

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 028**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/00** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2011 PCT/JP2011/060778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11142364**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2011 E 11780621 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2570139**

54 Título: **Método de producción de una lámina celular**

30 Prioridad:

**10.05.2010 JP 2010108674**

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

**24.03.2020**

73 Titular/es:

**YASUKAWA, TSUTOMU (100.0%)  
3-31, Oshima-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi  
Aichi 464-0833, JP**

72 Inventor/es:

**TAKAHASHI, MASAYO y  
YASUKAWA, TSUTOMU**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 750 028 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de producción de una lámina celular

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de producción de una lámina celular utilizando un sustrato plano, en particular, a un método de producción de una lámina epitelial del pigmento retiniano. La presente invención también se refiere a un método de producción de una membrana de Bruch usando un sustrato plano.

10

**Técnica antecedente**

La degeneración macular senil (DMS) es actualmente una de las principales enfermedades causantes de ceguera legal en los países desarrollados, y se presenta principalmente en personas mayores de 50 años o más. La degeneración macular senil es una enfermedad provocada por cambios de la mácula asociado con la edad, y se clasifica en principalmente en el tipo exudativo y el tipo atrófico. La degeneración macular senil exudativa es una enfermedad en que, en ciudadanos anciano, se desarrollan nuevos vasos sanguíneos en la mácula a partir de la membrana coroides, y se producen hemorragias y lesiones exudativas debajo del epitelio del pigmento retiniano o debajo de la retina, para finalmente formar tejidos cicatriciales. La degeneración macular senil atrófica es una enfermedad asociada con la atrofia de la región macular y la acumulación de drusas. Además, una lesión precursora antes de alcanzar una degeneración macular senil de tipo exudativo o de tipo atrófico, en ocasiones se denomina degeneración macular senil temprana, y esta lesión también se considera una patología de la degeneración macular senil.

15

20

25

30

Para el tratamiento de la degeneración macular senil en el caso de un tipo exudativo leve, se puede seleccionar un método de tratamiento dirigido a la degeneración/extracción de nuevos vasos sanguíneos mediante una terapia quirúrgica tal como la terapia fotodinámica, la fotocoagulación con láser, la cirugía de extracción de nuevos vasos sanguíneos y similares, una terapia farmacológica tal como la administración de un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) relacionado con la angiogénesis, y similares. Sin embargo, en el caso de un tipo exudativo o atrófico que ha progresado hasta mostrar atrofia severa y deficiencia del epitelio del pigmento retiniano (EPR), los medios antes mencionados no muestran eficacia. En tal caso, el trasplante de células epiteliales del pigmento retiniano o epitelio del pigmento retiniano a un sitio subretiniano de pérdida de epitelio del pigmento retiniano es un método de tratamiento eficaz (documentos de patente 1, 2).

35

40

45

50

Cuando las células se usan para trasplantes, los ejemplos de células epiteliales del pigmento retiniano incluyen células epiteliales del pigmento retiniano separadas del ojo de un feto como donante y cultivadas, células epiteliales del pigmento del iris separadas del propio ojo del paciente y cultivadas, células epiteliales del pigmento retiniano recogidas por raspado durante una cirugía, y similares. Sin embargo, cuando se usan células de otra persona como donante, se teme el rechazo por parte de los pacientes, e incluso cuando se usan las propias células del paciente para el tratamiento, el uso de un tipo celular distinto para el trasplante no es preferente. Adicionalmente, el trasplante de células separadas y cultivadas muestra una tasa de supervivencia problemática, lo que impide el ejercicio de una función suficiente como epitelio. Por lo tanto, también se ha propuesto como epitelio del pigmento retiniano para trasplante un tejido que consiste en epitelio del pigmento retiniano-membrana Bruch-membrana coroides y una lámina epitelial de pigmento retiniano cultivada sobre una lámina artificial (documentos de patente 1, 3). Sin embargo, se teme que la membrana coroides extirpada y la lámina artificial formen un bloqueo para el injerto del epitelio y el mantenimiento de la función del cuerpo. En los últimos años, además, se ha estudiado el trasplante de células epiteliales del pigmento retiniano (documento no de patente 1) o lámina artificial utilizando células iPS (forma sigla de *induced pluripotent stem*), y se ha buscado una solución al problema de la antigenicidad. Sin embargo, aún no se ha resuelto el problema del bloqueo para el prendimiento del injerto celular y el mantenimiento de la función de la lámina en el cuerpo, y ha sido el problema la producción de epitelio del pigmento retiniano que sea terapéuticamente eficaz para la degeneración macular senil y conveniente de preparar.

Kubota *et al* (2006) *Biomaterials* 27:3639-3644 divulga láminas de células epiteliales del pigmento retiniano trasplantables para ingeniería de tejidos. La publicación de patente internacional WO2009/127809 A1 divulga una membrana para soportar células, y en particular, células epiteliales del pigmento retiniano.

55

**[Listado de documentos]**

[documentos de patente]

60

documento de patente 1: JP-A-H9-501303  
 documento de patente 2: JP-A-2008-173333  
 documento de patente 3: JP-A-2007-509643

65

[documento no de patente]

documento no de patente 1: Neuroscience Letters, 458, 2009, 126-131

**Sumario de la invención**

**5 Problemas a resolver por la invención**

El problema de la presente invención es desarrollar un nuevo método para producir de forma simple una lámina celular procedente de mamífero sin usar una lámina artificial, y proporcionar la lámina celular a un sujeto que necesita un trasplante de tejido. En particular, el problema es proporcionar epitelio para trasplante, que muestre una alta tasa de supervivencia y se superior en función, para la degeneración macular senil acompañada de un defecto del epitelio del pigmento retiniano.

**Medios para resolver los problemas**

15 En general, cuando las células epiteliales que contienen células epiteliales del pigmento retiniano se cultivan a baja densidad en una placa plana, la parte basal de las células se forma en el lado de la superficie de contacto con la placa. Los presentes inventores han descubierto que, cuando las células epiteliales del pigmento retiniano separadas del ojo humano y cultivadas se agregan y cultivan de forma tridimensional en lugar de sobre un sustrato plano, es decir, se cultivan esféricamente (esferoidalmente), las células presentes dentro del agregado celular esférico se destruyen por apoptosis y la membrana de Bruch se forma en la superficie del agregado celular para estar en contacto con el suero (datos no publicados). Además, han descubierto que la superficie celular se diferencia como epitelio del pigmento retiniano. De ahí que los inventores hayan estudiado la posibilidad de la diferenciación del epitelio sin inducción de la desdiferenciación celular y la formación de la membrana de Bruch en la superficie de contacto con el suero, bajo un entorno donde se produce preferentemente la adhesión célula-célula en lugar de la adhesión con la matriz extracelular, incluso en un cultivo plano normal, y se descubrió que la membrana de Bruch se produce en el lado opuesto al normal, en concreto, el lado de la superficie de contacto con el suero, por parte de un cultivo plano de células epiteliales del pigmento retiniano en condiciones de alta densidad, es decir a 10.000 células/mm<sup>2</sup> - 120.000 células/mm<sup>2</sup>. Además, han descubierto que las células epiteliales del pigmento retiniano no se desdiferencian sino que se diferencian como epitelio en tal cultivo. Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos y han completado la presente invención. Por consiguiente, la presente invención proporciona

[1] un método de producción de una lámina celular, que comprende las siguientes etapas;

- (1) una etapa de preparación de una célula epitelial del pigmento retiniano,
- (2) una etapa de siembra de la célula preparada sobre un sustrato plano a 10.000 células/mm<sup>2</sup> - 120.000 células/mm<sup>2</sup>, y de cultivo de la célula, en donde la lámina celular comprende una membrana basal formada en el lado opuesto al lado a estar en contacto con el sustrato plano, y
- (3) una etapa de confirmación de la formación de la membrana de Bruch en el lado de la célula opuesto al lado a estar en contacto con el sustrato plano;

- [2] el método del anteriormente mencionado [1], en donde la lámina celular obtenida comprende una unión estrecha formada entre las células;
- [3] el método del anteriormente mencionado [1], que comprende adicionalmente la siguiente etapa (4):
- [4] una etapa de confirmación de la presencia o ausencia de expresión de un marcador de diferenciación en las células cultivadas obtenidas en la etapa (2);
- [4] el método del anteriormente mencionado [3], en donde, en la etapa (4), el marcador de diferenciación es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en bestrofina-1, RPE-65, citoqueratina, ocludina, ZO-1, elastina, actina, colágeno de tipo 1 y colágeno de tipo 4;
- [5] un método de producción de una membrana de Bruch que comprende una etapa de separación de la membrana de Bruch formada mediante el método de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [1] - [4];
- [6] una lámina celular producida mediante el método de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [1] - [4];
- [7] un material para trasplante para el tratamiento de una enfermedad, que comprende una lámina celular producida mediante el método de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [1] - [4]; y
- [8] la membrana de Bruch producida mediante el método del anteriormente mencionado [5].

