

MÉTODO PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS

Campo de la invención

[0001]

La presente invención hace referencia a un método para producir células de la cresta neural, un método para permitir la proliferación de las células de la cresta neural, un medio, una reserva congelada y un método para producir varios tipos de células a partir de células de la cresta neural. Más específicamente, la presente invención hace referencia a un método para producir células de la cresta neural, un método para permitir la proliferación de las células de la cresta neural, un medio para usar en estos métodos, una reserva congelada que comprende células de la cresta neural y un método para producir varios tipos de células en las que se puede inducir la diferenciación de las células de la cresta neural.

Arte previo

[0002]

Las células de la cresta neural (NCC) son células que se desarrollan entre el neuroectodermo y el ectodermo epidérmico cuando el tubo neural se forma a partir de la placa neural durante el desarrollo temprano. Estas células tienen multipotencia para diferenciarse en muchos tipos de células, tales como células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células corneales y células

pigmentarias, y la capacidad de auto-proliferarse. Tal multipotencia y capacidad de auto proliferación indican la utilidad de las células de la cresta neural como medicamento celular para la medicina regenerativa. Por lo tanto, existe una demanda de una técnica para el mantenimiento eficiente o la proliferación de células de la cresta neural.

[0003]

La literatura no patente 1 establece que las células de la cresta neural se inducen a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) de humanos, y las células del estroma mesenquimal o similares se inducen adicionalmente a partir de las células de la cresta neural. En la literatura no patente 1, las células de la cresta neural se cultivan por mantenimiento mediante cultivo adherente usando un medio suplementado con un inhibidor $TGF\beta$, un factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF (también conocido como FGF2)).

[0004]

La literatura no patente 2 establece que las células de la cresta neural se inducen desde el tubo neural embrionario de pollo, y las células gliales o similares se inducen adicionalmente a partir de las células de la cresta neural. En la literatura no patente 2, las células de la cresta neural se cultivan por mantenimiento mediante el cultivo en suspensión usando un medio suplementado con extractos embrionarios de pollo, un

factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), bFGF y ácido retinoico (RA).

[0005]

La literatura no patente 3 establece que las células de la cresta neural se inducen a partir de células madre embrionarias humanas (ESC) o de iPSC humanas, y las células musculares lisas o similares se inducen, además, a partir de las células de la cresta neural. En Literatura no patente 3, las células de la cresta neural se cultivan por medio de cultivo adherente utilizando un medio suplementado con un inhibidor de GSK3 β y un inhibidor de TGF β .

[0006]

La literatura no patente 4 establece que las células de la cresta neural se inducen a partir de iPSC humanas y se mantienen mediante cultivo adherente o cultivo en suspensión usando un medio suplementado con un inhibidor de GSK3 β , un inhibidor de TGF β , EGF y bFGF. La literatura no patente 4 informa que el número y la proporción de células de la cresta neural en una población de células cultivadas bajo cultivo de mantenimiento a través de cultivo adherente disminuyeron dependiendo de la concentración dentro del rango de concentración de bFGF de 0 pg/ml a 10 ng/ml (ver las figuras 5A a 5C). En el cultivo de mantenimiento por cultivo en suspensión, la presencia de células positivas para Sox10 se confirmó por cultivo durante 7 días usando 1 μ M CHIR99021 como inhibidor de GSK3 μ . Sin embargo, no

se determinó si las células tenían multipotencia.

[0007]

Ninguna de las publicaciones 1 a 4 correspondientes a literatura no patente revela que las células de la cresta neural se mantienen y se dejan proliferar mediante cultivo en suspensión usando un medio suplementado con CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M y bFGF.

Lista de referencias

Literatura diferente a patente (NPL)

[0008]

Literatura diferente a patente 1: Fukuta M. et al., "Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media.", PLoS One, 2014, 9(12):e112291.

Literatura diferente a patente 2: Kerosuo L. et al., "Crestospheres: Long-Term Maintenance of Multipotent, Premigratory Neural Crest Stem Cells.", Stem Cell Reports, 2015, 5(4):499-507.

Literatura diferente a patente 3: Menendez L. et al., "Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells.", Proc. Natl. Acad. Sci., 2011, 108(48):19240-5.

Literatura diferente a patente 4: Horikiri T. et al., "SOX10-Nano-Lantern Reporter Human iPS Cells; A Versatile Tool for Neural Crest Research.", PLoS One, 2017, 12(1):e0170342.

Resumen de la invención

Problema técnico

[0009]

Las células de crestas neurales originalmente poseen multipotencia para diferenciarse en muchos tipos de células, como es el caso de las células nerviosas, las células gliales, las células del estroma mesenquimal, las células óseas, los condrocitos, las células corneales y las células pigmentarias. Sin embargo, se sabe que el cultivo de las células de la cresta neural reduce gradualmente la multipotencia y disminuye los tipos de células en las que las células de la cresta neural pueden diferenciarse.

[0010]

Uno de los objetivos principales de la presente invención es proporcionar una técnica para el cultivo y la proliferación durante un largo período de células de cresta neural que conserven la multipotencia.

Solución al problema

[0011]

Para lograr el objeto, la presente invención proporciona lo siguientes aspectos del [1] al [21b].

[1] Un método para producir células de la cresta neural que comprende los pasos de:

- (1) obtener células de la cresta neural; y
- (2) someter a cultivo por suspensión a las células de la cresta neural en un medio que comprende un inhibidor de GSK3 β y un factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), en donde el medio comprende el inhibidor de GSK3 β con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M.

[1a] El método de producción de acuerdo con [1], en el que la concentración del inhibidor de GSK3 β es una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M.

[1b] El método de producción de acuerdo con [1], en el que

el efecto se evalúa en función de la actividad inhibitoria de GSK3 β del inhibidor de GSK3 β , en el que la actividad inhibitoria de GSK3 β del inhibidor de GSK3 β se determina mediante los procedimientos de:

- (i) cultivar células cuya expresión del gen reportero se suprime bajo el control de GSK3 β , en presencia y ausencia del inhibidor de GSK3 β ;
- (ii) medir un nivel de expresión del gen reportero en presencia y ausencia del inhibidor de GSK3 β ; y

(iii) determinar la actividad inhibidora de GSK3 β del inhibidor de GSK3 β sobre la base de una cantidad de aumento en el nivel de expresión del gen reportero en presencia del inhibidor de GSK3 β con respecto al nivel de expresión del gen reportero en la ausencia del inhibidor de GSK3 β .

[2] El método de producción de acuerdo con [1], en donde el medio comprende además un inhibidor de TGF β .

[3] El método de producción de acuerdo con [1], en donde el medio es el medio CDM.

[4] El método de producción de acuerdo con [1], en donde el medio comprende además un factor de crecimiento epidérmico (EGF).

[5] El método de producción de acuerdo con [1], en el cual el inhibidor de GSK3 β es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, kenpaulona, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 y SB415286.

[6] El método de producción de acuerdo con [5], en donde el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021.

[6a] El método de producción de acuerdo con [6], en el que el CHIR99021 tiene una concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M.

[6b] El método de producción de acuerdo con [6a], en el que el CHIR99021 tiene una concentración de 2 o superior y 4,5 μ M o inferior.

[6c] El método de producción de acuerdo con [5], en el que el inhibidor de GSK3 β es CP21R7.

[6d] El método de producción de acuerdo con [6c], en el que el CP21R7 tiene una concentración de 0,5 o superior y 1 μM o inferior.

[7] El método de producción de acuerdo con [2], en donde el inhibidor de $\text{TGF}\beta$ es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 y SB505124.

[7a] El método de producción de acuerdo con cualquiera de [1] a [7], en donde el bFGF tiene una concentración de 20 a 40 ng/ml.

[8] El método de producción de acuerdo con [1], en el que en la etapa (2), las células de la cresta neural se subcultivan cada 5 a 8 días después de la inoculación.

[9] El método de producción de acuerdo con [1], en el que el paso (1) es el paso de inducir la diferenciación de las células madre en las células de la cresta neural.

[10] Un método para proliferar las células de la cresta neural, que constituye el paso de:

(I) someter a cultivo por suspensión a las células de la cresta neural en un medio que comprende un inhibidor de $\text{GSK3}\beta$ y un factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), en donde el medio comprende el inhibidor de $\text{GSK3}\beta$ con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μM .

[10a] El método de proliferación de acuerdo con [10], en el que la concentración del inhibidor de GSK3 β es una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M.

[10b] El método de proliferación de acuerdo con [10], en donde el medio comprende además un inhibidor de TGF β .

[10c] El método de proliferación de acuerdo con [10], en donde el medio es el medio CDM.

[10d] El método de proliferación de acuerdo con [10], en donde el medio comprende además un factor de crecimiento epidérmico (EGF).

[10e] El método de proliferación de acuerdo con [10], en el cual el inhibidor de GSK3 β es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, kenpaulona, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 y SB415286.

[10f] El método de proliferación de acuerdo con [10e], en donde el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021.

[10g] El método de proliferación de acuerdo con [10f], en el que el CHIR99021 tiene una concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M.

[10h] El método de proliferación de acuerdo con [10g], en el que el CHIR99021 tiene una concentración de 2 o superior y 4,5 μ M o inferior.

[10i] El método de proliferación de acuerdo con [10e], en donde el inhibidor de GSK3 β es CP21R7.

[10j] El método de proliferación de acuerdo con [10i], en el que el CP21R7 tiene una concentración de 0,5 o superior y 1 μM o inferior.

[10k] El método de proliferación de acuerdo con [10b], en el que el inhibidor de $\text{TGF}\beta$ es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 y SB505124.

[10l] El método de proliferación de acuerdo con [10], en el que en el paso (I), las células de la cresta neural se subcultivan cada 5 a 8 días después de la inoculación.

[11] Un medio que comprende un inhibidor de $\text{GSK3}\beta$, un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y células de la cresta neural, en el que el medio comprende el inhibidor de $\text{GSK3}\beta$ con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración más alta de 1 μM .

[11a] El medio de acuerdo con [11], en donde la concentración del inhibidor de $\text{GSK3}\beta$ es una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración mayor que 1 μM y menor que 5 μM .

[12] El medio de acuerdo con [11], que comprende, además, un inhibidor de $\text{TGF}\beta$.

[13] El medio de producción de acuerdo con [11], en donde el medio es el medio CDM.

[14] El medio de acuerdo con [11], que comprende además un factor de crecimiento epidérmico (EGF).

[15] El medio de acuerdo con [11], en el cual el inhibidor de GSK3 β es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, kenpaulona, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 y SB415286.

[16] El medio de acuerdo con [15], en el que el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021.

[16a] El medio de acuerdo con [16], en el que el CHIR99021 tiene una concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M.

[16b] El medio de acuerdo con [16a], en el que el CHIR99021 tiene una concentración de 2 o superior y 4,5 μ M o inferior.

