

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 814**

51 Int. Cl.:

A61F 2/14 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02780078 .8**

96 Fecha de presentación: **13.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1454600**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **LÁMINA SEMEJANTE A LA ECTOCÓRNEA Y MÉTODO PARA CONSTRUIR LA MISMA.**

30 Prioridad:
19.11.2001 JP 2001352675

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.01.2012

73 Titular/es:
ArBlast Co., Ltd.
Kobe International Business Center Bldg. 5-5-2,
Minatojima-minamimachi Chuo-ku
Kobe Hyogo 650-0047, JP

72 Inventor/es:
NAKAMURA, Takahiro y
KINOSHITA, Shigeru

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 814 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lámina semejante a la ectocórnea y método para construir la misma

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere a una lámina semejante al epitelio corneal (ectocórnea), a una lámina de trasplante del epitelio corneal (ectocórnea) y a un método para construir la misma. La presente invención puede usarse para tratar enfermedades (enfermedades de la superficie ocular) que necesitan el trasplante del epitelio corneal. Particularmente, la presente invención proporciona un medio eficaz para tratar la enfermedad corneal que ocurre en ojos bilaterales.

Técnica anterior

10 En el tratamiento quirúrgico para la enfermedad de la superficie ocular en la que la córnea está cubierta con el epitelio conjuntival para causar opacidad, actualmente, se usa el trasplante del epitelio corneal. Sin embargo, en queratoconjuntivitis refractaria con inflamación grave (síndrome de Setevens-Johnson, perfigoide ocular cicatricial, corrosión corneal, y semejantes), el pronóstico parece extremadamente pobre. Por lo tanto, se piensa que la principal razón es porque el epitelio corneal de un sistema diferente (alo) que tiene una fuerte antigenicidad es reconocido y rechazado inmunológicamente por el sistema inmune de un huésped. Además, la complicación causada por la
15 administración sistémica y local de una gran cantidad de fármaco inmunosupresor para evitar el rechazo después de la operación es uno de los factores principales para un mal pronóstico. Por otra parte, cuando se usa el epitelio corneal de alo, existe un problema que es la escasez de donantes. Por lo tanto, se piensa que el trasplante usando epitelio corneal autólogo es ideal. En el caso de enfermedad ocular unilateral (tal como corrosión corneal), existe una publicación de que el epitelio corneal del ojo normal podría trasplantarse con éxito en el ojo afectado. Sin embargo, la mayor parte de las
20 enfermedades corneales intratables son enfermedades oculares bilaterales, de manera que la técnica mencionada anteriormente no puede usarse en la actualidad.

Descripción de la invención

25 Con lo anterior en mente, es un objeto de la presente invención proporcionar una lámina semejante al epitelio corneal, una lámina de trasplante de epitelio corneal, y un método para construir la misma. En particular, es un objeto proporcionar un material de trasplante capaz de ser usado para tratar pacientes que tienen dificultad para obtener células madre corneales autólogas.

Los presentes inventores han investigado a la vista de WO/0180760 A1 que describe: una lámina semejante al epitelio corneal, que comprende una capa de células que comprende una estructura en capas de células epiteliales de origen limbal (corneal).

30 Ueda M.; Nagoya. Med. Sci., 58, 13-28, 1995 describe: injertos de piel obtenidos a partir de células epiteliales de origen mucosal que comprenden una capa de células que comprende una estructura en capas. problemas mencionados anteriormente. En primer lugar, como en los pacientes con enfermedad ocular bilateral, no pueden obtenerse células madre corneales autólogas, los presentes inventores han pensado que sería ideal usar un tejido mucosal autólogo de otros sitios normales y seleccionar un epitelio mucosal oral como una fuente de células. Esto es porque se sugiere que el
35 epitelio mucosal oral tiene células madre en el tejido mucosal local y tiene una baja diferenciación y alto potencial de división y es más fácilmente disponible comparado con la epidermis que es otro tejido epitelial. Por otra parte, los presentes inventores han empleado membrana amniótica como un sustrato para cultivar la célula epitelial mucosal oral.

40 En primer lugar, se recogió un epitelio mucosal oral de un conejo y se quitó el tejido subcutáneo del epitelio por un procedimiento enzimático para preparar una suspensión celular que contiene células madre. Después, la suspensión celular se inoculó en la membrana amniótica de la que se raspó el epitelio y se cocultivó con células de apoyo (células alimentadoras), induciendo de esta manera la diferenciación. Como resultado, pudo obtenerse con éxito una capa de células semejante al epitelio corneal (lámina semejante al epitelio corneal) en la que se formó una estructura en capas de las células epiteliales mucosales orales. Cuando se observó la morfología de la capa de células obtenida, 5 a 6 capas de las células estaban en forma de lámina en la membrana amniótica y estaban presentes células con forma plana en la
45 capa más superior. Además, la capa de células tenía una alta transparencia. La estructura de la capa de células obtenida fue extremadamente similar a la del epitelio corneal. Por otra parte, la capa de células semejante al epitelio corneal se trasplantó autológamente en los ojos de un conejo junto con la membrana amniótica usada como un sustrato y se observó la supervivencia de ésta. Como resultado, se confirmó que el injerto había sobrevivido y se había extendido en la superficie ocular y se mantuvo la transparencia post-operatoria. Esto muestra que el uso del epitelio mucosal oral
50 como una fuente de células y la membrana amniótica como un sustrato permite la construcción de la capa de células semejante al epitelio corneal (lámina semejante al epitelio corneal), en la que se forma una estructura en capas de las células epiteliales mucosales orales. Además, esta capa semejante al epitelio corneal puede sustituirse adecuadamente

por el epitelio corneal. La presente invención se completó basada en los descubrimientos e incluye las configuraciones siguientes.

[1] Una lámina semejante al epitelio corneal, que incluye una capa de células en la que se forma una estructura en capas de células obtenidas de las células epiteliales mucosales orales.

5 [2] La lámina semejante al epitelio corneal descrita en [1], en la que las células de la capa más exterior no están cornificadas.

[3] La lámina semejante al epitelio corneal descrita en [1] o [2], en la que las células de la capa más exterior tienen forma plana.

10 [4] La lámina semejante al epitelio corneal descrita en cualquiera de [1] a [3], en la que la lámina semejante al epitelio corneal tiene una función de barrera.

[5] Una lámina de trasplante de epitelio corneal, que comprende una capa de células en la que se forma una estructura en capas de células obtenidas de las células epiteliales mucosales orales en una capa de colágeno.

[6] La lámina de trasplante de epitelio corneal descrita en [5], en la que las células de la capa más exterior de la capa de células no están comificadas.

15 [7] La lámina de trasplante de epitelio comeal descrita en [5] o [6], en la que las células de la capa más exterior de la capa de células tienen forma plana.

[8] La lámina de trasplante de epitelio corneal descrita en una cualquiera de [5] a [7], en la que la capa de colágeno se obtiene de membrana amniótica.

20 [9] La lámina de trasplante de epitelio corneal descrita en una cualquiera de [5] a [7], en la que la capa de colágeno consiste en membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio.

