioconservación de la presente invención es una etapa de crioconservar el tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial, que se mantuvo en la disolución de crioconservación, en presencia de un refrigerante.

- 15 Como método para "crioconservar" tejidos, se conocen varios métodos. Un método de crioconservación representativo es, por ejemplo, un método que implica congelar a una velocidad lenta de 0,1 a 10 °C/min durante un periodo de tiempo largo. Este método puede realizarse usando aparatos y herramientas, tales como como un congelador programable y BICELL (NIHON FREEZER CO., LTD).

- 20 Como método de crioconservación rápido, puede mencionarse un método que implica la aplicación de un fenómeno de vitrificación que aparece cuando un gas o líquido cristalino se solidifica rápidamente a no más de la temperatura de transición vítrea sin cristalización. Este método es mejor porque el tejido, el embrión y el óvulo sumergidos con antelación en una disolución de conservación con una concentración alta pueden crioconservarse de modo estable mediante una operación sencilla de vitrificación en un corto periodo de tiempo.

- 25 En la presente, el método de crioconservación rápido es un método de congelación de una muestra biológica, que incluye verter la muestra en un refrigerante, tal como nitrógeno líquido. Por ejemplo, puede mencionarse un método que implica colocar un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial y una disolución de crioconservación en un criotubo en hielo, y sumergir el criotubo mencionado en un refrigerante con unas pinzas. El tiempo para mantener un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial en una disolución de crioconservación para verterla en un refrigerante es preferiblemente lo más corto posible, lo cual sería dentro de 30 segundos, preferiblemente dentro de 10 segundos.

- 30 El "refrigerante" que se va a usar en la presente invención es preferiblemente un refrigerante capaz de provocar la vitrificación de las células, y puede usarse un refrigerante en general a -20 °C o menor, preferiblemente a -80 °C o menor, más preferiblemente a -150 °C o menor.

- 35 Los ejemplos específicos de refrigerante incluyen nitrógeno líquido, nitrógeno semiderretido, helio líquido, propano líquido y etano semiderretido, prefiriéndose el nitrógeno líquido y el nitrógeno semiderretido. El nitrógeno semiderretido es nitrógeno obtenido conservando el nitrógeno líquido a presión reducida para disminuir la temperatura del nitrógeno líquido de -205 a -210 °C, que es menor que -196 °C a presión normal (Huang *et al.*, Human Reproduction, vol. 20, n.º 1, pp. 122-128 (2005)). Cuando se emplea el nitrógeno semiderretido como refrigerante, puede realizarse la conservación mediante vitrificación mediante un aparato, tal como Vit-Master™ (IMT, Nes Ziona, Israel).

- 40 La velocidad de disminución de la temperatura para la crioconservación en presencia de un refrigerante es, por ejemplo, no menor que 10 °C/min, preferiblemente no menor que 30 °C/min, más preferiblemente no menor que 50 °C/min, en particular preferiblemente no menor que 100 °C/min.

- 45 El tiempo necesario para la crioconservación en presencia de un refrigerante para alcanzar una temperatura de crioconservación deseada (por ejemplo, -196 °C para el nitrógeno líquido) desde la temperatura ambiental está, por ejemplo, dentro de 5 min, más preferiblemente dentro de 3 min, aún más preferiblemente dentro de 1 min.

Ejemplos

Los ejemplos de la presente invención se describen con más detalle a continuación.

Ejemplo de referencia 1: Establecimiento de células ES humanas con una introducción en RAX

- 50 Se preparó una línea de células ES humanas en las que se ha introducido GFP en el locus del gen RAX, que es uno de los genes marcadores de las células progenitoras retinianas.

La nucleasa de dedos de cinc ("Zinc Finger Nuclease", ZFN) que rompe específicamente el gen RAX en el ADN genómico de una línea de células ES humanas (KhES-1: línea de células ES humanas establecida por la