[16c] El medio de acuerdo con [15], en donde el inhibidor de GSK3 β es CP21R7.

[16d] El medio de acuerdo con [16c], en el que el CP21R7 tiene una concentración de 0,5 o superior y 1 μ M o inferior.

[17] El medio de acuerdo con [12], en donde el inhibidor de TGF β es por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 y SB505124.

[18] Una reserva congelada compuesta por células de la cresta neural obtenidas por un método de producción de acuerdo con [1].

[18a] La reserva congelada de acuerdo con [18], en el que la reserva congelada se obtiene mediante los pasos de:

separación de las células de la cresta neural obtenidas a través de los pasos del método de producción de acuerdo con [1]; y

suspensión de las células de la cresta neural separadas en una solución de preservación celular, seguido de congelación.

[19] Un método para producir células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células corneales o células pigmentarias, que está compuesto por los pasos de:

(i) someter a cultivo por suspensión a las células de la cresta neural en un medio que comprende un inhibidor de GSK3 β y un factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), en donde el medio comprende el inhibidor de GSK3 β con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M; y

(ii) diferenciar las células de la cresta neural obtenidas en el paso (i) en células de al menos un linaje seleccionado del grupo que consiste en células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células corneales y células pigmentarias.

[19a] El método de proliferación de acuerdo con [19], en el que la concentración del inhibidor de GSK3 β es una concentración que exhibe un efecto equivalente al

exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μM e inferior a 5 μM .

[19b] El método de producción de acuerdo con [19], en el que el medio comprende además un inhibidor de $\text{TGF}\beta$.

[19c] El método de producción de acuerdo con [19], en el que el medio es medio CDM.

[19d] El método de producción de acuerdo con [19], en el que el medio comprende además un factor de crecimiento epidérmico (EGF).

[19e] El método de producción de acuerdo con [19], en el que el inhibidor de $\text{GSK3}\beta$ es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, kenpaulona, AR-A0144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 y SB415286.

[19f] El método de producción de acuerdo con [19e], en el que el inhibidor de $\text{GSK3}\beta$ es CHIR99021.

[19g] El método de producción de acuerdo con [19f], en el que el CHIR99021 tiene una concentración superior a 1 μM e inferior a 5 μM .

[19h] El medio de acuerdo con [19g], en el que el CHIR99021 tiene una concentración de 2 o superior y 4,5 μM o inferior.

[19i] El medio de acuerdo con [19e], en el que el inhibidor de $\text{GSK3}\beta$ es CP21R7.

[19j] El método de producción de acuerdo con [19i], en el que el CP21R7 tiene una concentración de 0,5 o superior y 1 μM o inferior.

[19k] El método de producción de acuerdo con [19b], en el que el inhibidor de TGF β es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 y SB505124.

[19l] El método de producción de acuerdo con [19], en el que en el paso (I), las células de la cresta neural se subcultivan cada 5 a 8 días después de la inoculación.

[20] Un método para cultivar células de la cresta neural que tienen multipotencia durante un largo período, que comprende los pasos de:

- (1) obtener células de la cresta neural; y
- (2) someter a cultivo por suspensión a las células de la cresta neural en un medio que comprende un inhibidor de GSK3 β y un factor de crecimiento básico de fibroblastos, en donde el medio comprende el inhibidor de GSK3 β con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M.

[20a] El método de cultivo de acuerdo con [20], en el que la concentración del inhibidor de GSK3 β es una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M.

[20b] El método de cultivo de acuerdo con [20], en el que el medio comprende además un inhibidor de TGF β .

[20c] El método de cultivo de acuerdo con [20], en el que el medio es medio CDM.

[20d] El método de cultivo de acuerdo con [20], en el que el medio comprende además un factor de crecimiento epidérmico (EGF).

[20e] El método de cultivo de acuerdo con [20], en el que el inhibidor de GSK3 β es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, kenpaulona, AR-A0144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 y SB415286.

[20f] El método de cultivo de acuerdo con [20e], en el que el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021.

[20g] El método de cultivo de acuerdo con [20f], en el que el CHIR99021 tiene una concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M, }.

[20h] El método de cultivo de acuerdo con [20g], en el que el CHIR99021 tiene una concentración de 2 o superior y 4,5 μ M o inferior.

[20i] El método de cultivo de acuerdo con [20e], en el que el inhibidor de GSK3 β es CP21R7.

[20j] El método de cultivo de acuerdo con [20i], en el que el CP21R7 tiene una concentración de 0,5 o superior y 1 μ M o inferior.

[20k] El método de cultivo de acuerdo con [20b], en el que el inhibidor de TGF β es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 y SB505124.

[201] El método de cultivo de acuerdo con [20], en el que en el paso (I), las células de la cresta neural se subcultivan cada 5 a 8 días después de la inoculación.

[21] Uso de un medio que comprende un factor de crecimiento de fibroblastos básico y un inhibidor de GSK3 β con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M, para cultivar células de la cresta neural que tienen multipotencia para un período prolongado.

[21a] Uso de un factor de crecimiento de fibroblastos básico y un inhibidor de GSK3 β con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M, para cultivar células de la cresta neural.

[21b] Uso de un factor de crecimiento básico de fibroblastos y un inhibidor de GSK3 β con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M, para producir un medio de células de la cresta neural.

[0012]

Como se usa en el presente documento, "pluripotencia" significa la capacidad de poder diferenciarse en tejidos y células que tienen diversas formas y funciones diferentes, además de poder diferenciarse en células de cualquier linaje de las 3 capas germinales. La "pluripotencia" es diferente a la "totipotencia", que es la capacidad de poder

diferenciarse en cualquier tejido del cuerpo vivo, incluida la placenta, ya que las células pluripotentes no pueden diferenciarse en la placenta y, por lo tanto, no tienen la capacidad de formar un individuo.

[0013]

"Multipotencia" se refiere a la capacidad de poder diferenciarse en un número plural y limitado de linajes de células. Por ejemplo, las células madre mesenquimales, las células madre hematopoyéticas, las células madre neurales son multipotentes, pero no pluripotentes. Las células de la cresta neural tienen multipotencia para diferenciarse en células tales como células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células corneales y células pigmentarias.

[0014]

En el presente documento, "cultivo" hace referencia al mantenimiento, proliferación (crecimiento) y/o diferenciación de células en un entorno in vitro. "Cultivar" significa mantener células y/o permitir que las células proliferen (crezcan) y/o se diferencien del tejido o del cuerpo, por ejemplo, en una placa de cultivo celular o en un matraz.

[0015]

"Cultivo adherente" hace referencia a un cultivo en un estado donde las células están unidas a un recipiente, por ejemplo, en un estado donde las células están unidas a una placa de cultivo celular o un matraz hecho de un

plástico esterilizado (o plástico recubierto) en presencia de un medio apropiado.

"Cultivo en suspensión" hace referencia a un cultivo en un estado en el que las células se dispersan como células individuales o como esferas celulares que consisten cada una de dos o más células en un medio apropiado sin estar unidas a un recipiente.

[0016]

"Cultivo por expansión" hace referencia al cultivo cuyo objetivo consiste en permitir que proliferen las células deseadas.

[0017]

El "inhibidor de GSK3- β " es una sustancia que tiene actividad inhibitoria contra GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 β). GSK3 (glucógeno sintasa quinasa 3) es una proteína quinasa de serina/treonina y participa en muchas vías de señalización asociadas con la producción de glucógeno, apoptosis, mantenimiento de células madre, etc. GSK3 tiene las 2 isoformas α y β . El "inhibidor de GSK3 β " usado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que el inhibidor de GSK3 β tenga actividad inhibidora de GSK3 β . El inhibidor de GSK3 β puede ser una sustancia que tiene actividad inhibidora tanto de GSK3 β como de GSK3 α .

[0018]

El "inhibidor de TGF β " es una sustancia que tiene actividad inhibitoria contra TGF β (factor de crecimiento transformante β). TGF β es una citocina que

se une a dos tipos de receptores de serina/treonina proteína quinasa y controla la proliferación celular, la diferenciación celular, la muerte celular, etc. a través de la transducción de señales, principalmente, para activar Smad (R-Smad). Los ejemplos de la sustancia que tiene actividad inhibidora de TGF β incluyen sustancias que inhiben la unión de TGF β a su receptor, y sustancias que inhiben las señales posteriores después de la unión de TGF β a su receptor. Los ejemplos de las señales posteriores incluyen la fosforilación del receptor de TGF β I por el receptor de TGF β II, y la fosforilación de Smad por el receptor de TGF β I fosforilado. β El "inhibidor de TGF β " usado en la presente invención no está particularmente limitado siempre y cuando el inhibidor de TGF β tenga actividad inhibidora de TGF β .

[0019]

En el presente documento, "marcador" hace referencia a la "proteína marcadora" o "gen marcador" y significa una proteína que se expresa específicamente en la superficie celular, en el citosol y/o en el núcleo de un tipo celular predeterminado, o un gen del mismo. El marcador puede ser un marcador de selección positivo o un marcador de selección negativo. Preferiblemente, el marcador es un marcador de superficie celular. Particularmente, un marcador de selección positiva de superficie celular permite la concentración, aislamiento y/o detección de células vivas.

La proteína marcadora puede detectarse mediante el uso de un ensayo inmunológico, por ejemplo, ELISA, inmunotinción o citometría de flujo, usando un anticuerpo específico para la proteína marcadora. Un anticuerpo que se une a una secuencia de aminoácidos específica de la proteína marcadora o una cadena de azúcar específica unida a la proteína marcadora, etc. puede usarse como el anticuerpo específico para la proteína marcadora. En el caso de una proteína marcadora expresada intracelularmente que no aparece en la superficie de las células (por ejemplo, un factor de transcripción o una subunidad del mismo), la proteína marcadora de interés puede detectarse expresando la proteína marcadora con una proteína indicadora y detectando la proteína indicadora (por ejemplo, literatura no patente 4). Este método puede usarse preferiblemente cuando no se encuentra un marcador de superficie celular apropiado. El gen marcador se puede detectar mediante el uso de un método de amplificación y/o detección de ácido nucleico conocido en la técnica, por ejemplo, RT-PCR, microarrays, biochip o RNAseq.

[0020]

En el presente documento, "expresión" se define como la transcripción y/o traducción de una determinada secuencia de nucleótidos dirigida por un promotor intracelular.

[0021]

En el presente documento, el término "comprende" o "consiste de" se refiere a la inclusión del (los) elemento(s) posteriores de la palabra sin limitaciones a la misma. Por lo tanto, esto sugiere la inclusión de los elementos que acompañan a la palabra, pero no sugiere la exclusión de ningún otro elemento.

[0022]

En este documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un valor que puede variar hasta más o menos 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor de referencia. Preferiblemente, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de menos o más de 15 %, 10 %, 5 % o 1 % del valor de referencia.

