

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 447**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735	(2010.01)
A61K 35/12	(2015.01)
A61K 35/44	(2015.01)
A61L 27/00	(2006.01)
A61P 27/00	(2006.01)
C12N 5/074	(2010.01)
C12N 5/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2014 PCT/JP2014/076471**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15068505**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2014 E 14860084 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3070162**

54 Título: **Método para producir células epiteliales del pigmento retiniano**

30 Prioridad:

11.11.2013 JP 2013232795

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

11.05.2020

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:

**NAKANO, TOKUSHIGE;
OZONE, CHIKAFUMI y
SASAI, YOSHIKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 759 447 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir células epiteliales del pigmento retiniano

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para producir células epiteliales del pigmento retiniano y otras.

5 Antecedentes de la invención

Se conoce un informe sobre la producción de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células madre pluripotentes (Documento de no Patente 1). Se muestran los métodos para obtener una célula epitelial del pigmento retiniano mediante la formación de un agregado homogéneo de células madre pluripotentes en un medio sin suero que contiene una sustancia que inhibe la vía de señal de Wnt, sometiénolas a un cultivo flotante en presencia de una preparación de membrana basal, después a un cultivo flotante en un medio que contiene suero, y a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero que contiene una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt, y libre de una sustancia que actúa en la vía de señal por Sonic hedgehog (Documento de no Patente 2 y Documento de Patente 1).

Se conocen ciertos métodos para producir tejidos retinianos y células relacionadas con la retina (documento de Patente 2), junto con ciertos métodos para diferenciar las células madre en las células retinianas (documento de Patente 3).

Lista de Documentos

Documentos de Patente

Documento de Patente 1: WO 2013/077425

20 Documento de Patente 2: EP 2784152

Documento de Patente 3: WO 2011/043591

Documentos de no-Patente

Documento de no Patente 1: Cell Stem Cell, 5, 396-408 (2009)

Documento de no Patente 2: Cell Stem Cell, 10 (6), 771-785 (2012)

25 Compendio de la invención

Problemas a resolver por la invención

Se ha deseado el desarrollo de un método para producir una célula epitelial del pigmento retiniano a partir de células madre pluripotentes.

Medios para resolver los problemas

30 La presente invención proporciona un método para producir células epiteliales del pigmento retiniano o una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano a partir de células madre pluripotentes, etc.

Es decir, la presente invención proporciona:

[1] un método para producir una célula epitelial del pigmento retiniano, que comprende

35 (1) una primera etapa de someter las células madre pluripotentes a un cultivo flotante en un medio sin suero para formar un agregado de células madre pluripotentes,

(2) una segunda etapa para someter el agregado formado en la etapa (1) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero cada uno de ellos sin una sustancia que pueda mejorar la transducción de la señal mediada por Sonic hedgehog y que contienen una sustancia que puede mejorar la vía de la transducción de señales mediada por BMP, obteniéndose así un agregado que contiene células progenitoras retinianas, y

40 (3) una tercera etapa para someter el agregado obtenido en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero cada uno de ellos sin una sustancia que pueda mejorar la transducción de la señal mediada por Sonic hedgehog y una sustancia que puede mejorar la vía de la transducción de señales mediadas por BMP y que contienen una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniéndose así un agregado que contiene la célula epitelial del pigmento retiniano;

45

[2] un método para producir una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano, que comprende

(1) una primera etapa para someter células madre pluripotentes a un cultivo flotante en un medio sin suero para formar un agregado de células madre pluripotentes,

5 (2) una segunda etapa para someter el agregado formado en la etapa (1) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero cada uno de ellos sin una sustancia que pueda mejorar la transducción de señales mediadas por Sonic hedgehog y que contienen una sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP, obteniéndose así un agregado que contiene células progenitoras retinianas,

10 (3) una tercera etapa para someter el agregado obtenido en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero cada uno de ellos sin una sustancia que pueda mejorar la transducción de señales mediadas por Sonic hedgehog y una sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP y que contienen una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniéndose así un agregado que contiene células epiteliales del pigmento retiniano, y

(4) una cuarta etapa de dispersar el agregado obtenido en la etapa (3) y someter las células resultantes a un cultivo de adhesión;

15 [3] el método de producción del anteriormente mencionado [2], en donde

(a) el cultivo de adhesión se realiza en presencia de un sustituto del suero en dicha etapa (4); y/o

(b) el cultivo de adhesión se realiza en presencia de una sustancia inhibidora de ROCK, en dicha etapa (4);

20 [4] el método de producción de los anteriormente mencionados [2] o [3], en donde el cultivo de adhesión se realiza en un medio sin suero o un medio que contiene suero comprendiendo además una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt, una sustancia que inhibe la vía de señales por FGF, una sustancia capaz de mejorar un señal mediada por Activina y una sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP, en dicha etapa (4);

25 [5] el método de producción de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [2] a [4], en donde el cultivo de adhesión se realiza en un material de recipiente de cultivo que tiene una superficie tratada con un sustrato de cultivo, en dicha etapa (4);

[6] el método de producción del anteriormente mencionado [5], en donde

(a) dicho sustrato de cultivo es un sustrato de cultivo sintético; o

(b) dicho sustrato de cultivo es laminina;

[7] el método de producción de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [1] a [6], en donde

30 (a) las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes de primate; o

(b) las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes de humano;

[8] el método de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [1] a [7], en donde la etapa (1) y la etapa (2) se llevan a cabo en presencia de un sustituto del suero;

35 [9] el método de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [1] a [8], en donde el cultivo flotante se realiza en ausencia de una preparación de membrana basal;

[10] el método de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [1] a [9], en donde la sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en BMP2, BMP4, BMP7 y GDF7;

40 [11] el método de uno cualquiera de los anteriormente mencionados [1] a [10], en donde el medio sin suero o el medio que contiene suero estando cada uno de ellos sin una sustancia que pueda mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y una sustancia que pueda mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP y que contienen una sustancia que pueda mejorar la transducción de señales mediada por Wnt en la etapa (3) comprende además una sustancia que inhibe la vía de señal de FGF;

45 [12] el método según uno cualquiera de los mencionados anteriormente [1] a [11], en donde la sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt se selecciona del grupo que consiste en proteínas que pertenecen a la familia de Wnt, agonista del receptor de Wnt, e inhibidor de GSK3 β ;

[13] el método según el anteriormente mencionado [12], en donde la proteína que pertenece a la familia de Wnt es Wnt1, Wnt3a o Wnt7a, y en donde el inhibidor de GSK3 β es 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021 o Kenpaulona;

[14] el método según uno cualquiera de los anteriormente mencionados [4] a [13], en donde la sustancia que inhibe la vía de la señal de FGF se selecciona del grupo que consiste en el receptor de FGF, inhibidor del receptor de FGF, sustancia inhibidora de la cascada de MAP quinasa, inhibidor de la quinasa PI3 e inhibidor de Akt;

5 [15] el método según el anteriormente mencionado [14], en donde el inhibidor del receptor de FGF es SU-5402, AZD4547 o BGJ398, y en donde la sustancia inhibidora de la cascada de MAP quinasa es el inhibidor de MEK, inhibidor de MAPK o inhibidor de ERK; y

[16] el método según uno cualquiera de los anteriormente mencionados [4] a [15], en donde la sustancia capaz de mejorar una señal mediada por Activina se selecciona del grupo que consiste en proteínas que pertenecen a la familia de Activina, receptor de Activina y agonista del receptor de Activina.

10 Efecto de la invención

Según el método de producción de la presente invención, se puede producir una célula epitelial del pigmento retiniano o una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano con alta eficiencia. En el método de producción de la presente invención, ya que una célula epitelial del pigmento retiniano o una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano se pueden obtener mediante el cultivo flotante de un agregado sin añadir una preparación de membrana basal a un medio, es decir, en ausencia de una preparación de membrana basal, se reduce el riesgo de contaminación de la célula o lámina de células obtenidas con un componente derivado de especies heterólogas.

15

Según el método de producción de la presente invención, una célula epitelial del pigmento retiniano o una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano se pueden proporcionar efectivamente para el fin de la toxicidad o evaluación de la eficacia de una sustancia química etc., un tratamiento de trasplante, etc.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra (A) una imagen de campo brillante en el día 18 del cultivo flotante de agregados, derivado de células madre embrionarias de humanos, cultivo flotante en un medio suplementado con BMP4 en el día 3 del cultivo flotante, y (B) una imagen de campo brillante en el día 20 del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas, cultivo flotante en un medio suplementado con BMP4 en el día 3 del cultivo flotante y cultivo flotante en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 en el día 18 del cultivo flotante.

25

La Figura 2 muestra (A) una imagen de campo brillante en el día 27 del cultivo flotante en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 desde los días 18 hasta 21 del cultivo flotante y después de eso en un medio sin BMP4 y CHIR99021, (B) una imagen de campo brillante en el día 27 del cultivo flotante en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 desde los días 18 hasta 27 del cultivo flotante, y (C) una imagen de campo brillante en el día 27 del cultivo flotante en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 en los días 18 a 21 en el cultivo flotante, en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 y SU-5402 desde los días 21 hasta 27 del cultivo flotante, del cultivo flotante de agregados derivados de células madre embrionarias humanas en un medio que contiene BMP4 en los días 3-18 desde el comienzo del cultivo flotante.

30

La Figura 3 muestra (A) una imagen de campo brillante, (B) una imagen de inmunotinción de fluorescencia del marcador epitelial del pigmento retiniano Mitf, y (C) una imagen de inmunotinción de fluorescencia del marcador de unión estrecha ZO-1, cada uno en el día 27 desde el comienzo del cultivo flotante,

35

de las células del cultivo de adhesión en un medio que contiene CHIR99021 en donde las células se obtuvieron mediante el cultivo flotante de los agregados derivados de células madre embrionarias humanas en un medio que contiene BMP4 desde los días 3 hasta 18 del cultivo flotante, en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 desde los días 18 hasta 21 del cultivo flotante, y la ruptura de los agregados en el día 21 del cultivo.