**Efecto de la invención**

De acuerdo con la presente invención, se puede preparar de manera simple una lámina celular que posee una estructura de capa inversa a la de una lámina celular obtenida por un método de cultivo normal, y que tiene una constitución en donde la membrana basal está expuesta. Usando la lámina celular de la presente invención, la membrana basal puede ponerse en contacto con un tejido objetivo de trasplante, sin voltear la lámina. Por lo tanto, la lámina celular puede simplificar la operación de trasplante, es superior en tasa de supervivencia y, por lo tanto, es extremadamente útil para el uso en trasplantes. Por ejemplo, se puede producir fácilmente una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano mediante un cultivo plano, y se puede aplicar al trasplante a pacientes con degeneración macular senil. En particular, cuando las células a cultivar son células epiteliales del pigmento retiniano obtenidas de células iPS, se puede evitar el rechazo en el trasplante dado que se utilizan las células del propio

paciente.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La Fig. 1 muestra una imagen fotográfica de una lámina observada sembrando células epiteliales del pigmento retiniano humanas a 5.000 células/mm<sup>2</sup> sobre un portaobjetos de cámaras de 4 pocillos (Lab-Tek), en donde la flecha muestra una lámina de células retraída.
- 10 La Fig. 2 muestra una imagen fotográfica de una lámina observada sembrando células epiteliales del pigmento retiniano humanas a 20.000 células/mm<sup>2</sup> sobre un portaobjetos de cámaras de 4 pocillos (Lab-Tek), en donde no se observó contracción en la lámina celular.
- 15 La Fig. 3 muestra imágenes fotográficas e imágenes teñidas de células cuando se sembraron células epiteliales del pigmento retiniano humanas a 20.000 células/mm<sup>2</sup>, en donde (A) es una imagen fotográfica de células en el día 0 después de la siembra, (C) es una imagen fotográfica de las drusas duras en el día 1 después de la siembra, (C) es una imagen fotográfica de células en el día 1 después de la siembra, (D) es una imagen fotográfica de la membrana de Bruch en el día 1 después de la siembra, (E) es una imagen de tinción de núcleos celulares el día 1 después de la siembra, y (F) es una imagen de tinción de actina en la membrana de Bruch el día 1 después de la siembra.
- 20 La Fig. 4 es una imagen de elastina teñida de fibras elásticas reticuladas después de 2 semanas de cultivo plano de células epiteliales del pigmento retiniano humano.
- La Fig. 5 muestra los resultados de una transferencia Western para una proteína extraída de una lámina epitelial de pigmento retiniano humano, que confirma la expresión de cada una de las proteínas marcadoras RPE-65, ocludina, citoqueratina 18, ZO-1, colágeno de tipo 4 y elastina.
- 25 La Fig. 6 muestra imágenes de microscopio electrónico de barrido de una lámina epitelial de pigmento retiniano humano, en donde las flechas muestran una fibra de colágeno y una fibra elástica, y la figura de la parte inferior derecha muestra un plegamiento basal expuesto (microvellosidades de la parte basal).

### Descripción de realizaciones

30 La presente invención se explica en detalle a continuación. La presente invención proporciona un método de producción de una lámina celular, que comprende las siguientes etapas;

- (1) una etapa de preparación de una célula epitelial del pigmento retiniano, y  
 (2) una etapa de siembra de las células preparadas sobre un sustrato plano a 10.000 células/mm<sup>2</sup> - 120.000 células/mm<sup>2</sup>y, de cultivo de las células.

35 Las células preparadas en la etapa (1) pueden proceder de cualquier mamífero (por ejemplo, ser humano, mono, ratón, rata, perro, ganado bovino, caballo, cerdo, oveja, cabra, gato, conejo, hámster, cobaya, etc.). Son preferentes las células procedentes de ser humano.

40 Como tipo celular de las células a preparar, se usa preferentemente cualquiera de las células de tipo epitelial y endotelial que presenten adherencia. Los ejemplos de tales células incluyen las células epiteliales del pigmento retiniano.

45 Las células a preparar pueden ser células primarias recogidas directamente de un tejido u órgano, o pueden ser células de varias generaciones después de pases. Adicionalmente, las células también pueden obtenerse induciendo la diferenciación de células madre, entre ellas células madre embrionarias (células ES (forma siglada de *embryonic stem cell*), que son células indiferenciadas, células madre pluripotentes, tales como células madre mesenquimatosas, que tienen pluripotencia, y similares, y células madre unipotentes, tales como células progenitoras endoteliales de vasos sanguíneos que tienen unipotencia, y similares. Las células ES pueden ser células ES producidas por reprogramación nuclear de células somáticas. Además, las células a utilizar pueden prepararse induciendo la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (célula iPS), lo que se ha informado en los últimos años. Las células iPS son células madre artificiales obtenidas de células somáticas que tienen propiedades equivalentes a las de las células ES, que se pueden producir mediante la introducción de una sustancia de reprogramación nuclear particular (ácido nucleico, proteína, compuesto de bajo peso molecular, etc.) en células somáticas [Takahashi, K. y Yamanaka, S., *Cell*, 126: 663-676 (2006); Takahashi, K. *et al.*, *Cell*, 131: 861-872 (2007)]. La condición/medio para la diferenciación de las células madre mencionadas anteriormente en células diferenciadas deseadas puede ser una condición/medio conocido de forma convencional, o puede ser determinado apropiadamente por los expertos en la materia. Cuando la lámina celular a producir mediante la presente invención se usa para trasplante, el uso de células iPS es preferible dado que usando células somáticas del sujeto trasplantado como fuente de las células iPS se puede obtener una

50  
55  
60 lámina celular que no tenga antigenicidad para el sujeto trasplantado.

65 Las células a preparar en la presente invención son preferentemente células epiteliales del pigmento retiniano humano. Además, las células epiteliales del pigmento retiniano son células diferenciadas obtenidas de células madre o células obtenidas de un ojo. Las células epiteliales del pigmento retiniano de un ojo se recogen extrayendo un ojo de un cadáver, dividiendo rápidamente el ojo en el segmento ecuatorial, extrayendo el cuerpo vítreo y la retina, y raspando las células con un raspador de células o liberando las células de la membrana de Bruch con solución de tripsina o

