

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 707**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)
A61K 35/44 (2015.01)
A61L 27/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2014 PCT/JP2014/072065**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15025967**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2014 E 14838289 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3037524**

54 Título: **Método para producir tejido retiniano y células relacionadas con la retina**

30 Prioridad:

23.08.2013 JP 2013173285

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

31.07.2020

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 2 776 707 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 tejido retiniano y células relacionadas con la retina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para producir un tejido retiniano y células relacionadas con la retina, tales como células progenitoras retinianas y células neurales específicas de una capa retiniana, etc.

Antecedentes de la técnica

10 Como un método para producir un tejido retiniano tridimensional a partir de células madre pluripotenciales, se muestra un método para obtener un tejido retiniano de múltiples capas formando un agregado homogéneo de células madre pluripotenciales en un medio sin suero, sometiéndolas a un cultivo flotante en presencia de una preparación de membrana basal, y haciendo flotar el cultivo en un medio de cultivo de órganos (documento que no es patente 1 y documento de patente 1), y un método para obtener un tejido retiniano de múltiples capas formando un agregado homogéneo de células madre pluripotenciales en un medio sin suero que contiene una sustancia que inhibe la vía de señales de Wnt, sometiéndolas a un cultivo flotante en presencia de una preparación de membrana basal, y haciendo flotar el cultivo en un medio que contiene suero (documento que no es patente 2 y documento de patente 2).

Lista de documentos

Documentos de patente:

Documento de patente 1: WO 2011/055855

Documento de patente 2: WO 2013/077425

20 Documentos que no son patentes:

Documento que no es patente 1: Nature, 472, 51-56 (2011).

Documento que no es patente 2: Cell Stem Cell, 10(6), 771-785 (2012).

Sumario de la invención

Problemas que se van a solucionar mediante la invención

25 Se ha deseado el desarrollo de un método de producción de un tejido retiniano a partir de una célula madre pluripotencial.

Medios para resolver los problemas

30 La presente invención proporciona un método para producir un tejido retiniano y células relacionadas con la retina, tales como células progenitoras retinianas y células neurales específicas de una capa retiniana a partir de células madre pluripotenciales, etc.

Por consiguiente, la presente invención proporciona:

[1] un método para producir una célula progenitora retiniana, que comprende:

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

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 de ellos exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas (en lo sucesivo, a veces se indica como método de producción 1 de la presente invención);

40

[2] un método para producir un tejido retiniano, que comprende:

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

45 (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 exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede

potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas, y

5 (3) una tercera etapa de someter el agregado formado en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de cualquiera de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, y una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniendo con ello un agregado que contiene tejidos retinianos y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural (en lo sucesivo, a veces se indica como método de producción 2 de la presente invención);

10 [3] un método para producir una célula neural específica de una capa retiniana, que comprende:

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

15 (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 exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas, y

20 (3) una tercera etapa de someter el agregado formado en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de cualquiera de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, y una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniendo con ello un agregado que contiene tejidos retinianos que contienen las células neurales específicas de una capa retiniana previstas y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural (en lo sucesivo, a veces se indica como método de producción 3 de la presente invención);

[4] el método de cualquiera de los puntos [1] a [3] mencionados anteriormente, en el que las células madre pluripotenciales son células madre pluripotenciales de primate;

[5] el método de cualquiera de los puntos [1] a [4] mencionados anteriormente, en el que las células madre pluripotenciales son células madre pluripotenciales humanas;

30 [6] el método de cualquiera de los puntos [1] a [5] mencionados anteriormente, en el que la etapa (1) y la etapa (2) se realizan en presencia de un reemplazo de suero;

[7] el método de cualquiera de los puntos [1] a [6] mencionados anteriormente, en el que el cultivo flotante se realiza en ausencia de una preparación de membrana basal;

35 [8] el método de cualquiera de los puntos [1] a [7] mencionados anteriormente, en el que la sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en BMP2, BMP4, BMP7 y GDF7;

[9] el método de cualquiera de los puntos [1] a [8] mencionados anteriormente, en el que la sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP es BMP4;

[10] el método según el punto [9] mencionado anteriormente, en el que BMP4 está a una concentración de 1,5 nM;

40 [11] el método de cualquiera de los puntos [1] a [10] mencionados anteriormente, en el que la sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP se añade al medio entre el día 1 y el día 15 desde el inicio del cultivo flotante en la etapa (1);

[12] el método de cualquiera de los puntos [1] a [11] mencionados anteriormente, en el que en la etapa (2), el agregado formado en la etapa (1) se somete al cultivo flotante hasta que aparece una célula que expresa el gen Rax;

45 etc.

Efecto de la invención

Según el método de producción de la presente invención, puede producirse con alta eficacia una célula progenitora retiniana, un tejido retiniano o una célula neural específica de una capa retiniana. En el método de producción de la presente invención, puesto que puede obtenerse una célula progenitora retiniana, un tejido retiniano o una célula neural específica de una capa retiniana mediante el cultivo flotante de un agregado sin la adición de una preparación de membrana basal al medio, es decir, en ausencia de una preparación de membrana basal, se reduce el riesgo de contaminación de la célula o el tejido obtenido con un componente derivado de una especie heteróloga. Según el

método de producción de la presente invención, puede proporcionarse con eficacia un tejido retiniano o células relacionadas con la retina, tales como células progenitoras retinianas y células neurales específicas de una capa retiniana, con el objetivo de evaluar la toxicidad o la eficacia de una sustancia química, un tratamiento de trasplante, etc.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra una imagen de campo de luz (A) y una imagen de fluorescencia (B) en el día 18 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, sin añadir al medio una sustancia que actúe sobre la vía de transducción de señales de BMP; una imagen de campo de luz (C) y una imagen de fluorescencia (D) en el día 18 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP2 a 100
10 ng/ml en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante; una imagen de campo de luz (E) y una imagen de fluorescencia (F) en el día 18 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante; una imagen de campo de luz (G) y una imagen de fluorescencia (H) en el día 18 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP7 a 100 ng/ml en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante; y una imagen de campo de luz (I) y una imagen de fluorescencia (J) en el día 18 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción dRAX::GFP, en un medio suplementado con GDF7 a 100 ng/ml en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante.

La figura 2 muestra una imagen de campo de luz (A), una imagen de fluorescencia (B) y un histograma de FACS (C) en el día 26 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, sin añadir al medio una sustancia que actúe sobre la vía de transducción de señales de BMP; una imagen de campo de luz (D), una imagen de fluorescencia (E) y un histograma de FACS (F) en el día 26 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM simultáneamente al inicio del cultivo flotante
25 (día 0); una imagen de campo de luz (G), una imagen de fluorescencia (H) y un histograma de FACS (I) en el día 26 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 1 desde el inicio del cultivo flotante; una imagen de campo de luz (J), una imagen de fluorescencia (K) y un histograma de FACS (L) en el día 26 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 2 desde el inicio del cultivo flotante; y una imagen de campo de luz (M), una imagen de fluorescencia (N) y un histograma de FACS (O) en el día 26 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante.

35 La figura 3 muestra una imagen de campo de luz (A) y una imagen de fluorescencia (B) en el día 24 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, sin añadir al medio una sustancia que actúe sobre la vía de transducción de señales de BMP4; una imagen de campo de luz (C) y una imagen de fluorescencia (D) en el día 24 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 6 desde el inicio del cultivo flotante; una imagen de campo de luz (E) y una imagen de fluorescencia (F) en el día 24 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 9 desde el inicio del cultivo flotante; una imagen de campo de luz (G) y una imagen de fluorescencia (H) en el día 24 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 12 desde el inicio del cultivo flotante; y una imagen de campo de luz (I) y una imagen de fluorescencia (J) en el día 24 desde el inicio del cultivo flotante de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción dRAX::GFP, en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 15 desde el inicio del cultivo flotante.

La figura 4 muestra una imagen de fluorescencia de GFP (A), una imagen de inmunotinción de fluorescencia (B) usando un anticuerpo anti-Chx10, y una imagen teñida con Hoechst (C) de criosecciones de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, que se sometieron a un cultivo flotante hasta el día 26 desde el inicio del cultivo flotante en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante.

La figura 5 muestra una imagen de inmunotinción (A) usando un anticuerpo anti-recoverina, una imagen de inmunotinción (B) usando un anticuerpo anti-Nr1, una imagen de inmunotinción (C) usando un anticuerpo anti-RXR-gamma, una imagen de inmunotinción (D) usando un anticuerpo anti-Chx10, una imagen de inmunotinción (E) usando un anticuerpo anti-calretinina, y una imagen de inmunotinción (F) usando un anticuerpo anti-calbindina de criosecciones de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, que se sometieron a un cultivo flotante hasta el día 117 desde el inicio del cultivo flotante en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante.

La figura 6 muestra una imagen de inmunotinción (A) usando un anticuerpo anti-Chx10, una imagen de inmunotinción (B) usando un anticuerpo anti-Pax6, una imagen de inmunotinción (C) usando un anticuerpo anti-Crx, y una imagen de inmunotinción (D) usando un anticuerpo anti-Brn3b de criosecciones de agregados, derivados de células madre embrionarias humanas con la introducción RAX::GFP, que se sometieron a un cultivo flotante hasta el día 50 desde el inicio del cultivo flotante en un medio suplementado con BMP4 a 1,5 nM en el día 6 desde el inicio del cultivo flotante.

Descripción de las realizaciones

A continuación se explican en detalle los modos para realizar la presente invención.

Un "vector" significa un vector capaz de transferir una secuencia polinucleotídica deseada en una célula prevista. Los ejemplos de dicho vector incluyen un vector capaz de una replicación autónoma en una célula hospedante, tal como una célula procariota, levadura, célula animal, célula vegetal, célula de insecto, animal individual y planta individual, un vector capaz de incorporarse en un cromosoma de una célula hospedante, un vector que contiene un promotor en una posición adecuada para la transcripción de polinucleótidos, etc.

De estos vectores, un vector adecuado para la clonación a menudo se indica como "vector de clonación". Los ejemplos de un vector de clonación incluyen un vector que presenta en general múltiples sitios de clonación que contienen una pluralidad de sitios de enzimas de restricción. Por ejemplo, pueden mencionarse los vectores descritos en "Molecular Cloning (3rd edition)" por Sambrook, J. y Russell, D.W., apéndice 3 (volumen 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor, EE. UU., 2001).