Efectos ventajosos de la invención

[0023]

La presente invención proporciona una técnica para el cultivo y la proliferación durante un período prolongado de las células de la cresta neural que mantienen la multipotencia.

Breve descripción de los dibujos

[0024]

[Figura 1] La Figura 1 es un gráfico que muestra el cambio en el número total de células después del inicio del cultivo de expansión de las células de la cresta

neural (Ejemplo 1). La ordenada muestra el número total de células y "1.E +" representa un multiplicador de 10. Por ejemplo, "1.E + 04" significa 10000 células. La abscisa muestra los días de cultivo.

[Figura 2] La Figura 2 es un gráfico que muestra el cambio en el porcentaje de células con expresión positiva de SOX10 después del inicio del cultivo de expansión de las células de la cresta neural (Ejemplo 1). La ordenada muestra el porcentaje de células SOX10 con expresión positiva (%). La abscisa muestra los días de cultivo.

[Figura 3] La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de la medición del cambio en el número celular total de células de la cresta neural cultivadas por expansión al establecer las concentraciones de bFGF y EGF en 20 ng/ml (A) o 40 ng/ml (B) y establecer la concentración de CHIR99021 en 1, 2, 3 o 5 μ M (indicado por 1x, 2x, 3x, y 5x, respectivamente) (Ejemplo 2). La ordenada muestra el número total de células y "1.E +" representa un multiplicador de 10. Por ejemplo, "1.E + 04" significa 10000 células. La abscisa muestra los días de cultivo.

[Figura 4] La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de la medición del cambio en el número total de células de la cresta neural cultivadas por expansión ajustando las concentraciones de bFGF y EGF a 40 ng/ml y estableciendo la concentración de CHIR99021 a 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 μ M (Ejemplo 2). La ordenada muestra el número

total de células y "1.E +" representa un multiplicador de 10.

[Figura 5] La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la medición del cambio en el porcentaje de células positivas para la expresión de SOX10 de las células de la cresta neural cultivadas por expansión al establecer las concentraciones de bFGF y EGF en 20 ng/ml (A) o 40 ng/ml (B) y establecer la concentración de CHIR99021 en 1, 2, 3 o 5 μ M (indicado por 1x, 2x, 3x, y 5x, respectivamente) (Ejemplo 2). La ordenada muestra el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 (%). La abscisa muestra los días de cultivo.

[Figura 6] La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de la medición del cambio en el porcentaje de células positivas para la expresión de SOX10 de las células de la cresta neural cultivadas en expansión estableciendo las concentraciones de bFGF y EGF en 40 ng / ml y estableciendo la concentración de CHIR99021 en 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 μ M (Ejemplo 2). La ordenada muestra el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 (%). La abscisa muestra los días de cultivo.

[Figura 7] La figura 7 es un gráfico que muestra el cambio en el porcentaje de células positivas para la expresión de SOX10 después del inicio del cultivo de expansión de células de la cresta neural usando CP21R7 como un inhibidor de GSK3 β (Ejemplo 3). La ordenada muestra el porcentaje de células positivas para

expresión de SOX10 (%). La abscisa muestra los días de cultivo.

[Figura 8] La Figura 8 es un gráfico que muestra los resultados de medición del cambio en el número total de células de la cresta neural cultivadas por expansión ajustando la concentración de bFGF a 10, 12.5, 15.0 o 17.5 ng/ml (Ejemplo 8). La ordenada muestra el número total de células y "1.E +" representa un multiplicador de 10.

[Figura 9] La Figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de la medición del cambio en el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10, el número total de células de la cresta neural cultivadas por expansión al establecer la concentración de bFGF en 10, 12.5, 15.0 o 17.5 ng/ml (Ejemplo 8). La ordenada muestra el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 (%). La abscisa muestra los días de cultivo.

Descripción de las Realizaciones

[0025]

A continuación, se describirán los modos adecuados para llevar a cabo la presente invención. Las realizaciones descritas a continuación se proporcionan simplemente para ilustrar realizaciones típicas de la presente invención. El alcance de la presente invención no debe interpretarse como limitado por estas realizaciones.

[0026]

[Método para producir células de la cresta neural y método para proliferar células de la cresta neural]

El método para producir células de la cresta neural de acuerdo con la presente invención comprende los pasos dados a continuación. De estos pasos, el paso (2) corresponde específicamente al método para proliferar las células de la cresta neural de acuerdo con la presente invención.

(1) obtener células de la cresta neural; y

(2) someter a cultivo por suspensión a las células de la cresta neural en un medio que comprende un inhibidor de GSK3 β y un factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), en donde el medio comprende el inhibidor de GSK3 β con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M.

[0027]

[Paso (1) para obtener células de la cresta neural]

El paso (1) para obtener células de la cresta neural es el paso que corresponde a la obtención de las células de la cresta neural que se someterán al paso (2). Los ejemplos del método para obtener las células de la cresta neural en el paso (1) incluyen, entre otros, un método para inducir la diferenciación de las células madre en las células de la cresta neural, un método para comprar células de la cresta neural disponibles a nivel comercial, y un método para recolectar células de la cresta neural

de origen natural.

[0028]

En una realización de la presente invención, para obtener las células de la cresta neural que se someterán a la etapa (2), se puede inducir la diferenciación de las células madre en las células de la cresta neural.

[0029]

Los ejemplos de las "células madre" que se pueden usar en la presente invención incluyen células madre pluripotentes. Las "células madre pluripotentes" que pueden usarse en la presente invención corresponden a las células madre que pueden diferenciarse en tejidos y células que tienen muchas formas y funciones diferentes y que tienen la capacidad de diferenciarse en células de cualquier linaje de las 3 capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Los ejemplos de las mismas incluyen, pero no están particularmente limitados a, células madre embrionarias (ESC), células madre embrionarias derivadas de embriones clonados obtenidos por trasplante nuclear, células madre espermátogoniales, células germinales embrionarias y células madre pluripotentes inducidas (también denominadas "iPSCs" en el presente documento). Las "células madre multipotentes" que pueden usarse en la presente invención corresponden a células madre que tienen la capacidad de poder diferenciarse en un número plural y limitado de linajes de células. Los ejemplos de las

"células madre multipotentes" que se pueden usar en la presente invención incluyen células madre de pulpa dental, células madre derivadas de mucosa oral, células madre de folículo piloso y células madre somáticas derivadas de fibroblastos cultivados o células madre de médula ósea. Las células madre pluripotentes son preferiblemente ESC e iPSC.

[0030]

Las "ESC" disponibles incluyen ESC murinas, tales como varias líneas de ESC murinas establecidas por el Laboratorio de Orientación Genética, Riken (Instituto de Investigación Física y Química), y similares, y ESC humanas, como varias líneas de ESC humanas establecidas por la Universidad de Wisconsin, NIH, Riken, Universidad de Kyoto, Centro Nacional de Salud y Desarrollo Infantil, Cellartis, y similares. Por ejemplo, se pueden usar las líneas CHB-1 a CHB-12, línea RUES1, línea RUES2 y líneas HUES1 a HUES28 distribuidas por ESI Bio, la línea H1 y la línea H9 distribuidas por WiCell Research, y las líneas KhES-1, línea KhES-2, línea KhES-3, línea KhES-4, línea KhES-5, línea SSES1, línea SSES2 y línea SSES3 distribuidas por Riken como líneas ESC humanas.

[0031]

Las "células madre pluripotentes inducidas" corresponden a las células que se obtienen reprogramando células somáticas de mamíferos o células madre indiferenciadas mediante la introducción de factores

particulares (factores de reprogramación nuclear). En la actualidad, existen varias "células madre pluripotentes inducidas" e iPSC establecidas por Yamanaka, et al. introduciendo los 4 factores Oct3 / 4, Sox2, Klf4, c-Myc en fibroblastos murinos (Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676); iPSCs derivadas de células humanas, establecidas mediante la introducción de 4 factores similares en fibroblastos humanos (Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872); las Nanog-iPSC se establecen clasificando las células usando la expresión de Nanog como indicador después de la introducción de los 4 factores (Okita, K., Ichisaka, T. y Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.); iPSCs producidas por un método que no emplea c-Myc (Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106); iPSCs establecidas mediante la introducción de 6 factores por medio de un método libre de virus (Okita K et al. Nat. Methods 2011 May; 8(5): 409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31 (3) 458-66); y similares también se pueden usar. Además, las células madre pluripotentes inducidas se establecieron al introducir los 4 factores OCT3/4, SOX2, NANOG y LIN28 por Thomson et al. (Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.); células madre pluripotentes inducidas producidas por Daley et al. (Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146); las células madre pluripotentes inducidas producidas por Sakurada et al.

(publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar No. 2008-307007) y similares pueden ser usadas.

Además, cualquiera de las células madre pluripotentes inducidas conocidas en la técnica descrita en todos los artículos publicados (por ejemplo, Shi Y., Ding S., et al., Células Madre, (2008) Volumen 3, Ejemplar 5, 568- 574; Kim JB., Scholer HR., Et al., Naturaleza, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., Y otros, Biotecnología Natural(2008) 26, No. 7, 795-797) o patentes (por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Japonesa sin examinar No. 2008-307007, Publicación de Solicitud de Patente Japonesa sin examinar No. 2008-283972, US2008-2336610, US2009-047263, WO2007-069666, WO2008-118220, WO2008- 124133, WO2008-151058, WO2009-006930, WO2009-006997, WO2009-007852).

Las líneas celulares pluripotentes inducidas disponibles incluyen varias líneas de iPSC establecidas por NIH, Riken, la Universidad de Kyoto y similares. Ejemplos de tales líneas de iPSC humanas incluyen la línea HiPS-RIKEN-1A, la línea HiPS-RIKEN-2A, la línea HiPS-RIKEN-12A y la línea Nips-B2 de Riken, y la línea 253G1, la línea 253G4, la línea 1201C1, la línea 1205D1, la 1210B2 línea, línea 1383D2, línea 1383D6, línea 201B7, línea 409B2, línea 454E2, línea 606A1, línea 610B1, línea 648A1, línea 1231A3 y línea FfI-01s04 de la Universidad de Kyoto. La línea 1231A3 es preferible.

[0032]

La inducción de la diferenciación de las células madre en las células de la cresta neural se puede realizar de acuerdo con un método conocido que está descrito en una literatura (por ejemplo, literatura no patente 1). En el caso de usar, por ejemplo, iPSC humanas, las iPSC se inoculan en una placa o un recipiente similar, se cultivan por adherencia y posteriormente se cultivan por adherencia en un medio que comprende un inhibidor de TGF β y un inhibidor de GSK3 β , y por lo tanto pueden diferenciarse en las células de la cresta neural.