[10] La lámina de trasplante de epitelio comeal descrita en una cualquiera de [5] a [9], en la que lámina de trasplante de epitelio comeal tiene una función de barrera.

[11] Un método para construir una lámina semejante al epitelio corneal, incluyendo el método:

a) cultivar células epiteliales mucosales orales en una capa de colágeno; y

25 b) cuando las células epiteliales mucosales orales han proliferado y se ha formado una estructura en capas de las células, poner en contacto la capa más exterior con el aire.

[12] El método para construir una lámina semejante al epitelio comeal descrito en [11], en el que la etapa a) se lleva a cabo en coexistencia con células de apoyo.

30 [13] El método para construir una lámina semejante al epitelio comeal descrito en [11], en el que la etapa a) se lleva a cabo en coexistencia con células de apoyo y en un estado en el que existe una membrana de aislamiento, con un tamaño de poro a través del cual las células de apoyo no pueden pasar, entre las células de apoyo y la capa de colágeno.

[14] El método para construir una lámina semejante al epitelio corneal descrito en una cualquiera de [11] a [13], en el que la capa de colágeno se obtiene de membrana amniótica.

35 [15] El método para construir una lámina semejante al epitelio corneal descrito en una cualquiera de [11] a [13], en el que la capa de colágeno consiste en membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio.

[16] Un método para construir una lámina semejante al epitelio corneal, que incluye las etapas de:

inocular células de apoyo en un primer contenedor para formar una capa de células de apoyo;

40 disponer un segundo contenedor, que tiene una cara inferior hecha de una membrana de aislamiento con un tamaño de poro a través del cual las células de apoyo no pueden pasar, en el primer contenedor de manera que la cara inferior está localizada en un medio de cultivo;

formar una capa de colágeno en la cara inferior del segundo contenedor;

inocular células epiteliales mucosales orales en la capa de colágeno;

cultivar las células epiteliales mucosales orales para formar una estructura en capas de las células; y

poner en contacto la capa más exterior de la estructura en capas de las células epiteliales mucosales orales con el aire.

[17] El método para construir la lámina semejante al epitelio corneal descrito en [16], en el que la capa de colágeno se obtiene de membrana amniótica.

- 5 [18] El método para construir la lámina semejante al epitelio corneal descrito en [16], en el que la capa de colágeno consiste en membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio.

Obsérvese aquí que la "lámina semejante al epitelio corneal" de la presente memoria se usa como un término para significar una capa de células que tiene una característica similar a la del epitelio corneal y que es capaz de ser sustituida por el epitelio corneal.

- 10 De manera similar, "lámina de trasplante del epitelio corneal" se usa como un término para significar una composición que tiene una capa de células que tiene una característica similar a la del epitelio corneal y que es capaz de ser usada en trasplante para reconstruir el epitelio corneal.

Descripción Breve de los Dibujos

- 15 La Fig. 1 muestra imágenes de las membranas amnióticas tomadas por un microscopio electrónico de barrido. La Fig. 1A muestra una imagen de la superficie de la membrana amniótica en el estado normal (es decir, el estado en el que no se lleva a cabo el tratamiento para raspar el epitelio); y la Fig. 1B muestra la superficie de la membrana amniótica después de raspar el epitelio (en disolución al 0,02% de EDTA). En la Fig. 1A, se observa epitelio amniótico con forma poligonal. Por otra parte, en la Fig. 1B, no se observa el epitelio amniótico y se confirma que el epitelio se ha eliminado completamente.

- 20 La Fig. 2 es una vista transversal que muestra esquemáticamente un estado de instrumentos, etc. cuando las células epiteliales mucosales orales se cultivan en membrana amniótica. En una placa de cultivo 1, se dispone un inserto de cultivo 2. En la superficie inferior de la placa de cultivo 1, se forma una capa de células 3T3 5. Además, en la superficie inferior del inserto de cultivo 2, se pone la membrana amniótica 3 y las células epiteliales mucosales orales 4 se cultivan en ésta. El número de referencia 6 indica un medio de cultivo.

- 25 La Fig. 3 es una imagen tomada por un microscopio óptico, que muestra un estado confluyente de la capa de epitelio mucosal oral.

La Fig. 4 muestra una imagen teñida con HE (hematoxilina-eosina) de las células epiteliales mucosales orales formadas en la membrana amniótica. Se observa que se forma una capa que incluye 5 a 6 capas de células que son similares al epitelio corneal.

- 30 La Fig. 5 muestra imágenes de la capa de células epiteliales mucosales orales (la lámina de epitelio mucosal oral) en la membrana amniótica teñida con anticuerpos producidos frente a queratina 3 (K3) y queratina 12 (K12), respectivamente. Se observa la capacidad de tinción de la queratina 3 mientras que no se observa la capacidad de tinción de la queratina 12. Obsérvese aquí que la parte teñida se muestra por apertura.

- 35 La Fig. 6 muestra imágenes de la capa de células epiteliales mucosales orales (la lámina de epitelio mucosal oral) en la membrana amniótica teñida con anticuerpos producidos frente a queratina 4 (K4) y queratina 13 (K13), respectivamente. Se observa la capacidad de tinción de la queratina 4 y la queratina 13. Obsérvese aquí que la parte teñida se muestra por apertura.

- 40 La Fig. 7 muestra imágenes de la capa de células epiteliales mucosales orales (la lámina de epitelio mucosal oral) en la membrana amniótica teñida con anticuerpos producidos frente a queratina 1 (K1) y queratina 10 (K10), respectivamente. No se observa la capacidad de tinción de la queratina 1 ni capacidad de tinción de la queratina 10.

La Fig. 8 es una imagen que muestra la superficie del ojo de un conejo al que se ha quitado el epitelio de la córnea y de la conjuntiva y que se tiñó con agentes de tinción de fluoresceína. Una parte teñida con los agentes de tinción de fluoresceína se muestra por apertura. Estas imágenes muestran que la superficie completa del ojo se tiñe con fluoresceína y que el epitelio se ha quitado completamente.

- 45 La Fig. 9 es una imagen que muestra la superficie del ojo de un conejo cuatro semanas después de la eliminación del epitelio de la córnea y de la conjuntiva. Esta imagen muestra que la transparencia de la superficie ocular se pierde debido a la invasión de la conjuntiva con tejido cicatricial de la parte periférica.

La Fig. 10 es una imagen que muestra un estado de la superficie ocular después del trasplante de la lámina de trasplante de epitelio corneal. Esta imagen muestra que la superficie ocular (parte trasplantada) tiene transparencia.

5 La Fig. 11 muestra una imagen teñida con agentes de tinción de fluoresceína 48 después del trasplante de la lámina de trasplante de epitelio corneal. Una parte teñida con los agentes de tinción de fluoresceína se muestra por apertura. Esta imagen muestra que la superficie ocular (parte trasplantada) no se tiñe con los agentes de tinción de fluoresceína y que el injerto sobrevivió en la superficie ocular. Mientras, se encontró que toda la parte periférica del injerto se tiñe con los agentes de tinción de fluoresceína.