El "vector" también incluye un "vector de expresión" y un "vector indicador". En el "vector de expresión", diversos elementos reguladores, además de un gen estructural y un promotor que regula su expresión, pueden estar unidos de tal manera que pueden funcionar en la célula hospedante. En el "vector indicador", diversos elementos reguladores, además de un gen indicador y un promotor que regula su expresión, pueden estar unidos de tal manera que pueden funcionar en la célula hospedante. Los ejemplos del "elemento regulador" incluyen un terminador y un potenciador. El "vector de expresión" y el "vector indicador" pueden incluir también genes marcadores de selección, tales como un gen de resistencia a un fármaco.

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

Como técnica para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula, por ejemplo pueden mencionarse la transformación, la transducción, la transfección, etc. Como dicha técnica de introducción, pueden mencionarse, por ejemplo, los métodos descritos en Ausubel F. A. *et al.*, ed. (1988), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, Nueva York, NY; Sambrook J. *et al.* (1987), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. y 3ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook J. *et al.* (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; artículo extra, Experimental Medicine, "Transgene & expression analysis experiment method", YODOSHA CO., LTD., 1997, etc. Como técnica para confirmar la introducción intracelular de un gen, por ejemplo puede mencionarse el análisis de la transferencia Northern o el análisis de la transferencia Western.

El "cultivo flotante" en la presente invención significa cultivar bajo condiciones que prohíben la adhesión de una célula o una masa celular al material del recipiente de cultivo celular, etc.

El recipiente de cultivo celular que se va a usar en un cultivo flotante no presenta una limitación concreta, con la condición de que permita un "cultivo flotante", y los expertos en la técnica pueden determinarlos de modo apropiado. Los ejemplos de dicho recipiente de cultivo celular incluyen un matraz, matraz de cultivo de tejidos, placa, placa Petri, placa de cultivo de tejidos, multiplaca, microplaca, placa de micropocillos, microporos, múltiples placas, placa de múltiples pocillos, portaobjetos de cámara, cáscara, tubo, bandeja, bolsa de cultivo y botella rodante. Puesto que estos recipientes de cultivo celular se emplean para un cultivo flotante, preferiblemente son no adhesivos para células. Como recipiente no adhesivo para células, puede usarse un recipiente cuya superficie no ha sido tratada de modo artificial para mejorar la adhesividad de las células (por ejemplo, un tratamiento de revestimiento con matriz extracelular, etc.), etc.

El medio que se va a emplear en general en la presente invención puede prepararse a partir de un medio usado para el cultivo de una célula animal como medio basal. Los ejemplos del medio basal incluye los que pueden usarse para cultivar células animales, tales como medio BME, medio BGJb, medio CMRL1066, medio Glasgow HEM, medio

Improved HEM Zinc Option, medio IMDM, medio Medium199, medio Eagle MEM, medio aMEM, medio DMEM, medio F-12, medio de Ham, medio RPMI1640, medio de Fischer, y medios mixtos de estos.

5 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 y componentes derivados de tejidos animales purificados (por ejemplo, factor de crecimiento) se considera un medio sin suero, a menos que contenga suero no ajustado o no purificado.

10 El medio sin suero puede contener un reemplazo de suero. Los ejemplos de reemplazo de suero incluyen los que contienen, de modo apropiado, por ejemplo, albúmina, transferrina, ácidos grasos, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol o 3' tioglicerol, un equivalente de estos, etc. Dicho reemplazo de suero puede prepararse, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento WO98/30679. Además, el reemplazo de suero puede ser un producto disponible en el mercado. Los ejemplos de dichos reemplazos de suero disponibles en el mercado incluyen el reemplazo de suero Knockout™ (fabricado por Invitrogen; en lo sucesivo, a veces también se indica como KSR), concentrado de lípidos químicamente definido (fabricado por Gibco), y Glutamax™ (fabricado por Gibco).

15 El medio sin suero que se va a usar para el cultivo flotante puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos no esenciales), vitaminas, factores de crecimiento, citoquinas, antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agentes tamponantes, sales inorgánicas, etc.

20 Para evitar una preparación complicada, puede usarse un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada (por ejemplo, aproximadamente 1-aproximadamente 20%) de KSR disponible en el mercado como el medio sin suero (por ejemplo, un medio obtenido añadiendo KSR al 10% y 1-monotioglicerol 450 µM en una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM).

25 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, factores de crecimiento, citoquinas, antioxidantes, 2-mercaptoetanol, 1-monotioglicerol, ácido pirúvico, agentes tamponantes, sales inorgánicas, etc.

30 La "preparación de membrana basal" en la presente invención se refiere a una preparación que contiene componentes constituyentes de la membrana basal que tienen la función de controlar la forma celular, la diferenciación, el crecimiento, la movilidad, la expresión de la función, etc., que son similares a los de las células epiteliales, cuando las células previstas capaces de formar una membrana basal se colocan sobre ellos y se cultivan. En la presente, el "componente constituyente de la membrana basal" se refiere a una molécula de la matriz extracelular en forma de una membrana fina presente entre la capa de células epiteliales y la capa de células intersticiales, etc., en tejidos animales. Puede producirse una preparación de membrana basal, por ejemplo, retirando células capaces de formar una membrana basal, que se adhieren sobre un soporte a través de una membrana basal, con una disolución capaz de disolver los lípidos de las células, una disolución alcalina, etc. Los ejemplos de una preparación de membrana basal preferibles incluyen productos disponibles en el mercado como componentes de la membrana basal (por ejemplo, Matrigel™ (fabricado por Beckton Dickinson; en lo sucesivo, a veces se indica como Matrigel)), y moléculas de la matriz extracelular conocidas como componentes de la membrana basal (por ejemplo, laminina, colágeno de tipo IV, proteoglicano de sulfato de heparano, entactina, etc.).

40 Matrigel™ es un producto extraído de una membrana basal derivado del sarcoma de ratón de Engelbreth Holm Swarn (EHS). Los componentes principales del Matrigel™ son colágeno de IV, laminina, proteoglicano de sulfato de heparano y entactina. Además de estos, contiene TGF-β, factor de crecimiento de fibroblastos ("fibroblast growth factor", FGF), activador de plasminógeno de tejidos, y un factor de crecimiento producido por el tumor EHS de modo natural. El "producto con factor de crecimiento reducido" de Matrigel™ tiene una concentración menor en factor de crecimiento que el Matrigel™ normal, y su concentración convencional es de <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.

45 El "medio que contiene la sustancia X" significa un medio suplementado con una sustancia exógena X o un medio que contiene una sustancia exógena X, y el "medio sin sustancia X" significa un medio no suplementado con una sustancia exógena X o un medio que no contiene una sustancia exógena X. En la presente, la "sustancia exógena X" significa una sustancia X exógena a una célula o un tejido que se va a cultivar en el medio, y no se incluye una sustancia endógena X producida por la célula o el tejido.

50 Por ejemplo, un "medio que contiene una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP" es un medio suplementado con una sustancia exógena que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP o un medio que contiene una sustancia exógena que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP. Un "medio sin una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog" es un medio no suplementado con una sustancia exógena que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog o un medio que no contiene una sustancia exógena que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog.

Los "primates" en la presente invención significan mamíferos que pertenecen a los primates. Los ejemplos de

primates incluyen estrepsirinos, tales como lémures, loris, y tsubai, y haplorrinos, tales como monos, simios antropoides y seres humanos.

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 formado por ellas cuando el tejido se daña. En la presente, la célula madre puede ser una célula madre embrionaria (en lo sucesivo, a veces se denomina célula ES) o una célula madre de tejido (también denominada célula madre tisular, célula madre específica de tejido, o célula madre somática), o una célula madre pluripotencial artificial (célula iPS, "induced pluripotent stem cell"). Tal como se apreciará a partir del hecho de que la célula de tejido derivada de la célula madre mencionada anteriormente puede regenerar un tejido, se sabe que la célula madre puede diferenciarse en una célula normal parecida a una célula de un cuerpo vivo.

Las células madre pueden adquirirse en organizaciones concretas o también pueden comprarse como un producto disponible en el mercado. Como referencia, están disponibles células madre embrionarias humanas, KhES-1, KhES-2 y KhES-3, en Institute for Frontier Medical Sciences de la Universidad de Kioto. Las células EB5 están disponibles en RIKEN, y la línea celular D3 está disponible en ATCC; ambas son células madre embrionarias de ratón.

Las células madre pueden mantenerse mediante un cultivo según un método conocido *per se*. Por ejemplo, las células madre humanas pueden mantenerse mediante su cultivo en un medio suplementado con suero de reemplazo Knockout™ (Invitrogen). Las células madre de ratón pueden mantenerse añadiendo suero de ternero fetal ("fetal calf serum", FCS) y factor inhibidor de leucemia ("Leukemia Inhibitory Factor", LIF) y cultivando sin células de soporte.

En la presente invención, la "célula madre pluripotencial" se refiere a una célula madre que puede cultivarse *in vitro* que tiene la capacidad de diferenciarse en cualquier célula (tejido derivado de triploblastos (ectodermo, mesodermo, endodermo)) que constituye un cuerpo vivo, excepto la placenta (pluripotencia), y en las células madres pluripotenciales se incluyen las células madre embrionarias ("embryonic stem" (ES)). Como referencia, la "célula madre pluripotencial" puede obtenerse a partir de un huevo fertilizado, un embrión clonal y una célula madre reproductora. La "célula madre pluripotencial" también puede obtenerse a partir de una célula madre en un tejido. En las células madre pluripotenciales también se incluye una célula que posee 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 denominada célula madre pluripotencial artificial). Una célula madre pluripotencial puede producirse mediante un método conocido *per se*. Los ejemplos del método de producción incluyen los métodos descritos en Cell, 131(5), pp. 861-872; y Cell, 2006, 126(4), pp. 663-676.

Una "célula madre embrionaria (célula ES)" se refiere a una célula madre que tiene capacidad autorreplicativa y multipotencia (en particular, "pluripotencia"), que es una célula madre pluripotencial derivada de un embrión temprano. Las células madre embrionarias fueron establecidas por primera vez en 1981, y también se han aplicado a la generación de ratones "knockout" desde 1989. En 1998, se establecieron las células madre embrionarias humanas, que también se están utilizando para la medicina regenerativa.