40

La Figura 4 muestra (A) una imagen de una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano y (B) una imagen ampliada de un campo brillante, cada uno en el día 40 desde el comienzo del cultivo flotante, de las células del cultivo de adhesión en un medio que contiene Y27632 en donde las células se obtuvieron mediante el cultivo flotante de los agregados derivados de las células madre embrionarias humanas en un medio que contiene BMP4 desde los días 3 hasta 18 del cultivo flotante, en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 desde los días 18 hasta 21 del cultivo flotante, dispersión en el día 21 del cultivo flotante, y siembra de las células resultantes en una cámara Boyden tratada superficialmente con Synthemax™.

45

La Figura 5 muestra imágenes ampliadas del campo brillante de una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano en el día 40 desde el comienzo del cultivo flotante. Los agregados derivados de células madre embrionarias humanas se sometieron a un cultivo flotante en un medio que contiene BMP4 desde el día 3 hasta el día 18 del cultivo flotante, en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 desde el día 18 hasta el día 21 del cultivo flotante, dispersión en el día 21 del cultivo, siembra de las células resultantes en una cámara Boyden tratada superficialmente con Synthemax™ y cultivo de adhesión del mismo. El cultivo de adhesión se continuó hasta el día 40 desde el comienzo del cultivo flotante, (A) sin la adición de componentes, o con la adición de (B) CHIR99021 3 μM, (C) SU-5402 10 μM, (D) CHIR99021 3 μM y SU-5402 10 μM, (E) proteína BMP4 humana 1 nM, o (F) activina humana 50 ng/ml en el día 24 desde el comienzo del cultivo flotante, o día 3 desde el comienzo del cultivo de

50

55

adhesión.

La Figura 6 muestra imágenes de una lámina de epitelio del pigmento retiniano en el día 26 desde el comienzo del cultivo flotante, de las células del cultivo de adhesión que se sembraron en una cámara Boyden tratadas superficialmente con (A) Matrigel™ o (B) Synthemax™ en donde las células se obtuvieron mediante el cultivo flotante de agregados derivados de células madre embrionarias humanas en un medio que contiene BMP4 desde el día 3 hasta el día 18 del cultivo flotante, en un medio sin BMP4 y que contiene CHIR99021 desde el día 18 hasta el día 21 del cultivo flotante, y dispersión en el día 21 del cultivo flotante.

Descripción de realizaciones

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

10 El "cultivo flotante" en la presente invención significa cultivar en condiciones que prohíben la adhesión de células o masa celular a un material del recipiente de cultivo celular etc.

15 El recipiente de cultivo que se va a utilizar en el cultivo flotante no está particularmente limitado siempre y cuando permita el "cultivo flotante", y los expertos ordinarios en la técnica puedan determinarlo apropiadamente. Ejemplos de dichos recipientes de cultivo incluyen, matraces, matraces de cultivo de tejidos, placas, placas Petri, placas de cultivo de tejidos, multiplacas, microplaca, placa de micropocillos, microporos, multiplaca, placa multipocillos, portaobjeto con cámara, fuente, tubo, bandeja, bolsa de cultivo y botella de rodillo. Ya que estos recipientes de cultivo se utilizan para cultivos flotantes, son preferiblemente no adhesivos celulares. Como un recipiente de células no adhesivo, se puede utilizar uno que tenga su superficie no tratada artificialmente para mejorar la adhesividad celular (por ejemplo, un tratamiento de recubrimiento con una matriz extracelular), etc.

20 El medio para utilizarse generalmente en la presente invención se puede preparar de un medio utilizado para el cultivo de células animales como un medio basal. Ejemplos del medio basal incluyen aquellos que se pueden utilizar para cultivar células animales, tales como medio BME, medio BGJb, medio CMRL1066, medio MEM de Glasgow, medio de opción de zinc de MEM mejorado, medio IMDM, medio Medium199, medio MEM de Eagle, medio α MEM, medio DMEM, medio F-12, medio de Ham, medio RPMI1640, medio de Fischer, y medio mezcla de los mismos.

25 El "medio sin suero" en la presente invención significa un medio sin suero no ajustado o no purificado. En la presente invención, un medio que contiene componentes derivados de sangre purificada y componentes derivados de tejido animal (por ejemplo, factor de crecimiento) se considera que es un medio sin suero a menos que contenga suero no ajustado o no purificado.

30 El medio sin suero puede contener un sustituto del suero. Ejemplo de sustitutos del suero incluyen los que contienen apropiadamente, por ejemplo, albúmina, transferrina, ácidos grasos, precursor de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol o 3'-tioglicerol, un equivalente de los mismos, etc. Dichos sustitutos del suero se pueden preparar por, por ejemplo, el método descrito en el documento de Patente WO98/30679. Además, el sustituto del suero puede ser un producto comercialmente disponible. Ejemplos de dichos sustitutos del suero comercialmente disponibles incluyen el sustituto del suero Knockout™, (fabricado por Invitrogen: en adelante algunas veces nombrado como KSR), concentrado lipídico químicamente definido (fabricado por Gibco), y Glutamax™ (fabricado por Gibco).

35 El medio sin suero para utilizarse para el cultivo flotante puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos no esenciales), vitaminas, factor de crecimiento, citoquinas, antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agente tamponante, sales inorgánicas, etc.

40 Para evitar una preparación complicada, un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada (por ejemplo, aproximadamente 1- aproximadamente 20%) de KSR comercialmente disponible se puede utilizar como un medio sin suero (por ejemplo, un medio obtenido por adición de KSR al 10% y 1-monotioglicerol 450 μ M a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM).

45 El "medio que contiene suero" en la presente invención significa un medio que contiene suero no ajustado o no purificado. El medio puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos no esenciales), vitaminas, factor de crecimiento, citoquinas, antioxidantes, 2-mercaptoetanol, 1-monotioglicerol, ácido pirúvico, agente tamponante, sales inorgánicas, etc.

50 La "preparación de membrana basal" en la presente invención se refiere a una que contiene componentes que constituyen la membrana basal que tienen una función para controlar la forma celular, diferenciación, crecimiento, motilidad, expresión de la función, etc, que son similares a los de las células epiteliales, cuando las células deseadas capaces de formar una membrana basal se colocan en ella y se cultivan. Aquí, el "componente que constituye la membrana basal" se refiere a una molécula de la matriz extracelular en la forma de una delgada membrana presente entre la capa de células epiteliales y la capa de células intersticiales y así sucesivamente en los tejidos animales. Una preparación de membrana basal se puede producir por, por ejemplo, eliminación de las células capaces de formar una membrana basal, que se adhieren a un soporte a través de una membrana basal, con una disolución capaz de disolver los lípidos de las células, una disolución alcalina, etc. Ejemplos de preparaciones de membrana basal preferibles incluyen productos disponibles comercialmente como productos de membrana basal ((por ejemplo,

Matrigel™ (fabricado por Beckton Dickinson: en adelante algunas veces nombrado como Matrigel)), y moléculas de la matriz extracelular conocidas como componentes de la membrana basal (por ejemplo, laminina, colágeno de tipo IV, proteoglicanos de sulfato de heparano, entactina, etc).

5 Matrigel™ es un producto de membrana basal extraído del sarcoma de ratón Engelbreth Holm Swarn (EHS). El principal componente del Matrigel™ es el colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicano de sulfato de heparano, y entactina. Además de estos, están contenidos TGF- β , el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el activador del plasminógeno tisular y un factor de crecimiento producido naturalmente por el tumor EHS. El “producto reducido el factor de crecimiento” de Matrigel™ tiene una menor concentración de factor de crecimiento que el Matrigel™ común, y la concentración estándar del mismo es < 0,5 ng/ml para EGF, < 0,2 ng/ml para NGF, < 5 pg/ml para PDGF, 5 ng/ml para IGF-1, y 1,7 ng/ml para TGF- β .

10 El “medio que contiene la sustancia X” significa un medio suplementado con una sustancia X exógena o un medio que contiene una sustancia X exógena, y el “medio sin sustancia X” significa un medio no suplementado con una sustancia X exógena o un medio que no contiene una sustancia X exógena. Aquí, la “sustancia X exógena” significa una sustancia X exógena a una célula o tejido que se va a cultivar en el medio, y una sustancia X endógena producida por la célula o tejido no se incluye en la misma.

15 Por ejemplo, un “medio que contiene una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP” es un medio suplementado con una sustancia exógena que actúa en la vía de transducción de señales por BMP o un medio que contiene una sustancia exógena que actúa en la vía de transducción de señales por BMP. Un “medio sin una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog” es un medio no suplementado con una sustancia exógena que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog o un medio que no contiene una sustancia exógena que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog.

Los “primates” en la presente invención significa mamíferos que pertenecen a los primates. Ejemplos de los primates incluyen Strepsirrhini tales como el lémur, loris, y Tsubai, y Haplorhini tales como mono, mono antropoide y humano.

25 En la presente invención, la “célula madre” se refiere a una célula que mantiene la misma capacidad de diferenciación incluso después de la división celular, que puede contribuir a la regeneración de un tejido del mismo cuando el tejido está lesionado. Aquí, la célula madre puede ser una célula madre embrionaria (en adelante algunas veces nombrada como célula ES) o una célula madre del tejido (también llamada célula madre tisular, célula madre específica del tejido o célula madre somática), o una célula madre pluripotente artificial (célula IPS: célula madre pluripotente inducida). Como se aprecia por el hecho de que la célula del tejido derivada de células madre mencionada anteriormente puede regenerar un tejido, se sabe que la célula madre puede diferenciarse en una célula normal cercana a una en el cuerpo vivo.

30 Las células madre de referencia están disponibles en organizaciones dadas, o también se puede comprar un producto disponible comercialmente. Por ejemplo, células madre embrionarias humanas, KhES-1, KhES-2 y KhES-3, están disponibles en el Institute for Frontier Medical Sciences de la Universidad de Kyoto. La célula EB5 está disponible en RIKEN, y la línea celular D3 está disponible en ATCC, cada una de las cuales es una célula madre embrionaria de ratón.