10 La Fig. 12 muestra una imagen teñida con agentes de tinción de fluoresceína 10 días después del trasplante de la lámina de trasplante de epitelio corneal. Una parte teñida con los agentes de tinción de fluoresceína se muestra por apertura. Se observa que una región no teñida se extiende y que el injerto permanece en la superficie ocular y se extiende además hacia la periferia comparado con 48 horas después del trasplante.

La Fig. 13 muestra estados de la superficie ocular antes de la operación (imagen de la izquierda) y cinco meses después de la operación (imagen de la derecha) de un paciente con defecto epitelial prolongado en el estadio agudo de trauma químico.

15 La Fig. 14. muestra estados de la superficie ocular antes de la operación (imagen de la izquierda) y dos meses después de la operación (imagen de la derecha) de un paciente (síndrome del epitelio queratoconjuntivo cicatricial) en el estadio crónico de trauma químico.

La Fig. 15 muestra los estados de la superficie ocular antes de la operación (imagen de la izquierda) y un mes después de la operación (imagen de la derecha) de un paciente con penfigoide ocular cicatricial.

20 Mejor Modo para Llevar a Cabo la Invención

El primer aspecto de la presente invención se refiere a una lámina semejante al epitelio corneal que comprende una capa de células en la que se forma una estructura en capas de células obtenidas de células epiteliales mucosales orales.

25 La "capa de células en la que se forma una estructura en capas de células obtenidas de células epiteliales mucosales orales" en la presente memoria indica una capa de células formada cultivando células la parte del epitelio mucosal oral como material de partida para que proliferen, de manera que al menos una parte de ellas se diferencia y forma capas. Las células para formar la capa de células se obtienen, por ejemplo, de células epiteliales mucosales tales como células del epitelio de la mucosa marginal interna oral, del parte labial, células de la parte del paladar, células la parte bucal, y semejantes. La obtención de dichas células puede confirmarse por la indicación de que la queratina 4 o la queratina 13, que son específicas de la célula epitelial mucosal, se expresa en las células que forman la capa de células.

30 Alternativamente, también puede confirmarse por la indicación de que se expresa la queratina 3. Se sabe que esta queratina 3 es una de las queratinas específicas de la córnea pero se ha confirmado que también se expresa en la célula epitelial mucosal oral. Obsérvese aquí que puede decirse que es preferible usar células epiteliales mucosales orales para los materiales para producir composiciones para el trasplante del epitelio corneal desde el punto de vista de que esta queratina 13 (queratina específica de la córnea) se expresa.

35 Por otra parte, también examinando las expresiones de los genes específicos para una célula epitelial mucosal oral, puede confirmarse que las células que forman la capa de células se obtienen de células epiteliales mucosales orales.

Preferiblemente, la lámina semejante al epitelio corneal de la presente invención tiene una o más de una de las características o propiedades siguientes. De manera particularmente preferida, la lámina semejante al epitelio corneal de la presente invención tiene todas las características o propiedades siguientes.

40 (1) Las células de la capa más alta no están cornificadas. Ésta es una de las características del epitelio corneal. Cando se observa esta característica, la lámina semejante al epitelio corneal de la presente invención es similar al epitelio corneal y se espera que presente la misma función que la del epitelio corneal. Obsérvese aquí que "cornificada" también es referida como "queratinizada", que representa el fenómeno en el que se genera queratina en una célula y el orgánulo de la célula tal como el núcleo se pierde. Puede confirmarse si las células están cornificadas o no, por ejemplo, por la presencia o ausencia de planicidad o núcleo en una célula.

45

(2) Las células de la capa más alta tienen forma plana. Esto es lo mismo que decir que se configura una capa de células epiteliales mucosales orales formando una capa de células que tiene forma plana en una capa de células que tiene aproximadamente forma cuboidal. Se piensa que cuando la capa más alta se cubre con las células de forma plana, la estanqueidad entre las células se incrementa y se consigue una función de barrera mencionada más adelante. También, en el epitelio corneal, las células de la capa más alta tienen forma plana. Cuando se observa esta característica, la

50

lámina semejante al epitelio corneal de la presente invención es similar al epitelio comeal y se espera que presente la misma función que la del epitelio corneal.

5 (3) Se proporciona una función de barrera. La función de barrera significa una función para evitar la infiltración de líquido, gas o semejantes desde la superficie o una función para evitar que el líquido se libere a través de la capa de la superficie. Cuando se proporciona dicha función de barrera, es posible mantener la humedad (lagrime) en la superficie después del trasplante y evitar que se libere más humedad de la necesaria. La córnea puede mantener la humedad en la superficie de ésta al tener una función de barrera y, de esta manera, resiste el parpadeo. Por lo tanto, la función de barrer es una de las características más importantes requeridas para un material para el trasplante de córnea. Cuando se observa esta característica, la lámina semejante al epitelio corneal de la presente invención es similar al epitelio corneal y se espera que presente la misma función que la del epitelio corneal. Se puede comprobar si esta función de barrera se proporciona o no examinando el grado de infiltración de una disolución que incluya un indicador tal como peroxidasa de rábano.

10 Esta lámina semejante al epitelio corneal puede usarse como material de trasplante (sustituto del epitelio comeal) en un paciente con córnea dañada o defectuosa, etc. En el trasplante, es preferible que se fije un injerto en y se permita que sobreviva fijándolo al tejido circundante con una sutura quirúrgica. Además, es preferible que después del trasplante, la superficie de la parte trasplantada esté protegida cubriéndola temporalmente con una lente de contacto terapéutica.

15 El segundo aspecto de la presente invención proporciona una lámina de trasplante de epitelio corneal que tiene las configuraciones siguientes. Es decir, proporciona una lámina de trasplante de epitelio comeal, que comprende una capa de células en la que se forma una estructura en capas de células obtenidas de las células epiteliales mucosales orales en una capa de colágeno. En otras palabras, proporciona una lámina de trasplante de epitelio corneal en la que la lámina semejante al epitelio comeal mencionada anteriormente se forma en una capa de colágeno. Es preferible que la capa de colágeno en la presente memoria se obtenga de membrana amniótica. Es preferible además usar la membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio por el procedimiento de raspado, etc. Puede confirmarse si la capa de colágeno se ha hecho o no de la membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio examinando que una célula de la capa del epitelio amniótico no está contenida en la capa de colágeno. Obsérvese aquí que es preferible usar la membrana amniótica humana como la membrana amniótica.

20 La lámina de trasplante de epitelio corneal puede usarse como material de trasplante (sustitución del epitelio corneal) en pacientes con córnea dañada o defectuosa, etc. En este caso, la lámina se trasplanta en la parte defectuosa del epitelio corneal de manera que el lado de la capa de colágeno esté localizado en el lado del globo ocular. En el trasplante, es preferible estimular la supervivencia del injerto fijándolo al tejido circundante con una sutura quirúrgica. Además, es preferible que después del trasplante, la superficie de la parte trasplantada esté protegida cubriéndola temporalmente con una lente de contacto terapéutica.