Una "célula madre pluripotencial artificial" se refiere a una célula inducida para que presente multipotencia mediante la reprogramación directa de una célula diferenciada, tal como un fibroblasto, etc., mediante la expresión de varios tipos de genes, tales como Oct3/4, Sox2, Klf4, y Myc, lo cual fue establecido por Yamanaka *et al.* en células de ratón en 2006 (Cell, 2006, 126(4), pp. 663-676). En 2007, también se establecieron células madre pluripotenciales inducidas en fibroblastos humanos, y estas 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).

Puede producirse una célula madre pluripotencial modificada genéticamente, por ejemplo usando un método de recombinación homóloga. Los ejemplos del gen en el cromosoma que se va a modificar incluyen un gen marcador de la célula, un gen de antígeno de histocompatibilidad, un gen relacionado con una enfermedad debida a un trastorno de las células del sistema nervioso, etc. Un gen diana en el cromosoma puede modificarse mediante los métodos descritos en Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1993); Bio Manual series 8, Gene Targeting, Production of mutant mouse by using ES cells, YODOSHA CO., LTD. (1995), etc.

De modo específico, por ejemplo, el gen genómico de un gen diana que se va a modificar (por ejemplo, un gen marcador de la célula, un gen de antígeno de histocompatibilidad, un gen relacionado con una enfermedad, etc.) se aísla, y se produce un vector de transporte dirigido usado para la recombinación homóloga del gen diana empleando el gen genómico aislado. El vector de transporte dirigido producido se introduce en las células madre y se seleccionan las células que muestran recombinación homóloga entre el gen diana y el vector de transporte dirigido, con lo cual pueden producirse células madre que poseen un gen modificado en el cromosoma.

Como método para aislar el gen genómico del gen diana, pueden mencionarse métodos conocidos descritos en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997), etc. Además, el gen genómico del gen diana puede aislarse usando un sistema de selección de bancos de ADN genómico (fabricado por Genome Systems), kits

Universal GenomeWalker (fabricados por CLONTECH), etc.

5 Puede producirse un vector de transporte dirigido usado para la recombinación homóloga del gen diana, y puede seleccionarse con eficacia un recombinante homólogo según los métodos descritos en Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1993); Bio Manual series 8, Gene-targeting, Production of mutant mouse by using ES cells, YODOSHA CO., LTD. (1995), etc. El vector de transporte dirigido puede ser cualquiera del tipo de reemplazo y del tipo de inserción, y el método de selección puede ser una selección positiva, una selección de promotores, una selección negativa, una selección de poliA, etc.

Como método para seleccionar un recombinante homólogo deseado a partir de las líneas celulares seleccionadas, puede mencionarse el método de hibridación Southern, el método de PCR, etc., para el ADN genómico.

10 El "agregado" en la presente invención se refiere a una masa de células dispersa en el medio, pero agrupadas para formar el agregado. El "agregado" en la presente invención incluye un agregado formado por las células dispersas al inicio del cultivo flotante y un agregado que ya está formado al inicio del cultivo flotante.

15 Cuando las células se agrupan para formar agregados celulares y los agregados se someten a un cultivo flotante, "se forman agregados" significa "un número concreto de células dispersas se agrega con rapidez" para formar agregados celulares cualitativamente homogéneos.

En la presente invención, resulta preferible agrupar con rapidez las células madre pluripotenciales para permitir la formación de un agregado de células madre pluripotenciales. Mediante la formación de un agregado de células madre pluripotenciales de esta manera, puede formarse una estructura similar a un epitelio con una buena reproducibilidad en las células inducidas para diferenciarse del agregado formado.

20 Los ejemplos de esta ejecución experimental para formar un agregado incluyen un método que implica mantener a las células en un espacio pequeño usando una placa con pocillos pequeños (placa de 96 pocillos), microporos, etc., y un método que implica agregar las células mediante centrifugación durante un periodo corto de tiempo usando un pequeño tubo de centrifugación.

25 Puede determinarse si se han formado agregados de células madre pluripotenciales y si se ha formado una estructura similar al epitelio en las células que forman el agregado basándose en el tamaño y el número de células de los agregados, la morfología macroscópica, la morfología microscópica mediante un análisis de tinción de tejidos y observando su uniformidad, la expresión de marcadores de diferenciación y no diferenciación y observando su uniformidad, el control de la expresión de un marcador de diferenciación y su sincronía, la reproducibilidad de la eficacia de la diferenciación entre agregados, etc.

30 En la presente invención, el "tejido" se refiere a una estructura de una población de células que presenta una conformación en la que más de un tipo de célula diferente en forma y propiedad se configura estéricamente en un patrón concreto.

35 En la presente invención, el "tejido retiniano" significa un tejido retiniano en el que al menos dos o más tipos de células, tales como fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células retinianas ganglionares, sus células progenitoras retinianas o células precursoras, que constituyen las respectivas capas retinianas en la retina viva, se disponen estéricamente en capas. Con respecto a cada célula, pueden confirmarse las células que constituyen cada capa retiniana mediante un método conocido, por ejemplo, la presencia o la ausencia o el nivel de expresión de un marcador celular, etc.

40 La "capa retiniana" en la presente invención significa cada capa que constituye la retina. Sus ejemplos específicos incluyen la capa epitelial de pigmento retiniano, la capa de fotorreceptores, la membrana limitante externa, la capa nuclear externa, la capa plexiforme externa, la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna, la capa de células ganglionares, la capa de fibras nerviosas y la membrana limitante interna.

45 La "célula neural específica de una capa retiniana" en la presente invención significa una célula neural que constituye una capa retiniana y que es específica de la capa retiniana. Los ejemplos de la célula neural específica de una capa retiniana incluye una célula bipolar, una célula ganglionar, una célula amacrina, una célula horizontal, un fotorreceptor, una célula del epitelio pigmentario, una célula de bastón y una célula de cono.

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

50 La célula precursora de fotorreceptor, la célula precursora horizontal, la célula precursora bipolar, la célula precursora amacrina, la célula precursora ganglionar retiniana y la célula precursora epitelial del pigmento retiniano son células precursoras determinadas para diferenciarse en un fotorreceptor, una célula horizontal, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula ganglionar retiniana y una célula epitelial del pigmento retiniano, respectivamente.

Los ejemplos de un marcador de células retinianas incluyen Rax y PAX6 expresados en células progenitoras retinianas, Nkx2.1 expresado en células progenitoras de las neuronas del hipotálamo, pero no expresado en células progenitoras retinianas, Sox1 expresado en el neuroepitelio del hipotálamo y no expresado en la retina, Crx expresado en células precursoras de fotorreceptores, y similares. Los ejemplos de un marcador de células neurales específicas de una capa retiniana incluyen Chx10 y L7 expresados en células bipolares, Tuj1 y Brn3 expresados en células ganglionares, calretinina expresada en células amacrinas, calbindina expresada en células horizontales, rodopsina y recoverina expresadas en fotorreceptores, RPE65 y Mitf expresados en células del epitelio pigmentario, Nr1 expresado en células de bastones, Rxr-gamma expresado en células de conos, y similares.

El método de producción 1 de la presente invención es un método para producir células progenitoras retinianas, que incluye las siguientes etapas (1) y (2):

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

(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 exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas.

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

El medio sin suero usado en la etapa (1) no presenta una limitación concreta, con la condición de que sea como se mencionó anteriormente. Por ejemplo, puede usarse un medio sin suero no suplementado con ninguna sustancia que actúe sobre la vía de transducción de señales de BMP ni una sustancia que inhiba la vía de señales de Wnt. Para evitar un proceso de formulación complicado, se emplea preferiblemente un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada de reemplazo de suero, tal como KSR disponible en el mercado (por ejemplo, un medio obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μ M y 1 x concentrado de lípidos químicamente definido a una mezcla 1:1 de IMDM y F-12). La cantidad de KSR que se va a añadir a un medio sin suero en general es de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 20%, en el caso, por ejemplo, de células ES humanas.

Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura de cultivo y la concentración de CO₂ en la etapa (1), pueden determinarse de modo apropiado. La temperatura de cultivo, por ejemplo, es de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂, por ejemplo, es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10%, preferiblemente de aproximadamente 5%.

Puede determinarse la concentración de células madre pluripotenciales en la etapa (1) más apropiada para formar agregados de células madre pluripotenciales de una manera más uniforme y eficaz. Por ejemplo, cuando las células ES humanas se someten a un cultivo flotante usando una placa de micropocillos de 96 pocillos, se añade a un pocillo un líquido preparado a 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 que se formen los agregados.

Puede determinarse el tiempo de cultivo de flotación apropiado necesario para formar agregados según la célula madre pluripotencial que se va a utilizar, para permitir la agregación uniforme de las células. Para formar agregados uniformes, resulta deseable que sea lo más corto posible. Por ejemplo, en el caso de células ES humanas, los agregados se forman preferiblemente dentro de aproximadamente 24 hr, más preferiblemente dentro de aproximadamente 12 hr. El tiempo para la formación de agregados puede ajustarse de modo apropiado controlando las herramientas para agregar las células, las condiciones de centrifugación, etc.

Puede determinarse si se han formado agregados de células madre pluripotenciales basándose en el tamaño y el número de células de los agregados, la morfología macroscópica, la morfología microscópica mediante un análisis de tinción de tejidos y observando su uniformidad, la expresión de marcadores de diferenciación y no diferenciación y observando su uniformidad, el control de la expresión de un marcador de diferenciación y su sincronía, la reproducibilidad de la eficacia de la diferenciación entre agregados, etc.

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 un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas.

Como medio para ser usado en la etapa (2), se emplea un medio sin suero o un medio que contiene suero no suplementado con una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y

suplementado con una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, y la adición de una preparación de membrana basal no es necesaria.

El medio sin suero o el medio que contiene suero que se va a usar como dicho medio no presenta una limitación concreta, con la condición de que sean como se mencionó anteriormente. Para evitar un proceso de formulación complicado, se emplea preferiblemente un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada de reemplazo de suero, tal como KSR disponible en el mercado (por ejemplo, un medio obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μ M y 1 x concentrado de lípidos químicamente definido a una mezcla 1:1 de IMDM y F-12). La cantidad de KSR que se va a añadir a un medio sin suero en general es de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 20%, en el caso, por ejemplo, de células ES humanas.