[0033]

En dicho sentido, el medio utilizado no está particularmente limitado y, por ejemplo, se utilizan adecuadamente el medio TeSR1 y el medio químicamente definido (CDM). Además del medio BME, medio BGJb, medio CMRL 1066, medio Glasgow MEM, medio MEM mejorado (IMEM), medio MDM mejorado (IMDM), medio 199 medio, medio Eagle MEM, medio α MEM, medio DMEM (glucosa alta o baja glucosa), se puede usar medio DMEM/F12, medio Ham, medio RPMI 1640, medio Fischer y un medio mixto de los mismos, etc.

[0034]

El medio CDM no está particularmente limitado y, por ejemplo, puede usarse un medio preparado a partir del medio Dulbecco modificado de Iscove (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.). Como un ejemplo más específico, se utiliza el medio CDM descrito en la literatura no patente 1. El medio CDM puede contener

apotransferrina, monotioglicerol, albúmina de suero bovino (BSA), insulina y/o un antibiótico.

[0035]

El período de cultivo antes de la adición del inhibidor de TGF β y el inhibidor de GSK3 β puede ser un período en el que se obtiene el número de células de interés. Este período de cultivo no está particularmente limitado y es, por ejemplo, de 2 a 6 días.

[0036]

Los ejemplos del inhibidor de TGF β incluyen SB431542 (4- (5-benzol [1,3] dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il) -benzamida, 4- [4- (1,3-benzodioxol-5-il) -5- (2-piridinil) -1H-imidazol-2-il] -benzamida, 4- [4- (3,4-metilendioxifenil) -5- (2-piridilo) -1H-imidazol-2-il] -benzamida), A83-01 (3- (6-metilpiridin-2-il) -1-feniltiocarbamoil-4-quinolin-4-ilpirazol), LDN193189 (4- [6- [4- (1-piperazinil) fenil] pirazolo [1,5-a] pirimidin-3-il] -quinolina), Wnt3a/BIO (miembro de la familia Wnt 3A/(2'Z, 3'E) -6-bromoindirrubina -3 -oxima), BMP4 (proteína morfogenética ósea 4), GW788388 (4- [4- [3- (piridin-2-il) -1H-pirazol-4-il] -piridin-2-il] -N - (tetrahidro-2H-piran-4-il) benzamida), SM16 (4- [4- (1,3-benzodioxol-5-il) -5- (6-metil-2-piridinil) -1H-imidazol- 2-il] -biciclo [2.2.2] octano-1-carboxamida), IN-1130 (3 - [[5- (6-metil-2-piridinil) -4- (6-quinoxalinil) -1H-imidazol- 2-il] metil] -benzamida), GW6604 (2-fenil-4- [3- (piridin-2-il) -1H-pirazol-4-il] piridina) y SB505124 (2- (5-benzo [1 , 3] dioxol-5-il-

2-terc-butil-3H-imidazol-4-il) -6-metilo piridina). Dos o más de estas sustancias pueden usarse combinadas. [0037]

La concentración del inhibidor de TGF β que se va a agregar en esta etapa se ajusta de manera apropiada dependiendo del tipo de inhibidor de TGF β que se va a agregar, y es, por ejemplo, de 1 a 40 μ M, preferiblemente de 5 a 20 μ M.

Si se usa SB431542 (4- [4- (1,3-benzodioxol-5-il) -5- (2-piridinil) -1H-imidazol-2-il] -benzamida), la concentración del inhibidor TGF β que se añadirá se puede configurar particularmente a 10 μ M. [0038]

Los ejemplos del inhibidor de GSK3 β incluyen CHIR98014 (2 - [[2 - [(5-nitro-6-aminopiridina-2-il)amino]etil]amino] -4- (2,4-diclorofenil) -5- (1H -imidazol-1-il) pirimidina), CHIR99021 (6 - [[2 - [[4- (2,4-diclorofenil) -5- (4-metil-1H-imidazol-2-il) -2- pirimidinilo]amino]etil]amino] nicotinonitrilo), CP21R7 (3- (3-amino-fenil) -4- (1-metil-1H-indol-3-il) -pirrol-2,5-diona), LY2090314 (3- [9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2- (1-piperidinilcarbonil) pirrolo [3,2,1-jk] [1,4] benzodiazepin-7-il] -4-imidazo [1, 2-a] piridin-3-il-1h-pirrol-2,5-diona), TDZD-8 (4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-diona), SB216763 (3- (2,4-diclorofenil) -4- (1-metil-1H-indol-3-il) -1H-pirrol-

2,5-diona), TWS-119 (3-[6-(3-aminofenilo)]-7H-pirrolo [2,3-d] pirimidin-4-iloxi]fenol), kenpaulona, 1-azakenpaulona, SB415286 (3 - [(3-cloro-4-hidroxifenil) amino]-4-(2-nitrofenilo)-1H-pirrol-2,5-diona), AR-AO144-18 (1 - [(4-metoxifenil)metil] -3- (5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea), CT99021, CT20026, BIO ((2'Z, 3'E) - 6-bromoindirubin-3'-oxima), BIO-ace toxina, complejo piridocarbazol-rutenio ciclopentadienilo, OTDZT, alfa-4-dibromoacetofenona y litio. Dos o más de estas sustancias pueden usarse combinadas.

El inhibidor de GSK3 β no se limita a estas sustancias, y los oligonucleótidos antisentido y siRNA contra el ARNm de GSK3 β , los anticuerpos que se unen a GSK3 β , las mutaciones dominantes negativas de GSK3 β y similares también se pueden usar como inhibidores de GSK3 β . Estos inhibidores de GSK3 β están disponibles a nivel comercial o pueden sintetizarse de acuerdo con un método conocido.

[0039]

La concentración del inhibidor de GSK3 β que se va a agregar en esta etapa se ajusta de manera apropiada dependiendo del tipo de inhibidor de GSK3 β que se va a agregar, y es, por ejemplo, de 0,01 a 20 μ M, preferiblemente de 0,1 a 10 μ M.

En caso de usar CHIR99021, la concentración del inhibidor de GSK3 β a agregar no está particularmente limitada y puede ser, por ejemplo, de 0,1 a 1 μ M, preferiblemente de 0,5 a 1 μ M, particularmente, 1 μ M.

[0040]

El período de cultivo después de la adición del inhibidor de TGF β y el inhibidor de GSK3 β puede ser un período en el que se obtiene el número de células de interés. Este período de cultivo no está particularmente limitado y es, por ejemplo, de 6 a 14 días, de 8 a 12 días, de 9 a 11 días o 10 días.

[0041]

Para el cultivo adherente se utiliza un recipiente de cultivo, por ejemplo, una placa, un frasco, una microplaca o una hoja de cultivo celular como OptiCell (nombre del producto) (Nunc). El recipiente de cultivo se trata preferiblemente en la superficie para mejorar la adherencia a las células (hidrofilicidad), o se recubre con un sustrato para la adherencia celular como colágeno, gelatina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, laminina, fibronectina, Matrigel (por ejemplo, BD Matrigel (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.)), o vitronectina.

El "Matrigel" es una preparación soluble de membrana basal extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) rico en proteína de la matriz extracelular. El recipiente de cultivo recubierto con Matrigel está disponible en el mercado. El Matrigel está compuesto principalmente de laminina, colágeno IV, heparán sulfato de proteoglicanos y entactina/nidógeno-1,2. El Matrigel contiene, además de estos componentes principales, TGF β , un factor de crecimiento de células epiteliales, un factor de crecimiento similar a la insulina, un factor

de crecimiento de fibroblastos, activadores de plasminógeno tisular 3,4, y otros factores de crecimiento producidos naturalmente en el tumor EHS.

La temperatura del cultivo no está particularmente limitada y es de 30 a 40°C (por ejemplo, 37°C). La concentración de dióxido de carbono en el recipiente de cultivo es del orden de, por ejemplo, 5 %.

[0042]

En una realización de la presente invención, a fin de obtener las células de la cresta neural para ser sometidas al paso (2), se pueden adquirir células de la cresta neural comercialmente disponibles. Entre los ejemplos de células de la cresta neural disponibles en el mercado figuran las células de la vaina de la raíz externa del folículo piloso humano (fabricadas por Cosmo Bio Co., Ltd.) y la línea de células de la cresta neural craneal del ratón O9-1 (fabricada por Merck Millipore).

[0043]

En una realización de la presente invención, con el fin de obtener las células de la cresta neural para ser sometidas al paso (2), se pueden recoger las células de la cresta neural que se producen de forma natural. Según se informa, las células de la cresta neural existen en los cuerpos vivos de los mamíferos, por ejemplo, en el tubo neural de un embrión humano alrededor de 30 días después de la fecundación, en el tubo neural de un

embrión de ratón alrededor del noveno día del feto, y en la piel de adultos de humanos, cerdos y roedores Betters et al., *Developmental biology*, 2010, 344 (2): 578-592; Jiang et al., *Development*, 2000, 127 (8): 1607-1616; Dupin et al., *Developmental biology*, 2012, 366 (1): 83-95; y Nagoshi et al., *Cell Stem Cell* 2, April 2008, 392-403). Esas células de la cresta neural pueden recogerse mediante un método conocido (por ejemplo, Motohashi et al., *Biology open*, 2016, 5: 311-322; y Pfaltzgraff et al., *Journal of Visualized Experiments*, 2012, 64: 4134) y someterse al paso (2).

[0044]

[Paso (2) de células de la cresta neural de cultivo de expansión]

El paso (2) de cultivo de expansión de las células de la cresta neural es el paso de cultivo de suspensión de las células de la cresta neural en un medio que comprende un inhibidor GSK3 β y un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

[0045]

A este respecto, el medio utilizado no es particularmente limitado y, por ejemplo, se utiliza adecuadamente el medio CDM. Además, se puede utilizar el medio TeSR1, el medio BME, el medio BGJb, el medio CMRL 1066, el medio MEM de Glasgow, el medio MEM (IMEM) mejorado, el medio MDM (IMDM) mejorado, el medio 199, el medio MEM de Eagle, el medio α MEM, el medio DMEM (glucosa alta o glucosa baja), el medio DMEM/F12, el medio de Ham,

el medio RPMI 1640, el medio de Fischer y un medio mixto de los mismos, etc.

[0046]

El inhibidor de GSK3 β mencionado anteriormente puede utilizarse sin limitaciones particulares.

El inhibidor GSK3 β es preferiblemente al menos un miembro seleccionado del grupo formado por CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, la kenpaulona, AR-A0144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 y SB415286. El inhibidor de GSK3 β es particular y preferiblemente CHIR99021 o CP21R7.