35 Las células madre se pueden mantener mediante el cultivo según un método conocido per se. Por ejemplo, las células madre humanas se pueden mantener mediante el cultivo en un medio suplementado con el sustituto del suero Knockout™ (Invitrogen). Las células madre de ratón se pueden mantener por adición de suero de bovino fetal (FCS) y Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) y cultivando sin células alimentadoras.

40 En la presente invención, las “células madre pluripotentes” se refieren a una célula madre que se puede cultivar in vitro y tiene una capacidad de diferenciarse en cualquier célula (tejidos derivados del triploblasto (ectodermo, mesodermo, endodermo)) que constituyen un cuerpo vivo excepto para la placenta (pluripotencia), y una célula madre embrionaria (célula ES) se incluye en la célula madre pluripotente. La “célula madre pluripotente” se obtiene del óvulo fecundado, el embrión clon, las células madre reproductivas y las células madre en un tejido. Una célula que tiene una pluripotencia de diferenciación artificial similar a la de las células madre embrionarias, después de introducir varios tipos de genes en una célula somática (también llamada célula madre pluripotente artificial) se incluye también en la célula madre pluripotente. La célula madre pluripotente se puede producir mediante un método conocido per se. Ejemplos del método de producción incluyen los métodos descritos en Cell, 2007, 131 (5) pp. 861-872 y Cell, 2006, 126 (4) pp. 663-676.

45 En la presente invención, la “célula madre embrionaria (célula ES)” se refiere a una célula madre que tiene una capacidad de autoreplicación y multipotencia (particularmente, “pluripotencia”), que es una célula madre pluripotente derivada de un embrión temprano. Como referencia, las células madre embrionarias se establecieron por primera vez en 1981, y se han aplicado también para la generación de ratones knockout desde 1989. Como referencia, en 1998, se estableció una célula madre embrionaria humana, que también se está utilizando para la medicina regenerativa.

55 Una “célula madre pluripotente artificial” se refiere a una célula inducida para tener multipotencia al reprogramar directamente una célula diferenciada, tal como fibroblastos, etc, mediante la expresión de varios tipos de genes tales

como Oct3/4, Sox2, Klf4, y Myc, que fue establecido por Yamanaka et al., in células de ratón en 2006 (Cell. 2006, 126(4), pp. 663-676). En 2007, células madre pluripotentes inducidas se establecieron también en fibroblastos humanos, y tienen una multipotencia similar a la de las células madre embrionarias (Cell, 2007, 131(5) pp. 861-872; Science, 2007, 318 (5858) pp. 1917-1920; Nat. Biotechnol., 2008, 26 (1) pp. 101-106).

5 Una célula madre pluripotente modificada genéticamente se puede producir, por ejemplo, utilizando una técnica de recombinación homóloga. Ejemplos del gen en el cromosoma que se va a modificar incluyen un gen marcador celular, un gen de antígeno de histocompatibilidad, un gen relacionado con una enfermedad debido a un trastorno de las células del sistema nervioso, etc. Un gen objetivo en el cromosoma se puede modificar mediante los métodos descritos en Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Bio Manual series 8, gene targeting, Production of mutant mouse using ES cells, YODOSHA CO., LTD. (1995), etc.

10 Para ser específico, por ejemplo, se aísla el gen genómico de un gen diana a modificar (por ejemplo, gen marcador celular, gen de antígeno de histocompatibilidad, gen relacionado con la enfermedad, etc) y un vector diana utilizado para la recombinación homóloga del gen diana se produce utilizando el gen genómico aislado. El vector diana producido se introduce en las células madre, y se seleccionan las células que muestran recombinación homóloga entre el gen diana y el vector diana, por lo cual se pueden producir las células madre que tienen genes modificados en el cromosoma.

15 Como un método para aislar el gen genómico del gen diana, se pueden mencionar métodos conocidos descritos en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997), etc. Además, el gen genómico del gen diana se puede aislar utilizando un sistema de selección de bibliotecas de DNA genómico (fabricado por Genome Systems), Universal GenomeWalker Kits (fabricado por CLONTECH), etc.

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

25 Como un método para seleccionar un recombinante homólogo deseado a partir de líneas celulares seleccionadas, se puede mencionar un método de hibridación de Southern, método de PCR, etc para DNA genómico.

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

30 Cuando las células se juntan para formar los agregados celulares y los agregados se someten a un cultivo flotante, "formar un agregado" significa "agregar rápidamente un número dado de células dispersas" para formar cualitativamente agregados celulares homogéneos.

35 En la presente invención, es preferible juntar rápidamente células madre pluripotentes para permitir la formación de un agregado de células madre pluripotentes. Para formar un agregado de células madre pluripotentes de esta manera, se puede formar una estructura similar a un epitelio con buena reproducibilidad en las células inducidas a diferenciarse del agregado formado.

Ejemplos de la operación experimental para formar un agregado incluyen un método que implica mantener las células en un pequeño espacio utilizando una placa con pequeños pocillos (placa de 96 pocillos), microporos, etc, un método que implica células de agregación mediante centrifugación durante un corto tiempo utilizando un pequeño tubo de centrifugación.

40 Si los agregados de células madre pluripotentes se han formado y si una estructura similar al epitelio se ha formado en las células que forman el agregado se puede determinar en base al tamaño y número de células de los agregados, la morfología macroscópica, morfología microscópica por análisis de tinción del tejido y uniformidad de la misma, expresión de los marcadores de diferenciación e indiferenciación de los mismos, control de la expresión del marcador de diferenciación y sincronismo de la misma, reproducibilidad de la eficiencia de la diferenciación entre agregados, etc.

45 Un "tejido" se refiere a una estructura de una población celular, que tiene una conformación en el que más de un tipo de célula diferente en la forma y propiedad está configurado estéricamente en un patrón dado.

50 Un "tejido retiniano" significa un tejido retiniano en donde al menos dos o más tipos de células tales como fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células ganglionares de la retina, sus células progenitoras o células progenitoras retinianas de las mismas, que constituyen capas retinianas respectivas en la retina viva, están dispuestas estéricamente en capas. Con respecto a cada célula, qué célula constituye qué

capa retiniana puede confirmarse mediante un método conocido, por ejemplo, la presencia o ausencia o el nivel de expresión de un marcador celular, etc.

5 Una "capa retiniana" significa cada capa que constituye la retina. Ejemplos específicos de las mismas incluyen una capa epitelial del pigmento retiniano, capa fotorreceptora, membrana limitante externa, capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna, capa de glándulas glanglionares, capa de fibra nerviosa y membrana limitante interna.

10 Una "célula neural específica de la capa retiniana" significa una célula neural que constituye una capa retiniana y específica de la capa retiniana. Ejemplos de la célula neural específica de la capa retiniana incluye célula bipolar, célula ganglionar, célula amacrina, célula horizontal, fotorreceptor, célula del epitelio del pigmento, células de la barra y células de cono.

15 La "célula epitelial del pigmento retiniano" en la presente invención significa células epiteliales presentes en el exterior del tejido neurorretiniano en la retina biológica. Los expertos en la técnica pueden confirmar si la célula es una célula epitelial de pigmento retiniano, basándose, por ejemplo, en la expresión de marcadores celulares (RPE65 (célula del epitelio del pigmento), Mitf (célula del epitelio del pigmento) y similares), presencia de gránulos de melanina, forma celular característica de polígono, etc.

La "célula progenitora retiniana" en la presente invención se refiere a una célula progenitora que se puede diferenciar en cualquier célula retiniana madura de un fotorreceptor, una célula horizontal, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula ganglionar de la retina y una célula epitelial del pigmento retiniano.

20 La célula progenitora del fotorreceptor, célula progenitora horizontal, célula progenitora bipolar, célula progenitora amacrina, célula progenitora ganglionar de la retina y célula progenitora epitelial del pigmento retiniano son células progenitoras determinadas para diferenciarse en un fotorreceptor, una célula horizontal, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula ganglionar de la retina, y una célula epitelial del pigmento retiniano, respectivamente.

25 Ejemplos de marcadores celulares retinianos incluyen Rax y PAX6 expresados en células progenitoras retinianas, Nkx2.1 expresado en células progenitoras de neuronas del hipotálamo, pero no expresado en células progenitoras retinianas, Sox1 se expresó en el neuroepitelio del hipotálamo y no se expresó en la retina, Crx se expresó en células progenitoras del fotorreceptor, etc. Ejemplos del marcador celular neural específico de la capa retiniana incluye Chx10 y L7 expresados en células bipolares, Tuj1 y Brn3 expresados en células ganglionares, Calretinina expresado en células amacrinas, Calbindina expresada en células horizontales, Rodopsina y Recoverina expresados en fotorreceptores, RPE65 y Mitf expresados en células del epitelio del pigmento, Nrl expresado en célula de la barra, Rxr-gamma expresado en células de cono, etc.

30 El método de producción 1 de la presente invención es un método para producir células epiteliales del pigmento retiniano, que incluye las siguientes etapas (1), (2) y (3):

(1) una primera etapa de someter las células madre pluripotentes a un cultivo flotante en un medio sin suero para formar un agregado de células madre pluripotentes,

35 (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la etapa (1) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno libre de una sustancia que pueda mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por BMP, obteniéndose así un agregado que contiene las células progenitoras retinianas, y

40 (3) una tercera etapa de someter el agregado obtenido en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno libre de una sustancia que pueda mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por BMP y que contiene una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por la vía de señales de Wnt, obteniéndose así un agregado que contiene la célula epitelial del pigmento retiniano.

45 Se explica la etapa (1) para someter las células madre pluripotentes a un cultivo flotante en un medio sin suero para formar un agregado de células madre pluripotentes.