Como medio sin suero para ser usado en la etapa (2), puede emplearse el medio sin suero usado en la etapa (1), con la condición de que no contenga una sustancia que potencie la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, o puede sustituirse por un medio sin suero fresco. Cuando el medio sin suero usado en la etapa (1), que no contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, se usa directamente para la etapa (2), solo debe añadirse al medio una sustancia que pueda potenciar la transducción de señales mediada por BMP.

Una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog (en lo sucesivo, a veces se indica como Shh) es una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Shh. Los ejemplos de la sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Shh incluyen proteínas que pertenecen a la familia Hedgehog (por ejemplo, Shh), receptor de Shh, agonista del receptor de Shh, purmorfamina, SAG, etc.

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

Una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP es una sustancia que puede potenciar la vía de transducción de señales mediada por BMP. Los ejemplos de la sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP incluyen proteínas de BMP, tales como BMP2, BMP4 o BMP7, proteínas de GDF, tales como GDF7, anticuerpo anti-receptor de BMP, péptido parcial de BMP, etc. La proteína BMP2, la proteína BMP4 y la proteína BMP7 puede adquirirse, por ejemplo, en R&D Systems, y la proteína GDF7 puede adquirirse, por ejemplo, en Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

La concentración de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP solo debe ser una concentración capaz de inducir la diferenciación de las células que forman los agregados de células madre pluripotenciales en células retinianas. En el caso de BMP4, por ejemplo, se añade al medio a una concentración de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 1 μ M, preferiblemente de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 100 nM, más preferiblemente de aproximadamente 1,5 nM.

Una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP solo necesita añadirse después de aproximadamente 24 horas desde el inicio del cultivo flotante en la etapa (1), y puede añadirse al medio dentro de varios días desde el inicio del cultivo flotante (por ejemplo, dentro de 15 días). Preferiblemente, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de 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 preferiblemente en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante.

Después de añadir una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP al medio y de que se inicie la inducción de la diferenciación de las células que forman los agregados de células madre pluripotenciales en células retinianas, no es necesario añadir la sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP al medio, y el medio puede reemplazarse por un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP, con lo cual puede suprimirse el coste del medio. Puede confirmarse que en una célula se ha iniciado la inducción de la diferenciación en una célula retiniana, por ejemplo, detectando la expresión del gen Rax en la célula. También es posible confirmar el momento en que se inició la inducción de la diferenciación en una célula retiniana sometiendo los agregados formados en la etapa (1) usando una célula madre pluripotencial, en la que se ha activado un gen de proteína indicadora de fluorescencia, tal como GFP, en el locus del gen Rax, a un cultivo flotante en presencia de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP a una concentración necesaria para la inducción de la diferenciación en células retinianas, y detectando la fluorescencia emitida desde la proteína indicadora de fluorescencia expresada. Una de las realizaciones de la etapa (2) es una etapa de 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 puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP a una concentración necesaria para la inducción de la diferenciación en células retinianas, y estando exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, hasta que aparece una célula que expresa el gen Rax, para obtener un agregado que contiene una célula progenitora retiniana.

Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura de cultivo y la concentración en la etapa (2), pueden determinarse de modo apropiado. La temperatura de cultivo, por ejemplo, es de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂, por ejemplo, es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10%, preferiblemente de aproximadamente 5%.

- 5 Puede confirmarse que se ha obtenido un agregado que contiene una célula progenitora retiniana, por ejemplo, detectando que el agregado contiene una célula que expresa Rax o PAX6, que es un marcador de células progenitoras retinianas.

10 El agregado obtenido que contiene una célula progenitora retiniana puede usarse como reactivo para evaluar la toxicidad o la eficacia como fármaco. También es posible obtener una célula progenitora retiniana muy pura sometiendo el agregado que contiene una célula progenitora retiniana a un tratamiento de dispersión (por ejemplo, un tratamiento de tripsina/EDTA), y seleccionando las células obtenidas usando FACS.

El método de producción 2 de la presente invención es un método para producir un tejido retiniano, que comprende las siguientes etapas (1), (2) y (3):

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

20 (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 exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas, y

25 (3) una tercera etapa de someter el agregado formado en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de cualquiera de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, y una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniendo con ello un agregado que contiene tejidos retinianos y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural.

La etapa (1) y la etapa (2) del método de producción 2 de la presente invención pueden realizarse de manera similar a la etapa (1) y la etapa (2) del método de producción 1 de la presente invención.

30 Se explica la etapa (3), que incluye someter el agregado formado en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, obteniendo con ello un agregado que contiene tejidos retinianos y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural.

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

40 El medio "exento de cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt" también incluye un medio sustancialmente exento de cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, por ejemplo, un medio que no contiene cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, a una concentración que ejerce una influencia adversa sobre la diferenciación selectiva en tejidos retinianos.

45 El medio "no suplementado con cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt" también incluye un medio sustancialmente no suplementado con cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, por ejemplo, un medio no suplementado con cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, a una concentración que ejerce una influencia adversa sobre la diferenciación selectiva en tejidos retinianos.

El medio sin suero o el medio que contiene suero que se va a usar como dicho medio no presenta una limitación

concreta, con la condición de que sean como se mencionó anteriormente. Para evitar un proceso de formulación complicado, se emplea preferiblemente un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada de reemplazo de suero, tal como KSR disponible en el mercado (por ejemplo, un medio obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μ M y 1 x concentrado de lípidos químicamente definido a una mezcla 1:1 de IMDM y F-12). La cantidad de KSR que se va a añadir a un medio sin suero en general es de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 20%, en el caso, por ejemplo, de células ES humanas.

La sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt es una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Wnt. Los ejemplos de la sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt incluyen proteínas que pertenecen a la familia (por ejemplo, Wnt1, Wnt3a, Wnt7a), receptor de Wnt, agonista del receptor de Wnt, inhibidor de GSK3 β (por ejemplo, 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO), CHIR99021, kenpaulona), etc.

Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂ y la concentración de O₂ en la etapa (3), pueden determinarse de modo apropiado. La temperatura de cultivo, por ejemplo, es de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂, por ejemplo, es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10%, preferiblemente de aproximadamente 5%. La concentración de O₂ no es menor que aproximadamente 18%, por ejemplo, de aproximadamente 20% a aproximadamente 70%, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 60%, más preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%.

Aunque el periodo de cultivo en la etapa (3) no presenta una limitación concreta, en general es de 48 hr o mayor, preferiblemente de 7 días o mayor.

En los agregados sometidos de esta manera a un cultivo flotante, el tejido retiniano está presente para cubrir la superficie del agregado. Puede confirmarse la presencia de tejido retiniano, después de finalizar el cultivo flotante, fijando los agregados con un fijador, tal como una disolución de para-formaldehído, preparando una sección congelada y confirmando la formación de un tejido retiniano que tiene una estructura de capas mediante un método de inmunotinción, etc. Puesto que las respectivas capas de un tejido retiniano están compuestas de diferentes células progenitoras retinianas (fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células ganglionares retinianas), la formación de una estructura de capas puede confirmarse mediante un método de inmunotinción usando anticuerpos contra los marcadores expresados en estas células.

También es posible escindir físicamente el tejido retiniano presente sobre la superficie de los agregados con pinzas, etc. En este caso, puesto que puede formarse un tejido neural distinto de un tejido retiniano sobre la superficie de cada agregado, una parte del tejido neural escindido del agregado se corta y se confirma mediante el método de inmunotinción, según se describe a continuación, etc., con lo cual se confirma que el tejido es un tejido retiniano.

En un agregado que contiene el tejido retiniano y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural, por ejemplo, se observan tejidos positivos a RAX en las imágenes inmunoteñidas de la criosección del agregado, y no se observan tejidos negativos a RAX en su parte externa.

Pueden obtenerse tejidos retinianos con mucha eficacia a partir de células madre pluripotenciales humanas mediante el método de producción 2 de la presente invención. Puesto que los tejidos retinianos obtenidos mediante el método de producción 2 de la presente invención contienen una neurona específica de cada una de las capas de la retina, también es posible obtener una célula que constituye un tejido retiniano, tal como un fotorreceptor, una célula horizontal, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula ganglionar, o células progenitoras de estas y similares. Puede confirmarse la célula que está disponible a partir del tejido retiniano obtenido mediante un método conocido *per se*, por ejemplo, la expresión de un marcador celular.

Puede usarse un agregado que contenga el tejido retiniano obtenido y que esté sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural como reactivo para evaluar la toxicidad o la eficacia como fármaco. También es posible obtener una célula que constituye un tejido retiniano muy pura sometiendo el agregado que contiene un tejido retiniano y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural a un tratamiento de dispersión (por ejemplo, un tratamiento de tripsina/EDTA), y seleccionando las células obtenidas usando FACS.

El método de producción 3 de la presente invención es un método para producir una célula neural específica de una capa retiniana, que comprende las siguientes etapas (1), (2) y (3):

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

(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 exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas, y

una tercera etapa de someter el agregado formado en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de cualquiera de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, y una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniendo con ello un agregado que contiene tejidos retinianos que contienen las células neurales específicas de una capa retiniana previstas y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural.

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

Se explica la etapa (3), que incluye someter el agregado formado en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de cualquiera de una sustancia que actúa sobre la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la transducción de señales mediada por BMP, y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt hasta que aparecen las células neurales específicas de una capa retiniana previstas, obteniendo con ello un agregado que contiene tejidos retinianos que contienen las células neurales específicas de una capa retiniana previstas y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural.

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

El medio "exento de cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt" también incluye un medio sustancialmente exento de cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, por ejemplo, un medio que no contiene cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, a una concentración que ejerce una influencia adversa sobre la diferenciación selectiva en tejidos retinianos y células neurales específicas de una capa retiniana.

El medio "no suplementado con cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt" también incluye un medio sustancialmente no suplementado con cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, por ejemplo, un medio no suplementado con cualquiera de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de Sonic hedgehog, una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP y una sustancia que actúa sobre la vía de señales de Wnt, a una concentración que ejerce una influencia adversa sobre la diferenciación selectiva en tejidos retinianos y células neurales específicas de una capa retiniana.