- EDTA. Posteriormente, las células se dejan en reposo en un medio de cultivo para permitir la adhesión a la placa de cultivo, se inducen a crecer hasta una cantidad necesaria de células, y el número de células se garantiza mediante un subcultivo apropiado con tratamiento con tripsina y similar. Cuando se induce la diferenciación de células madre, las células ES humanas o las células iPS se cultivan en un medio de diferenciación de células ES al que se ha añadido Dkk-1 (antagonista de Wnt) y Lefty A (antagonista nodal). Rx, Pax6 y Mitf, que son marcadores de células progenitoras de retina, se expresan mediante el cultivo durante un período dado, y se pueden obtener células epiteliales del pigmento retiniano humana confirmando una forma poligonal mediante observación morfológica basada en observación al microscopio óptico.
- En la etapa (2), se puede producir una lámina celular sembrando las células preparadas anteriormente sobre un sustrato plano a una alta densidad, y cultivando las células. Si bien el sustrato plano en la presente memoria descriptiva no está particularmente limitado, siempre que se use para cultivo celular, por ejemplo, se pueden mencionar un matraz, matraz para cultivo de tejidos, placa, placa de Petri, placa para cultivo de tejidos, multiplaca, microplaca, placa de micropocillos, placa múltiple, placa multipocillo, portaobjetos de cámaras, carcaza, tubo, bandeja, bolsa de cultivo, frasco rotatorio. Los ejemplos del material del sustrato plano en la presente memoria descriptiva incluyen, pero sin limitación, materiales inorgánicos tales como metal, vidrio, cerámica, silicio y similares, y materiales orgánicos tales como elastómero y plástico (por ejemplo, resina de poliéster, resina de polietileno, resina de polipropileno, resina de ABS, nylon, resina acrílica, resina de flúor, resina de policarbonato, resina de poliuretano, resina de metilpenteno, resina de fenol, resina de melamina, resina epoxi, resina de cloruro de vinilo). Si bien el sustrato plano puede someterse a un tratamiento de la superficie para mejorar la adherencia para las células adherentes, puede no someterse a un tratamiento alguno, para facilitar la etapa de desprendimiento de la lámina celular de la presente invención del sustrato plano. Cuando se trata el sustrato plano, puede ser un tratamiento de superficie con, por ejemplo, colágeno, gelatina, Matrigel, poli-L-lisina, poli-D-lisina, laminina, fibronectina y similares.
- "Alta densidad" en la presente memoria descriptiva significa una densidad, de un nivel no menor que la densidad celular observada en un tejido normal del que proceden las células preparadas. Si bien los expertos en la materia pueden determinar el límite superior de la misma de manera apropiada, es, por ejemplo, una densidad celular de un nivel en el cual las células pueden adherirse estrechamente entre sí y no presentan formación de láminas defectuosas y extinción celular debida a la siembra en exceso. Más específicamente, "alta densidad" es, por ejemplo, una densidad celular de 1 a 100 veces, preferentemente, de 1,2 a 50 veces, más preferentemente, de aproximadamente 2,5 a 30 veces, en particular, más preferentemente de aproximadamente 5 a 10 veces, la observada en tejidos normales. Si bien la densidad celular observada en el tejido normal varía según el tipo de tejido, es, por ejemplo, de aproximadamente 3.000 células/mm<sup>2</sup> en el endotelio corneal y de aproximadamente 4.000 células/mm<sup>2</sup> para células epiteliales del pigmento retiniano.
- Las células obtenidas de mamífero a preparar en la presente invención son células epiteliales del pigmento retiniano. "Alta densidad" significa una densidad de un nivel no inferior a la densidad celular observada en un ojo normal". Dicha densidad es, en concreto, de al menos 4.000 células/mm<sup>2</sup> o más. Como se muestra en los siguientes ejemplos, sin embargo, incluso cuando la densidad no es inferior a la densidad celular observada en un ojo normal, cuando las células se siembran en un sustrato plano a una densidad no mayor que una densidad dada, una fuerza contráctil actúa sobre la propia lámina celular formada y no se puede mantener el área de siembra. La incapacidad para mantener el área de siembra se considera atribuible al hecho de que se recluta un determinado número de células para cubrir la superficie de contacto con el suero del epitelio del pigmento retiniano, y la densidad celular es inconsistente, así como a la tasa de supervivencia de las propias células. Sin embargo, incluso tal lámina retraída se puede utilizar para el uso mencionado a continuación sin ningún inconveniente particular. Por lo tanto, la "densidad de un nivel no inferior a la densidad celular observada en un ojo normal" es preferentemente de aproximadamente 5.000 células/mm<sup>2</sup> o más, más preferentemente de aproximadamente 10.000 células/mm<sup>2</sup> o más, donde la contracción de la lámina celular formada a partir del área de siembra es tolerable, y preferentemente de alrededor de 20.000 células/mm<sup>2</sup> o más, donde la lámina celular formada mantiene el área de siembra. Además, el límite superior de la misma es una densidad que no induce la formación de una lámina defectuosa y la extinción celular debida a la siembra excesiva. La "densidad de un nivel es de preferentemente 10.000 células/mm<sup>2</sup> - 120.000 células/mm<sup>2</sup>, en particular, de preferentemente 20.000 células/mm<sup>2</sup> - 40.000 células/mm<sup>2</sup>.
- Se puede formar una población celular en una única capa, cultivando las células sembradas en la alta densidad mencionada anteriormente en un medio de cultivo. Como medio de cultivo, se puede usar cualquier medio para cultivo celular sin ninguna limitación particular, siempre que se use normalmente en la técnica. Por ejemplo, dependiendo del tipo de células a utilizar, se puede usar un medio basal descrito en "Tissue Culture Techniques, 3ª edición editada por la Japanese Tissue Culture Association", página 581, Asakura Publishing Co., Ltd., tal como el medio F-10, medio F12, MEM, medio BME, DMEM,  $\alpha$ MEM, medio IMD, medio ES, medio DM-160, medio de Fisher, medio WEe, medio RPMI1640 y similares. Adicionalmente, se puede añadir al medio basal suero (suero bovino fetal, etc.), diversos factores de crecimiento, antibiótico, aminoácidos y similares. El pH del medio es preferentemente de aproximadamente 6 - aproximadamente 8. El cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 30 - aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 15 - aproximadamente 60 h. Cuando sea necesario, se pueden realizar también aireación y agitación.
- En la lámina celular obtenida por el método de la presente invención, se forma una unión estrecha entre las células y

- se forma una membrana basal formada en el lado opuesto al lado a estar en contacto con el sustrato plano. El lado opuesto al lado que está en contacto con el sustrato plano es un lado de la superficie de contacto entre las células y el suero. La formación de las uniones estrechas se puede confirmar mediante la observación de una forma celular hexagonal, estrechamente adherida y por la expresión de ocludina intercelular, ZO-1 y similares, mediante inmunotinción. La formación de la membrana de Bruch, que incluye una membrana basal, puede confirmarse mediante la observación en la superficie celular de la expresión de elastina, colágeno de tipo 1 o colágeno de tipo 4, y similares, mediante inmunotinción, y la observación con un microscopio electrónico de barrido.
- Las células obtenidas de mamífero a preparar en la presente invención son células epiteliales del pigmento retiniano. Adicionalmente, puede estar incluida la siguiente etapa (4).  
(4) Una etapa de confirmación de la presencia o ausencia de expresión de un marcador de diferenciación en las células cultivadas obtenidas en la etapa (2)
- En la etapa (4) la finalización de una lámina celular puede juzgarse por la confirmación de la presencia o ausencia de expresión de un marcador de diferenciación en las células cultivadas obtenidas en la etapa (2). En la presente memoria descriptiva, el marcador de diferenciación puede expresarse en cualquier lugar de las células (por ejemplo, citoplasma, membrana celular, membrana nuclear y similares) y preferentemente, un marcador expresado en el lado de la superficie de contacto entre las células sembradas y el suero es el objetivo.
- El "marcador de diferenciación" en la presente memoria descriptiva incluye un producto transcripcional, un producto traduccional y un producto de degradación del mismo, de un gen expresado específicamente en células diferenciadas, o que muestra una expresión amplificada o atenuada en comparación con otras células diferenciadas, células indiferenciadas o células progenitoras. Los ejemplos de tal gen incluyen marcadores de diferenciación neuronal, tales como tubulina (en particular  $\beta$  tubulina), MAP2, neurofilamento y enolasa específica de neuronas, marcadores de diferenciación de adipocitos, tales como aP2, glicerofosfato deshidrogenasa, adiposina y leptina, marcadores de diferenciación de osteoblastos, tales como procolágeno 1 $\alpha$ 1, RUNX2, fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina, y marcadores de diferenciación epiteliales del pigmento retiniano tales como bestrofina-1 (VMD2), RPE-65, citoqueratina, ocludina, ZO-1, elastina, actina, colágeno de tipo 1 o colágeno de tipo 4, y similares.
- Una muestra a utilizar para la "confirmación de la presencia o ausencia de expresión de un marcador de diferenciación" no está particularmente limitada siempre que incluya marcadores de diferenciación (por ejemplo, ARN, proteína, producto de degradación del mismo y similares) procedentes de las células cultivadas en la etapa (2).
- Cuando la muestra mencionada anteriormente es ARN, la expresión de un gen marcador de diferenciación puede examinarse preparando una fracción de ARN (por ejemplo, ARN total, ARNm) procedente de las células cultivadas en la etapa (2) y detectando un producto de transcripción del gen marcador contenido en la fracción, o detectando directamente un producto del gen marcador en las células sin extraer ARN de las mismas.
- Cuando la fracción de ARN (por ejemplo fracción de ARN total, ARNm) se prepara a partir de células, la preparación de la fracción de ARN puede llevarse a cabo utilizando una técnica conocida, tal como un método de ultracentrifugación con guanidina-CsCl, un método con AGPC (forma siglada de *acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform*: tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo) o similar, pero el ARN total de alta pureza se puede preparar rápida y convenientemente a partir de una cantidad mínima de muestra, utilizando un kit de extracción de ARN disponible en el mercado (por ejemplo, RNeasy Mini Kit fabricado por QIAGEN, etc.). Como medio para detectar los productos de transcripción de los genes marcadores de diferenciación en la fracción de ARN, por ejemplo, pueden mencionarse un método para utilizar hibridación (transferencia de Northern, transferencia puntual, análisis por chip de ADN, etc.), un método para utilizar PCR (RT-PCR, PCR competitiva, PCR en tiempo real, etc.), o similares. Desde el punto de vista de que la fluctuación en la expresión de genes marcadores de diferenciación puede detectarse a partir de una cantidad mínima de muestra de forma rápida y conveniente con una buena capacidad cuantitativa, es preferente un método de PCR cuantitativa tal como la PCR competitiva, la PCR en tiempo real o similar, mientras que desde el punto de vista de que la fluctuación en la expresión de una pluralidad de genes marcadores puede detectarse colectivamente, y la capacidad cuantitativa puede mejorarse mediante la selección del método de detección, es preferente el análisis por chips de ADN.
- En el caso de realizar hibridación de Northern o hibridación puntual, la detección de un gen marcador de diferenciación puede realizarse utilizando un ácido nucleico (sonda) que pueda hibridarse con el producto de transcripción del gen. Dicho ácido nucleico puede ejemplificarse por un ácido nucleico que puede hibridarse con el producto de transcripción de un gen marcador de diferenciación en condiciones altamente rigurosas. Como "condiciones altamente rigurosas", se puede mencionar una reacción de hibridación a 45 °C en SSC 6x (cloruro de sodio/citrato de sodio) seguido de lavado una vez o más a 65 °C en SSC 0,2x /SDS al 0,1 %, o similares. Los expertos en la materia pueden ajustar fácilmente las condiciones hasta la rigurosidad deseada, modificando de forma apropiada la concentración de sal en la solución de hibridación, la temperatura para la reacción de hibridación, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda, la cantidad de desapareamientos, la duración de la reacción de hibridación, la concentración de sal de la solución de lavado, la temperatura del procedimiento de lavado, o similar. El ácido nucleico puede ser un ADN o un ARN, o también puede ser una quimera de ADN/ARN. Preferentemente, el ácido nucleico puede ser un ADN.