- Universidad de Kioto) se adquirió en Sigma Aldrich. Usando las células ES humanas dispersadas en células individuales, se cotransfectaron dentro de estas un ARNm que codifica ZFN y un vector de introducción que contiene GFP y un marcador selectivo de fármaco, el gen de resistencia a la neomicina, mediante un método de electroporación, y las células se cultivaron en placa sobre fibroblastos de ratón con resistencia a la neomicina que se trataron con mitomicina C. Se añadió G418 al medio de cultivo al día siguiente del cultivo en placa y se realizó la selección con fármaco. La colonia de los clones de resistencia obtenidos se seleccionó y posteriormente se cultivó, y después se seleccionaron las células con la introducción mediante un método de PCR y un método de transferencia Southern, que produjo el establecimiento de la línea de células ES humanas con la introducción RAX::GFP.
- Ejemplo de referencia 2: Inducción de la diferenciación de células ES humanas con una introducción en RAX para producir tejido retiniano
- Usando las células ES humanas con la introducción RAX::GFP, se indujo la diferenciación en tejido retiniano.
- Se cultivaron células ES humanas con la introducción RAX::GFP (derivadas de KhES-1) según el método descrito en Ueno, M. *et al.*, PNAS, 2006, 103(25), 9554-9559, y Watanabe, K. *et al.*, Nat. Biotech., 2007, 25, 681-686, y se emplearon para el experimento.
- Como medio, se añadió medio DMEM/F12 (Invitrogen) con KSR al 20% ("Knockout Serum Replacement", sustitución de suero inactivante; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, bFGF 5 a 10 ng/ml y similares. Para la inducción de la diferenciación en tejido retiniano mediante un cultivo flotante, las células ES se dispersaron en células individuales en tripsina al 0,25%-EDTA (Invitrogen), y se hicieron flotar en 150 µl de medio de diferenciación a 9×10^3 células por pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para las células (placa esferoide SUMILON, SUMITOMO BAKELITE) para permitir la rápida formación de agregados, que se cultivaron a 37 °C, CO₂ al 5%.
- Como medio de diferenciación, se usó un medio sin suero (medio G-MEM con KSR al 20%, Y27632 y similares). Desde el día 2 de cultivo, se añadió Matrigel al cultivo. Después del inicio de la inducción de la diferenciación, se observó la expresión de GFP en los agregados mediante observación microscópica de fluorescencia desde aproximadamente el día 12 y, aproximadamente en el día 14, se formó una estructura similar al neuroepitelio que expresa GFP en la periferia de los agregados (figura 1, figura 2). Durante el periodo desde el día 18 al día 30, la estructura similar al neuroepitelio se separó de los agregados con una pinzas y después se cultivó en una cáscara de plástico no adhesiva después de la adición de suero de ternera fetal y ácido retinoico (figura 3, figura 4). Se preparó una sección y se analizó el estado de diferenciación mediante un método de inmunotinción de a fluorescencia (figura 5). Por ejemplo, se demostró que la estructura neuroepitelial después de 40 días desde el inicio de la inducción de la diferenciación estaba compuesta de células GFP-positivas que expresan el gen RAX, y que, en las células GFP-positivas, Pax6, que es una de las células positivas a genes marcadores de células progenitoras retinianas, Chx10, que es una de las células positivas a genes marcadores de células bipolares, y Brn3, que es una de las células positivas a genes marcadores de células ganglionares, estaban dispuestas en capas para formar un tejido retiniano (figura 5).
- Ejemplo comparativo 1: Crioconservación de tejido retiniano obtenido mediante la inducción de la diferenciación de una célula ES humana
- Los tejidos retinianos obtenidos mediante la inducción de la diferenciación se crioconservaron a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min.
- Se añadió medio DMEM/F12 con sulfóxido de dimetilo 2 M (DMSO), acetamida 1 M y propilenglicol 3 M (DAP213) como disolución de crioconservación. Se recolectaron aproximadamente 10 tejidos retinianos en un tubo de polipropilenglicol de 15 ml desde una placa de cultivo, seguido de la retirada del sobrenadante y la adición de 200 µl de la disolución de crioconservación, y el tejido retiniano se trasladó a un criotubo junto con la disolución de crioconservación. El criotubo se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido con unas pinzas y se crioconservó a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min. El tubo congelado se conservó en una nevera a -150 °C hasta la descongelación.
- El criotubo se extrajo de la nevera a -150 °C, y se añadió un medio calentado hasta 37 °C con antelación en un baño de agua a 37 °C al criotubo para descongelar el tejido. La mezcla se dispensó en un tubo de 15 ml, y el tejido retiniano se colocó en un medio (10 ml) calentado hasta 37 °C, seguido de la retirada del sobrenadante. El tejido se lavó con PBS (10 ml) y se añadió a una placa de cultivo flotante que contenía un medio (medio DMEM/F12 con N2, FBS al 10%, ácido retinoico y similares) (medio de cultivo de tejido retiniano), y se cultivó a 37 °C. Se realizó una observación microscópica y una observación microscópica de fluorescencia desde el día siguiente a la descongelación, y se comparó el estado de supervivencia de las células y el aspecto de la estructura epitelial con los del tejido retiniano (figura 6 A, B) sin crioconservación, y se comprobó el éxito o el fracaso de la crioconservación.
- Como resultado, casi todas las células estaban muertas, y se observó una gran cantidad de residuos de las células muertas. Apenas se observó expresión de GFP. Por tanto, se demostró que la mera crioconservación a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min no produce la crioconservación del tejido retiniano (figura 6 C, D).