50 El medio sin suero utilizado en la etapa (1) no está particularmente limitado siempre y cuando sea como se mencionó anteriormente. Por ejemplo, se puede utilizar un medio sin suero no suplementado con ninguna sustancia que actúe en la vía de transducción señales por BMP y una sustancia que inhiba la vía de la señal de Wnt. Para evitar procesos de formulación complicados, se prefiere utilizar un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada de un sustituto del suero tal como KSR comercialmente disponible (por ejemplo, un medio obtenido por adición de KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM y 1 x concentrado lipídico definido químicamente a una mezcla 1:1 de IMDM y F-12). La cantidad de KSR que se va a añadir a un medio sin suero es generalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, preferiblemente aproximadamente de 2% a aproximadamente 20%, en el caso de, por ejemplo, células ES humanas.

55 Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂ en la etapa (1) se pueden

determinar apropiadamente. La temperatura de cultivo es, por ejemplo, aproximadamente de 30°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, aproximadamente de 1% a aproximadamente 10%, preferiblemente aproximadamente 5%.

5 La concentración de las células madre pluripotentes en la etapa (1) se puede determinar de manera apropiada para formar agregados de células madre pluripotentes de manera más uniforme y eficiente. Por ejemplo, cuando las células ES humanas se someten a un cultivo flotante utilizando una placa de 96 pocillos, se añade a un pocillo un líquido preparado de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 5×10^5 células, preferiblemente de aproximadamente 3×10^3 a aproximadamente 5×10^4 células, más preferiblemente de aproximadamente 5×10^3 a aproximadamente 3×10^4 células, lo más preferible aproximadamente $1,2 \times 10^4$ células por pocillo, y la placa se deja en reposo para formar los agregados.

10 El tiempo del cultivo flotante necesario para formar los agregados se puede determinar de manera apropiada según las células madre pluripotentes que se van a utilizar, para permitir la agregación uniforme de las células. Para formar agregados uniformes, es deseable tan corto como sea posible. Por ejemplo, en el caso de células ES humanas, los agregados se forman preferiblemente dentro de aproximadamente 24 horas, más preferiblemente dentro de aproximadamente 12 horas. El tiempo para la formación del agregado se puede ajustar de manera apropiada controlando las herramientas para la agregación de las células, condiciones de centrifugación, etc.

15 Se puede determinar si los agregados de las células madre pluripotentes se han formado en base al tamaño y número de células de los agregados, morfología macroscópica, morfología microscópica mediante el análisis de la tinción tisular y uniformidad de la misma, expresión de los marcadores de diferenciación e indiferenciación y uniformidad de la misma, control de la expresión del marcador de diferenciación y sincronismo de la misma, reproducibilidad de la eficiencia de la diferenciación entre agregados, etc.

20 Se explica la etapa (2) que incluye someter el agregado formado en la etapa (1) a un cultivo flotante en un medio sin suero o en un medio que contiene suero estando cada uno libre de una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP, obteniéndose así un agregado que contiene células progenitoras retinianas.

25 Como el medio que se va a utilizar en la etapa (2), por ejemplo, se utiliza un medio sin suero o un medio que contiene suero no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP, y no es necesario la adición de una preparación de membrana basal.

30 El medio sin suero o el medio que contiene suero que se van a utilizar como tales medios no están limitados siempre y cuando sea como se mencionó anteriormente. Para evitar procesos de formulación complicados, se utiliza preferiblemente un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada de un sustituto del suero tal como KSR comercialmente disponible (por ejemplo, un medio obtenido por adición de KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μ M y 1 x concentrado lipídico definido químicamente a una mezcla 1:1 de IMDM y F-12). La cantidad de KSR que se va a añadir a un medio sin suero es generalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 20%, en el caso de, por ejemplo, células ES humanas.

35 Como el medio sin suero que se va a utilizar en la etapa (2), el medio sin suero utilizado en la etapa (1) se puede utilizar siempre y cuando no contenga una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog, o se puede sustituir con un medio sin suero nuevo. Cuando el medio sin suero utilizado en la etapa (1) se utiliza directamente en la etapa (2), solo se necesita añadir al medio una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por BMP.

40 Una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog (en adelante algunas veces nombrada como Shh) es una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Shh. Ejemplos de la sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Shh incluyen proteínas que pertenecen a la familia de Hedgehog (por ejemplo, Shh), receptor de Shh, agonista del receptor de Shh, Purmorfamina, SAG, etc.

45 Un medio "sin una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog" incluye también un medio sustancialmente libre de una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog, tal como un medio sin una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog, a una concentración que ejerza una influencia adversa en la diferenciación selectiva en la célula progenitora retiniana y en el tejido retiniano.

50 Un medio "no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog" incluye también un medio sustancialmente no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog, tal como un medio no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog, a una concentración que ejerza una influencia adversa en la diferenciación selectiva en la célula progenitora retiniana y en el tejido retiniano.

55 Una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP es una sustancia que puede mejorar la vía

de transducción de señales mediada por BMP. Ejemplos de la sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP incluyen proteínas BMP tales como BMP2, BMP4 o BMP7, proteínas GDF tales como GDF7, anticuerpo del receptor anti-BMP, péptido parcial de BMP, etc. La proteína BMP2, la proteína BMP4 y la proteína BMP7 están disponibles en, por ejemplo, R & D Systems, y la proteína GDF7 está disponible en, por ejemplo, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

La concentración de una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP solo necesita estar en una concentración capaz de inducir la diferenciación de células que forman agregados de células madre pluripotentes en las células retinianas. En el caso de BMP4, por ejemplo, se añade a un medio a una concentración de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 1 µM, preferiblemente de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 100 nM, más preferiblemente aproximadamente 1,5 nM.

Una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP solo necesita añadirse después de aproximadamente 24 horas desde el comienzo del cultivo flotante en la etapa (1), y se puede añadir al medio dentro de varios días desde el comienzo del cultivo flotante (por ejemplo, dentro de los 15 días). Preferiblemente, una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP se añade al medio entre el día 1 y el día 15, más preferiblemente entre el día 1 y el día 9, lo más preferible en día 3, desde el comienzo del cultivo flotante.

Después de que una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP se añade al medio y se inicia la inducción de la diferenciación de células que forman los agregados de células madre pluripotentes en células retinianas, la sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP no necesita añadirse al medio, y el medio se puede cambiar con un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno de ellos libre de una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP, por lo que el costo del medio se puede suprimir. Se puede confirmar una célula en la que la inducción de la diferenciación en una célula retiniana ha comenzado, por ejemplo, mediante la detección de la expresión del gen Rax en la célula. También es posible confirmar el tiempo cuando la inducción de la diferenciación en la célula retiniana se inició sometiendo los agregados formados en la etapa (1) utilizando una célula madre pluripotente, en la que el gen de una proteína informadora de fluorescencia tal como GFP ha sido activada en el locus del gen Rax, a un cultivo flotante en presencia de una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP a una concentración necesaria para la inducción de la diferenciación en las células retinianas, y detectar la fluorescencia emitida desde las proteínas informadoras de fluorescencia. Una de las realizaciones de la etapa (2) es una etapa que incluye someter los agregados formados en la etapa (1) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero conteniendo cada uno una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP a una concentración necesaria para la inducción de la diferenciación en las células retinianas y sin una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog hasta que una célula que expresa el gen Rax aparece para obtener un agregado que contiene una célula progenitora retiniana.

Las condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂ en la etapa (2) se pueden determinar de manera apropiada. La temperatura de cultivo es, por ejemplo, aproximadamente de 30°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, aproximadamente del 1% a aproximadamente el 10%, preferiblemente aproximadamente del 5%.

Se puede confirmar que un agregado que contiene una célula progenitora retiniana se ha obtenido, por ejemplo, detectando la presencia de una célula que expresa un marcador de la célula progenitora retiniana Rax o PAX6 en el agregado.

Se explica la etapa (3) que incluye someter el agregado obtenido en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno sin una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP y que contienen una sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt, obteniéndose así un agregado que contiene una célula epitelial del pigmento retiniano.

El medio utilizado en la etapa (3) es, por ejemplo, un medio sin suero o un medio que contiene suero no suplementado con ninguna sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por BMP, y suplementado con una sustancia que actúe en la vía de señales de Wnt.

El medio "sin una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por BMP" incluye también un medio sustancialmente libre de una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por BMP, por ejemplo, un medio que no contiene una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por BMP, a una concentración que ejerza una influencia adversa en la diferenciación selectiva en los tejidos retinianos.

El medio "no suplementado con ninguna sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por BMP" incluye también un medio no suplementado sustancialmente con una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por Sonic

hedgehog y una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por BMP, por ejemplo, un medio no suplementado con una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y una sustancia que actúe en la vía de transducción de señales por BMP, a una concentración que ejerza una influencia adversa en la diferenciación selectiva en tejidos retinianos.

- 5 Ejemplos de medio sin suero o medio que contiene suero que se van a utilizar como dicho medio incluyen el medio mencionado anteriormente. Se prefiere un medio sin suero que es un medio basal tal como el medio DMEM-F12 suplementado con una mezcla de factores neurotróficos tales como suplemento de N2 (Invitrogen), suplemento de B27 (Invitrogen) y no suplementado con KSR.

- 10 La sustancia que actúa en la vía de señales Wnt es una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt. Ejemplos de la sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt incluye proteínas que pertenecen a la familia Wnt (por ejemplo, Wnt1, Wnt3a, Wnt7a), agonista del receptor de Wnt, inhibidor de GSK3 β (por ejemplo, 6-bromindirrubina-3'-oxima (BIO), CHIR99021, Kenpaulona), etc.

- 15 La concentración de la sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt puede ser cualquiera siempre y cuando se puedan introducir la diferenciación de las células que forman los agregados de células madre pluripotentes en las células retinianas. Por ejemplo, en el caso de CHIR99021, se añade a una concentración de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 100 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 30 μ M, más preferiblemente aproximadamente 3 μ M.

Se añade una sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt, por ejemplo, no antes del día 12 desde el comienzo del cultivo flotante en la etapa (1), preferiblemente en el día 18, cuando se utilizan células ES humanas.