25 La lámina semejante al epitelio corneal y la lámina de trasplante de epitelio corneal mencionadas anteriormente pueden construirse por los métodos siguientes.

30 El tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método para construir una lámina semejante al epitelio comeal e incluye las etapas siguiente de:

a) cultivar células epiteliales mucosales orales en una capa de colágeno; y

b) cuando las células epiteliales mucosales orales han proliferado y se ha formado una estructura en capas de las células, poner en contacto la capa más exterior con el aire.

35 En la presente memoria, los tipos de colágeno como material crudo de la capa de colágeno no están particularmente limitados y pueden usarse colágeno tipo I, colágeno tipo III y colágeno tipo IV y semejantes. Puede usarse una pluralidad de colágenos en combinación de éstos. Dichos colágenos pueden extraerse y purificarse a partir del tejido conectivo de la piel y cartilago, etc. de animales tales como cerdo, bovino, ovejas, y semejantes, por un método de solubilización ácida, método de solubilización alcalina y método de solubilización con oxígeno y semejantes. Obsérvese aquí que para el propósito de disminuir la antigenicidad, un denominado aterocolágeno obtenido eliminando telopéptido por el tratamiento con el uso de enzima catabólica tal como pepsina, tripsina, etc.

40 Es preferible que como la capa de colágeno, se use uno obtenido de membrana amniótica, particularmente obtenido de membrana amniótica humana. En la presente memoria, la capa de colágeno se "obtiene de membrana amniótica" en la presente memoria significa de manera amplia que la capa de colágeno se obtiene usando membrana amniótica como material de partida. La membrana amniótica humana es una membrana que cubre la capa más exterior del útero y de la placenta y se forman una membrana basal y una capa de epitelio en tejido parenquimático que es rico en colágeno. La membrana amniótica humana puede recogerse, por ejemplo, de membrana embrionaria humana, placenta, etc. obtenida en el momento del nacimiento en el parto. Específicamente, la membrana amniótica humana puede prepararse tratando

5 y purificando el material integrado incluyendo membrana embrionaria humana, placenta y cordón umbilical obtenidos justo después de la parto. El método para tratar y purificar puede emplear un método descrito en JP 5(1993)-5698A, etc. Es decir, la membrana amniótica se separa de la membrana embrionaria obtenida en el parto y se quita el tejido remanente por un tratamiento físico tal como lavado con ultrasonidos y un tratamiento enzimático y semejantes. Después, se lleva a cabo un proceso de lavado apropiado y así puede prepararse membrana amniótica humana.

La membrana amniótica humana así preparada puede crioconservarse antes de su uso. La membrana amniótica humana puede congelarse en una mezcla de líquido con una proporción igual de volumen de DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) y glicerol, por ejemplo, a -80°C . Mediante la crioconservación, puede esperarse no sólo la mejora de la operación sino también la reducción de la antigenicidad.

10 Puede usarse la membrana amniótica intacta como una capa de colágeno pero es preferible que se use la membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio por un tratamiento de raspado, etc. Por ejemplo, después de descongelar, la membrana amniótica humana crioconservada se somete a un tratamiento con EDTA o enzima proteolítica de manera que se pierde la adhesión entre las células y después se raspa el epitelio usando un raspador celular, etc. Así, puede prepararse la membrana amniótica humana a la que se ha quitado el epitelio.

15 En la capa de colágeno, se cultivan las células epiteliales mucosales orales. Se sugiere que el epitelio mucosal oral tiene células madre y se piensa que es fácil inducir la diferenciación de éstas en células que forman una capa de células semejante al epitelio. Además, el uso de células epiteliales mucosales orales tiene las ventajas siguientes: pueden recogerse fácilmente; puede recogerse un gran número de células; y cuando se trata un paciente con enfermedad ocular bilateral, puede prepararse material del trasplante obtenido de las células autólogas. En particular, con la ventaja de que
20 un paciente del que no pueden recogerse células epiteliales corneales, pueden usarse materiales de trasplante obtenidos de células autólogas, se espera que el problema clínicamente importante acerca del rechazo inmunológico pueda resolverse significativamente.

25 Como la célula epitelial mucosal oral, puede usarse una célula que exista en la parte de la raíz del diente (una célula del epitelio mucosal marginal interna oral), una célula de la parte labial, una célula de a parte del paladar, una célula de la parte bucal, y semejantes. Entre éstas, es particularmente preferible usar una célula del epitelio mucosal marginal interna oral porque tiene una alta capacidad de proliferación y una baja antigenicidad. Las células epiteliales mucosales orales pueden recogerse mediante ablación de un sitio cuando existen células diana usando un escalpelo o raspándolas. El epitelio mucosal marginal interno oral puede recogerse del epitelio mucosal interno oral que se separa de la parte de transición del cemento esmalte. Obsérvese aquí que con el fin de eliminar impurezas tales como tejido conectivo, se
30 llevan a cabo preferiblemente un tratamiento con enzima tal como Dopasa o tripsina, etc., tratamiento por filtración.

Pueden usarse células epiteliales mucosales orales recogidas de una cavidad oral de un individuo distinto de un paciente al que se trasplanta una lámina semejante al epitelio corneal construida según la presente invención. Sin embargo, cuando se considera el rechazo inmunológico, preferiblemente se recogen y cultivan las células epiteliales mucosales orales de un paciente mismo.

35 Las células epiteliales mucosales orales así recogidas se cultivan en una capa de colágeno. Por ejemplo, se prepara un líquido de una suspensión de células epiteliales mucosales orales por el método mencionado anteriormente y se inocula en la capa de colágeno y se cultiva bajo condiciones de cultivo apropiadas. Cuando se usa membrana amniótica humana a la que se ha quitado el epitelio como la capa de colágeno, las células epiteliales mucosales orales se inoculan preferiblemente en el lado de la capa de colágeno con el lado al que se ha quitado y expuesto el epitelio (es decir, el lado
40 de la membrana basal). Se piensa que este lado es rico en colágenos de tipo IV y las células epiteliales mucosales orales inoculadas pueden proliferar y formar capas bien.

45 Las células epiteliales mucosales orales pueden inocularse en la capa de colágeno de manera que, por ejemplo, la densidad celular sea aproximadamente 1×10^3 células/cm² o, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1×10^3 células/cm² a aproximadamente 1×10^7 células/cm² y más preferiblemente aún en el intervalo de aproximadamente 1×10^4 células/cm² a aproximadamente 1×10^6 células/cm².

50 Las células epiteliales mucosales orales se cultivan preferiblemente en presencia de células de apoyo. La célula de apoyo es referida también como una célula alimentadora y suministra factor de crecimiento, etc. con el medio de cultivo. Cuando las células epiteliales mucosales orales se cultivan en coexistencia con las células de apoyo, mejora la eficacia de la proliferación de las células epiteliales mucosales orales. Como las células de apoyo pueden usarse, por ejemplo, una célula 3T3 (célula 3T3 de ratón Swiss, célula NIH3T3 de ratón, célula 3T3J2, etc.) y semejantes. Entre ellas, es preferible usar una célula NIH3T3 de ratón como una célula de apoyo desde el punto de vista de eficacia de la proliferación, facilidad de manejo, etc.