- El ácido nucleico utilizado como sonda puede ser bicatenario o monocatenario. En el caso de ser bicatenario, el ácido nucleico puede ser un ADN bicatenario, un ARN bicatenario o un híbrido de ADN:ARN. En el caso de un ácido nucleico monocatenario, se puede usar una cadena antisentido. La longitud del ácido nucleico no está particularmente limitada, siempre que el ácido nucleico pueda hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana y, por ejemplo, la longitud es de aproximadamente no menos de 15 bases, y preferentemente de no menos de 30 bases. El ácido nucleico se marca preferentemente con un agente de marcaje para permitir la detección/cuantificación del ácido nucleico diana. Como agente de marcaje se puede usar, por ejemplo, un radioisótopo, una enzima, un material fluorescente, un material luminiscente o similar. El radioisótopo puede ejemplificarse por [<sup>32</sup>P], [<sup>3</sup>H], [<sup>14</sup>C] o similar. La enzima es preferentemente una enzima que sea estable y tenga una alta actividad específica y, por ejemplo, se usa β-galactosidasa, β-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa, malato deshidrogenasa o similar. El material fluorescente puede ejemplificarse por fluorescamina, isotiocianato de fluoresceína o similar. El material luminiscente puede ejemplificarse por luminol, un derivado de luminol, luciferina, lucigenina o similar. Adicionalmente, para la unión entre una sonda y un agente de marcaje también se puede usar biotina-(estrept)avidina.
- En el caso de la hibridación de Northern, se separa por electroforesis en gel una fracción de ARN preparada como se describe anteriormente, posteriormente se transfiere a una membrana hecha de nitrocelulosa, nylon, fluoruro de polivinilideno o similar, y se hibrida en las "condiciones altamente rigurosas" descritas anteriormente, en una solución de tampón de hibridación que contiene una sonda marcada preparada como se describe anteriormente, y después se mide para cada banda la cantidad de marcador unido a la membrana mediante un método apropiado, mediante lo cual se puede medir el nivel de expresión de cada uno de los genes marcadores de diferenciación. En el caso de una transferencia puntual, se somete una membrana con una aplicación puntual de una fracción de ARN a una reacción de hibridación (realizada para cada gen marcador), y se mide la cantidad de marcador de la aplicación puntual, mediante lo cual se puede medir el nivel de expresión de cada uno de los genes marcadores.
- En el caso del análisis por chip de ADN, por ejemplo, se sintetiza un ADNc al que se ha introducido un promotor apropiado, tal como el promotor T7, a partir de una fracción de ARN preparada como se describe anteriormente, mediante una reacción de transcripción inversa, y se sintetiza adicionalmente un ARNc usando una ARN polimerasa (en este caso, se obtiene un ARNc marcado usando un mononucleótido marcado con biotina o similar, como sustrato). Este ARNc marcado se somete a una reacción de hibridación poniendo en contacto el ARNc con un chip en el que están inmovilizadas las sondas y se mide la cantidad de marcador unida a cada una de las sondas inmovilizadas, mediante lo cual se puede medir el nivel de expresión de cada uno de los genes marcadores de diferenciación. Este método es ventajoso en términos de rapidez y conveniencia, dado que el número de genes marcadores de diferenciación a detectar (por lo tanto, las sondas que se inmovilizan) aumenta.
- Por otro lado, cuando se detecta un gen marcador sin extraer ARN de las células, para ello puede usarse hibridación *in situ* como una técnica de detección. En este método, en lugar de extraer ARN de las células, las células se fijan tratando las células con un fijador, preferentemente un fijador precipitante, por ejemplo, acetona, o incubando brevemente las células en una solución tamponada de formaldehído. Después de la fijación, las células se incluyen en parafina para formar un bloque, y se corta un corte fino que se puede usar como muestra. Una muestra incluida en parafina bien preparada puede conservarse a temperatura ambiente durante muchos años. Como ácido nucleico para utilizar como sonda, se puede usar uno similar a los ácidos nucleicos mencionados anteriormente. La hibridación *in situ* puede usarse preferentemente en la presente invención dado que la expresión de un marcador de diferenciación puede confirmarse directamente en la superficie de contacto con el suero de las células.
- Como alternativa, la expresión de un gen marcador de diferenciación en las células cultivadas en la etapa (2) puede confirmarse preparando una fracción de proteínas a partir de las células, y detectando un producto de traducción (es decir, proteína marcadora) del gen marcador contenido en la fracción, o detectando directamente un producto de traducción del gen marcador en las células, sin extraer una proteína de las mismas. La detección de las proteínas marcadoras puede realizarse de acuerdo con un método de ensayo inmunológico (por ejemplo, ELISA, FIA, RIA, transferencia de Western, etc.), usando anticuerpos contra las proteínas respectivas, o en el caso de proteínas que presenten una actividad fisiológica medible, tal como una enzima o similar, la detección se puede realizar midiendo la actividad fisiológica utilizando técnicas conocidas para las proteínas marcadoras respectivas. Si no, la detección de proteínas marcadoras también se puede realizar utilizando un método de espectroscopía de masas tal como MALDI-TOFMS o similar.
- Adicionalmente, el anticuerpo para cada una de las proteínas marcadoras se puede obtener de acuerdo con las técnicas de producción de anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales utilizadas de forma convencional, utilizando como antígeno sensibilizante, dichas proteínas marcadoras, dicha proteína o un péptido parcial de las mismas.
- Al aplicar los métodos de análisis inmunológicos individuales al método de examen de la presente invención, no es necesario establecer condiciones particulares o llevar a cabo operaciones particulares. Se puede construir un sistema de medición apropiado para las proteínas marcadoras de diferenciación proporcionando consideraciones técnicas que son obvias para los expertos en la materia, a las condiciones y operaciones que son convencionales en los métodos respectivos. Para detalles de estos medios técnicos convencionales, se puede hacer referencia a artículos de revisión y monografías. Por ejemplo, se puede hacer referencia a "Radioimmunoassay", editado por Hiroshi Irie (Kodansha,

publicado en 1974), "Radioimmunoassay, Supplemental", editado por Hiroshi Irie (Kodansha, publicado en 1979), "Enzyme Immunoassay", editado por Eiji Ishikawa *et al.* (Igaku Shoin, publicado en 1978), "Enzyme Immunoassay" (2ª edición), editado por Eiji Ishikawa, *et al.* (Igaku Shoin, publicado en 1982), "Enzyme Immunoassay" (3ª edición) editado por Eiji Ishikawa, *et al.* (Igaku Shoin, publicado en 1987), "Methods In Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Parte A)), anteriormente citado, Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Parte B)), anteriormente citado, Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Parte C)), anteriormente citado, Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Parte D: Selected Immunoassays), anteriormente citado, Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Parte E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), anteriormente citado, Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Parte I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (publicado por Academic Press), y similares.