- 20 En la etapa (3), es más preferible cultivar los agregados en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno de ellos libre de una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por Sonic hedgehog y una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP, y que contienen una sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt y una sustancia que inhibe la vía de señal de FGF.

- 25 Una sustancia que inhibe la vía de señal de FGF es una sustancia capaz de inhibir una señal mediada por FGF. Ejemplos de la sustancia que inhibe la vía de señal de FGF incluyen el receptor de FGF, inhibidor del receptor de FGF (por ejemplo, SU-5402, AZD4547, BGJ398), sustancia inhibidora de la cascada de MAP quinasa (por ejemplo, inhibidor de MEK, inhibidor de MAPK, inhibidor de ERK), inhibidor de quinasa PI3, inhibidor de Akt, etc.

- 30 La concentración de una sustancia que inhibe la vía de señal de FGF que se va a utilizar en la etapa (3) puede ser cualquiera siempre y cuando se pueda introducir la diferenciación de las células que forman los agregados de células madre pluripotentes en células retinianas. Por ejemplo, en el caso de SU-5402, se añade a una concentración de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 100 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 30 μ M, más preferiblemente aproximadamente 10 μ M.

- 35 Ya que las células epiteliales del pigmento retiniano así producidas están presentes en la superficie de un agregado, se pueden confirmar mediante observación microscópica y similares. También es posible obtener una célula epitelial de pigmento retiniano altamente pura sometiendo el agregado que contiene las células epiteliales del pigmento retiniano a un tratamiento de dispersión (por ejemplo, tratamiento de tripsina/EDTA), y seleccionando las células resultantes mediante el uso de FACS. También es posible cortar físicamente las células epiteliales del pigmento retiniano del agregado utilizando pinzas y similares, y cultivar las células. Las células epiteliales del pigmento retiniano dispersadas o cortadas así se pueden cultivar bajo condiciones de adhesión. Es posible también romper los agregados que contienen las células epiteliales del pigmento retiniano mediante una operación de pipeteo utilizando una micropipeta, etc, y cultivar además las células resultantes bajo condiciones de adhesión. En el caso del cultivo de adhesión, se utiliza preferiblemente un recipiente de cultivo de adhesión celular, por ejemplo, un recipiente de cultivo después de un tratamiento de recubrimiento con una matriz extracelular, etc, (por ejemplo, poli-D-lisina, laminina, fibronectina). Las condiciones de cultivo del cultivo de adhesión tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂, y concentración de O₂ se puede determinar según corresponda. En este caso, las células se pueden cultivar en presencia de un suero, un factor de crecimiento conocido, y aditivos y sustancias químicas que promueven el crecimiento. Ejemplos de factores de crecimiento conocidos incluyen EGF, FGF y similares. Ejemplos de los aditivos que promueven el crecimiento incluyen suplemento de N2 (Invitrogen), suplemento de B27 (Invitrogen) y similares.

- 50 El método de producción 2 de la presente invención es un método para producir una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano, que comprende las siguientes etapas (1), (2), (3) y (4):

(1) una primera etapa de someter las células madre pluripotentes a un cultivo flotante en un medio sin suero para formar un agregado de células madre pluripotentes,

- 55 (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la etapa (1) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno de ellos libre de una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por BMP, obteniéndose así un agregado que contiene células progenitoras

retinianas,

5 (3) una tercera etapa de someter el agregado obtenido en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno libre de una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por BMP y que contiene una sustancia de la vía de señal de Wnt, obteniéndose así un agregado que contiene células progenitoras retinianas, y

(4) una cuarta etapa de dispersar el agregado obtenido en la etapa (3) y someter las células resultantes a un cultivo de adhesión.

10 La etapa (1), etapa (2) y etapa (3) del método de producción 2 de la presente invención se pueden realizar de manera similar a la etapa (1), etapa (2) y etapa (3) del método de producción 1 de la presente invención.

Se explica la etapa (4) para dispersar el agregado obtenido en la etapa (3) y someter las células resultantes a un cultivo de adhesión.

La etapa (4) se realiza dentro de los 60 días, preferiblemente dentro de los 30 días, más preferiblemente dentro de los 3 días, después del comienzo de la etapa (3).

15 Las células derivadas de los agregados dispersos en la etapa (4) se siembran en un recipiente de cultivo de adhesión a una concentración capaz de formar eficientemente una lámina uniforme de células epiteliales del pigmento retiniano. Por ejemplo, cuando las células derivadas de los agregados se someten a un cultivo de adhesión utilizando una cámara Boyden de 65 mm, una disolución preparada para contener de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^7 , preferiblemente de aproximadamente 3×10^3 a aproximadamente 5×10^6
 20 células, más preferiblemente de aproximadamente 5×10^3 a aproximadamente 1×10^6 células, más preferiblemente aproximadamente 2×10^5 células, por pocillo se añade a los pocillos, y la placa se coloca para permitir que las células derivadas de los agregados se adhieran y cultiven.

Ejemplos del medio sin suero o del medio que contiene suero que se va a utilizar para el cultivo de adhesión en la etapa (4) incluye el medio anteriormente mencionado. Para evitar los procesos de formulación complicados, por
 25 ejemplo, se utiliza preferiblemente un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada de un sustituto del suero tal como KSR comercialmente disponible (por ejemplo, un medio en donde una mezcla 1:1 de DMEM/F-12 y Neurobasal se añade con 1/2x suplemento de N2, 1/2x suplemento de B27 y 2-mercaptoetanol 100 μ M). La concentración de KSR que se va a añadir a un medio sin suero es generalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 20%, en el caso de, por
 30 ejemplo, células derivadas de células ES humanas.

En la etapa (4), las células se cultivan preferiblemente en un medio sin suero o un medio que contiene suero que contiene una sustancia inhibidora de ROCK.

La sustancia inhibidora de ROCK es una sustancia capaz de inhibir una señal mediada por una quinasa Rho. Ejemplos de la sustancia inhibidora de ROCK incluyen Y-27632 y Fasudil.

35 La concentración de una sustancia inhibidora de ROCK que se va a utilizar en la etapa (4) puede ser cualquiera siempre y cuando se pueda formar de manera eficiente una lámina uniforme de células epiteliales del pigmento retiniano. Por ejemplo, en el caso de Y-27632, se añade a una concentración de aproximadamente 0,01 μ M a aproximadamente 100 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 30 μ M, más preferiblemente aproximadamente 20 μ M.

40 En la etapa (4), es más preferible cultivar las células en un medio sin suero o un medio que contiene suero conteniendo además una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en una sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt, una sustancia que inhibe la vía de señales de FGF, una sustancia que actúa en la vía de señales de Activina y una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP.

Ejemplos de la sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt incluyen proteínas que pertenecen a la familia de Wnt (por ejemplo, Wnt1, Wnt3a, Wnt7a), agonista del receptor de Wnt, inhibidor de GSK3 β (por ejemplo, 6-bromoindirubina-3'-oxima (BIO), CHIR99021, Kenpaulona) y similares.

45 La concentración de una sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt que se va a utilizar en la etapa (4) puede ser cualquiera siempre y cuando se pueda formar de manera eficiente una lámina uniforme de células epiteliales del pigmento retiniano. Por ejemplo, en el caso de CHIR99021, se añade a una concentración de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 100 μ M, preferiblemente aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 30 μ M, más preferiblemente aproximadamente 3 μ M.

50 Se añade una sustancia que actúa en la vía de señales de Wnt, por ejemplo, dentro de los 18 días, preferiblemente en el día 6, desde el comienzo de la etapa (4).

Ejemplos de la sustancia que inhibe la vía de señales de FGF incluyen el receptor de FGF, inhibidor del receptor de

FGF (por ejemplo, SU-5402, AZD4547, BGJ398), sustancia inhibidora de la cascada de MAP quinasa (por ejemplo, inhibidor de MEK, inhibidor de MAPK, inhibidor de ERK), inhibidor de la quinasa PI3, e inhibidor de Akt.

5 La concentración de una sustancia que inhibe la vía de señales de FGF que se va a utilizar en la etapa (4) puede ser cualquiera siempre y cuando se pueda formar de manera eficiente una lámina uniforme de células epiteliales del pigmento retiniano. Por ejemplo, en el caso de SU-5402, se añade a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM , preferiblemente de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 30 μM , más preferiblemente aproximadamente 10 μM .

Se añade una sustancia que inhibe la vía de señales de FGF, por ejemplo, dentro de los 18 días, preferiblemente en el día 6, desde el comienzo de la etapa (4).

10 Una sustancia que actúa en la vía de señales de Activina es una sustancia capaz de mejorar una señal mediada por Activina. Ejemplos de la sustancia que actúa en la vía de señales de Activina incluyen proteínas que pertenecen a la familia de la Activina (por ejemplo, Activina A, Activina B, Activina C, Activina AB, etc), receptor de la Activina y agonista del receptor de la Activina.

15 La concentración de una sustancia que actúa en la vía de señales de la Activina que se va a utilizar en la etapa (4) puede ser cualquiera siempre y cuando se pueda formar de una manera eficiente una lámina uniforme de células epiteliales del pigmento retiniano. Por ejemplo, en el caso de Activina A humana recombinante/ratón/rata (R & D Systems, Inc. #338-AC), se añade a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente aproximadamente de 10 ng/ml a aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$, más preferiblemente aproximadamente 100 ng/ml.

20 Se añade una sustancia que actúa en la vía de señales de Activina, por ejemplo, dentro de los 18 días, preferiblemente en el día 6, desde el comienzo de la etapa (4).

Ejemplos de la sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP incluye proteínas BMP tales como BMP2, BMP4 o BMP7 y, proteínas GDF tales como GDF7, etc, anticuerpos receptores de anti-BMP, péptido parcial de BMP y similares.

25 La concentración de una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP que se va a utilizar en la etapa (4) puede ser cualquiera siempre y cuando se pueda formar de manera eficiente una lámina uniforme de células epiteliales del pigmento retiniano. Por ejemplo, en el caso de BMP4, se añade a una concentración de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 1 μM , preferiblemente de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 100 nM, más preferiblemente aproximadamente 1,5 nM.