Es preferible que las células de apoyo se inactiven usando mitomicina C, etc. Es ventajoso porque se evita la inhibición de la proliferación de las células epiteliales mucosales orales debida a la proliferación de las células de apoyo en sí

mismas y se incrementa la eficacia de la proliferación de las células epiteliales mucosales orales. Dicha inactivación también puede llevarse a cabo por un tratamiento con radiación, etc.

5 Cuando las células epiteliales mucosales orales se cultivan en coexistencia con células de apoyo, es preferible que se proporcione una membrana de aislamiento, que tenga un tamaño de poro a través del cual no puedan pasar las células de apoyo, entre las células de apoyo y la capa de colágeno. El uso de la membrana de separación hace posible evitar que las células de apoyo entren en el lado de la capa de colágeno (es decir, el lado de las células epiteliales mucosales orales) en el momento del cultivo. Como resultado, las células de apoyo no pueden mezclarse en la lámina semejante al epitelio corneal obtenida finalmente. Esto significa que puede construirse una lámina semejante al epitelio corneal que carece del problema del rechazo inmunológico de las células de apoyo. Esto es muy significativo clínicamente.

10 Como la membrana de aislamiento, puede usarse una membrana de aislamiento que tenga un tamaño de poro a través del cual no puedan pasar las células de apoyo seleccionado la membrana conocida apropiadamente. Por ejemplo, puede usarse una membrana que tenga un tamaño de poro de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 3,0 μm hecha de policarbonato. Un material de la membrana de aislamiento no está particularmente limitado. Además de policarbonato, pueden usarse poliéster y semejantes. Dichas membranas de aislamiento son comerciales y fácilmente disponibles.

15 Un ejemplo del método de cultivo usando una membrana de aislamiento puede incluir el método siguiente. En primer lugar, las células de apoyo inactivadas se inoculan y cultivan en un contenedor tal como una placa (un primer contenedor), formando de esta manera una capa de células de apoyo en la superficie del contenedor. Después, se ajusta un segundo contenedor, que tiene una cara inferior hecha de una membrana de aislamiento, en el primer contenedor de manera que la cara inferior del segundo contenedor está localizada en un medio de cultivo. Después, en
20 la capa de colágeno, se inoculan y cultivan las células epiteliales mucosales orales.

En la superficie inferior del segundo contenedor, se forma previamente una capa de colágeno (por ejemplo, en la superficie inferior del segundo contenedor se pone la membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio. En este estado, puede llevarse a cabo un proceso de secado). Este segundo contenedor se ajusta en el primer contenedor en el que se inoculan las células de apoyo y después en la capa de colágeno pueden inocularse y cultivarse las células
25 epiteliales mucosales orales.

La densidad celular de las células de apoyo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1×10^2 células / cm^2 o más, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1×10^2 células / cm^2 a aproximadamente 1×10^7 células / cm^2 y aún más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1×10^3 células / cm^2 a aproximadamente 1×10^5 células / cm^2 .
30 Referente a la proporción respecto al número de células epiteliales mucosales orales, el cultivo puede llevarse a cabo en las condiciones en las que las células de apoyo que se van a usar pueden ser, por ejemplo, $1/10^3$ veces a 1×10^2 veces y preferiblemente $1/10^2$ veces a 1 vez el número de células epiteliales mucosales orales. Cuando el número de células de apoyo es pequeño, la velocidad de proliferación de las células epiteliales mucosales orales disminuye; y cuando es demasiado pequeño, no puede obtenerse una excelente estructura en capas de las células epiteliales mucosales orales. Por otra parte, no es preferible que el número de células de apoyo sea demasiado grande porque disminuye la velocidad
35 de proliferación de las células epiteliales mucosales orales.

El medio de cultivo usado para cultivar las células epiteliales mucosales orales no está particularmente limitado siempre que las células puedan proliferar y se pueda formar una estructura en capas de las células. Por ejemplo, puede usarse un medio, en el que DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) que se usa generalmente para crecer células epiteliales y medio Ham F12 se mezclan entre sí a una proporción determinada, y se añaden FBS, factor de crecimiento,
40 antibióticos y semejantes. Los ejemplos específicos incluyen un medio mezclado de DMEM y medio Ham F12 (proporción de volumen de mezclado de 1:1) al que se añaden FBS (10%), insulina (5 mg/ml), toxina del cólera (0,1 nM), factor de crecimiento de células epiteliales (EGF) (10 ng/ml) y penicilina-estreptomycinina (50 UI/ml). Además, puede usarse un medio mezclado de DMEM y medio Ham F12 al que se añaden además triyodotironina (por ejemplo 2 nM), glutamina (por ejemplo, 4 mM), transferrina (por ejemplo, 5 mg/ml), adenina (por ejemplo, 18 mM) y/o hidrocortisona (por
45 ejemplo, 0,4 mg/ml).

En la etapa a), las células epiteliales mucosales orales proliferan en la capa de colágeno y se forma la estructura en capas de células. Después, se lleva a cabo una etapa (etapa b)) de poner en contacto la capa de la superficie de la capa de células superpuesta con el aire. Obsérvese aquí que esta etapa en la presente memoria se refiere también como levantamiento con aire. Esta etapa (b) se lleva a cabo para la diferenciación de las células que forman la capa de
50 células y para inducir la función de barrera.

Esta etapa puede llevarse a cabo disminuyendo la superficie del medio de cultivo quitando temporalmente una parte del medio de cultivo usando un cuentagotas, una pipeta, y semejantes, exponiendo de esta manera temporalmente la capa más exterior de la capa de células epiteliales mucosales orales a la parte exterior del medio de cultivo. Alternativamente, esta etapa puede llevarse a cabo subiendo la capa de células epiteliales mucosales orales junto con la capa de