El método de producción de una lámina celular mencionado anteriormente, en donde las células son células epiteliales del pigmento retiniano, contiene adicionalmente la siguiente etapa (3):

(3) una etapa de confirmación de la formación de la membrana de Bruch en el lado opuesto al lado a estar en contacto con el sustrato plano de las células

La "membrana de Bruch" en la presente memoria descriptiva es una membrana fina entre el epitelio del pigmento retiniano y la membrana coroides, y es una capa que recubre el epitelio del pigmento retiniano. Es una estructura sin células constituida principalmente de una fibra de colágeno, a la cual están adheridas la membrana coroides y las células epiteliales del pigmento, y funciona como una vía para suministrar sustancias desde la membrana coroides a la capa externa de la retina, donde no hay vasos sanguíneos. El epitelio de capa única es muy frágil y se rompe fácilmente durante la operación de trasplante y similares, las células se cultivan convencionalmente en una lámina sustituta tal como una lámina artificial, una membrana amniótica y similares. Sin embargo, la diferenciación celular es insuficiente, y la lámina artificial bloquea los fenómenos biofísicos en el sitio del trasplante. Por el contrario, dado que en la presente invención se forma la membrana de Bruch que contiene la membrana basal original y las fibras elásticas producidas por las propias células, se puede obtener la fuerza suficiente para soportar una operación de trasplante. Además, dado que la membrana de Bruch de la presente invención se forma en el lado a estar en contacto con el suero, la lámina se puede desprender fácilmente de una placa de cultivo, incluida la membrana de Bruch.

La presente invención también proporciona, en el método de producción de una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano mencionado anteriormente, un método de producción de una membrana de Bruch *in vitro*, que comprende separar la membrana de Bruch formada de la lámina de células epiteliales del pigmento retiniano. La membrana de Bruch formada en el epitelio del pigmento retiniano puede desprenderse y recuperarse a partir de la lámina mediante tratamiento con EDTA, o por operación de pipeteo y aspiración en la superficie de la lámina en un medio de adición libre de magnesio y calcio. Además, la membrana de Bruch también se puede desprender y recuperar aspirando el medio de cultivo, para permitir que la membrana esté en contacto con el aire, y realizando una acción de deshidratación en la superficie de la lámina mediante un tratamiento con alcohol diluido.

La presente invención también se refiere a una lámina celular obtenida de acuerdo con el método mencionado anteriormente de producción de una lámina celular epitelial del pigmento retiniano. La lámina celular puede usarse para organismos vivos, por ejemplo, en diversos usos de exploración y de análisis de toxicidad. Además, la lámina celular de la presente invención se puede trasplantar, preferentemente, como material de trasplante para el tratamiento de enfermedades, en un sujeto que necesita un trasplante de tejido. En particular, la lámina de células epiteliales del pigmento retiniano de la presente invención es preferible como material de trasplante para el tratamiento de la retina de pacientes con enfermedades oftálmicas. Los ejemplos de enfermedad oftálmica incluyen la enfermedad de degeneración macular senil, retinosis pigmentaria y similares. Además, la lámina de células epiteliales del pigmento retiniano también se puede utilizar para diversos usos de exploración, tal como la exploración de eficacia de fármacos, la evaluación de toxicidad y similares, para las enfermedades oftálmicas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la lámina celular se puede aplicar a la exploración de una sustancia tóxica de acuerdo con el método descrito en el documento JP-A-2007-517210. Adicionalmente, la lámina de células epiteliales del pigmento retiniano también se puede utilizar como un modelo *in vitro* para la evaluación de diversas distintas funciones que poseen las células epiteliales del pigmento retiniano en el cuerpo, tales como funciones implicadas en el mantenimiento de las células visuales (por ejemplo, capacidad de fagocitosis del segmento externo del fotorreceptor, acción neuroprotectora y similares), acción de bombeo, función de barrera de los vasos sanguíneos retinianos por las uniones estrechas, y similares.

El material de trasplante para el tratamiento de enfermedades de la presente invención se puede usar para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente en seres humanos y mamíferos que no sean humanos (por ejemplo, mono, ratón, rata, perro, ganado bovino, caballo, cerdo, oveja, cabra, gato, conejo, hámster, cobaya, etc.).

Si bien la amplitud del área de la lesión a la que es aplicable el material de trasplante para el tratamiento de enfermedades de la presente invención puede variar dependiendo de la enfermedad que es el objetivo, de las especies del sujeto de administración, la edad, el sexo, el peso corporal, los síntomas y similares, cuando se aplica a, por ejemplo, la degeneración macular senil, la amplitud del área de la lesión para trasplante es generalmente de 0,07 cm<sup>2</sup> - 0,28 cm<sup>2</sup>.

El material de trasplante para el tratamiento de enfermedades de la presente invención se puede trasplantar de una

vez o en varias porciones. El número de operaciones de trasplante se determina de acuerdo con la enfermedad, por parte de profesionales sanitarios y basándose en las directrices. Por ejemplo, cuando la enfermedad es degeneración macular senil, la lámina de células epiteliales del pigmento retiniano de la presente invención puede ser trasplantada dos veces o más de acuerdo con la gravedad de la enfermedad. Cuando el trasplante se realiza varias veces, el intervalo entre ellos no está particularmente limitado y puede realizarse después de un lapso de varios días a varias semanas.

El material de trasplante para el tratamiento de enfermedades de la presente invención se trasplanta de acuerdo con un método de trasplante apropiado, por parte de profesionales sanitarios de acuerdo con las directrices. Por ejemplo, se puede emplear una técnica endoscópica. Además, cuando se trasplanta una capa de células epiteliales del pigmento retiniano, como material de trasplante para el tratamiento de enfermedades de la presente invención, debajo de la retina, o puede usarse un método de trasplante que incluye colocar la lámina en un flujo de agua desde una aguja de inyección insertada en el sitio de trasplante debajo de la retina de un ojo, o un aparato de tratamiento exclusivo para el transporte.

La presente invención proporciona adicionalmente la membrana de Bruch obtenida por el método para la producción de la membrana de Bruch mencionado anteriormente. Dado que la membrana de Bruch de la presente invención es una membrana basal sin células, está bajo menos restricciones normativas en comparación con el trasplante de células, y el trasplante de membrana de Bruch tiene un umbral más bajo para su práctica. Además, también es útil para su uso en investigación, tal como el análisis funcional y similares.

### Ejemplos

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación remitiéndose a los Ejemplos. Sin embargo, son meras ejemplificaciones y no limitan el alcance de la presente invención de ninguna manera.

#### Preparación de células epiteliales del pigmento retiniano humano a partir de un ojo

Se recogieron células epiteliales del pigmento retiniano (EPR) humano (las CEPRh) de varios donantes dentro de las 48 h posteriores al fallecimiento. Las células se suspendieron en medio Ham F-10 (suero bovino fetal al 10 %, medio para diagnóstico (Glutamax II; Invitrogen), penicilina G (100 UI/ml), estreptomycin (0,1 mg/ml) y anfotericina B (0,25 mg/l), y sembraron en una placa de 10 cm. Las células se cultivaron en una atmósfera del 95 % de aire/5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

#### Consideración del número de células para la siembra

Antes de la siembra de las células, se consideró el número de células a sembrar. El diámetro de una célula epitelial del pigmento retiniano es de 10 - 20 μm. En el presente Ejemplo, se supusieron 10 μm, y el área de una célula se estimó en  $5 \times 5 \times 3,14 = 78,5 \mu\text{m}^2$ . Por lo tanto, cuando se va a ocupar con células 1 mm<sup>2</sup>, el número de células a sembrar es de  $1.000 \times 1.000 / 78,5 =$  aproximadamente 12.740 células. En el presente Ejemplo, se usó como sustrato plano un portaobjetos de cámaras de 4 pocillos (Lab-Tek) (2 cm<sup>2</sup> por pocillo). Para ocupar 1 pocillo con células, podrían estimarse como necesarias  $12.740 \times 2 \times 10 \times 10 = 2.548.000$ , es decir, alrededor de 2.500.000 células. En un cultivo celular normal, el número de células epiteliales del pigmento retiniano cultivadas hasta la confluencia en una placa de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> es de aproximadamente 1.000.000 - 2.500.000 células y, asumiendo 2.500.000 células, la densidad celular es de  $2.500.000 \text{ células} / 75 \text{ cm}^2 =$  aproximadamente 333 células/mm<sup>2</sup>. El número es considerablemente menor que la densidad celular en el cuerpo (aproximadamente 4.000 células/mm<sup>2</sup>) y que la densidad celular empleada en el presente método de cultivo (por ejemplo, 4.000.000 células, densidad celular de 20.000 células/mm<sup>2</sup>).