30 Una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP se añade, por ejemplo, dentro de los 18 días, preferiblemente en el día 6, desde el comienzo de la etapa (4).

35 En la etapa (4), por ejemplo, las células se cultivan en un medio sin suero o en un medio que contiene suero conteniendo además una clase de sustancia seleccionada del grupo que consiste en una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt, una sustancia que inhibe la vía de señal de FGF, una sustancia que actúa en la vía de señal de la Activina y una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP, o un medio sin suero o un medio que contiene suero conteniendo además una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt y una sustancia que inhibe la vía de señal de FGF.

En la etapa (4), el cultivo de adhesión se lleva a cabo preferiblemente en un material de recipiente de cultivo que se trata superficialmente con un sustrato de cultivo.

40 Como un sustrato de cultivo utilizado para tratar el material de recipiente de cultivo en la etapa (4), se puede mencionar un sustrato de cultivo celular que permite el cultivo de adhesión de las células derivadas del agregado, y la formación de una lámina de células epiteliales de un pigmento retiniano. Para evitar preparaciones complicadas y prevenir la contaminación de componente(s) derivados de unas especies heterólogas, es preferible el uso de un sustrato de cultivo sintético, un componente de membrana basal derivado de humanos, una proteína de membrana basal humana recombinante, etc. Ejemplos específicos de dichos sustratos de cultivo incluyen sustratos de cultivo sintéticos tales como Synthmax™ (Corning incorporated), etc, componentes de membrana basal derivados de humanos tales como Cellstart™ (Invitrogen), sustrato extracelular humano (BD), etc, laminina humana recombinante tal como laminin111 recombinante humana (Biolamina), laminin511 recombinante humana (Biolamina), laminin521 recombinante humana (Biolamina), laminin411 recombinante humana (Biolamina), laminin421 recombinante humana (Biolamina), laminin332 recombinante humana (Biolamina) y laminin211 (Biolamina), etc. Como se utiliza en la presente memoria, la laminin111 es una laminina que consiste en la cadena α 1, cadena β 1 y la cadena γ 1, la laminin511 es una laminina que consiste en la cadena α 5, cadena β 1 y cadena γ 1, la laminin521 es una laminina que consiste en la cadena α 5, cadena β 2 y cadena γ 1, la laminin411 es una laminina que consiste en la cadena α 4, cadena β 1 y cadena γ 1, la laminin421 es una laminina que consiste en la cadena α 4, cadena β 2 y cadena γ 1, la laminin332 es una laminina que consiste en la cadena α 3, cadena β 3 y cadena γ 2, y la laminin211 es una laminina que consiste en la cadena α 2, cadena β 1 y la cadena γ 1. Además, una parte llamada fragmento E8, que está constituido por la región C-terminal de cada una de las cadenas α , cadenas β y cadenas γ de la laminina, también se

sabe que muestra una actividad de unión a la integrina expresada por las células (J.Biol. Chem., 284, 7820-7831 (2009)). Por lo tanto, se espera que sea similar a la laminina mencionada anteriormente.

5 Una célula epitelial del pigmento retiniano o una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano producidas por el método de producción 1 o 2 de la presente invención tienen características extremadamente similares a las de las células epiteliales del pigmento retiniano en el cuerpo.

10 Por lo tanto, se pueden también utilizar para seleccionar un fármaco terapéutico para una enfermedad debida a un trastorno de las células retinianas, o un material de trasplante para tratamiento celular, un material para el estudio de enfermedades o un material de descubrimiento de fármacos para un fármaco terapéutico para un daño celular debido a otra etiología. Además, se pueden utilizar para el estudio de la toxicidad tal como fototoxicidad, ensayo de toxicidad, etc en la evaluación de la toxicidad y la eficacia del fármaco de las sustancias químicas, etc.

Ejemplos de la enfermedad debida a un trastorno de las células retinianas incluyen envenenamiento orgánico por mercurio, retinopatía por cloroquina, retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, galucoma, retinopatía diabética, retinopatía neonatal, etc.

15 Una célula epitelial del pigmento retiniano o una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano producidas por el método de producción 1 o 2 de la presente invención se pueden utilizar como una célula epitelial del pigmento retiniano para trasplantes, que se utiliza para suplementar una célula dañada o tejido roto en un estado de daño celular (por ejemplo, utilizado para una operación de trasplante), etc.

Ejemplos

20 La presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplo de referencia 1: Producción de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células ES humanas

25 Células ES humanas (derivadas de KhES-1) se cultivaron según los métodos descritos en "Ueno, M. et al., PNAS 2006, 103 (25), 9554-9559" y "Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como el medio, se utilizó un medio obtenido por adición de KSR al 20% (sustituto de suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácido no esenciales, medio bFGF 5 ng/ml a DMEM/F12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales utilizando cada 3 días TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersas individualmente se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a $1,2 \times 10^4$ células por un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos sin adhesivo celular (placas esféricas sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) para permitir la formación rápida de agregados, y sometidas a un cultivo a 37°C, 5% de CO₂. Como medio sin suero para el mismo, se utilizó un medio sin suero obtenido por adición del KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado lipídico definido químicamente, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el comienzo del cultivo flotante, se añadió BMP4 a una concentración final 1,5 nM, y continuó el cultivo flotante. Se intercambia la mitad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días con el medio anteriormente mencionado no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP. En el día 18 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se transfirieron a un medio sin suero, que fue un medio DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 µM y se añadió con 1x suplemento de N2, y se cultivaron hasta el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante, y se realizó la observación al microscopio.

35 En el día 18 desde el comienzo del cultivo flotante, se confirmó la formación del neuroepitelio (Figura 1A). En el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante, se confirmó la diferenciación de las células en las células epiteliales del pigmento retiniano que tienen el epitelio delgado (Figura 1B).

Ejemplo de referencia 2: Producción de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células ES humanas

45 Las células ES humanas (derivadas de KhES-1) se cultivaron según los métodos descritos en "Ueno, M. et al., PNAS 2006, 103 (25), 9554-9559" y "Watanabe, K. et al., Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como el medio, se utilizó un medio obtenido por adición de KSR al 20% (sustituto del suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácido no esencial, medio de bFGF 5 ng/ml a DMEM/F-12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales utilizando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas individualmente se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a $1,2 \times 10^4$ células por un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos sin adhesivo celular (placas esféricas sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) para permitir la formación rápida de agregados, y se sometieron a un cultivo a 37°C, 5% de CO₂. Como medio sin suero para el mismo, se utilizó un medio sin suero obtenido por adición del KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado lipídico definido químicamente, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el comienzo del cultivo flotante, se añadió BMP4 a una concentración final 1,5 nM, y continuó el cultivo flotante. Se intercambia la mitad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días con el medio anteriormente mencionado no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP. En el día 18 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se transfirieron a un medio sin suero, que fue un medio DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 µM y se añadió con 1x suplemento de N2, y el cultivo flotante se continuó hasta el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante. Como un control, los agregados se cultivaron similarmente

incluso en ausencia de CHIR99021. Una parte de los agregados sometidos a cultivo flotante en el medio anteriormente mencionado que contiene CHIR99021 se sometió a cultivo flotante bajo las mismas condiciones del medio hasta el día 27 desde el comienzo del cultivo flotante, y la otra parte se sometió a cultivo flotante en un medio sin suero, que fue el medio DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 μM (una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt) y SU-5402 10 μM (una sustancia que inhibe la vía de señal de FGF) y se añadió con 1x suplemento de N2, desde el día 21 hasta el día 27 desde el comienzo del cultivo flotante a 37°C, 5% de CO₂.

Los agregados se cultivaron en ausencia de una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt desde el día 21 del cultivo, el epitelio del pigmento retiniano que tiene el epitelio delgado volvió al neuroepitelio que tiene el epitelio grueso (Figura 2A), mientras en los agregados que se siguieron cultivando en presencia de una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt, las células epiteliales del pigmento retiniano oscuro aparecieron en la superficie de casi todos los agregados (Figura 2B). Los agregados cultivados en presencia de una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt y una sustancia que inhibe la vía de señal de FGF mostraron un aumento en la eficiencia de la inducción de la diferenciación, y se formaron los agregados que tienen células epiteliales del pigmento retiniano en casi toda la superficie de los agregados (Figura 2C).

Ejemplo de Referencia 3: Producción de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células ES humanas

Las células ES humanas (derivadas de KhES-1) se cultivaron según los métodos descritos en "Ueno, M. et al., PNAS 2006, 103 (25), 9554-9559" y "Watanabe, K. et al., Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como el medio, se utilizó un medio obtenido por adición de KSR al 20% (sustituto del suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácido no esencial, medio bFGF 5 ng/ml a DMEM/F-12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales utilizando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas individualmente se suspendieron en 100 μl de un medio sin suero a 1,2 x 10⁴ células por un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos sin adhesivo celular (placas esferoides sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) para permitir la formación rápida de agregados, y se sometieron a un cultivo a 37°C, 5% de CO₂. Como medio sin suero para el mismo, se utilizó un medio sin suero obtenido por adición del KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μM , 1x concentrado lipídico definido químicamente, Y27632 20 μM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el comienzo del cultivo flotante, se añadió BMP4 a una concentración final 1,5 nM, y continuó el cultivo flotante. Se intercambia la mitad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días con el medio anteriormente mencionado no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP. En el día 18 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se transfirieron a un medio sin suero, que fue un medio DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 μM y se añadió con 1x suplemento de N2, y el cultivo flotante se continuó hasta el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante. En el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se rompieron mediante la inyección y eyección de la solución por micropipetas, y las células resultantes se sometieron a un cultivo de adhesión en un medio sin suero, que fue un medio DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 μM (una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt) y se añadió con 1x suplemento de N2, a 37°C, 5% de CO₂.