Ejemplo comparativo 2: Crioconservación de tejido retiniano obtenido mediante la inducción de la diferenciación de una célula ES humana mediante congelación después de un tratamiento de penetración en un crioprotector (sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v))

5 Antes de la congelación, un tejido retiniano obtenido mediante la inducción de la diferenciación se sometió a un tratamiento de penetración en una disolución que contenía sulfóxido de dimetilo (DMSO) como crioprotector, y se crioconservó a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min.

10 Se recolectaron aproximadamente de 10 a 20 tejidos retinianos en un tubo de polipropilenglicol de 15 ml desde una placa de cultivo, seguido de la retirada del sobrenadante y la adición de una disolución (1 ml) que contenía un crioprotector enfriado con antelación sobre hielo, y la mezcla se mantuvo en hielo durante 15 min a 30 min. Como disolución que contiene un crioprotector, se usó el medio de cultivo de tejido retiniano mencionado anteriormente con adición de sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v). La disolución que contenía el crioprotector se retiró, se añadió DAP213 (200 µl) como disolución de crioconservación, y el tejido retiniano se trasladó a un criotubo junto con la disolución de crioconservación. El criotubo se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido con unas pinzas y se crioconservó a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min. El tubo congelado se conservó en una nevera a -150 °C hasta la descongelación.

15 Cuando se crioconserva a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min después de un tratamiento de penetración que emplea un medio de cultivo de tejido retiniano que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) como crioprotector, el tejido retiniano que expresa RAX se reduce drásticamente, comparado con el control sin congelación (figura 6 E, F).

20 Ejemplo 1: Crioconservación de tejido retiniano obtenido mediante la inducción de la diferenciación de una célula ES humana mediante congelación después de un tratamiento de penetración con crioprotectores (sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) y etilenglicol al 5,55% (en p/v))

25 Se realizó de la misma manera que el ejemplo comparativo 2, excepto que un tejido retiniano obtenido mediante la inducción de la diferenciación se sometió a un tratamiento de penetración usando una disolución que contenía sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) y etilenglicol (EG) al 5,55% (en p/v) como crioprotectores.

30 Cuando se crioconserva a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min después de un tratamiento de penetración crioprotector usando un medio de cultivo de tejido retiniano que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) y etilenglicol (EG) al 5,55% (en p/v) como crioprotectores, la propiedad conservante de un tejido retiniano que expresa RAX mejoró (figura 6 G, H), y se descubrió que la estructura de capas se había mantenido (figura 8 A, B), con relación al tratamiento de penetración crioprotector mencionado anteriormente que emplea un medio de cultivo de tejido retiniano que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v).

35 Ejemplo 2: Crioconservación de tejido retiniano obtenido mediante la inducción de la diferenciación de una célula ES humana mediante congelación después de un tratamiento de penetración con crioprotectores (sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v), etilenglicol al 5,55% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v))

Se realizó de la misma manera que el ejemplo comparativo 2, excepto que un tejido retiniano obtenido mediante la inducción de la diferenciación se sometió a un tratamiento de penetración usando una disolución que contenía sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v), etilenglicol (EG) al 5,55% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v) como crioprotectores.

40 Cuando se crioconserva a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min después de un tratamiento de penetración crioprotector usando un medio de cultivo de tejido retiniano que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v), etilenglicol (EG) al 5,55% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v), se mantuvo una condición comparable a un tejido retiniano sin crioconservación, mientras que la intensidad de la expresión de GFP fue algo más débil, comparado con el tejido retiniano sin crioconservación. La propiedad de conservación fue muy buena (figura 6 I, J), y también se mantuvo la estructura de capas (figura 8 C, D, E).