El medio sin suero o el medio que contiene suero que se va a usar como dicho medio no presenta una limitación concreta, con la condición de que sean como se mencionó anteriormente. Por ejemplo, puede mencionarse un medio que contiene suero obtenido añadiendo suero de ternero fetal al 10%, suplemento de N₂, taurina 100 µM, y ácido retinoico 500 nM a medio DMEM-F12, un medio sin suero suplementado con una cantidad apropiada de reemplazo de suero, tal como KSR disponible en el mercado (por ejemplo, un medio obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM y 1x concentrado de lípidos químicamente definido a una mezcla 1:1 de IMDM y F-12) y similares.

Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂ y la concentración de O₂ en la etapa (3), pueden determinarse de modo apropiado. La temperatura de cultivo, por ejemplo, es de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂, por ejemplo, es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10%, preferiblemente de aproximadamente 5%. La concentración de O₂ no es menor que aproximadamente 18%, por ejemplo, de aproximadamente 20% a aproximadamente 70%, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 60%, más preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%.

El periodo de cultivo en la etapa (3) varía dependiendo de la célula neural específica de una capa retiniana prevista y es, por ejemplo, de aproximadamente 7 días a aproximadamente 200 días.

En el agregado sometido de esta manera a un cultivo flotante, el tejido retiniano que contiene la célula neural específica de una capa retiniana está presente para cubrir la superficie del agregado. Puede confirmarse la presencia de tejido retiniano, después de finalizar el cultivo flotante, fijando los agregados con un fijador, tal como una disolución de para-formaldehído, preparando una sección congelada y confirmando la formación de un tejido

retiniano que tiene una estructura de capas mediante un método de inmunotinción, etc. Puesto que las respectivas capas de un tejido retiniano están compuestas de diferentes células progenitoras retinianas (fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células ganglionares retinianas), la formación de una estructura de capas puede confirmarse mediante un método de inmunotinción usando anticuerpos contra los marcadores expresados en estas células.

En un agregado que contiene el tejido retiniano que contiene una célula neural específica de una capa retiniana y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural, por ejemplo, se observan tejidos positivos a RAX en las imágenes inmunoteñidas de la criosección del agregado, y no se observan tejidos negativos a RAX en su parte externa.

Puesto que los tejidos retinianos obtenidos mediante el método de producción 3 de la presente invención contienen una neurona específica de cada una de las capas de la retina, también es posible obtener una célula neural específica de una capa retiniana, tal como un fotorreceptor, una célula horizontal, una célula bipolar, una célula amacrina y una célula ganglionar. Puede confirmarse la célula que está disponible a partir del tejido retiniano obtenido mediante un método conocido *per se*, por ejemplo, la expresión de un marcador celular.

Puede usarse un agregado que contenga el tejido retiniano obtenido que contiene una célula neural específica de una capa retiniana y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural como reactivo para evaluar la toxicidad o la eficacia como fármaco. También es posible obtener una célula neural específica de una capa retiniana muy pura sometiendo el agregado que contiene un tejido retiniano que contiene una célula neural específica de una capa retiniana y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural a un tratamiento de dispersión (por ejemplo, un tratamiento de tripsina/EDTA), y seleccionando las células obtenidas usando FACS.

Las células neurales específicas de una capa retiniana obtenidas pueden seguir cultivándose directamente o pueden someterse a un tratamiento de dispersión (por ejemplo, un tratamiento de tripsina/EDTA) y después cultivarse bajo condiciones de adhesión. En el caso del cultivo de adhesión, se emplea preferiblemente un recipiente de cultivo adhesivo para células, un recipiente de cultivo después de un tratamiento de revestimiento con una matriz extracelular, etc. (por ejemplo, poli-D-lisina, laminina, fibronectina). Las condiciones de cultivo del cultivo de adhesión, tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂, y la concentración de O₂, pueden determinarse según sea apropiado. En este caso, el cultivo puede realizarse en presencia de una sustancia de inducción de la diferenciación conocida y un factor neurotrófico. Los ejemplos de la sustancia de inducción de la diferenciación y del factor neurotrófico incluyen NGF (Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 552 (1994)), ácido retinoico (Dev. Biol., 168, 342 (1995); J. Neurosci., 16, 1056 (1996)), factor inhibidor de BMP (Nature, 376, 333-336 (1995)), IGF (Genes&Development, 15, 3023-3028 (2003)), BDNF, NT3, NT4, etc.

Los tejidos retinianos y las células neurales específicas de una capa retiniana producidos pueden confirmarse usando la presencia o la ausencia de expresión de un marcador celular y similares como índices, o combinándolos según sea necesario. La célula neural específica de una capa retiniana obtenida también puede identificarse mediante la observación de la morfología celular. Una célula concreta deseada también puede aislarse basándose en dicho patrón de expresión de un marcador y la morfología celular.

La célula progenitora retiniana, el tejido retiniano o la célula neural específica de una capa retiniana producidos mediante los métodos de producción 1 a 3 de la presente invención también pueden usarse para la selección de un fármaco terapéutico para una enfermedad debida a un trastorno del tejido retiniano o de una célula relacionada con la retina, o un material de trasplante para un tratamiento celular, un material para el estudio de enfermedades, o un material para el descubrimiento de fármacos terapéuticos para el daño celular debido a otra etiología. Además, pueden utilizarse para el estudio, el ensayo, etc., de la toxicidad, tal como fototoxicidad, en la evaluación de la toxicidad y la eficacia como fármaco de sustancias químicas, etc.

Los ejemplos de una enfermedad debida a un trastorno del tejido retiniano o de una célula relacionada con la retina incluyen intoxicación por mercurio orgánico, retinopatía por cloroquinas, retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con el envejecimiento, glaucoma, retinopatía diabética, retinopatía neonatal, etc.

La célula progenitora retiniana, el tejido retiniano o la célula neural específica de una capa retiniana producidos mediante los métodos de producción 1 a 3 de la presente invención pueden usarse como retina para el trasplante, el cual se emplea para suplementar una célula dañada o un tejido enfermo que presenta un estado dañado de las células (por ejemplo, se emplea para una operación de trasplante), etc.

Ejemplos

La presente invención se explica con más detalle a continuación remitiéndose a los ejemplos, que no deben considerarse como limitantes.

Ejemplo 1: Ejemplo de producción de un agregado que contiene células progenitoras retinianas

Como referencia, se cultivaron células ES humanas con la introducción RAX::GFP (derivadas de KhES-1; Cell Stem

Cell, 2012, 10(6), 771-785) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.*, PNAS, 2006, 103(25), 9554-9559" y "Watanabe, K. *et al.*, Nat, Biotech., 2007, 25, 681-686". Como medio, se usó un medio obtenido añadiendo KSR al 20% (reemplazo de suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, bFGF 5 ng/ml a medio DMEM/F12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales usando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas de modo individual se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a 1,2x10⁴ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placas esféricas Sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) y se sometieron a un cultivo flotante a 37 °C, CO₂ al 5%. Como medio sin suero para estas, se usó un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado de lípidos químicamente definido, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el inicio del cultivo flotante, se añadió cualquiera de BMP4 recombinante humana (R&D) (concentración final, 1,5 nM), BMP2 (R&D) (concentración final, 100 ng/ml), BMP7 (R&D) (concentración final, 100 ng/ml) y GDF7 (R&D) (concentración final, 100 ng/ml), y se realizó el cultivo flotante. Se realizó un cultivo similar bajo condiciones sin la adición de ninguna sustancia que actúe sobre la vía de transducción de señales de BMP. Se intercambió la mitad de la cantidad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días por el medio mencionado anteriormente no suplementado con ninguna sustancia que actúe sobre la vía de transducción de señales de BMP. En el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, se realizó una observación microscópica de la fluorescencia. Cuando se cultiva bajo condiciones sin la adición de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP, apenas se observan células que expresan GFP, que indican la inducción de células progenitoras retinianas (figura 1A, B). Por contraste, las células que expresan GFP claramente aumentaron bajo condiciones de cultivo que incluyen la adición de cualquiera de BMP2 (figura 1C, D), BMP4 (figura 1E, F), BMP7 (figura 1G, H), y GDF7 (figura 1I, J).

Ejemplo 2: Ejemplo de producción de tejido retiniano - 1

Como referencia, se cultivaron células ES humanas con la introducción RAX::GFP (derivadas de KhES-1; Cell Stem Cell, 2012, 10(6), 771-785) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.*, PNAS, 2006, 103(25), 9554-9559" y "Watanabe, K. *et al.*, Nat, Biotech., 2007, 25, 681-686". Como medio, se usó un medio obtenido añadiendo KSR al 20% (reemplazo de suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, bFGF 5 ng/ml a medio DMEM/F12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales usando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas de modo individual se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a 1,2x10⁴ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placas esféricas Sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) y se sometieron a un cultivo flotante a 37 °C, CO₂ al 5%. Como medio sin suero para estas, se usó un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado de lípidos químicamente definido, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. Se añadió BMP4 recombinante humana (R&D) (concentración final, 1,5 nM) en cualquier momento desde simultáneamente al inicio del cultivo flotante, en el día 1 desde el inicio del cultivo flotante, en el día 2 desde el inicio del cultivo flotante, y en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante, y se realizó el cultivo flotante. Se realizó un cultivo similar bajo condiciones sin la adición de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP. Se intercambió la mitad de la cantidad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días por el medio mencionado anteriormente no suplementado con una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP. En el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados se trasladaron desde la placa de 96 pocillos a una placa de cultivo flotante, y se realizó el cultivo flotante continuamente en un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado de lípidos químicamente definido a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 26 desde el inicio del cultivo flotante, se realizó una observación microscópica de la fluorescencia y la medición de las células positivas a GFP mediante FACS.