#### Ejemplo 1

##### Formación de la lámina epitelial del pigmento retiniano humano

Las células epiteliales del pigmento retiniano recogidas de un ojo se cultivaron, se trataron con tripsina al 0,1 % y EDTA al 0,02 % durante 5 min, y se recogieron por pipeteo. Las células EPR recogidas se centrifugaron, se contó su número, y se sembraron a 1.000.000 células y 2.000.000 de células en un portaobjetos de cámaras de 4 pocillos (Lab-Tek) (5.000 células/mm<sup>2</sup>, 10.000 células/mm<sup>2</sup>, respectivamente), de acuerdo con los resultados de consideración mencionados anteriormente. Como resultado, se formó una lámina, pero se contrajo hasta un 1/4 y una 1/2 del área del pocillo, respectivamente (Fig. 1). Suponiendo que el número de células sin contracción era de 2.000.000 células/cm<sup>2</sup>, las células se sembraron de forma reciente en portaobjetos de cámaras de 4 pocillos. Como resultado, no se observó contracción de la lámina celular (Fig. 2).

Además, la lámina celular se sometió a inmunotinción. Para la inmunotinción, la lámina se fijó con paraformaldehído al 4 % y se realizó un montaje completo, o se preparó un criocorte o un corte de parafina, y se tiñó mediante un método enzimático con anticuerpos o un método de fluorescencia con anticuerpos, utilizando un anticuerpo primario frente a una proteína objeto tal como elastina, colágeno IV, colágeno I, actina, citoqueratina, ocludina, ZO-1 y similares, y se observó al microscopio óptico o un microscopio de fluorescencia. En cuanto a la actina, también se puede teñir y es

observable con faloidina marcada con fluorescencia. Como resultado de tal inmunotinción, 1 día después de la siembra se confirmaron la adhesión célula-célula y la expresión de actina del músculo liso (Fig. 3). Posteriormente, la expresión de elastina y de colágeno IV, que son los componentes de la membrana de Bruch, se confirmó en la superficie de contacto con el suero de las células EPR (Fig. 4). Ningún informe ha documentado hasta el momento que la expresión de elastina pueda confirmarse *in vitro* en un sistema de cultivo de células epiteliales del pigmento retiniano.

Además, también se podrían obtener resultados similares a los de la inmunotinción mencionada anteriormente mediante la realización por separado, como se menciona a continuación.

Una lámina epitelial de pigmento retiniano humano producida se lavó dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1 M, y se fijó en PBS 0,2 M que contenía paraformaldehído al 4 % durante 15 min. Después de la fijación, la lámina epitelial de pigmento retiniano se lavó 5 veces con solución salina tampón Tris-buffer (TBS-T) que contenía Tween 20. Después, la lámina celular se bloqueó con un tampón de bloqueo de proteínas y se cultivó con un anticuerpo primario a 4 °C durante la noche. Como anticuerpo primario se utilizaron un anticuerpo policlonal de cabra anti-occludina (1:100; Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo policlonal de conejo anti-elastina (1:100; Calbiochem). La lámina celular se lavó 3 veces con TBS-T y se cultivó con un anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 30 min. Después, la lámina celular se lavó 3 veces con TBS-T, se secó y se montó con vectashield junto con DAPI. Cada pieza se observó con un microscopio óptico y un microscopio de fluorescencia (AX-70; Olympus optical Co., Ltd., Tokio, Japón).

#### Ejemplo 2

##### Formación de lámina epitelial de pigmento retiniano humano obtenida de células iPS humanas

Se formó una lámina epitelial del pigmento retiniano humano de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto en que se utilizaron células EPR obtenidas de células iPS como las células epiteliales de pigmento retiniano humano. Como células EPR obtenidas de células iPS, se utilizaron células EPR obtenidas por inducción de diferenciación de células iPS humanas, que se obtuvieron por el método descrito en Neuroscience Letters 458 (2009) 126-131, de acuerdo con el método descrito en el documento W001/088100.

#### Ejemplo 3

##### Transferencia de Western proteína obtenida de lámina epitelial de pigmento retiniano humano

Un extracto de la lámina epitelial de pigmento retiniano humano producida en el Ejemplo 1 se lisó con un tampón de lisis que contenía un inhibidor de proteasas. Se separaron por SDS-PAGE (10 %) cantidades equivalentes de la proteína obtenida, se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA) y se bloqueó con leche desnatada al 10 % disuelta en TBS-T durante 1 h. Después, la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con un anticuerpo primario obtenido disolviendo cada uno de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-RPE-65 (1:5000), un anticuerpo policlonal de conejo anti-occludina (1:250), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-citoqueratina 18 (1:1000), un anticuerpo policlonal de conejo anti-ZO-1 (1:50), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno de tipo 4 (1:1000), y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-elastina (1:1000) en TBS-T que contiene leche desnatada al 1 %. Después de lavar 6 veces con TBS-T, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario (50 ng/ml) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 h. La membrana se lavó 6 veces con un tampón de lavado para eliminar el anticuerpo, y se tiñó con un tampón para fluorescencia química (Fig. 5). Para la normalización, la membrana se volvió explorar con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-GAPDH o un anticuerpo monoclonal de conejo anti-actina. Se observó la expresión de proteína para cada uno de los anticuerpos mencionados anteriormente en la proteína obtenida de la lámina epitelial de pigmento retiniano humano.

#### Ejemplo 4

##### Análisis de imágenes de microscopio electrónico de la lámina epitelial de pigmento retiniano humano

Se recuperó la lámina epitelial de pigmento retiniano humano producida en el Ejemplo 1, y se fijó en un tampón fosfato (PB) 0,1 M que contenía glutaraldehído al 2,5 % durante 60 min. Después de lavar con PBS 0,1 M, la lámina epitelial de pigmento retiniano se dejó en reposo en PBS 0,1 M que contenía OsO<sub>4</sub> al 1 % durante 2 horas. Después de la fijación, la lámina se deshidrató con etanol y alcohol t-butílico, y se secó. Después, la lámina epitelial de pigmento retiniano se sometió a un revestimiento de bombardeo metálico (distancia de 50 mm a la muestra objetivo, a 5x 10<sup>-2</sup> milibares, 30 mA, durante 40 segundos) con paladio y se observó con un microscopio electrónico de barrido (Fig. 6). En las imágenes de microscopía electrónica se observó formación de fibra de colágeno y fibra elástica (Fig. 6, flecha).

#### Aplicabilidad industrial

De acuerdo con el método de la presente invención, se puede preparar de manera relativamente conveniente una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano para aplicación a trasplantes a pacientes con degeneración macular senil. En particular, cuando las células a utilizar para el cultivo son células epiteliales del pigmento retiniano

obtenidas de células iPS, se puede evitar el rechazo en el trasplante dado que se pueden utilizar las células de los propios pacientes.