- colágeno, exponiendo de esta manera temporalmente la capa más exterior de la superficie del medio de cultivo. Además, usando el tubo etc., el aire puede alimentarse en el medio de cultivo de manera que se pone en contacto la capa más alta de la célula epitelial mucosal oral con el aire. Desde el punto de vista de la facilidad de la operación, es preferible disminuir la superficie del medio de cultivo, exponiendo de esta manera la capa más exterior de la capa de célula epitelial mucosal oral al exterior.
- El periodo en el que esta etapa (b) se realiza, esto es, el periodo de tiempo cuando la capa más alta de la capa de la estructura en capas de células se pone en contacto con el aire difiere dependiendo del estado de las células o condiciones del cultivo, etc. pero puede ser por ejemplo 3 días a 3 semanas, preferiblemente 5 días a 2 semanas y más preferiblemente durante aproximadamente una semana.
- Según el método mencionado anteriormente de la presente invención, en la capa de colágeno, se forma una capa de células semejantes al epitelio corneal (lámina semejante al epitelio corneal), en la que las células epiteliales mucosales orales están en capas. Esta lámina semejante al epitelio corneal junto con la capa de colágeno que se usa como sustrato de las células epiteliales mucosales orales puede usarse como un material de trasplante (sustituto del epitelio corneal) para pacientes con córnea dañada o defectuosa, etc. En esta caso, la lámina semejante al epitelio corneal se trasplanta en la parte defectuosa del epitelio corneal de manera que la capa de colágeno está localizada en el lado del globo ocular. En el trasplante, es preferible estimular la supervivencia del injerto fijándolo al tejido circundante con una sutura quirúrgica. Además, es preferible que después del trasplante, la superficie de la parte trasplantada se proteja cubriéndola temporalmente con una lente de contacto terapéutica.
- Obsérvese aquí que puede usarse un injerto del que se ha quitado una parte o toda la capa de colágeno (es decir, sólo la lámina semejante al epitelio corneal). La capa de colágeno puede quitarse combinando apropiadamente un tratamiento químico con EDTA, etc., un tratamiento enzimático con enzima proteolítica, etc., y un tratamiento físico tal como raspado usando forceps.
- Según el tercer aspecto de la presente invención, se construye una capa de células semejante al epitelio corneal (lámina semejante al epitelio corneal) en la que las células epiteliales mucosales orales forman capas. Sin embargo, se piensa que el método de la presente invención puede proporcionar un material de trasplante (una lámina de trasplante de epitelio corneal) para la córnea, en la que se forman capas de células en la capa de colágeno. Es decir, el método de la presente invención puede usarse como un método para construir la lámina de trasplante de epitelio corneal que tiene dicha estructura.
- <Ejemplo 1>
- Evaluación de la lámina semejante al epitelio corneal usando conejo
- [Preparación de la membrana amniótica]
- Después de proporcionar a una mujer embarazada que no tiene una complicación sistémica y que se someterá a una sección Cesárea consentimiento informado suficiente junto con un obstetra previamente, se obtuvo la membrana amniótica durante la sección Cesárea en el quirófano. La operación se llevó a cabo limpiamente. Según el trabajo operatorio, los operadores se lavaron las manos y se vistieron con una bata especial. Antes del parto, se preparó una batea limpia para obtener la membrana amniótica y disolución salina para el lavado. Después del parto, el tejido de la placenta se transfirió a la batea y el tejido de la membrana amniótica se quitó manualmente de la placenta. Una parte en la que la membrana amniótica y la placenta estaban adheridas fuertemente entre sí se separó con tijeras.
- [Tratamiento de la membrana amniótica]
- El proceso de tratamiento de la membrana amniótica incluyó: (1) lavado, (2) recortar y (3) almacenar secuencialmente en este orden. A lo largo de todos los procesos, se desea llevar a cabo la operación en un entorno limpio. Para todos los contenedores e instrumentos que se van a usar, se utilizaron estériles y para placas, etc. se usaron las esterilizadas desechables. La membrana amniótica obtenida se lavó para eliminar los componentes sanguíneos unidos a ésta y se lavó adicionalmente en una cantidad suficiente de disolución salina fisiológica (se añadió 0,005% de ofloxacina).
- Después, la membrana amniótica se transfirió a una disolución de tampón fosfato (PBS) en una placa y se cortó y dividió hasta un tamaño de aproximadamente 4x3 cm con tijeras. Los trozos divididos de la membrana amniótica se almacenaron en varias placas llenas de una disolución madre, y posteriormente las membranas amnióticas en buenas condiciones se seleccionaron entre éstas.
- [Almacenamiento de la membrana amniótica]
- Se puso 1cc de cada disolución madre en un criotubo esterilizado de 2 cc y una lámina de la membrana amniótica, que se había obtenido, se lavó y se seleccionó, se puso y se marcó y se almacenó en un congelador a -80°C. Para la

disolución madre, se usó 50% glicerol esterilizado en DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco; GIBCOBRL). La fecha de caducidad para el uso de la membrana amniótica almacenada se determinó a los 3 meses y la membrana amniótica caducada se desechó por incineración.

[Tratamiento del epitelio amniótico]

- 5 La membrana amniótica se sometió a tratamiento para retirar un epitelio y después se usó para cultivo. En primer lugar, la membrana amniótica almacenada a -80°C se descongeló a temperatura ambiente y se lavó bien en disolución de tampón fosfato (PBS) esterilizada en la placa. Después de lavar, la membrana amniótica se almacenó en una disolución de EDTA al 0,02% (Nacalai tesque) a 37°C durante 2 horas y el epitelio se raspó mecánicamente usando un raspador celular (Nunc, EEUU) y se usó como un sustrato para cultivo. Obsérvese aquí que se confirmó que una capa del epitelio amniótico se raspó completamente por este proceso de tratamiento por operaciones de microscopía óptica y microscopía electrónica (microscopio electrónico de barrido) (Fig. 1). Obsérvese aquí que la Fig. 1 muestra imágenes de la membrana amniótica por el microscopio electrónico de barrido. La Fig. 1A muestra una imagen de la superficie de la membrana amniótica en el estado normal (es decir, estado en el que no se ha realizado un procedimiento sobre el epitelio); y la Fig. 1B muestra la superficie de la membrana amniótica después de raspar el epitelio (en disolución de EDTA al 0,02%).

[Recogida de las células epiteliales mucosales orales]

Se extrajeron los dientes a conejos blancos japoneses de 6 semanas. Después, el epitelio mucosal oral se separó cuidadosamente de la parte de transición del cemento esmalte. Obsérvese aquí que se llevó a cabo una serie de operaciones usando instrumentos esterilizados tan antisépticamente como fue posible.

- 20 El epitelio mucosal oral obtenido se sumergió dos veces en disolución de tampón fosfato (PBS) que contiene 50 UI/ml de penicilina estreptomycin y Gentacina durante 30 minutos bajo la condición de temperatura ambiente. Posteriormente, el tejido se sumergió en una disolución de tampón fosfato (PBS) que contiene 1,2 U de Dispasa (Nacalai tesque) durante 30 minutos a 37°C y se sumergió y se trató en disolución 0,05% tripsina-EDTA (GIBCOBRL) durante 30 minutos para separar las células. Se paró la actividad enzimática sumergiendo en DMEM que contiene 10% suero fetal bovino (FBS).
- 25 Posteriormente, los tejidos en exceso se quitaron usando un filtro celular de $60\ \mu\text{m}$ para aislar las células epiteliales mucosales orales (células epiteliales marginales internas orales).

[Preparación de células co-cultivadas]

- 30 Como células de co-cultivo (células de apoyo), se usaron células NIH-3T3 (de aquí en adelante, referidas como "célula 3T3"). Las células 3T3 que se habían cultivado previamente y estaban confluentes en un frasco 75F (producto BD de Falcon) se sumergieron en disolución de mitomicina C al 0,05% durante dos horas para suprimir la actividad de proliferación. Secuencialmente, se lavaron con una disolución de tampón fosfato (PBS) varias veces para eliminar la mitomicina C, seguido de tratamiento con disolución 0,05% tripsina-EDTA (PBS) para preparar una suspensión de 3T3.