En el día 27 desde el comienzo del cultivo flotante, se observaron las células epiteliales del pigmento retiniano que tienen una forma celular poligonal característica (Figura 3A). La expresión de proteínas se confirmó mediante un método de tinción celular. Como resultado, las células fueron positivas al factor de transcripción Mitf, que es un marcador de células epiteliales del pigmento retiniano (Figura 3B) y positivas a ZO-1, que es un marcador de unión estrecha (Figura 3C), a partir del cual se confirmó que las células obtenidas eran células epiteliales del pigmento retiniano.

Ejemplo de referencia 4: Producción de una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células ES humanas

Las células ES humanas (derivadas de KhES-1) se cultivaron según los métodos descritos en "Ueno, M. et al., PNAS 2006, 103 (25), 9554-9559" y "Watanabe, K. et al., Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como el medio, se utilizó un medio obtenido por adición de KSR al 20% (sustituto del suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácido no esencial, medio bFGF 5 ng/ml a DMEM/F-12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales utilizando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas individualmente se suspendieron en 100 μl de un medio sin suero a 1,2 x 10⁴ células por un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos sin adhesivo celular (placas esferoides sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) para permitir la formación rápida de agregados, y se sometieron a un cultivo a 37°C, 5% de CO₂. Como medio sin suero para el mismo, se utilizó un medio sin suero obtenido por adición del KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μM , 1x concentrado lipídico definido químicamente, Y27632 20 μM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el comienzo del cultivo flotante, se añadió BMP4 a una concentración final 1,5 nM, y continuó el cultivo flotante. Se intercambia la mitad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días con el medio anteriormente mencionado no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP. En el día 18 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se transfirieron a un medio sin suero, que fue un medio DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 μM y se añadió con 1x suplemento de N2, y se cultivó hasta el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante. En el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se dispersaron en la disolución de dispersión celular Accutase (ICT), y los restos se eliminaron utilizando un filtro celular de 40 μm . Las células resultantes se suspendieron en un medio sin suero (200 μl), que era una mezcla 1:1 de medio DMEM/F-12 y

medio Neurobasal añadido con KSR al 10%, 1/2 suplemento de N2, 1/2 suplemento de B27, Y27632 20 µM, y se sembraron en una cámara Boyden de 65 mm (Transwell, Corning Incorporated) después de un tratamiento de recubrimiento con Synthemax™ a 2×10^5 células por pocillo, se añadió también a un pocillo inferior un medio (1 ml) que tiene la misma composición, y se llevó a cabo un cultivo de adhesión a 37°C y 5% de CO₂. El medio se cambió cada 3 días y el nivel de formación epitelial se observó bajo un microscopio en el día 40 desde el comienzo del cultivo flotante.

En el día 40 desde el comienzo del cultivo flotante, se formó una lámina uniforme de células epiteliales del pigmento retiniano que tiene una forma celular poligonal característica (Figura 4B) con acumulación de pigmento (Figura 4A).

Ejemplo de referencia 5: Producción de una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células ES humanas

Las células ES humanas (derivadas de KhES-1) se cultivaron según los métodos descritos en "Ueno, M. et al., PNAS 2006, 103 (25), 9554-9559" y "Watanabe, K. et al., Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como el medio, se utilizó un medio obtenido por adición de KSR al 20% (sustituto del suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácido no esencial, medio bFGF 5 ng/ml a DMEM/F-12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales utilizando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas individualmente se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a $1,2 \times 10^4$ células por un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos sin adhesivo celular (placas esféricas sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) para permitir la formación rápida de agregados, y se sometieron a un cultivo a 37°C, 5% de CO₂. Como medio sin suero para el mismo, se utilizó un medio sin suero obtenido por adición del KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado lipídico definido químicamente, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el comienzo del cultivo flotante, se añadió BMP4 a una concentración final 1,5 nM, y el cultivo flotante se continuó. Se intercambia la mitad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días con el medio anteriormente mencionado no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP. En el día 18 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se transfirieron a un medio sin suero, que fue un medio DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 µM y se añadió con 1x suplemento de N2, y se cultivó hasta el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante. En el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se dispersaron en la disolución de dispersión celular Accutase (ICT), y los restos se eliminaron utilizando un filtro celular de 40 µm. Las células resultantes se suspendieron en un medio sin suero (200 µl), que era una mezcla 1:1 de medio DMEM/F-12 y medio Neurobasal añadido con KSR al 10%, 1/2 suplemento de N2, 1/2 suplemento de B27, Y27632 20 µM, y se sembraron en una cámara Boyden de 65 mm (Transwell, Corning Incorporated) después de un tratamiento de recubrimiento con Synthemax™ a 2×10^5 células por pocillo, se añadió también a un pocillo inferior un medio (1 ml) que tiene la misma composición, y se llevó a cabo un cultivo de adhesión a 37°C y 5% de CO₂. En el día 24 desde el comienzo del cultivo flotante, es decir, en el día 3 desde el comienzo del cultivo de adhesión, se añadió CHIR99021 3µM, se añadió SU-5402 10 µM, se añadieron simultáneamente CHIR99021 3µM y SU-5402 10 µM, se añadió la proteína BMP4 humana recombinante 1 nM, o se añadió activina humana recombinante 50 ng/ml, y se continuó el cultivo de adhesión. Cultivos similares se llevaron a cabo bajo condiciones sin la adición de las sustancias anteriormente mencionadas. El medio se cambió cada 3 días, y el nivel de formación epitelial se observó bajo microscopio en el día 40 desde el comienzo del cultivo flotante.

Cuando se añadió CHIR99021 3 µM en el día 24 desde el comienzo del cultivo flotante (Figura 5B), las células se diferenciaron en las células epiteliales del pigmento retiniano más oscuro en comparación con el control sin la adición (Figura 5A). Para la adición simultánea de CHIR99021 3µM y SU-5402 10 µM (Figura 5D), se obtuvo un epitelio del pigmento coloreado más oscuro que por una adición única de CHIR99021 3 µM (Figura 5B). Cuando se añadió una proteína BMP4 humana recombinante 1nM (Figura 5E), o se añadió activina humana recombinante 50 ng/ml (Figura 5F), se obtuvo un epitelio más uniforme en comparación con el control libre de adición (Figura 5A).

Ejemplo 1: Producción de una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células ES humanas

El factor de crecimiento reducido Matrigel™ (diluido 30 veces), o Synthemax™ (Corning Incorporated) (diluido 40 veces) se añadieron por 100 µl cada uno a los pocillos de una cámara Boyden de 65 mm (Transwell, Corning Incorporated). La cámara anteriormente mencionada añadida con Matrigel se incubó a 4°C durante 24 horas, y la cámara anteriormente mencionada añadida con Synthemax™ se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, por lo cual se realizó un tratamiento de recubrimiento de los materiales del recipiente de cultivo. La suspensión celular individual se preparó a partir de los agregados en el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante mediante el método descrito en el Ejemplo 4, las células suspendidas se sembraron en un medio sin suero (200 µl), que fue una mezcla de medio DMEM/F-12 y medio Neurobasal añadido con KSR al 10%, 1/2 suplemento de N2, 1/2 suplemento de B27, Y27632 20 µM a 2×10^5 células por pocillo, se añadió también un medio (1 ml) que tiene la misma composición a un pocillo inferior, y el cultivo de adhesión se llevó a cabo a 37°C, 5% de CO₂. La adhesión y la formación de epitelio de las células se observó en el día 5 desde la siembra en una cámara Boyden.

En un material de recipiente de cultivo recubierto con Synthemax™ (Figura 6B), se observó que las células cultivadas derivadas de los agregados se adherieron, de la misma manera que en el material de recipiente de cultivo recubierto con Matrigel, que es una preparación de membrana basal (Figura 6A), y una forma similar al epitelio del pigmento retiniano en donde las células están estrechamente adheridas unas a otras.

Ejemplo 2: Ejemplo de producción de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células madre pluripotentes inducidas (células iPS)

La línea celular iPS humana 201B7 (disponible en el centro RIKEN BioResource o iPS Academia Japan Inc.) se cultivó según los métodos descritos en "Ueno, M. et al., PNAS 2006, 103 (25), 9554-9559" y "Watanabe, K. et al., Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como el medio, se utilizó un medio obtenido por adición de KSR al 20% (sustituto del suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácido no esencial, medio bFGF 5 ng/ml a DMEM/F-12 (Sigma). Las células iPS cultivadas se dispersaron en células individuales utilizando TrypLE Express (Invitrogen), se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a 1,2 x 10⁴ células por un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos sin adhesivo celular (placas esféricas sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) para permitir la formación rápida de agregados, y se sometieron a un cultivo a 37°C, 5% de CO₂. Como el medio sin suero para el mismo, se utilizó un medio sin suero obtenido por adición del KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado lipídico definido químicamente, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el comienzo del cultivo flotante, se añadió BMP4 a una concentración final 1,5 nM, y el cultivo flotante se continuó. Se intercambia la mitad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días con el medio anteriormente mencionado no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP. En el día 18 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se transfirieron a un medio sin suero, que fue medio DMEM/F-12 que contenía CHIR99021 y se añadió con 1x suplemento de N2, y se cultivó hasta el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante. En el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se rompieron por la inyección y eyección de la disolución mediante una micropipeta, y las células resultantes se sometieron a un cultivo de adhesión en un medio sin suero, que es un medio DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 µM (una sustancia que actúa en la vía de señal de Wnt) y se añadió con 1x suplemento de N2, a 37°C y 5% de CO₂. En el día 27 desde el comienzo del cultivo flotante, la forma de la célula se observa bajo un microscopio y la expresión de los genes de marcadores epiteliales del pigmento retiniano (Mif, ZO-1) se confirma mediante un método de tinción celular.

De esta forma, las células epiteliales del pigmento retiniano se producen a partir de células iPS humanas.