[0047]

La concentración del inhibidor de GSK3 β que se añadirá en este paso es una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M (o una concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M). El propio CHIR99021 puede ser usado como el inhibidor de GSK3 β . En el caso de utilizar el propio CHIR99021 como inhibidor de GSK3 β , como se menciona más adelante, la concentración adecuada del inhibidor de GSK3 β que se debe añadir es una concentración superior a 1 μ M, preferiblemente 2 μ M o superior e inferior a 5 μ M, más preferiblemente superior a 2 μ M y 4,5 μ M o inferior, en particular preferiblemente 3 μ M o superior y 4,5 μ M o inferior. Así pues, en el caso de utilizar un inhibidor de GSK3 β distinto del CHIR99021 en este paso, la concentración del inhibidor de GSK3 β que debe añadirse es una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por el CHIR99021

con una concentración superior a 1 μM , preferiblemente una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por 2 μM o superior e inferior a 5 μM CHIR99021, más preferiblemente con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por más de 2 μM y 4,5 μM o inferior CHIR99021, particularmente preferiblemente con una concentración que muestre un efecto equivalente al exhibido por 3 μM o superior y 4,5 μM o inferior CHIR99021.

Las células de la cresta neural que mantienen la multipotencia se pueden cultivar y permitir que proliferen durante un período de cultivo de hasta más de 9 semanas (63 días) mediante el cultivo en suspensión de las células de la cresta neural en presencia del inhibidor de GSK3 β que tiene la concentración y el bFGF.
[0048]

En una realización de la presente invención, las "células de la cresta neural que mantienen la multipotencia" tienen capacidad de diferenciación en células nerviosas, células gliales y células estromales mesenquimales o capacidad de diferenciación en estas células así como en células óseas, condrocitos, células corneales y células pigmentarias.
[0049]

Las "células de la cresta neural que mantienen la multipotencia" pueden ser evaluadas por una pluralidad de métodos. Entre los ejemplos de estos métodos se

incluye, aunque no de manera exclusiva, un método para inducir la diferenciación de las células de la cresta neural que se van a evaluar en cada linaje, como las células nerviosas, las células gliales y las células del estroma mesenquimal. Siempre que las células de la cresta neural a evaluar puedan realmente diferenciarse en células nerviosas, células gliales y células del estroma mesenquimal, etc., las células de la cresta neural a evaluar pueden determinarse como las "células de la cresta neural que mantienen la multipotencia". Otro ejemplo del método incluye un método de medición de la expresión de una proteína o gen marcador. Siempre que se exprese un factor de transcripción SOX10 en las células de la cresta neural a evaluar, las células de la cresta neural a evaluar pueden determinarse como las "células de la cresta neural que mantienen la multipotencia". El SOX10 puede ser detectado por medio de un ensayo inmunológico, por ejemplo, ELISA, inmunotinción o citometría de flujo, utilizando un anticuerpo específico para la proteína marcadora. El gen marcador puede detectarse mediante un método de amplificación y/o detección de ácido nucleico conocido en la técnica, por ejemplo, RT-PCR, microarray o biochip. Cuando las células tienen un inserto de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína reportera (por ejemplo, Nano-Lantern (Saito K. et al., "Proteínas luminiscentes para imágenes de alta velocidad de una sola célula y de todo el cuerpo". Nat. Commun., 2012; 3: 1262)) después del gen SOX10, un gen marcador de los NCC,

y expresar una proteína de fusión de SOX10 y la proteína reportera bajo el control del promotor de SOX10, se puede utilizar un método para detectar la proteína reportera (por ejemplo, la medición de la intensidad de la fluorescencia).

[0050]

El efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una "concentración superior a 1 μM " (o una "concentración superior a 1 μM e inferior a 5 μM ") en cuanto al inhibidor de GSK3 β puede evaluarse con base en la actividad inhibidora de GSK3 β . La actividad inhibidora del GSK3 β puede medirse por un método conocido en sí mismo y puede medirse, por ejemplo, por un método descrito en Patsch et al., *Nature cell biology*, 2015, 17 (8): 994-1003 or Uno et al., *Brain Res.*, 2009, 1296: 148-163. Concretamente, la actividad inhibidora de GSK3 β puede medirse utilizando la función de regulación de la expresión génica (particularmente, la función de fosforilación de β -catenina) de GSK3 β en la ruta Wnt/ β -catenina como índice. Más específicamente, tal enfoque implica: i) El cultivo de células cuya expresión del gen reportero está suprimida bajo el control de GSK3 β , en presencia y ausencia del inhibidor de GSK3 β ; ii) La medición de un nivel de expresión del gen reportero en presencia y ausencia del inhibidor de GSK3 β ; y iii) La determinación de la actividad inhibidora GSK3 β del

inhibidor de GSK3 β sobre la base de un aumento del nivel de expresión del gen reportador en presencia del inhibidor de GSK3 β con respecto al nivel de expresión del gen reportero en ausencia del inhibidor de GSK3 β (véase el Ejemplo 9).

Cuando el inhibidor de GSK3 β exhibe una actividad inhibitoria de GSK3 β (% de inhibición) equivalente a la exhibida por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M en los resultados de la medición, se determina que el inhibidor de GSK3 β exhibe el "efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 (actividad inhibitoria de GSK3 β equivalente al efecto exhibido por CHIR99021) con una concentración superior a 1 μ M". En este contexto, el valor "equivalente" (% de inhibición) se refiere a un valor que puede variar hasta más o menos 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o 1 % del valor de referencia. Preferiblemente, el valor se refiere a un rango de menos o más de 15 %, 10 %, 5 % o 1 % del valor de referencia.

[0051]

El "efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una "concentración superior a 1 μ M" (o una "concentración superior a 1 μ M e inferior a 5 μ M") en cuanto al inhibidor de GSK3 β puede evaluarse más apropiadamente sobre la base de un período durante el cual las "células de la cresta neural que mantienen la multipotencia" son cultivables cuando las células de la cresta neural se cultivan de la misma manera que un método descrito en los ejemplos en este documento.

Cuando las "células de la cresta neural que mantienen la multipotencia" son cultivables, aumentando su número desde el comienzo del cultivo, mediante el cultivo de las células de la cresta neural en un medio que comprende el inhibidor de GSK3 β durante un período equivalente al del cultivo de las células de la cresta neural en un medio que comprende CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M, se determina que el inhibidor de GSK3 β exhibe el "efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 (actividad proliferativa de las células de la cresta neural equivalente al efecto exhibido por CHIR99021) con una concentración de más de 1 μ M". En este contexto, el valor "equivalente" (período) se refiere a un valor que puede variar hasta más o menos de 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor de referencia. Preferiblemente, el valor se refiere a un rango de menos o más de 15 %, 10 %, 5 % o 1 % del valor de referencia.

[0052]

En el caso de usar CHIR99021 como inhibidor de GSK3 β , la concentración del inhibidor de GSK3 β a agregar es una concentración mayor de 1 μ M preferiblemente 2 μ M o mayor y menor de 5 μ M, más preferiblemente mayor de 2 μ M y 4,5 μ M o inferior, particularmente preferiblemente 3 μ M o superior y 4,5 μ M o inferior. Se ha encontrado que el efecto de permitir que las células de la cresta neural proliferen mientras se mantiene la capacidad de

diferenciación durante un período prolongado es alto para 2 μM o más alto e inferior a 5 μM CHIR99021 y más alto, particularmente, para 3 μM o más alto y 4,5 μM o inferior CHIR99021. Específicamente, CHIR99021 con una concentración de 3 a 4,5 μM permitió el cultivo y la proliferación de células de la cresta neural que mantuvieron la multipotencia durante 112 días (16 semanas) o más. Además, CHIR99021 con una concentración de 2 μM mantuvo la multipotencia durante 9 semanas (63 días) o más. Por otro lado, 1 μM o 5 μM CHIR99021 disminuyó el número de células que mantuvieron la multipotencia en 3 semanas (21 días) y 6 semanas (42 días), respectivamente, de cultivo.

En el caso de usar CP21R7 como el inhibidor de GSK3 β , la concentración del inhibidor de GSK3 β a añadir es una concentración de más de 0,1 μM , preferiblemente 0,5 μM o más, más preferiblemente 1 μM o más. Se ha encontrado que el efecto de permitir que las células de la cresta neural proliferen mientras se mantiene la capacidad de diferenciación durante un período prolongado es alto para 0,5 μM o más alto y 1 μM o más bajo CP21R7. Específicamente, CP21R7 con una concentración de 0,5 a 1 μM permitió el cultivo y la proliferación de células de la cresta neural que mantuvieron la multipotencia durante 84 días (12 semanas) o más. Por otro lado, 0,1 μM CP21R7 disminuyó el número de células que mantuvieron la multipotencia en 3 semanas (21 días) de cultivo.

[0053]

La concentración de bFGF que debe añadirse no está particularmente limitada y es, por ejemplo, de 10 a 200 ng/ml, preferiblemente de 20 a 40 ng/ml.

[0054]

El medio puede complementarse con un inhibidor TGF β y/o un factor de crecimiento epidérmico (EGF), además del inhibidor de GSK3 β y el bFGF. El inhibidor de TGF β mencionado anteriormente puede utilizarse sin limitaciones particulares.

El inhibidor de TGF β es preferiblemente al menos un miembro seleccionado del grupo formado por SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3A/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 y SB505124. El inhibidor de TGF β es particularmente preferible SB431542.

La concentración del inhibidor de TGF $\beta\beta$ a añadir se ajusta adecuadamente según el tipo de inhibidor TGF3 β a añadir y es, por ejemplo, de 1 a 50 μ M, preferiblemente de 5 a 20 μ M.

En el caso de utilizar el SB431542, la concentración del inhibidor de TGF β a añadir no está particularmente limitada y puede ser, por ejemplo, de 1 a 40 μ M, preferiblemente de 5 a 20 μ M, particularmente, 10 μ M.

La concentración del FEG que se ha de añadir no está particularmente limitada y es, por ejemplo, de 5 a 100 ng/ml, preferiblemente de 20 a 40 ng/ml.

[0055]

En el cultivo en suspensión, las células de la cresta neural obtenidas en el paso (1) se separan del recipiente de cultivo y luego se dispersan en un medio, y se forma una masa celular agregada mientras que los componentes del medio y la concentración interna de oxígeno del medio se uniformizan mediante agitación o sacudida. La velocidad de agitación adecuada se establece de acuerdo con la densidad celular y el tamaño del recipiente de cultivo. Una agitación o sacudida excesiva ejerce una presión física sobre las células e inhibe la formación de masa celular agregada. Así pues, la velocidad de agitación se controla para poder uniformizar los componentes del medio y la concentración interna de oxígeno del medio y para no inhibir la formación de masa celular agregada. El cultivo en suspensión puede realizarse sin agitar o sacudir.

La temperatura del cultivo no está particularmente limitada y es de 30 a 40°C (por ejemplo, 37°C). La concentración de dióxido de carbono en el recipiente de cultivo es del orden de, por ejemplo, 5 %.

[0056]

El período de cultivo en este paso puede ser un período en el que se obtiene el número de células de interés. Este paso permite el cultivo y la proliferación de las células de la cresta neural que mantienen la multipotencia durante un largo período. La relación entre las células de la cresta neural que mantienen la multipotencia y la población de células cultivadas es de

al menos 20 % o más, 30 % o más, o 40 % o más y puede mantenerse preferiblemente en 50 % o más, 60 % o más, o 70 % o más, más preferiblemente 80 % o más, 90 % o más, o 95 % o más.