No se encontraron células que expresan GFP, que indican la inducción de células progenitoras retinianas, bajo condiciones sin la adición de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP (figura 2A, B, C) ni bajo condiciones con la adición de BMP4 simultáneamente al inicio del cultivo flotante (figura 2D, E, F). Por contraste, las células que expresan GFP claramente aumentaron bajo las condiciones con la adición de BMP4 en cualquier momento desde el día 1 desde el inicio del cultivo flotante (figura 2G, H, I), el día 2 desde el inicio del cultivo flotante (figura 2J, K, L), y el día 3 desde el inicio del cultivo flotante (figura 2M, N, O). En todas las condiciones, no se observó tejido negativo a RAX::GFP en la parte externa del tejido positivo a RAX::GFP formado. Según los resultados de las mediciones con FACS, no menos del 85% de las células fueron positivas a GFP bajo condiciones con la adición de BMP4 en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante (figura 2O). Los anteriores resultados revelan que la adición de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP en el día 1 o más tarde, preferiblemente en el día 3 desde el inicio del cultivo flotante, es eficaz para la producción de un agregado que contiene tejido retiniano y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural.

Ejemplo 3: Ejemplo de producción de tejido retiniano - 2

Como referencia, se cultivaron células ES humanas con la introducción RAX::GFP (derivadas de KhES-1; Cell Stem Cell, 2012, 10(6), 771-785) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.*, PNAS, 2006, 103(25), 9554-9559" y "Watanabe, K. *et al.*, Nat, Biotech., 2007, 25, 681-686". Como medio, se usó un medio obtenido añadiendo KSR al 20% (reemplazo de suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, bFGF 5 ng/ml a medio DMEM/F12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales usando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas de modo individual se suspendieron

en 100 μ l de un medio sin suero a $1,2 \times 10^4$ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placas esféricas Sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) y se sometieron a un cultivo flotante a 37 °C, CO₂ al 5%. Como medio sin suero para estas, se usó un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μ M, 1x concentrado de lípidos químicamente definido, Y27632 20 μ M a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. Se añadió BMP4 recombinante humana (R&D) (concentración final, 1,5 nM) en cualquier momento desde el día 6 desde el inicio del cultivo flotante, en el día 9 desde el inicio del cultivo flotante, en el día 12 desde el inicio del cultivo flotante, y en el día 15 desde el inicio del cultivo flotante, y se realizó el cultivo flotante. Se realizó un cultivo similar bajo condiciones sin la adición de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP. Se intercambié la mitad de la cantidad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días por el medio mencionado anteriormente no suplementado con una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP. En el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados se trasladaron desde la placa de 96 pocillos a una placa de cultivo flotante, y se realizó el cultivo flotante continuamente en un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μ M, 1x concentrado de lípidos químicamente definido a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 24 desde el inicio del cultivo flotante, se realizó una observación microscópica de la fluorescencia.

Como resultado, no se encontraron células que expresan GFP, que indican la inducción de células progenitoras retinianas, bajo condiciones sin la adición de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP (figura 3A, B). Por contraste, las células que expresan GFP claramente aumentaron bajo las condiciones con la adición de BMP4 en cualquier momento desde el día 6 desde el inicio del cultivo flotante (figura 3C, D), el día 9 desde el inicio del cultivo flotante (figura 3E, F), y el día 12 desde el inicio del cultivo flotante (figura 3G, H). Bajo las condiciones con la adición de BMP4 en el día 15 desde el inicio del cultivo flotante, se indujeron células que expresan GFP, pero la eficacia fue baja (figura 3I, J). En todas las condiciones, no se observó tejido negativo a RAX::GFP en la parte externa del tejido positivo a RAX::GFP formado. Los anteriores resultados revelan que la adición de una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP en el día 15 o antes desde el inicio del cultivo flotante es eficaz para la producción de un agregado que contiene tejido retiniano y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural.

Ejemplo 4: Ejemplo de producción de tejido retiniano - 3

En el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados que contienen células que expresan GFP, que se obtuvieron en el ejemplo 1, se trasladaron desde la placa de 96 pocillos a una placa de cultivo flotante, y se realizó el cultivo flotante continuamente en un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μ M, 1x concentrado de lípidos químicamente definido a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 26 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados se fijaron con una disolución de para-formaldehído al 4%, se prepararon criosecciones, y se confirmó la estructura del tejido mediante el método de la inmunotinción.

En el día 26 desde el inicio del cultivo flotante, todas las capas fueron positivas a RAX::GFP, y la capa externa fue positiva a Chx10, que es un marcador de células madre de la retina (figura 4A, B, C). No se encontraba presente tejido, tal como ectodermo no neural, en el exterior del epitelio positivo a RAX::GFP. Se demostró que el método de producción de la presente invención puede producir tejido retiniano con mucha eficacia a partir de células ES humanas.

Ejemplo 5: Ejemplo de producción de células neurales específicas de una capa retiniana

Como referencia, se cultivaron células ES humanas con la introducción RAX::GFP (derivadas de KhES-1; Cell Stem Cell, 2012, 10(6), 771-785) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.*, PNAS, 2006, 103(25), 9554-9559" y "Watanabe, K. *et al.*, Nat. Biotech., 2007, 25, 681-686". Como medio, se usó un medio obtenido añadiendo KSR al 20% (reemplazo de suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, bFGF 5 ng/ml a medio DMEM/F12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales usando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas de modo individual se suspendieron en 100 μ l de un medio sin suero a $1,2 \times 10^4$ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placas esféricas Sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) y se sometieron a un cultivo flotante a 37 °C, CO₂ al 5%. Como medio sin suero para estas, se usó un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 μ M, 1x concentrado de lípidos químicamente definido, Y27632 20 μ M a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el inicio del cultivo flotante, se añadió BMP4 recombinante humana (R&D) (concentración final, 1,5 nM). Se intercambié la mitad de la cantidad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días por el medio mencionado anteriormente no suplementado con una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP. En el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados se trasladaron desde la placa de 96 pocillos a una placa de cultivo flotante, y se realizó el cultivo flotante continuamente en un medio obtenido añadiendo suero de ternero fetal al 10%, suplemento de N2, taurina 100 μ M, ácido retinoico 500 nM a medio DMEM-F12. Desde el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, el cultivo se realizó bajo O₂ al 40%. En el día 117 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados se fijaron con una disolución de para-formaldehído al 4%, se prepararon criosecciones, y se confirmó la estructura del tejido mediante el método de la inmunotinción. En el día 117 desde el inicio del cultivo flotante, todas las capas fueron positivas a RAX::GFP, y estaba presente una célula positiva a recoverina, que es un marcador de fotorreceptores (figura 5A). Además, la capa externa del tejido retiniano contenía una célula positiva a Nr1, que es un marcador de fotorreceptores de bastones (figura 5B), y una

célula positiva a RXR-gamma, que es un marcador de fotorreceptores de conos (figura 5C), lo cual sugiere la aparición de diferenciación entre fotorreceptores de bastones y conos. Además, estaba presente una célula positiva a Chx10, que es un marcador de células progenitoras retinianas y células bipolares (figura 5D), una célula positiva a calretinina, que es un marcador de células amacrinas (figura 5E), y una célula positiva a calbindina, que es un

5 marcador de células horizontales (figura 5F). Los resultados revelan que el método de producción de la presente invención puede producir tejido retiniano, que está constituido de diversos tipos de células neurales específicas de una capa retiniana diferenciadas, de una manera muy eficaz a partir de células ES humanas.

Ejemplo 6: Ejemplo de producción de células neurales específicas de una capa retiniana

Como referencia, se cultivaron células ES humanas con la introducción RAX::GFP (derivadas de KhES-1; Cell Stem Cell, 2012, 10(6), 771-785) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.*, PNAS, 2006, 103(25), 9554-9559" y "Watanabe, K. *et al.*, Nat. Biotech., 2007, 25, 681-686". Como medio, se usó un medio obtenido añadiendo KSR al 20% (reemplazo de suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, bFGF 8 ng/ml a medio DMEM/F12 (Sigma). Las células ES cultivadas se dispersaron en células individuales usando TrypLE Express (Invitrogen), y las células ES dispersadas de modo individual se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a 1,2x10⁴ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placas esféricas Sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) y se sometieron a un cultivo flotante a 37 °C, CO₂ al 5%. Como medio sin suero para estas, se usó un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado de lípidos químicamente definido, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En el día 3 desde el inicio del cultivo flotante, se añadieron 50 µl del medio sin suero (total 150 µl). En el día 6 desde el inicio del cultivo flotante, se añadió BMP4 recombinante humana (R&D) (concentración final, 1,5 nM). Se intercambié la mitad de la cantidad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días por el medio mencionado anteriormente no suplementado con una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP. En el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados se trasladaron desde la placa de 96 pocillos a una placa de cultivo flotante, y se realizó el cultivo flotante continuamente en un medio obtenido añadiendo suero de ternero fetal al 10%, suplemento de N2, taurina 100 µM, ácido retinoico 500 nM a medio DMEM-F12. Desde el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, el cultivo se realizó bajo O₂ al 40%. En el día 50 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados se fijaron con una disolución de para-formaldehído al 4%, se prepararon criosecciones, y se confirmó la estructura del tejido mediante el método de la inmunotinción. En el día 50 desde el inicio del cultivo flotante, todas las capas fueron positivas a RAX::GFP, y estaba presente una célula positiva a Chx10, que es un marcador de células progenitoras retinianas y células bipolares (figura 6A) y una célula positiva a Pax6, que es un marcador de células ganglionares y células neurales (figura 6B), lo cual sugiere la formación de tejidos neurales retinianos de múltiples capas. Además estaba presente una célula positiva a Crx, que es marcador de fotorreceptores (figura 6C), y una célula positiva a Brn3b, que es un marcador de células ganglionares (figura 6D). Los resultados revelan que el método de producción de la presente invención puede producir tejido retiniano, que está constituido de diversos tipos de células neurales específicas de una capa retiniana diferenciadas, de una manera muy eficaz a partir de células ES humanas.