[Formación de lámina de epitelio mucosal oral en membrana amniótica]

- 35 Usando membrana amniótica humana a la que se había quitado el epitelio como sustrato, las células epiteliales mucosales orales se co-cultivaron con células 3T3 que se habían sometido al tratamiento mencionado anteriormente por el procedimiento siguiente. Para los instrumentos de cultivo, se usaron una placa de cultivo de 6 pocillos (Corning, NY) y un inserto de cultivo (un contenedor para insertar el cultivo) (policarbonato, tamaño medio de poro: $3,0\ \mu\text{m}$, Corning NY).

- 40 En primer lugar, la suspensión de 3T3 se inoculó en la placa de cultivo de manera que la densidad celular fuera aproximadamente 1×10^4 células/cm² y se cultivaron bajo condiciones a 37°C y en 5% CO₂. Además, se dejó el sustrato de membrana amniótica para que se fijara en el inserto de cultivo con el lado del epitelio raspado hacia arriba y se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, en el inserto de cultivo en el que se había unido la membrana amniótica, se inoculó la suspensión que contiene una célula epitelial mucosal oral de manera que la densidad celular fue aproximadamente 1×10^5 células/cm².

- 45 Después de la operación mencionada anteriormente, como se muestra en la Fig. 2, el inserto de cultivo se dispuso en la placa de cultivo y las células 3T3 y las células epiteliales mucosales orales se cultivaron en el mismo medio de cultivo. Obsérvese aquí que la Fig. 2 es una vista transversal que muestra esquemáticamente un estado durante el cultivo. En la placa de cultivo 1, se pone el inserto de cultivo 2 y en la superficie inferior de la placa de cultivo 1, se forma la capa de células 3T3 5. Además, en la superficie inferior del inserto de cultivo 2, se pone la membrana amniótica 3 y las células epiteliales mucosales orales 4 se cultivan ahí. El número de referencia 6 indica un medio de cultivo.

Como medio de cultivo, se usó un medio mezcla de DMEM/Ham's F12 (proporción de mezcla en volumen 1:1) que incluye 10% FBS, insulina (5 mg/ml), toxina del cólera (0,1 nM), penicilina-estreptomina (50 UI/ml) y factor de crecimiento de células epiteliales recombinante humano (10 ng/ml).

5 El cultivo se llevó a cabo en el medio mencionado anteriormente durante dos semanas (Submerge). Posteriormente, para inducir el epitelio mucosal por un método denominado levantamiento con aire, el cultivo se llevó a cabo durante una semana. El método de levantamiento con aire es un método de levantamiento de la superficie del líquido del medio de cultivo hacia la superficie de la capa de células epiteliales mucosales orales formada en la membrana amniótica para poner en contacto la capa de células con el aire. Durante la inmersión, el medio de cultivo se reemplazó con uno nuevo en días alternos y después de llevar a cabo el método de levantamiento con aire, el medio de cultivo se reemplazó con uno nuevo en días alternos.

[Verificación de la propiedad fisiológica de la lámina de epitelio mucosal oral en la membrana amniótica]

15 El cultivo de la capa de células epiteliales mucosales orales como se ha mencionado anteriormente se cultivó durante aproximadamente 20 días, formando de esta manera una capa de epitelio similar al epitelio corneal incluyendo 5 a 6 capas multi-diferenciadas y estructuradas en capas (de aquí en adelante, referida también como "lámina semejante al epitelio corneal") (véanse las Figs. 3 y 4). En el lado basal (el lado de la membrana amniótica) de esta capa de epitelio, existía un grupo de células con forma relativamente cuboidal similares a la célula basal. Además, se confirmó que las células de la capa más exterior tenían forma plana pero incluían un núcleo y que la superficie de éstas no estaba cornificada a diferencia de la piel. Como se ha mencionado anteriormente, la observación por microscopía óptica mostró que se formó la capa de epitelio similar a la córnea (lámina semejante al epitelio corneal) en la membrana amniótica.

20 Después, con el fin de confirmar la propiedad fisiológica de la lámina semejante al epitelio corneal, se llevó a cabo una inmunotinción. Después de preparar una lámina semejante al epitelio corneal, se cortó en un tamaño apropiado y se congeló y sumergió en un compuesto OCT. Después, el compuesto resultante se cortó con un criostato para preparar secciones en láminas. En la inmunotinción, se llevó a cabo la consideración sobre queratina, es decir, proteína del citoesqueleto respectiva. Esto es lo mismo que decir que se consideraron la queratina 3/12 específica de la córnea, queratina 4/13 específica de la mucosa y queratina 1/10 específica de la epidermis. El método se describirá más adelante. Una sección en lámina se lavó con una disolución de tampón fosfato (PBS) y se realizó un bloqueo con 1% FBS para suprimir la reacción de anticuerpo no específica. Posteriormente, se hizo reaccionar un anticuerpo frente a cada queratina (anticuerpo primario) a temperatura ambiente durante una hora. Después de la reacción, la sección en lámina se lavó con PBS que contiene tritón-X durante 15 minutos tres veces, seguido de reacción con anticuerpo marcado con fluorescencia (anticuerpo secundario) a temperatura ambiente durante una hora. Después de la reacción, la sección en lámina se lavó con una disolución de tampón fosfato (PBS) durante 15 minutos tres veces y se selló, seguido de observación del tejido con un microscopio confocal.

35 Se describen las reacciones de anticuerpo de las respectivas queratinas respecto a la lámina semejante al epitelio corneal. En primer lugar, se observó capacidad de tinción para la queratina 3 específica de la córnea (véase la Figura 5, imagen de la izquierda). Como la capacidad de tinción de la queratina 3 se observa en la mucosa oral in vivo, se pensó que la propiedad se mantuvo también bajo las condiciones de cultivo. Por otra parte, para la queratina 12 no se observó capacidad de tinción (véase la Fig. 5, imagen de la derecha). De manera similar, para la queratina 4 y 13 específicas de la mucosa, también se observó capacidad de tinción respectivamente (véase la Fig. 6). Sin embargo, para la queratina 1/10 que es una queratina de cornificación epidérmica, no se observó capacidad de tinción (véase la Fig. 7). A partir de los resultados mencionados anteriormente, respecto a la propiedad fisiológica de la lámina semejante al epitelio corneal, desde el aspecto del citoesqueleto, no se produce diferenciación en la dirección de la cornificación a diferencia de la epidermis. Se confirmó que la propiedad como epitelio mucosal no cornificado se mantuvo a la vez que se mantenía una parte de la queratina (queratina 3) específica de la córnea.