Durante este cultivo, las células son subcultivadas apropiadamente. El subcultivo se realiza cada 5 u 8 días después de la inoculación, por ejemplo. Preferiblemente, el intervalo entre subcultivos es un período suficiente para la expansión de la masa celular agregada, y este período es más corto que aquel en el que una masa celular agregada demasiado grande impide que el oxígeno o los nutrientes lleguen a las células dentro de la masa celular agregada.

El período en que este paso permite el cultivo y la proliferación de las células de la cresta neural que mantienen la multipotencia no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, de 7 días, 14 días, 21 días, 28 días, 35 días, 42 días, 49 días, 56 días, 63 días, 70 días, 77 días, 84 días, 91 días, 98 días, 105 días o 112 días o más. Este período es preferiblemente de 35 días o más, más preferiblemente de 42 días o más, además preferiblemente de 63 días o más, en particular preferiblemente de 84 días o más, más preferiblemente de 112 días o más.

[0057]

[Medio]

La presente invención también proporciona un medio para el uso en el método para producir células de la cresta neural y el método para proliferar las células de la cresta neural mencionadas anteriormente, que comprenden las células de la cresta neural. La composición preferida del medio es como se mencionó anteriormente.

[0058]

[Reserva de células]

La presente invención también proporciona una reserva congelada que comprende células de la cresta neural obtenidas por el método para producir células de la cresta neural y el método para proliferar las células de la cresta neural mencionadas anteriormente. Las células de la cresta neural son positivas para la expresión de SOX10 y positivas para la expresión de p75, un marcador de antígeno de superficie celular de NCC.

[0059]

La reserva congelada puede producirse separando las células de la cresta neural obtenidas por el método de producción de células de la cresta neural y el método de proliferación de células de la cresta neural del medio, y suspendiendo las células de la cresta neural en una solución de criopreservación para su congelación. La separación de las células de la cresta neural del medio puede realizarse mediante un colador celular o por centrifugación. Las células así separadas pueden lavarse, si es necesario. La reserva congelada puede comprender una población celular adicional además de las

células de la cresta neural y preferiblemente comprende células de la cresta neural purificadas. La purificación de las células de la cresta neural puede realizarse, por ejemplo, separando las células de la cresta neural de otras poblaciones celulares mediante la clasificación de las células utilizando la expresión de marcadores descrita anteriormente como índice. Como solución de conservación celular puede utilizarse un reactivo convencional para la crioconservación de las células. Por ejemplo, el medio de congelación Cryostem y CELLBANKER(R) están disponibles comercialmente.

[0060]

La reserva congelada puede utilizarse como material de partida para inducir la diferenciación de las células de la cresta neural para obtener células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células corneales y células pigmentarias. Además, la reserva congelada puede utilizarse para preparar modelos de tejido que tengan como componente las células de la cresta neural.

[0061]

[Método para producir varias células de la cresta neural]

El método para producir células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células corneales o células pigmentarias

según la presente invención comprende los pasos que se indican a continuación. De estos pasos, el paso (i) es el mismo que el paso (2) del método para producir células de cresta neural según la presente invención o como método para la proliferación de células de la cresta neural según la presente invención.

(i) someter a cultivo por suspensión a las células de la cresta neural en un medio que comprende un inhibidor de GSK3 β y un factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), en donde el medio comprende el inhibidor de GSK3 β con una concentración que exhibe un efecto equivalente al exhibido por CHIR99021 con una concentración superior a 1 μ M; y

(ii) permitir que las células de la cresta neural obtenidas en el paso (i) se diferencien en células de al menos un linaje seleccionado del grupo que consiste en células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células corneales y células pigmentarias.

[0062]

[Paso de inducción en varias células]

Según el método de producción de células de la cresta neural y el método de proliferación de células de la cresta neural de acuerdo con la presente invención, se pueden obtener células de la cresta neural que mantienen la multipotencia para diferenciarse en células nerviosas, células gliales y células del estroma mesenquimal o la multipotencia para diferenciarse en

estas células, así como células óseas, condrocitos, células corneales y células pigmentarias.

La inducción de la diferenciación de las células de la cresta neural en células de cada linaje seleccionadas de células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células de la córnea y células pigmentarias puede realizarse de acuerdo con un método conocido descrito en una literatura (por ejemplo, las literaturas lo patentadas 1 a 4).

[0063]

Específicamente, la inducción de la diferenciación en las células nerviosas puede realizarse con base en un método descrito en la literatura no patente 1 o 4.

Por ejemplo, las células de la cresta neural se inoculan en una placa recubierta de fibronectina, y el medio se reemplaza con DMEM/F12 complementado con el suplemento N-2 (17502-048, Gibco), BDNF (028-16451, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), GDNF (074-06264, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), NT-3 (141-06643, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y NGF (141-07601, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), seguido de un cultivo a 37°C durante 14 días bajo el 5 % de CO₂.

Alternativamente, las células de la cresta neural se inoculan en una placa y se cultivan durante 1 día en medio CDM que contiene 10 μ M SB431542 y 1 μ MCHIR99021 , y luego se reemplaza el medio con medio Neurobasal

(21103-049, Gibco) suplementado con suplemento B-27 (17504-044, Gibco), suplemento de N-2, L-glutamina (073-05391, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), penicilina/estreptomicina (15140-122, Gibco), BDNF, GDNF, NT-3 y NGF, seguido de cultivo a 37°C durante 35 días bajo 5 % de CO₂.

Las células cultivadas de esta manera se fijan en un 4 % de paraformaldehído, y la aparición de la diferenciación en células nerviosas que expresan la proteína TUBB3 se confirma por un método de inmunotinción.

[0064]

La inducción de la diferenciación en las células gliales puede realizarse mediante un enfoque similar a la inducción de la diferenciación en las células nerviosas por el método descrito en la literatura no patentada 1 o 4. Después de completar el período de inducción de la diferenciación, la aparición de la diferenciación en células gliales se confirma a partir de la expresión de la proteína GFAP.

[0065]

La inducción de la diferenciación en células del estroma mesenquimal puede realizarse con base en un método descrito en la literatura no patente 1. Concretamente, por ejemplo, las células de la cresta neural se inoculan a una densidad de $6,5 \times 10^4$ células/cm² en una placa y se cultivan durante 1 día en un medio CDM que contiene 10 µM SB431542 y 1 µM CHIR99021. Un día después, el medio es reemplazado por αMEM (Nacalai Tesque,

Inc.) que contiene un 10 % de suero bovino fetal (FBS, Nichirei Corp.). Alrededor de 4 días después, se observa un cambio morfológico en la célula. Las células se subcultivan por desprendimiento de las células con 0,25 % de tripsin-EDTA (Gibco) y la inoculación a una densidad de $1,0 \times 10^4$ células/cm². 14 días después del comienzo de la inducción de la diferenciación, la expresión de CD73, CD44, CD45 y CD105, marcadores de antígenos de superficie de las células estromales mesenquimales humanas, es analizada por el FACS para confirmar la diferenciación en células del estroma mesenquimal.

[0066]

La inducción de la diferenciación en las células óseas puede realizarse con base en un método descrito en la literatura no patente 1. Específicamente, por ejemplo, las células del estroma mesenquimal descritas anteriormente se inoculan a $2,5 \times 10^5$ células en una placa recubierta de fibronectina, y se cultivan durante 2 semanas en α MEM que contiene un 10 % de FBS, 0,1 μ M dexametasona, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y 10 mM de β -glicerofosfato. El medio se reemplaza una vez cada dos días durante la primera semana. Se detecta un nódulo calcificado mediante una tinción roja de alizarina para confirmar la diferenciación en células óseas.

[0067]

La inducción de la diferenciación en los condrocitos puede realizarse con base en un método descrito en la

literatura no patente 1. Concretamente, por ejemplo, las células del estroma mesenquimal descritas anteriormente se suspenden a una concentración de $1,5 \times 10^5$ células/5 μ l en DMEM:F12 (Invitrogen Corp.) que contiene un 1 % (v/v) de premezcla ITS+ (BD), 0,17 mM AA2P, 0,35 mM de prolina (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,15 % (v/v) de glucosa (Sigma-Aldrich Co. LLC), 1 mM de Na-piruvato (Invitrogen Corp.), 2 mM de GlutaMax, 0,05 mM de MTG, 40 ng/ml de PDGF-BB y 1 % (v/v) de FBS (Nichirei Corp.). 5 μ l de la suspensión de células se coloca en una placa recubierta de fibronectina, y se cultiva durante 1 hora. Una hora más tarde, se añade 1 ml del medio para la inducción de la diferenciación descrito anteriormente. De 3 a 5 días después del inicio de la inducción de la diferenciación, se añaden 10 ng/ml de TGF β 3 (R&D Systems, Inc.). A los 10 días del inicio de la inducción de la diferenciación, se añaden 50 ng/ml de BMP4. Las células se cultivan durante 16 días, y la aparición de la diferenciación en condrocitos se confirma con la tinción de azul alciano.

[0068]

La inducción de diferenciación en células corneales puede realizarse con base en un método descrito en la literatura no patente 1. Específicamente, por ejemplo, las células de la cresta neural se inoculan en una placa recubierta de fibronectina, y se cultivan durante 1 día en un medio CDM que contiene 10 μ M de SB431542 y 1 μ M de

CHIR99021. Un día después, el medio es reemplazado por un medio acondicionado preparado por el cultivo de células endoteliales de la córnea humana en el medio CDM. El medio es reemplazado una vez cada dos días. A los 12 días del comienzo de la inducción de la diferenciación, la expresión de ZO-1, una molécula marcadora de células corneales, se confirma por un método de inmunotinción, y la expresión de COL4A1 y COL8A1 se confirma por qPCR. [0069]

La inducción de la diferenciación en células pigmentarias puede realizarse con base en un método descrito en la literatura no patente 1. Específicamente, por ejemplo, las células de la cresta neural se inoculan en una placa recubierta de fibronectina, y se cultivan durante 1 día en un medio CDM que contiene 10 μ M SB y 1 μ M CHIR. Un día más tarde, el medio es reemplazado por un medio CDM que contiene 1 μ M CHIR, 25 ng/ml de BMP4 y 100 nM de endotelina-3 (American Peptide Company). El medio es reemplazado una vez cada dos días. A los 7 días del comienzo de la inducción de la diferenciación, la diferenciación en la célula pigmentaria se confirma a partir de la expresión de los genes MITF y c-KIT. [0070]

Las células nerviosas, las células gliales, las células del estroma mesenquimatosas, las células óseas, los condrocitos, las células corneales y las células

pigmentarias obtenidas pueden usarse como preparación celular para la medicina regenerativa.