45 Ejemplo comparativo 3: Crioconservación de tejido retiniano obtenido mediante la inducción de la diferenciación de una célula ES humana mediante congelación después de un tratamiento de penetración con un crioprotector (sacarosa)

50 Usando el medio de cultivo de tejido retiniano mencionado anteriormente al que se le añadió, respectivamente, sacarosa al 5%, sacarosa al 10%, sacarosa al 20%, y EG al 5,55% y sacarosa al 10%, y al que se le añadió sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v) como disoluciones de penetración crioprotectoras, se realizó la congelación y la descongelación mediante procesos similares a los mencionados anteriormente.

55 Cuando se crioconserva a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min después de un tratamiento de penetración que emplea un medio de cultivo de tejido retiniano solo con sacarosa como disolución de penetración crioprotectora, la propiedad de supervivencia celular después de la descongelación fue

5 considerablemente mala a cualquiera concentración del 5% (en p/v), 10% (en p/v) y 20% (en p/v), y apenas se observó expresión de GFP (figura 7 C, D, E, F, G, H), comparado con un control sin congelación (figura 7 A, B). Además, cuando se crioconserva a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min después de un tratamiento de penetración que emplea un medio de cultivo de tejido retiniano que contiene EG al 5,55% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v), la propiedad de supervivencia celular después de la descongelación fue considerablemente mala, y apenas se observó expresión de GFP (figura 7 K, L), comparado con un control sin congelación. Cuando se crioconserva a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 100 °C/min después de un tratamiento de penetración que emplea un medio de cultivo de tejido retiniano que contiene sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 11,0% (en p/v) y sacarosa al 10% (en p/v), la propiedad de supervivencia celular después de la descongelación fue mala y la expresión de GFP débil, comparado con un control sin congelación, y no fue posible la conservación en un estado comparable a un control sin congelación (figura 7 I, J).

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, puede proporcionarse un método de conservación de un tejido nervioso craneal originado a partir de una célula madre pluripotencial.

15 Esta solicitud se basa en la solicitud de patente n.º 2011-258208, presentada en Japón (fecha de presentación: 25 de noviembre de 2011).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para crioconservar un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial, que comprende los siguientes puntos (1) a (3):
- 5 (1) una primera etapa de poner en contacto un tejido originado a partir de una célula madre pluripotencial de 0 °C a 8 °C con una primera disolución, que es una disolución de protección de las células y que contiene sulfóxido y una cadena de poliol para un tratamiento de penetración,
- (2) una segunda etapa de mantener, en una segunda disolución que es una disolución de crioconservación, el tejido originado a partir de la célula madre pluripotencial que se puso en contacto con la disolución de protección de las células en la primera etapa, y
- 10 (3) una tercera etapa de crioconservar, en presencia de un refrigerante, el tejido originado a partir de la célula madre pluripotencial que se mantuvo en la disolución de crioconservación en la segunda etapa, en el que la etapa de crioconservación se realiza inmediatamente después del inicio de la segunda etapa;
- en el que el sulfóxido es sulfóxido de dimetilo y la cadena de poliol es etilenglicol, y el tejido es un tejido nervioso craneal.
- 15 2.- El método de crioconservación según la reivindicación 1, en el que la disolución de protección de las células que contiene sulfóxido y una cadena de poliol es una disolución de protección de las células que contiene sulfóxido, una cadena de poliol y un oligosacárido.
- 3.- El método de crioconservación según la reivindicación 2, en el que la disolución de protección de las células tiene una concentración de sulfóxido del 5% al 15%, una concentración de cadena de poliol del 4% al 15%, y una concentración de oligosacárido del 5% al 20%.
- 20 4.- El método de crioconservación según la reivindicación 2 o 3, en el que el oligosacárido es sacarosa.
- 5.- El método de crioconservación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha célula madre pluripotencial es una célula madre pluripotencial humana.
- 25 6.- El método de crioconservación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tejido nervioso craneal es un tejido retiniano.
- 7.- El método de crioconservación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la tercera etapa se realiza a una velocidad de disminución de la temperatura no menor que 10 °C/min.
- 8.- El método de crioconservación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el refrigerante es nitrógeno líquido.
- 30 9.- El método de crioconservación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la disolución de crioconservación es una disolución de crioconservación que contiene sulfóxido de dimetilo, acetamida y propilenglicol.
- 10.- El método de crioconservación según la reivindicación 9, en el que la concentración de sulfóxido de dimetilo es de 1 a 4 M, y la concentración de acetamida es de 0,5 a 2 M, y la concentración de propilenglicol es de 1,5 a 6 M.