5 La presente solicitud se basa en la solicitud de patente N.º 2010-108674 (fecha de presentación: 10 de mayo de 2010), presentada en Japón.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de una lámina celular, que comprende las siguientes etapas;
  - 5 (1) una etapa de preparación de una célula epitelial del pigmento retiniano,
  - (2) una etapa de siembra de la célula preparada sobre un sustrato plano a 10.000 células/mm<sup>2</sup> - 120.000 células/mm<sup>2</sup>, y de cultivo de la célula, en donde la lámina celular comprende una membrana basal formada en el lado opuesto al lado a estar en contacto con el sustrato plano, y
  - 10 (3) una etapa de confirmación de la formación de la membrana de Bruch en el lado de la célula opuesto al lado a estar en contacto con el sustrato plano.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la lámina celular obtenida comprende una unión estrecha formada entre las células.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la siguiente etapa (4):
  - (4) una etapa de confirmación de la presencia o ausencia de expresión de un marcador de diferenciación en las células cultivadas obtenidas en la etapa (2).
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde, en la etapa (4), el marcador de diferenciación es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en bestrofina-1, RPE-65, citoqueratina, ocludina, ZO-1, elastina, actina, colágeno de tipo 1 y colágeno de tipo 4.
- 25 5. Un método de producción de una membrana de Bruch que comprende una etapa de separación de la membrana de Bruch formada mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Una lámina celular producida mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un material para trasplante para su uso en el tratamiento de una enfermedad, que comprende una lámina celular producida mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 8. La membrana de Bruch producida mediante el método de acuerdo con la reivindicación 5.