[0071]

Las células de la cresta neural son células que tienen multipotencia para diferenciarse en muchos tipos de células, tales como células nerviosas, células gliales, células del estroma mesenquimal, células óseas, condrocitos, células corneales y células pigmentarias, y la capacidad de auto-proliferarse. La aplicación de las células de la cresta neural a los medicamentos celulares para la medicina regenerativa, etc., es esperada con base en dicha capacidad que se encuentra en las células de la cresta neural. Si las células de la cresta neural que mantienen la multipotencia se pueden mantener de manera eficiente o si se permite que proliferen, su producción a gran escala es posible. Si se puede preparar un stock de las células de la cresta neural que mantienen la multipotencia, dicho stock es útil como materia prima para los medicamentos celulares. Por ejemplo, el uso de células (p. Ej., células de la cresta neural) posicionó a la mitad la diferenciación de las células madre en las células de interés (por ejemplo, las células nerviosas) como material de partida, con el fin de, por ejemplo, simplificar los métodos de producción, acortar los períodos de producción, o reducir el costo de producción en la producción de medicamentos celulares. Se considera que la presente invención es capaz de producir una técnica útil para este fin. Esto puede ser válido no solo para la

producción de medicamentos celulares sino también para la construcción de sistemas de detección que utilizan varias células, etc.

Ejemplos

[0072]

[Ejemplo 1: Cultivo de expansión de células de la cresta neural]

[Inducción de la diferenciación de iPSC en NCC]

Se permitió la diferenciación de las iPSC humanas en células de la cresta neural (NCC) de acuerdo con el método descrito en la literatura no de patentes 1. Las iPSC utilizadas fueron las iPSC humanas SOX10-Nano-Lantern Reporter (línea 201B7) descritas en la literatura no de patentes 4. Esta línea celular tiene un inserto de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína fluorescente Nano-Lantern (Saito K. et al., "Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging." Nat. Commun., 2012; 3: 1262) posterior al gen SOX10, un gen marcador de NCC, y expresa una proteína de fusión de SOX10 y Nano-Lantern bajo el control del promotor SOX10.

[0073]

Las iPSC se inocularon en una placa de cultivo recubierta con Matrigel, se sometieron a cultivo celular adherente durante 4 días en medio TeSR1 y luego se sometieron a cultivo celular adherente durante 10 días en medio CDM que contiene 10 μ M SB431542 (inhibidor del

TGF β) y 1 μ M CHIR99021 (inhibidor de la GSK3 β), y posteriormente se permitió que se diferenciaron en NCC.
[0074]

[Cultivo de expansión de NCC]

Se separaron las NCC del plato y se cultivaron en suspensión en medio CDM que contenía 10 μ M SB431542, 3 μ M CHIR99021, 40 ng/ml bFGF y 40 ng/ml EGF. Las células se subcultivaron cada 7 días.

[0075]

El cambio en el número total de células después de iniciar el cultivo de expansión se muestra en la Figura 1, y el cambio en el porcentaje de células positivas para la expresión de SOX10 se muestra en la Figura 2. Para medir el porcentaje de células positivas para la expresión de SOX10, se disoció una masa celular agregada usando el Reactivo de Disociación Celular StemPro Accutase (Invitrogen Corp.) para preparar suspensiones unicelulares. Las suspensiones unicelulares en tampón FACS (BSA HBSS al 2 %) suplementadas con 1 μ g/mL de PI (yoduro de propidio, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se filtraron a través de un tubo con malla de nylon de 35 μ m (BD Falcon) y luego se analizaron usando un citómetro de flujo (FACS Aria, BD Biosciences) para medir la proporción de células positivas para GFP en células vivas (células negativas para PI). El número total de células aumentó a lo largo de todo el período, y se confirmó un alto porcentaje de células positivas para

expresión de SOX10 incluso en 121 días de cultivo. El SOX10 expresado sirve como un marcador de NCC que tienen multipotencia. Estos resultados indican que las NCC se proliferan mientras se mantiene la capacidad de diferenciación durante un largo período de cultivo.

[0076]

[Ejemplo 2: Estudio sobre concentración de aditivo de medio]

Se estudió la influencia de las concentraciones del inhibidor de GSK3 β , bFGF y EGF en la capacidad de las NCC de auto-proliferarse y su capacidad de diferenciación en el cultivo de expansión de las NCC. A continuación, el cultivo de expansión se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, a menos que se especifique lo contrario.

[0077]

La Figura 3 muestra el cambio en el número total de células cuando se fijaron las concentraciones de bFGF y EGF a 20 ng/ml (A) o 40 ng/ml (B) y se fijó la concentración de CHIR99021 a 1, 2, 3, o 5 μ M. La tasa de proliferación celular por 1 semana a una concentración de CHIR99021 de 1 μ M o 2 μ M fue de 8 a 30 veces (véase también el Ejemplo 8 mencionado más adelante). La Figura 4 muestra el cambio en el número total de células cuando se fijaron las concentraciones de bFGF y EGF en 40 ng/ml y se fijó la concentración de CHIR99021 en 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 μ M. Las concentraciones de bFGF, EGF y CHIR99021

no tuvieron influencia en el cambio en el número total de células.

[0078]

La Figura 5 muestra el cambio en el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 cuando se fijaron las concentraciones de bFGF y EGF a 20 ng/ml (A) o 40 ng/ml (B) y se fijó la concentración de CHIR99021 a 1, 2, 3, or 5 μ M. La Figura 6 muestra el cambio en el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 cuando se fijaron las concentraciones de bFGF y EGF a 40 ng/ml y se fijó la concentración de CHIR99021 a 3, 3.5, 4, 4.5, or 5 μ M. Cuando la concentración de CHIR99021 era de 3 a 4.5 μ M, se confirmó el 90 % o más de las células positivas para expresión de SOX10 en el periodo de cultivo largo (a los 121 días de cultivo). Incluso cuando la concentración de CHIR99021 era de 2 μ M, se confirmó aproximadamente el 55 % o más de las células positivas para expresión de SOX10 en el periodo de cultivo largo (a los 63 días de cultivo). Por otro lado, cuando la concentración de CHIR99021 era de 5 μ M, aproximadamente el 55 % o más porcentaje de las células positivas para expresión de SOX10 se mantuvo hasta los 42 días de cultivo, mientras que el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 disminuyó hasta el 5 % o menos a los 63 días de cultivo. Cuando la concentración de CHIR99021 era de 1 μ M, se observó una disminución en el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 en el periodo de cultivo corto (a los

21 días de cultivo) y el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 fue de aproximadamente del 25 % o menos a los 63 días de cultivo. Las concentraciones de bFGF y EGF1 no influyeron sobre el cambio en el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10.
[0079]

[Ejemplo 3: Estudio sobre el inhibidor de GSK3 β]

Las NCC se sometieron a cultivo por expansión de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que el inhibidor de GSK3 β usado en el cultivo de expansión de las NCC se cambió de CHIR99021 a CP21R7. Se fijó la concentración de CP21R7 en 0.1, 0.5 o 1 μ M.
[0080]

El cambio en el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 se ilustra en la Figura 7. En la concentración de CP21R7 de 0.5 o 1 μ M, se confirmó un alto porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 incluso a los 84 días de cultivo. Por otro lado, en la concentración de CP21R7 de 0.1 μ M, el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10 empezó a disminuir en el periodo de cultivo corto (a los 21 días de cultivo).

[0081]

[Ejemplo 4: Inducción de la diferenciación de células de la cresta neural en células nerviosas]

Se confirmó la capacidad de diferenciación de las NCC cultivadas por expansión en el Ejemplo 1 en células nerviosas.

La inducción de la diferenciación en las células nerviosas se realizó a partir del método descrito en la literatura no patente 4.

Las NCCs sometidas a cultivo en expansión mediante cultivo de mantenimiento por 30 días se inocularon a 5×10^5 células en una placa y se cultivaron por 1 día en medio CDM que contenía 10 μM SB431542 y 1 μM CHIR99021. Un día después, el medio se remplazó con medio neurobasal (21103-049, Gibco) suplementado con Suplemento B-27 (17504-044, Gibco), Suplemento N-2 (17502-048, Gibco), L-glutamina (073-05391, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), Penicilina / Estreptomicina (15140-122, Gibco), BDNF (028-16451, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), GDNF (074-06264, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), NT-3 (141-06643 , Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y NGF (141-07601, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), seguido de cultivo a 37°C durante 35 días bajo 5 % de CO₂. Durante este tiempo de cultivo, se reemplazó el medio cada 3 a 4 días.

[0082]

Las células se fijaron mediante la adición de paraformaldehído al 4 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e incubación a 4°C durante 1 hora. Se hizo reaccionar las células con un anticuerpo anti-TUBB3 (845502, BioLegend, Inc.) y un anticuerpo anti-GFAP (ab7260, Abcam PLC) como anticuerpos primarios, luego se hizo reaccionar secuencialmente con un anticuerpo

secundario marcado con Alexa 488 (Invitrogen Corp.) y un anticuerpo secundario marcado con Alexa 568 como anticuerpos secundarios compatibles con la especie animal inmunizada de los anticuerpos primarios, y luego se observaron bajo un microscopio de fluorescencia.

Se confirmó la aparición de diferenciación en células nerviosas que expresan la proteína TUBB y células gliales que expresan la proteína GFAP a partir de las NCC cultivadas en mantenimiento durante 30 días.

[0083]

La capacidad de diferenciación en células nerviosas se confirmó, además, de la misma manera que se hizo anteriormente usando NCC cultivadas por expansión mediante cultivo de mantenimiento durante 84 días. Como resultado, se confirmó la diferenciación en células nerviosas (células positivas para periferina) y células gliales (células positivas para GFAP).

[0084]

[Ejemplo 5: Inducción de la diferenciación de células de la cresta neural en células as]pigmentarias]

Se confirmó la capacidad de diferenciación de las NCC cultivadas por expansión en el Ejemplo 1 en células nerviosas.

La inducción de la diferenciación en melanocitos se realizó a partir del método descrito en la literatura no patente 1.

Las NCC cultivadas por expansión mediante cultivo de mantenimiento durante 84 días se inocularon en una placa de 6 pocillos recubierta con fibronectina y se cultivaron por 1 día en medio CDM que contiene 10 μM SB431542 y 1 μM CHIR99021. Un día después, se reemplazó el medio con medio CDM suplementado con BMP4 y endotelina-3 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), seguido de cultivo a 37°C durante 7 días con CO₂ al 5 %. Durante este tiempo de cultivo, se reemplazó el medio cada 2 días.

[0085]

Las células se fijaron mediante la adición de paraformaldehído al 4 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e incubación a 4°C durante 1 hora. Se hizo reaccionar las células con un anticuerpo anti-MITF (Sigma-Aldrich Co. LLC) como anticuerpo primario, adicionalmente se hizo reaccionar secuencialmente con un anticuerpo secundario marcado con Alexa 568 (Invitrogen Corp.) como un anticuerpo secundario compatible con la especie animal inmunizada del anticuerpo primario, y luego se observaron bajo un microscopio de fluorescencia. Se confirmó la aparición de diferenciación en melanocitos que expresan la proteína MITF a partir de las NCC cultivadas en mantenimiento durante 84 días.