35

FIG.1

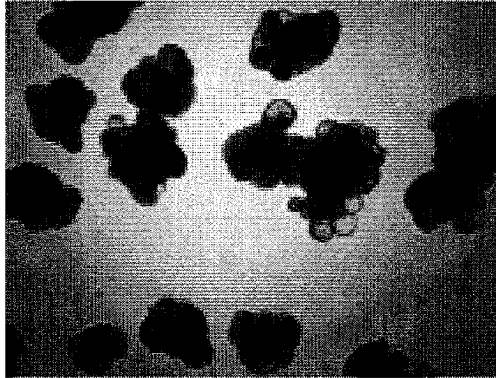


FIG.2

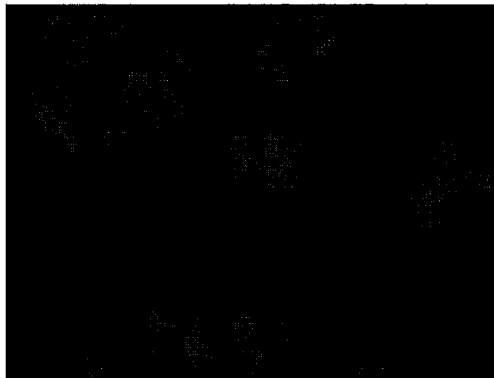


FIG.3

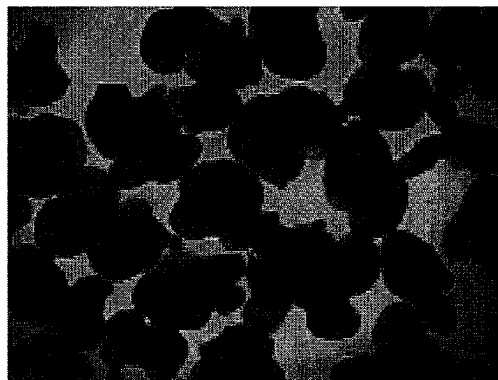


FIG.4

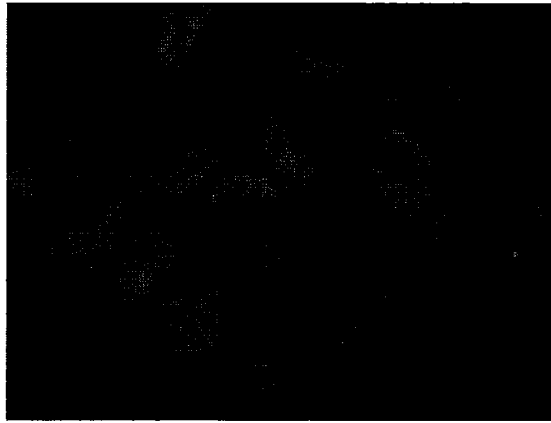
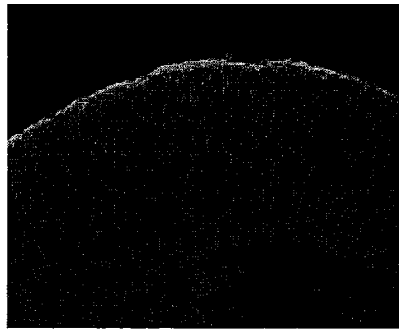