FIG. 1

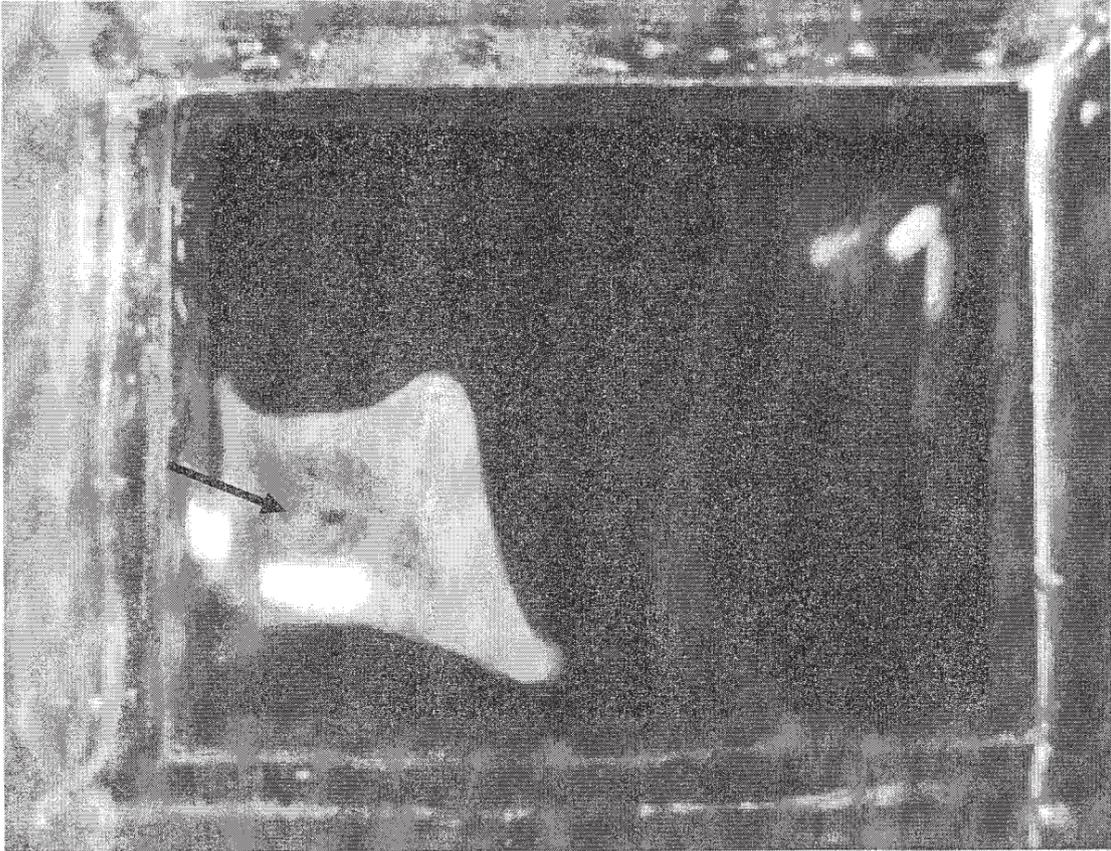


FIG. 2

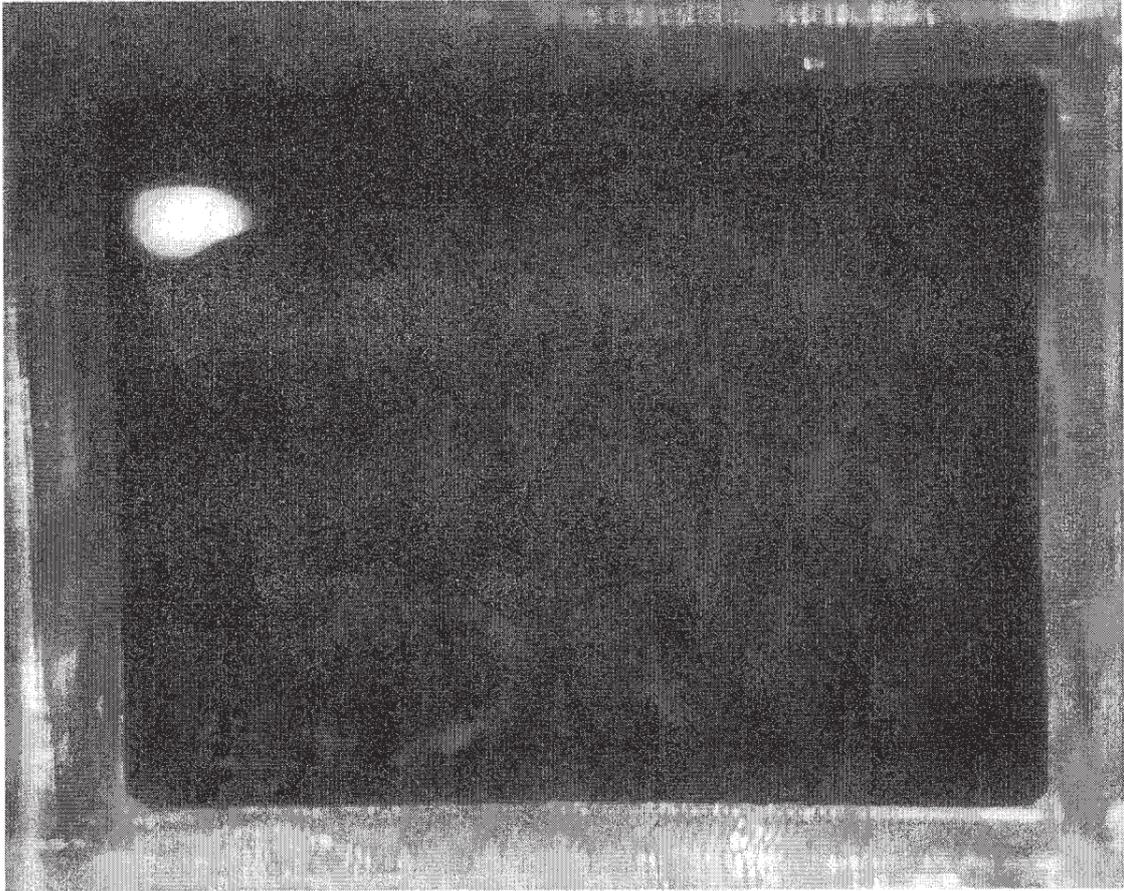


FIG. 3

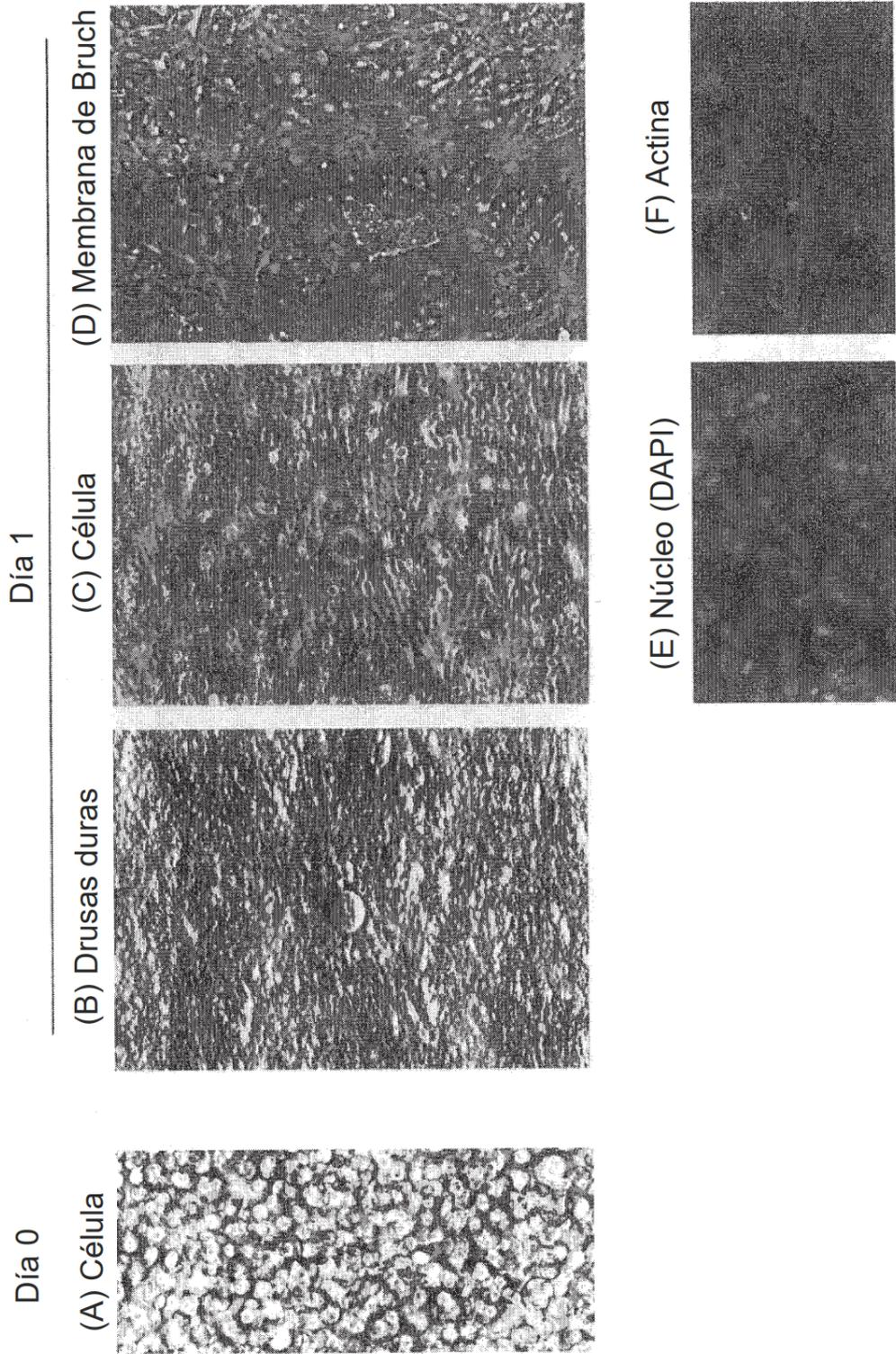


FIG. 4

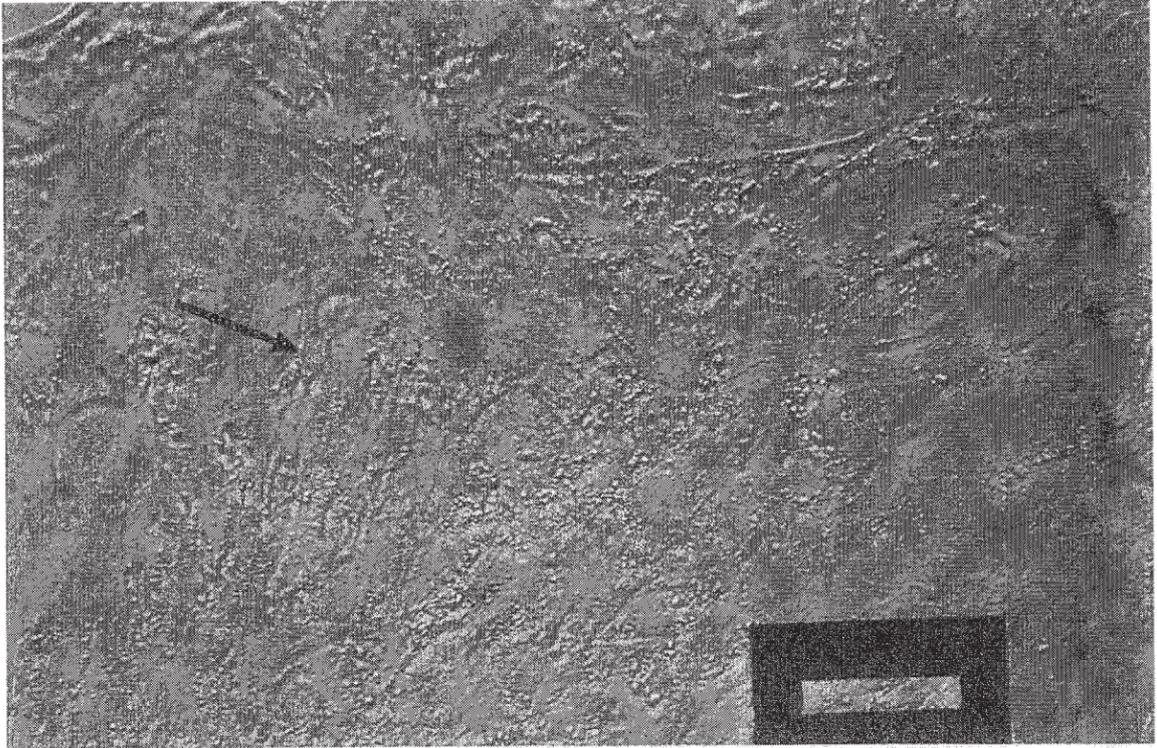


FIG. 5

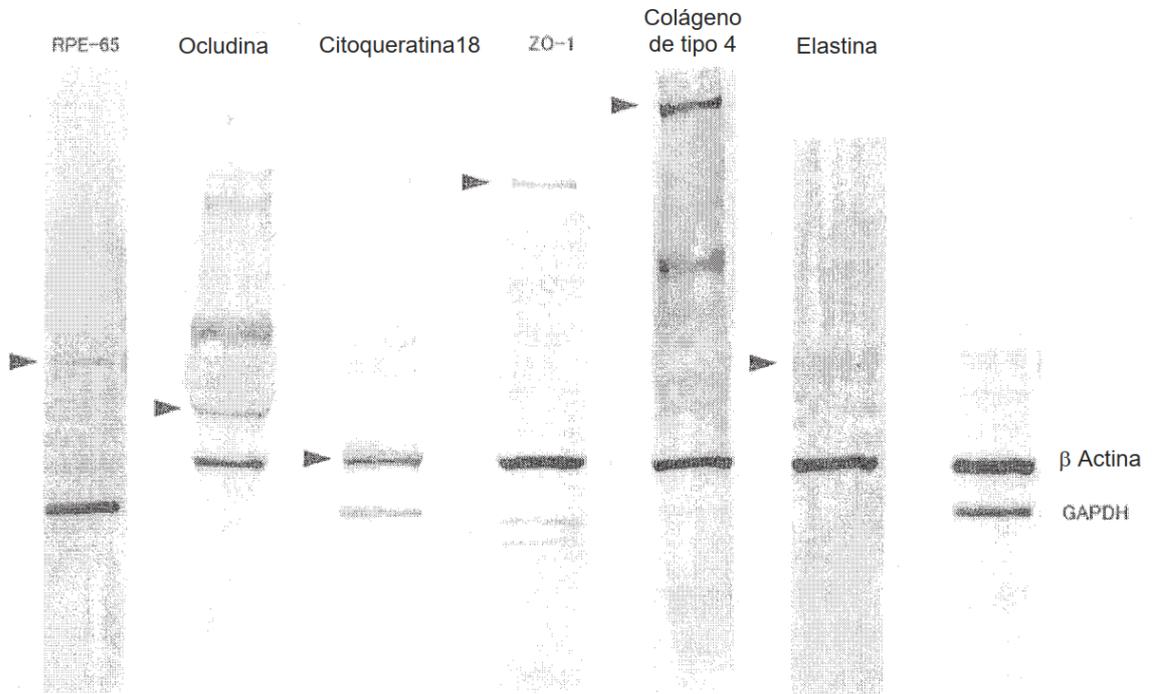


FIG. 6