[0086]

[Ejemplo 6: Inducción de la diferenciación de células de la cresta neural en células del estroma mesenquimal]

Se confirmó la capacidad de diferenciación de las NCC cultivadas por expansión en el Ejemplo 1 en células del estroma mesenquimal.

La inducción de la diferenciación en las células del estroma mesenquimal se realizó a partir del método descrito en la literatura no patente 1.

Las NCC cultivadas por expansión mediante cultivo de mantenimiento durante 84 días se inocularon en una placa para cultivo celular de 6 cm de diámetro recubierta con fibronectina y se cultivaron por 1 día en medio CDM que contiene 10 μ M SB431542 y 1 μ M CHIR99021. Un día después, se reemplazó el medio con CTS StemPro MSC SFM (Gibco, A1033201). Se subcultivaron las células mediante disociación de las células con el reactivo de disociación de células Accutase StemPro (Invitrogen Corp.) y la inoculación a una densidad de 1,0 a 2,0 $\times 10^6$ células/placa (para la placa de 10 cm).

[0087]

14 días después del inicio de la inducción de la diferenciación en células del estroma mesenquimatoso, las NCC se inmunotintaron con anticuerpo CD73 (BD), anticuerpo CD44 (BD), anticuerpo CD45 (BD) y anticuerpo CD105 (eBioscience, Inc.), anticuerpos contra los marcadores de antígeno de superficie de células del estroma mesenquimal humanas, seguido de análisis FACS. Se confirmó la aparición de diferenciación en células del estroma mesenquimal que expresan cada una de las proteínas CD44, CD73 y CD0105 y que no expresan ninguna

proteína CD45 a partir de las NCC cultivadas en mantenimiento durante 84 días.

[0088]

[Ejemplo 7: Inducción de la diferenciación de células de la cresta neural en células óseas, condrocitos o adipocitos]

Se confirmó la capacidad de diferenciación de las NCC cultivadas por expansión en el Ejemplo 1 en células óseas, condrocitos o adipocitos.

La inducción de la diferenciación en células óseas, condrocitos o adipocitos se realizó a partir del método descrito en la literatura no patente 1.

Se permitió que las NCC cultivadas por expansión mediante cultivo de mantenimiento durante 84 días se diferenciaran en células del estroma mesenquimal mediante el método descrito en el Ejemplo 6. Las células del estroma mesenquimal se inocularon a $4,0 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 12 pocillos recubierta con fibronectina y se cultivaron por 4 semanas en α MEM que contenía FBS al 10 %, 0,1 μ M de dexametasona, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y 10 mM β -glicerofosfato para inducir la diferenciación en células óseas. El medio se reemplazaba una vez cada dos a tres días. Se detectó un nódulo calcificado por tinción con rojo de alizarina para confirmar la diferenciación en células óseas.

[0089]

La inducción la diferenciación en condrocitos se realizó de la siguiente manera: las células del estroma mesenquimal en las que se indujo la diferenciación de las NCC cultivadas por expansión mediante cultivo de mantenimiento por 84 días se suspendieron a una concentración de 1.5×10^5 células/5 μ l en DMEM:F12 (Invitrogen Corp.) que contenía 1 % (v/v) de ITS + premezcla (BD), 0.17 mM de AA2P, 0.35 mM de prolina(Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,1 mM de Dexametasona (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,15 % (v/v) de glucosa (Sigma-Aldrich Co. LLC), 1 mM de Na-piruvato (Invitrogen Corp.), 2 mM de GlutaMax, 0,05 mM de MTG, 40 ng/ml de PDGF-BB y 1 % (v/v) de FBS (Nichirei Corp.). La suspensión celular se detectó a 5 μ l/pocillo en una placa de 12 pocillos recubierta con fibronectina y se cultivó durante 1 hora. Una hora más tarde, se añadió un medio suplementado con 10 ng/ml de TGF β 3 (R&D Systems, Inc.) y 100 ng/ml de BMP7 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 1 ml/pocillo. Las células se cultivaron durante 10 días, y la aparición de diferenciación en condrocitos se confirmó por tinción con azul alciano.

[0090]

La inducción de la diferenciación en adipocitos se realizó de la siguiente manera: las células del estroma mesenquimal en las que se indujo la diferenciación de las NCC cultivadas por expansión mediante cultivo de mantenimiento durante 84 días se inoculó a $4,0 \times 10^4$

células/pocillo en una placa de 24 pocillos recubierta con fibronectina y se cultivó durante 4 semanas en un medio unido a hMSC - BulletKit de medio de diferenciación adipogénica de células madre mesenquimales humanas (Lonza Japan Ltd.). El medio se reemplazaba una vez cada dos a tres días. Se detectaron gotitas de aceite dentro de las células teñidas por tinción con rojo petróleo O para confirmar la diferenciación en adipocitos.

[0091]

La tinción con rojo. S de alizarina de las células óseas se realizó de la siguiente manera: las células se fijaron mediante la adición de etanol al 100 % y la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se hizo reaccionar las células con solución de tinción roja de alizarina (Merck Millipore), se lavaron con agua, se secaron y luego se observaron bajo un microscopio.

La tinción con azul alciano de los condrocitos se realizó de la siguiente manera: las células fijadas mediante la adición de paraformaldehído al 4 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos se hicieron reaccionar con una solución de tinción de azul alciano al 1 % (Muto Pure Chemicals Co., Ltd.), se lavaron con agua y se secaron.

La tinción con rojo aceite O de los adipocitos se realizó de la siguiente manera: las células se fijaron en formalina al 10 % a temperatura ambiente durante 1 hora, se hicieron reaccionar con una mezcla 3:2 de una

dilución al 0,5 % de solución de rojo aceite O con isopropanol y agua a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se lavaron con agua. Las gotas de aceite se observaron bajo un microscopio.

[0092]

[Ejemplo 8: Estudio sobre concentración de aditivo de medio - 2]

Se estudió la influencia de la concentración de bFGF en la capacidad de las NCC de auto-proliferarse y su capacidad de diferenciación en el cultivo de expansión de las NCC. A continuación, el cultivo de expansión se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, a menos que se especifique lo contrario.

[0093]

La Figura 8 muestra el cambio en el número total de células cuando la concentración de CHIR99021 se ajustó a 1,5 μ M y la concentración de bFGF se ajustó a 10, 12.5, 15.0 o 17.5 ng/ml. La Figura 9 muestra el cambio en el porcentaje de células positivas para expresión de SOX10. La concentración de bFGF no influyó en el porcentaje de positividad de expresión de SOX10.

[0094]

El comportamiento del cambio en el número total de células fue sustancialmente el mismo dentro del rango de concentración de bFGF descrito anteriormente, y la tasa de proliferación celular estuvo dentro del rango de 6 a 13 veces durante 1 semana. La tasa de proliferación celular para 1 semana en el Ejemplo 2 estuvo dentro de

un rango más alto de 8 a 30 veces a la concentración de CHIR99021 de 1 μM o 2 μM y la concentración de bFGF de 20 ng/ml o 40 ng/ml (ver Figura 3), sugiriendo que el bFGF contribuye a la capacidad de las NCC de auto-proliferarse y tiene un rango de concentración adecuado de 20 a 40 ng/ml.

[0095]

[Ejemplo 9: Medición de la actividad inhibitoria de GSK3 β .

Se estableció un sistema experimental para evaluar la actividad inhibitoria de GSK3 β del inhibidor de GSK3 β .

[0096]

En la vía Wnt/ β -catenina, el GSK3 β funciona para fosforilar la β -catenina en ausencia de un ligando Wnt. La β -catenina fosforilada se ubiquitina y degrada dentro del proteasoma. Por consiguiente, se suprime la expresión génica posterior a la vía Wnt- β -catenina. Si se inhibe el GSK3 β en esta vía, la β -catenina se transloca al núcleo, sin degradarse, para inducir la expresión génica posterior a la vía Wnt- β -catenina junto con otros factores de transcripción como el factor de células T (TCF)/factor potenciador linfoide (LEF). La línea celular CellSensor LEF/TCF-bla HCT-116 (Thermo Fisher Scientific Inc., K1676) incorpora establemente LEF/TCF e incorpora un gen reportero (gen reportero beta-lactamasa) para expresar el gen reportero bajo el control de LEF/TCF. La expresión del gen reportero en esta línea

celular en ausencia del ligando Wnt sirve como índice para la inhibición de la función (función de fosforilación de β -catenina) de GSK3 β . La actividad inhibidora de GSK3 β del inhibidor de GSK3 β se midió mediante ensayo usando esta línea celular.

[0097]

El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo de Invitrogen Corp. (Protocolo de ensayo basado en células CellSensor (R) LEF/TCF-bla HCT 116).

Específicamente, se suspendieron células LEF/TCF-bla HCT-116 en un medio de ensayo (OPTI-MEM, FBS dializado al 0,5 %, 0,1 mM de NEAA, 1 mM de piruvato sódico, 100 U/ml/100 μ g/mL Pen/Strep) (312.500 células/ml). La suspensión celular se inoculó en cada pocillo de una placa de ensayo (10.000 células/pocillo) y se cultivó durante 16 a 24 horas.

Se añadió el inhibidor de GSK3 β (aquí se usó CHIR99021) a cada pocillo (concentración: 0,316, 1,00, 3,16, 10,0, 31,6, 100, 316, 1000, 3160 y 10000 nM), y las células se cultivaron durante 5 horas.

Se añadió una solución de sustrato de beta-lactamasa (mezcla de sustrato LiveBLAzer-FRET B/G (CCF4-AM)) a cada pocillo (8 μ L/pocillo) y se incubó durante 2 horas. Se midió un valor de fluorescencia en un lector de placa de fluorescencia. La medición se realizó en dos pocillos por cada condición de concentración.

[0098]

Los resultados se muestran en la "Tabla 1". La actividad inhibidora de GSK3 β exhibida por 1 μ M CHIR99021

fue de 113,5 (promedio de los dos pocillos) en términos del valor de fluorescencia.

La concentración que exhibe una actividad inhibitoria de GSK3 β equivalente a la exhibida por 1 μ M CHIR99021 (valor de fluorescencia: 113,5) también se puede determinar en cuanto a inhibidores de GSK3 β distintos a CHIR99021 midiendo los valores de fluorescencia en cada condición de concentración usando este sistema experimental y preparando curvas de calibración según el método estándar.

[0099]

[Tabla 1]

Concentración del compuesto (nM)	Valor de fluorescencia	
	Pocillo 1	Pocillo 2
10000	88	73
3160	99	136
1000	114	113
316	101	96
100	75	60
31,6	21	45
10,0	12	23
3,16	0	14
1,00	0	0
0,316	6	0