FIG.5

A:GFP



B:Chx10



C:Pax6



D:Brn3



FIG.6

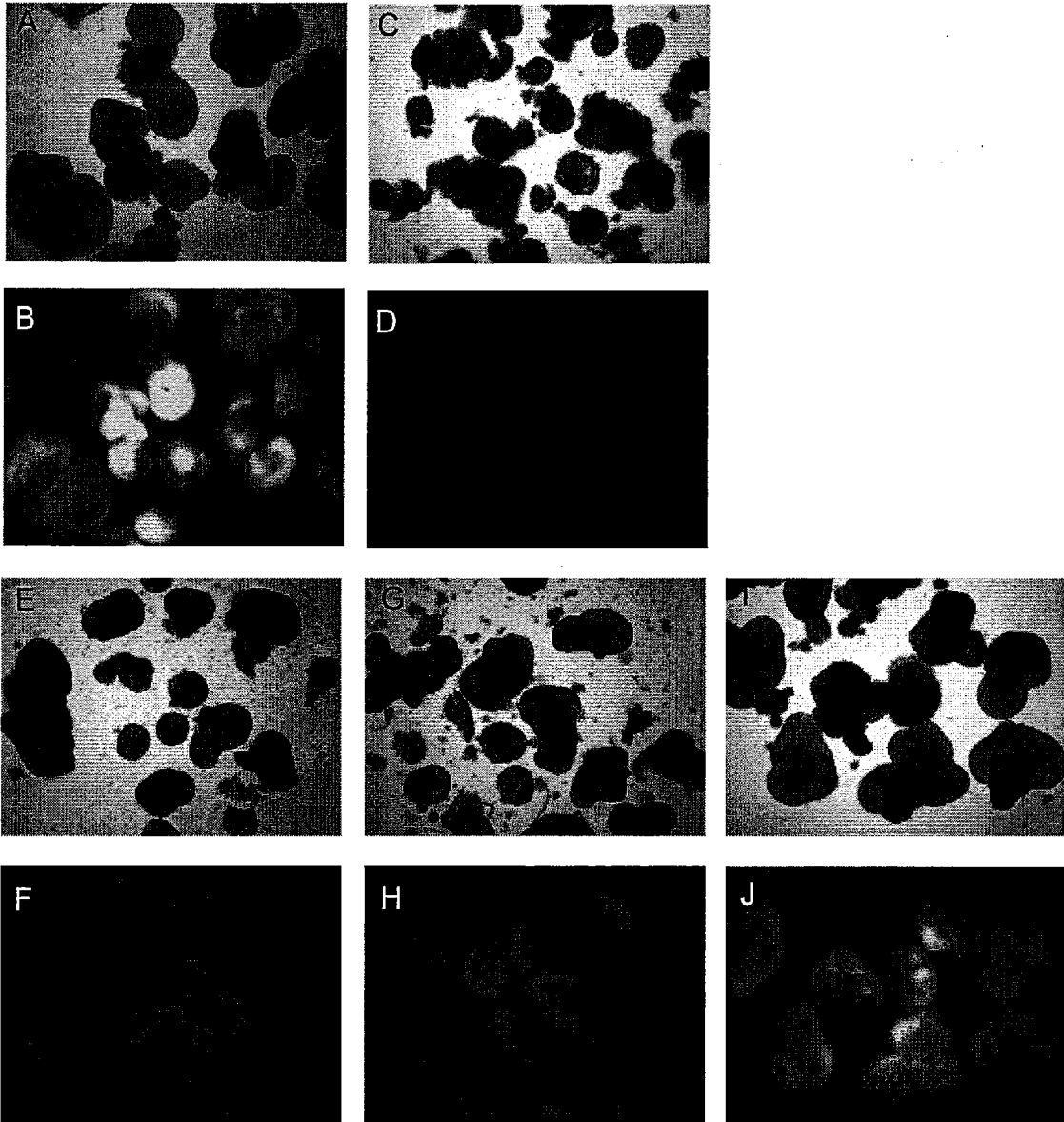


FIG.7

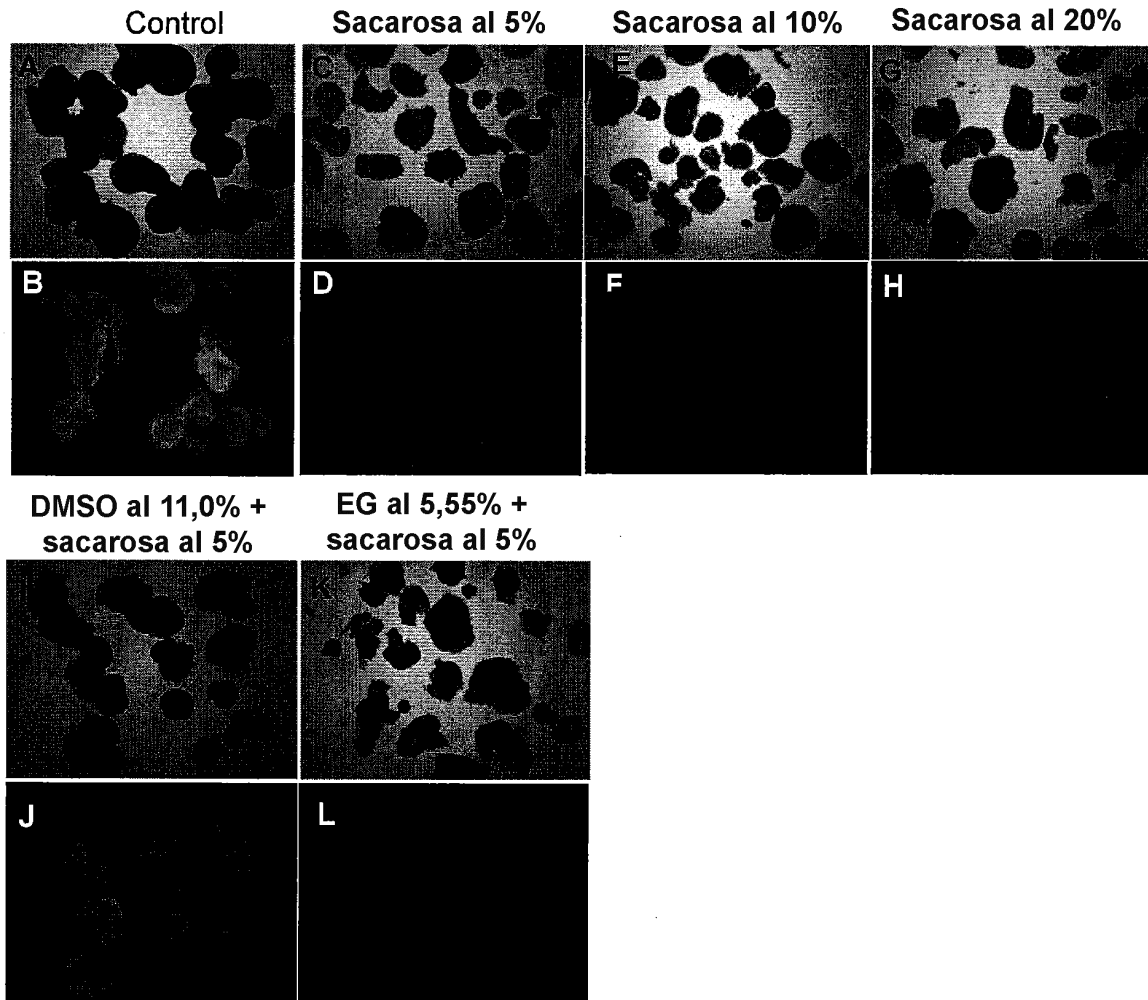