Ejemplo 7: Ejemplo de producción de un agregado que contiene células progenitoras retinianas, tejido retiniano y células neurales específicas de una capa retiniana a partir de células madre pluripotenciales inducidas (células iPS)

Se cultiva la línea de células iPS humanas 201B7 (disponible en RIKEN BioResource Center o iPS Academia Japan Inc.) según los métodos descritos en "Ueno, M. *et al.*, PNAS, 2006, 103(25), 9554-9559" y "Watanabe, K. *et al.*, Nat. Biotech., 2007, 25, 681-686". Como medio, se usó un medio obtenido añadiendo KSR al 20% (reemplazo de suero Knockout™; Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, bFGF 5 ng/ml a medio DMEM/F12 (Sigma). Las células iPS cultivadas se dispersaron en células individuales usando TrypLE Express (Invitrogen), se suspendieron en 100 µl de un medio sin suero a 1,2x10⁴ células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos no adhesiva para células (placas esféricas Sumilon, SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) y se sometieron a un cultivo flotante a 37 °C, CO₂ al 5%. Como medio sin suero para estas, se usó un medio sin suero obtenido añadiendo KSR al 10%, 1-monotioglicerol 450 µM, 1x concentrado de lípidos químicamente definido, Y27632 20 µM a una mezcla 1:1 de medio F-12 y medio IMDM. En algún momento entre el día 1 y el día 15 desde el inicio del cultivo flotante, se añadió cualquiera de BMP4 recombinante humana (R&D) (concentración final, 1,5 nM), BMP2 (R&D) (concentración final, 100 ng/ml), BMP7 (R&D) (concentración final, 100 ng/ml) y GDF7 (R&D) (concentración final, 100 ng/ml), y se realizó el cultivo flotante. Se intercambié la mitad de la cantidad del medio de cultivo en el pocillo cada 3 días por el medio mencionado anteriormente no suplementado con una sustancia que actúa sobre la vía de transducción de señales de BMP. En el día 18 desde el inicio del cultivo flotante se recuperó una parte de los agregados, se fijaron con una disolución de para-formaldehído al 4%, se prepararon criosecciones, y se confirmó la expresión de marcadores de células progenitoras retinianas (Rax, Chx10) mediante el método de la inmunotinción. El resto de los agregados se trasladaron desde la placa de 96 pocillos a una placa de cultivo flotante, y se realizó el cultivo flotante continuamente en un medio sin suero obtenido añadiendo suero de ternero fetal al 10%, suplemento de N2, taurina 100 µM, ácido retinoico 500 nM a medio DMEM-F12. Desde el día 18 desde el inicio del cultivo flotante, el cultivo se realizó bajo O₂ al 40%. En el día 117 desde el inicio del cultivo flotante, los agregados se fijaron con una disolución de para-formaldehído al 4%, se prepararon criosecciones, y se confirmó la estructura del tejido y la expresión de marcadores de células neurales específicas de una capa retiniana (Nr1, RXR-gamma, recoverina, Chx10, calretinina, calbindina) mediante el método de la inmunotinción.

De este modo, puede producirse una célula progenitora retiniana y, además, un tejido retiniano constituido de diversos tipos de células neurales específicas de una capa retiniana diferenciadas, a partir de células iPS humanas.

5 Según el método de producción de la presente invención, puede producirse con alta eficacia una célula progenitora retiniana, un tejido retiniano o una célula neural específica de una capa retiniana. En el método de producción de la presente invención, puesto que puede obtenerse una célula progenitora retiniana, un tejido retiniano o una célula neural específica de una capa retiniana mediante el cultivo flotante de un agregado sin la adición de una preparación de membrana basal al medio, se reduce el riesgo de contaminación de la célula o el tejido obtenido con un componente derivado de una especie heteróloga. El método de producción de la presente invención es muy útil, puesto que produce con eficacia un grupo de células (tales como fotorreceptores y nervio óptico) que constituyen un tejido retiniano, para el objetivo de evaluar la toxicidad o la eficacia como fármaco de una sustancia química, etc., un tratamiento celular, etc., así como produce con eficacia un tejido retiniano para que sea un "material de tejido" para usarse en ensayos y tratamientos con el objetivo de su aplicación a la evaluación de la toxicidad o la eficacia como fármaco usando un tejido retiniano con una estructura tisular, y para que sea un material de trasplante para un tratamiento de trasplante de tejido retiniano.

15

REIVINDICACIONES

1.- Un método para producir una célula progenitora retiniana, que comprende:

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

(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 exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas.

2.- Un método para producir un tejido retiniano, que comprende:

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

15 (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 exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas, y

20 (3) una tercera etapa de someter el agregado formado en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de cualquiera de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, y una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniendo con ello un agregado que contiene tejidos retinianos y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural.

25 3.- Un método para producir una célula neural específica de una capa retiniana, que comprende:

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

30 (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 exento de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog y que contiene una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, obteniendo con ello un agregado que contiene células progenitoras retinianas, y

35 (3) una tercera etapa de someter el agregado formado en la etapa (2) a un cultivo flotante en un medio sin suero o un medio que contiene suero, estando cada uno de ellos exento de cualquiera de una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Sonic hedgehog, una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP, y una sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por Wnt, obteniendo con ello un agregado que contiene tejidos retinianos que contienen las células neurales específicas de una capa retiniana previstas y que está sustancialmente exento de ectodermo de la cabeza no neural.

40 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células madre pluripotenciales son células madre pluripotenciales de primate.

5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células madre pluripotenciales son células madre pluripotenciales humanas.

45 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (1) y la etapa (2) se realizan en presencia de un reemplazo de suero.

7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el cultivo flotante se realiza en ausencia de una preparación de membrana basal.

50 8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en BMP2, BMP4, BMP7 y GDF7.

9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la sustancia que puede potenciar la

transducción de señales mediada por BMP es BMP4.

10.- El método según la reivindicación 9, en el que BMP4 está a una concentración de 1,5 nM.

5 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la sustancia que puede potenciar la transducción de señales mediada por BMP se añade al medio entre el día 1 y el día 15 desde el inicio del cultivo flotante en la etapa (1).

12.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que en la etapa (2), el agregado formado en la etapa (1) se somete al cultivo flotante hasta que aparece una célula que expresa el gen Rax.