Ejemplo 3: Ejemplo de producción de una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano utilizando células madre pluripotentes inducidas (células iPS)

La línea celular iPS humana 201B7 (disponible en el centro RIKEN BioResource o iPS Academia Japan Inc.) se cultivó según los métodos descritos en "Ueno, M. et al., PNAS 2006, 103 (25), 9554-9559" y "Watanabe, K. et al., Nat Biotech 2007, 25, 681-686". Como el medio, se utilizó un medio obtenido por adición de KSR al 20% (sustituto del suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácido no esencial, medio bFGF 5 ng/ml a DMEM/F-12 (Sigma). Las células iPS cultivadas se dispersaron en células individuales utilizando TrypLE Express (Invitrogen), se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a 1,2 x 10⁴ células por un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos sin adhesivo celular (placas esféricas sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) para permitir la formación rápida de agregados, y se sometieron a un cultivo a 37°C, 5% de CO₂. Como el medio sin suero para el mismo, se utilizó un medio sin suero obtenido por adición del KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado lipídico definido químicamente, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el comienzo del cultivo flotante, se añadió BMP4 a una concentración final 1,5 nM, y el cultivo flotante se continuó. Se intercambia la mitad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días con el medio anteriormente mencionado no suplementado con una sustancia que actúa en la vía de transducción de señales por BMP. En el día 18 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se transfieren a un medio sin suero, que fue un medio de DMEM/F-12 que contiene CHIR99021 3 µM y se añadió con 1x suplemento de N2, y se cultivaron hasta el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante. En el día 21 desde el comienzo del cultivo flotante, los agregados se dispersaron en una disolución de dispersión celular Accutase (ICT), y el resto se eliminó utilizando un filtro de células de 40 µm. Las células resultantes se suspendieron en un medio sin suero (200 µl), que es una mezcla 1:1 de medio DMEM/F-12 y medio Neurobasal añadido con KSR al 10%, 1/2 suplemento de N2, 1/2 suplemento de B27, Y27632 20 µM, y se sembraron en una cámara Boyden de 65 mm (Transwell, Corning Incorporated) después de un tratamiento de recubrimiento con Synthemax™ a 2 x 10⁵ células por pocillo, también se añade un medio (1 mL) que tiene la misma composición a un pocillo inferior, y el cultivo de adhesión se realiza a 37°C, 5% de CO₂. En el día 24 desde el comienzo del cultivo flotante, es decir, en el día 3 desde el comienzo del cultivo de adhesión, se puede añadir cualquiera de CHIR99021 3 µM, SU-5402 10 µM, proteína BMP4 humana recombinante 1 nM y activina humana recombinante 50 ng/ml, o una combinación de estas. El medio se cambia cada 3 días, y el nivel de formación epitelial se observa bajo un microscopio en el día 40 desde el comienzo del cultivo flotante.

De esta forma, la lámina de células epiteliales del pigmento retiniano se produce a partir de células iPS humanas.

Aplicabilidad industrial

Según el método de producción de la presente invención, las células epiteliales del pigmento retiniano o la lámina de células epiteliales del pigmento retiniano se pueden producir con una alta eficiencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células epiteliales del pigmento retiniano, que comprende
 - (1) una primera etapa de someter las células madre pluripotentes a un cultivo flotante en un medio sin suero para formar un agregado de células madre pluripotentes,
 - 5 (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la etapa (1) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno de ellos libre de una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP, obteniéndose así un agregado que contiene las células progenitoras retinianas, y
 - 10 (3) una tercera etapa de someter el agregado obtenido en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno de ellos libre de una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y una sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP y que contiene una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniéndose así un agregado que contiene las células epiteliales del pigmento retiniano.
 - 15
2. Un método para producir una lámina de células epiteliales del pigmento retiniano, que comprende
 - (1) una primera etapa de someter las células madre pluripotentes a un cultivo flotante en un medio sin suero para formar un agregado de células madre pluripotentes,
 - 20 (2) una segunda etapa de someter el agregado formado en la etapa (1) a un cultivo flotante en un medio sin suero o en un medio que contiene suero estando cada uno de ellos libre de una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP, obteniéndose así un agregado que contiene las células progenitoras retinianas,
 - 25 (3) una tercera etapa de someter el agregado obtenido en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero estando cada uno de ellos libre de una sustancia que pueda mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y una sustancia que pueda mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP y que contiene una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniéndose así un agregado que contiene las células epiteliales del pigmento retiniano, y
 - 30 (4) una cuarta etapa de dispersar los agregados obtenidos en la etapa (3) y someter las células resultantes a un cultivo de adhesión.
3. El método de producción según la reivindicación 2, en donde
 - (a) el cultivo de adhesión se realiza en presencia de un sustituto del suero en dicha etapa (4); y/o
 - 35 (b) el cultivo de adhesión se realiza en presencia de una sustancia inhibidora de ROCK, en dicha etapa (4).
4. El método de producción según la reivindicación 2 o 3, en donde el cultivo de adhesión se realiza en un medio sin suero o un medio que contiene suero comprendiendo además una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt, una sustancia inhibidora de la vía de señales de FGF, una sustancia capaz de mejorar una señal mediada por Activina y una sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP, en dicha etapa (4).
- 40
5. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el cultivo de adhesión se realiza en un material de recipiente de cultivo que tiene una superficie tratada con un sustrato de cultivo, en dicha etapa (4).
6. El método de producción según la reivindicación 5, en donde
 - 45 (a) dicho sustrato de cultivo es un sustrato de cultivo sintético; o
 - (b) dicho sustrato de cultivo es laminina.
7. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde
 - (a) las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes de primate; o
 - (b) las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes humanas.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la etapa (1) y la etapa (2) se realizan en presencia de un sustituto del suero.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cultivo flotante se realiza en ausencia de una preparación de membrana basal.
- 5 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en BMP2, BMP4, BMP7 y GDF7.
- 10 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el medio sin suero o el medio que contiene suero estando cada uno libre de una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y una sustancia que puede mejorar la vía de transducción de señales mediada por BMP y que contiene una sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt en la etapa (3) comprende además una sustancia que inhibe la vía de señales de FGF.
- 15 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la sustancia que puede mejorar la transducción de señales mediada por Wnt se selecciona del grupo que consiste en proteínas que pertenecen a la familia de Wnt, agonista del receptor Wnt, e inhibidor de GSK3 β .
13. El método según la reivindicación 12, en donde la proteína que pertenece a la familia de Wnt es Wnt1, Wnt3a o Wnt7a, y en donde el inhibidor GSK3 β es 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021 o Kenpaulona.
- 20 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en donde la sustancia que inhibe la vía de señales de FGF se selecciona del grupo que consiste en un receptor de FGF, inhibidor del receptor de FGF, sustancia inhibidora de la cascada de la MAP quinasa, inhibidor de la quinasa PI3 e inhibidor de Akt.
15. El método según la reivindicación 14, en donde el inhibidor del receptor de FGF es SU-5402, AZD4547 o BGJ398, y en donde la sustancia inhibidora de la cascada de la MAP quinasa es inhibidor de MEK, inhibidor de MAPK o inhibidor de ERK.
- 25 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15, en donde la sustancia capaz de mejorar una señal mediada por Activina se selecciona del grupo que consiste en proteínas que pertenecen a la familia de Activina, receptor de Activina y agonista del receptor de Activina.

Fig. 1

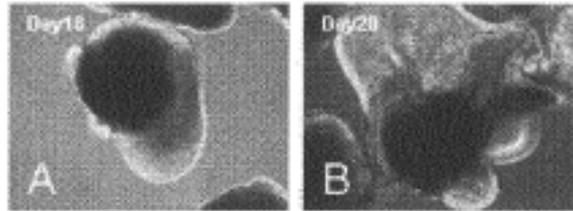


Fig. 2

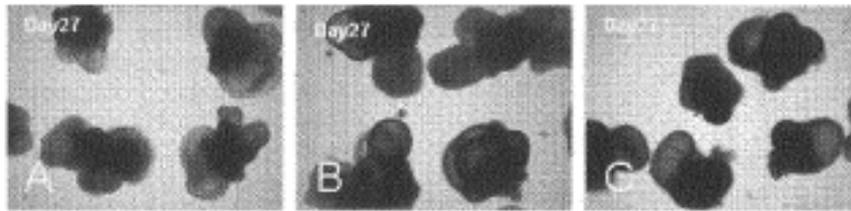


Fig. 3



Fig. 4

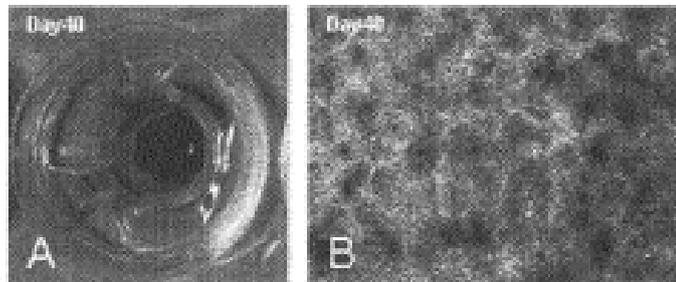


Fig. 5

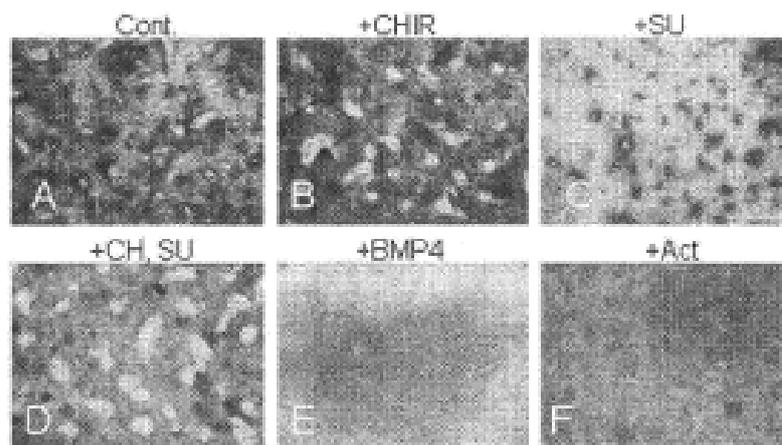


Fig. 6