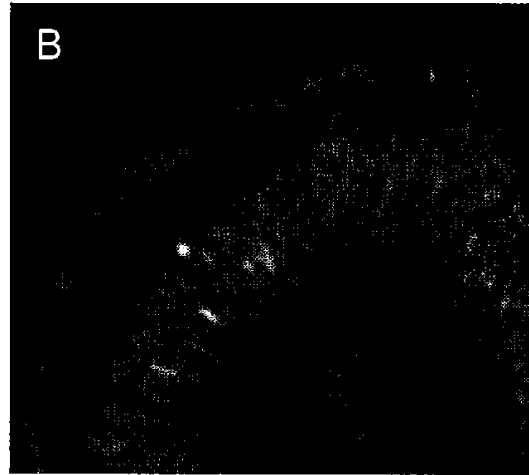
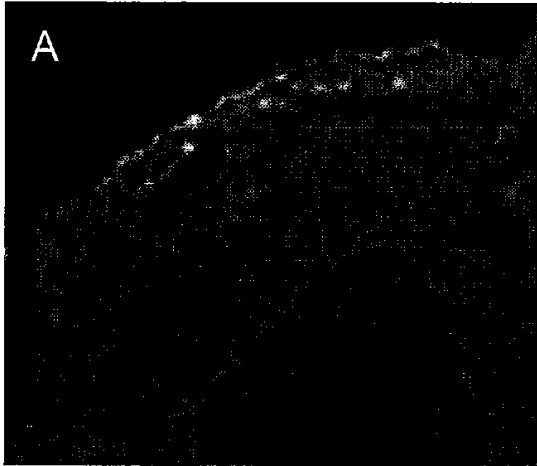


FIG.8

DMSO/EG



DMSO/EG/Sacarosa