Fig. 1

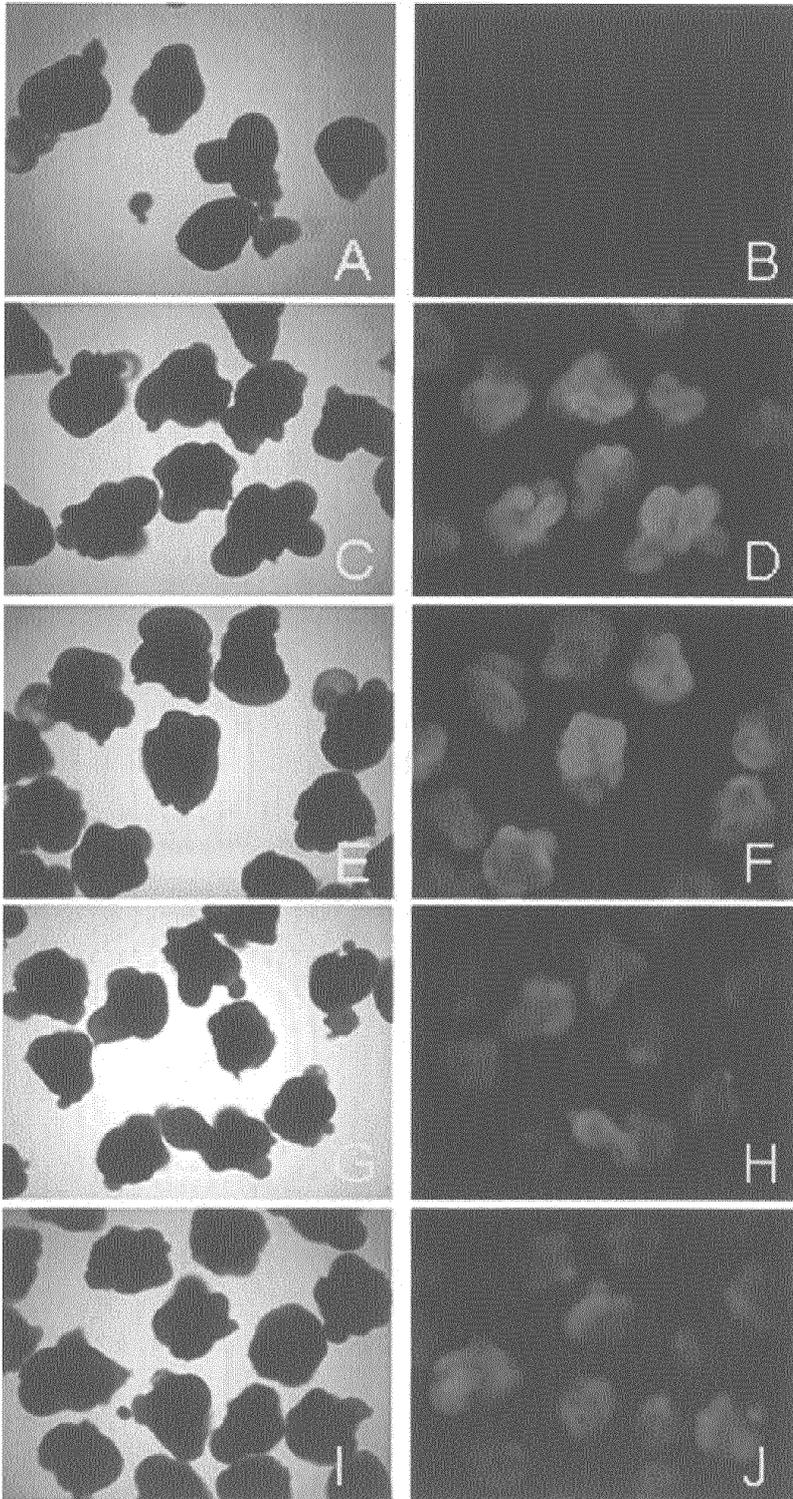


Fig. 2

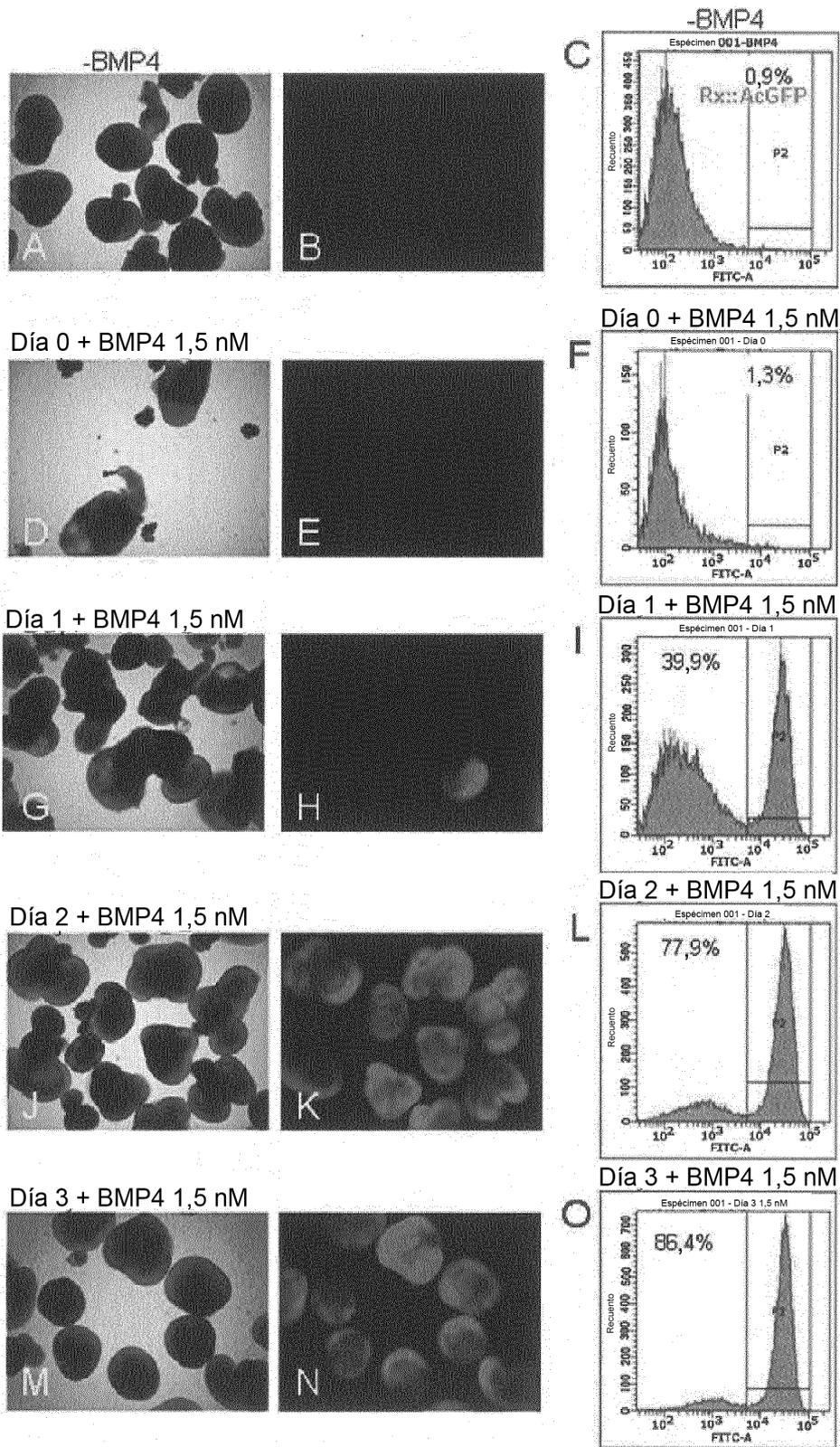


Fig. 3

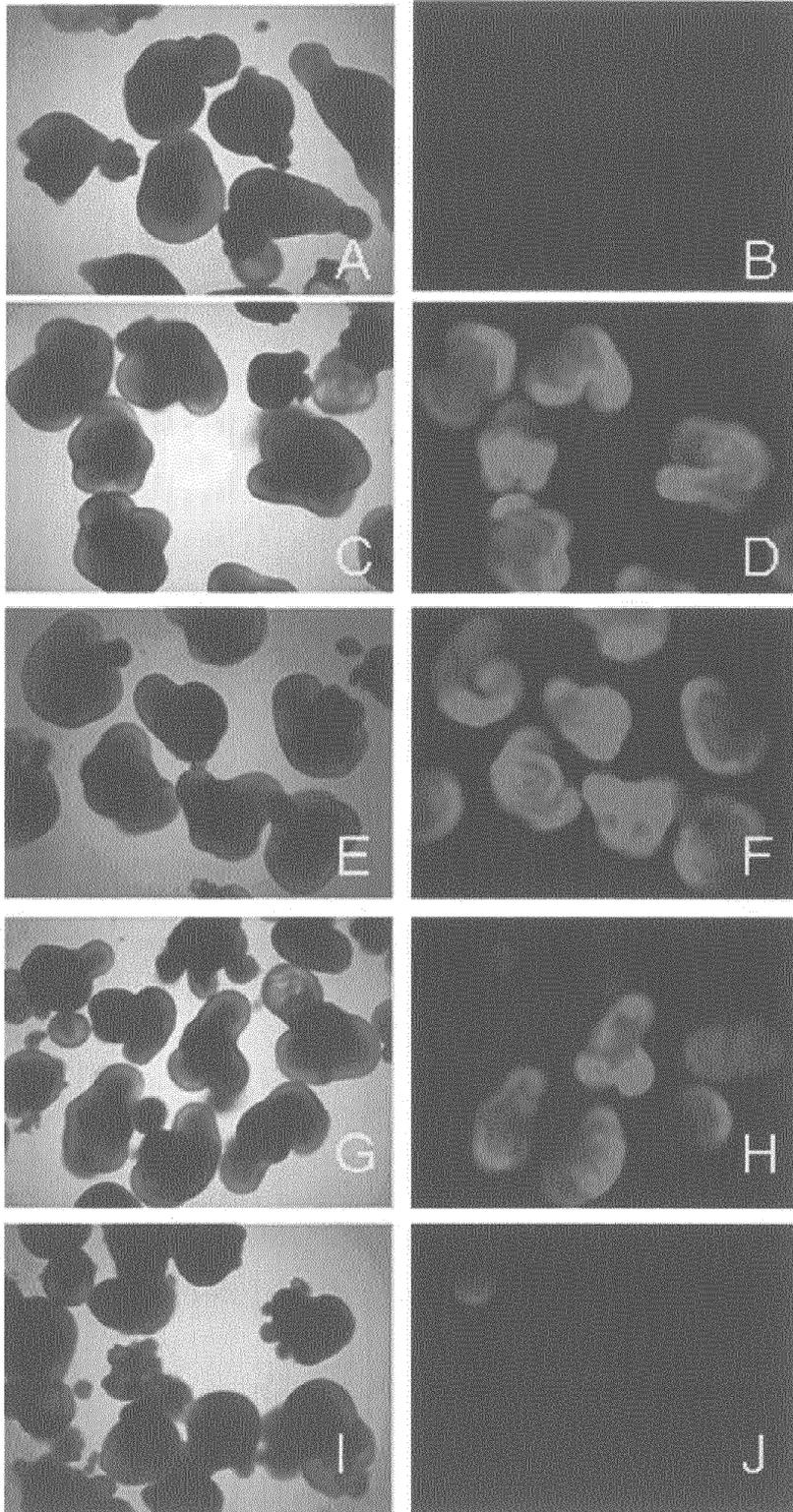


Fig. 4

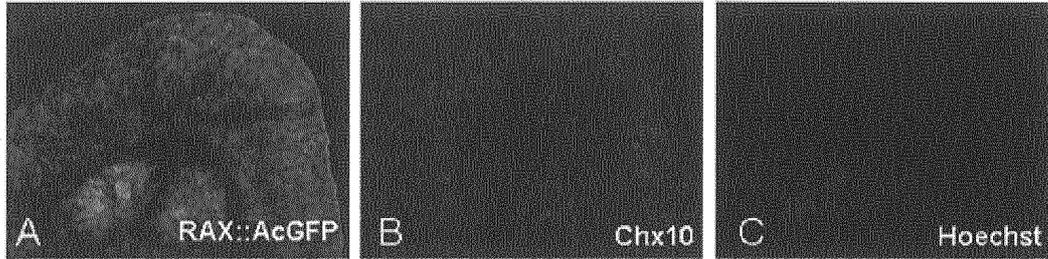


Fig. 5

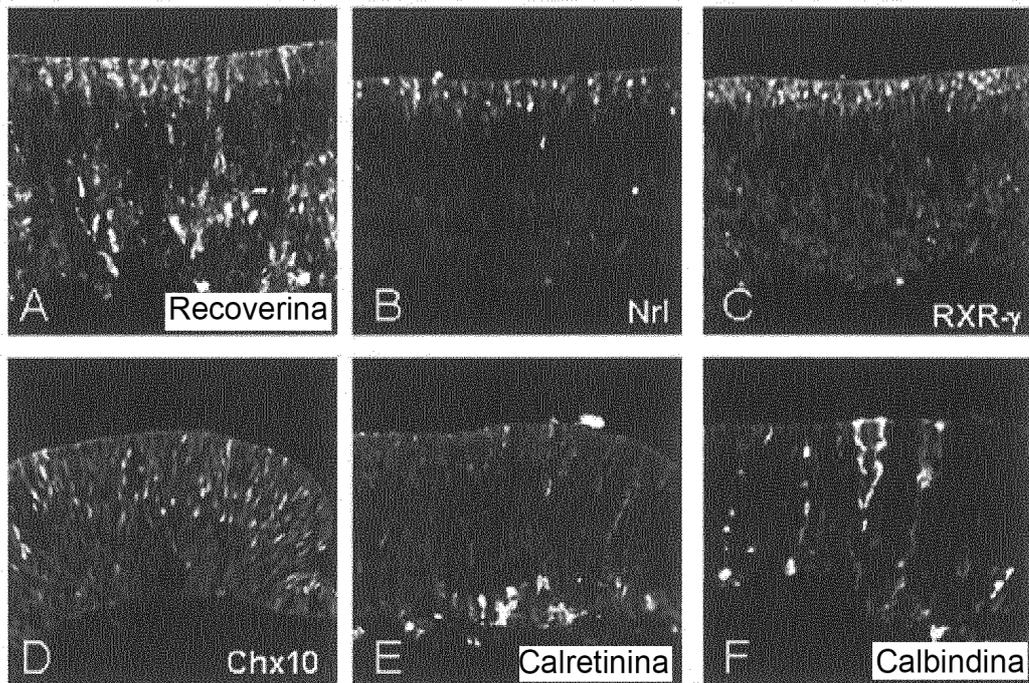


Fig. 6