[Trasplante autólogo de lámina de epitelio mucosal oral]

45 A continuación, se llevó a cabo un experimento de trasplante autólogo usando la lámina semejante al epitelio corneal. Mediante el método mencionado anteriormente, las células epiteliales mucosales orales se recogieron de conejos blancos japoneses de 6 semanas para construir una lámina de trasplante en la que se formó una lámina semejante al epitelio corneal en la membrana amniótica (de aquí en adelante, también referida como "lámina de trasplante del epitelio corneal"). Mientras tanto, del conejo del que se habían recogido las células epiteliales mucosales orales se quitó todo el epitelio corneal y conjuntival con un espesor de 100 μ m desde 4 mm fuera del limbus usando un cuchillo semicircular. Mediante esta operación, como las células epiteliales que contienen células madre del epitelio corneal se han perdido, se pensó que reaparecería el agotamiento artificial de las células madre de la superficie ocular. Después de esta operación, se confirmó por la tinción con fluoresceína que no permanecían las células de epitelio corneal que contienen epitelio (véase la Fig. 8). Obsérvese aquí que el ensayo de tinción con fluoresceína se llevó a cabo como sigue: esto es, un papel de ensayo de fluoresceína impregnado con instilación tal como antibióticos se aplicó directamente en la superficie

ocular, seguido de permitir que el ojo parpadeara unas pocas veces, y después se observó la tinción con fluoresceína de la superficie ocular. Si el epitelio corneal permanece, debido a la estructura fuertemente adhesiva intercelular, el agente de tinción fluoresceína no se satura y no se observa tinción con fluoresceína. 4 semanas después, la superficie ocular del conejo se cubrió con el epitelio conjuntival remanente y no mantuvo la transparencia (véase la Fig. 9).

5 Después, en el ojo que se había cubierto con el epitelio conjuntival y que había perdido la transparencia, después de quitar el tejido conjuntival de la superficie ocular, se trasplanta la lámina de trasplante de epitelio corneal mencionada anteriormente en la región bastante interior del limbus. En el trasplante, usando fibra de nylon 10-0 se usó para suturar la lámina al tejido periférico. Después del trasplante, en el injerto, se puso una lente de contacto terapéutica. Después de la operación, se aplicaron dos veces al día antibióticos y crema oftalmológica estéril. En el momento del trasplante, la superficie ocular tenía una transparencia que es la misma que la de la lámina de trasplante del epitelio corneal antes del trasplante (véase la Fig. 10).

10 48 horas después de la operación y 10 días después de la operación, se observó la superficie ocular en la que se había realizado el trasplante. Cuando pasaron 48 horas desde la operación, se confirmó que la lámina de trasplante de epitelio corneal trasplantada mantenía transparencia. Además, se confirmó por tinción con fluoresceína que la lámina de trasplante de epitelio corneal trasplantada permanecía en la superficie ocular sin sufrir daños (véase la Fig. 11). Además, como el injerto (la lámina de trasplante de epitelio corneal) no mostró la capacidad de tinción con fluoresceína, se confirmó que la lámina de trasplante de epitelio corneal (lámina semejante al epitelio corneal) de la presente invención tenía una función de barrera similar al epitelio corneal. Además, como por tinción con fluoresceína, se confirmó la capacidad de tinción con fluoresceína sobre la periferia completa del injerto, se confirmó por lo tanto que el tejido que está presente en la parte trasplantada no era una contaminación del epitelio conjuntival remanente.

15 Obsérvese aquí que como las células del epitelio corneal están fuertemente adheridas entre sí, el agente de tinción fluoresceína no invade desde la superficie y la capacidad de tinción con fluoresceína no se observa en la tinción con fluoresceína. Por otra parte, cuando la adhesión entre las células se vuelve más laxa o la función de barrera resulta dañada por exfoliación de la célula en sí misma, ocurre la invasión del agente de tinción fluoresceína y los tejidos se tiñen. Por lo tanto, examinando la capacidad de tinción de la tinción con fluoresceína se examinó, puede conformarse si la lámina semejante al epitelio corneal trasplantada tenía o no la función de barrera similar al epitelio corneal.

20 Cuando habían pasado 10 días después del trasplante, se observó la superficie ocular de manera similar a anteriormente. La lámina de trasplante de epitelio corneal trasplantada permaneció en la superficie ocular. Además, se observó por tinción con fluoresceína que la lámina de trasplante de epitelio corneal se extiende hacia la periferia más que el estado a las 48 horas después del trasplante (véase la Fig. 12). Se confirmó que el trasplante no presentaba la capacidad de tinción con fluoresceína y que se mantenía una función de barrera necesaria para el epitelio corneal. También se mantuvo la transparencia.

25 Como se ha mencionado anteriormente, se confirmó que la lámina semejante al epitelio corneal obtenida cultivando en la membrana amniótica sobrevivió en la superficie ocular y se extendió en la superficie ocular y mantuvo transparencia durante un tiempo largo después de la operación. Es decir, la lámina semejante al epitelio corneal construida por el método mencionado anteriormente funciona bien como un sustituto del epitelio corneal y una composición semejante a lámina (lámina de trasplante de epitelio corneal) que incluye la lámina semejante al epitelio corneal formada en la membrana amniótica puede usarse adecuadamente como un material de trasplante para reconstruir la superficie ocular en el caso en el que la córnea esté lesionada o dañada.

30 <Ejemplo 2>

Evaluación de la lámina semejante al epitelio corneal en seres humanos

35 Después, se confirmó el efecto del caso en el que la lámina semejante al epitelio corneal se aplicaba a un ser humano. Los sujetos que se van a trasplantar incluyeron (1) pacientes con un defecto en el epitelio prolongado en un estadio agudo de un trauma químico; (2) pacientes con opacidad debida a la invasión de tejido cicatricial en un estadio crónico de un trauma químico; y (3) pacientes con penfigoide ocular cicatricial. Se recogieron células epiteliales mucosales orales de cada paciente por el mismo método que en el Ejemplo 1 mencionado anteriormente. Posteriormente, las células epiteliales mucosales orales se co-incubaron con células 3T3 usando membrana amniótica humana a la que se había raspado el epitelio como sustrato para obtener una lámina de trasplante de epitelio corneal en la que se formó una capa de células epiteliales mucosales orales en la membrana amniótica humana. Obsérvese aquí que un método para preparar la membrana amniótica humana a la que se había raspado el epitelio y las condiciones de co-cultivo con 3T3 fueron los mismos que en el Ejemplo 1. La lámina de trasplante de epitelio corneal así preparada se trasplantó en pacientes cuyas células se usaron para la preparación de la lámina (trasplante autólogo) y después se evaluó el efecto de ésta. El método de trasplante se llevó a cabo por el mismo método que en el Ejemplo 1. Sin embargo, para pacientes con penfigoide ocular cicatricial, se quitó un tejido cicatricial en la parte anterior para liberar la adhesión, después la

lámina semejante al epitelio corneal se trasplantó en la parte que es un tercio anterior y al mismo tiempo se llevó a cabo una operación de cataratas para insertar la lente intraocular.

5 La Fig. 13 muestra los estados de la superficie ocular antes de la operación (imagen de la izquierda) y cinco meses después de la operación (imagen de la derecha) de un paciente con defecto en el epitelio prolongado en un estadio agudo de trauma químico. La Fig. 13 muestra que cinco meses después de la operación, la superficie ocular se ha reconstruido con éxito. Se esperaba que la agudeza visual de este paciente estuviera aproximadamente a nivel de movimiento de la mano debido a la invasión de tejido cicatricial si la operación de trasplante no se hubiera llevado a cabo. Actualmente, la agudeza visual está recuperada a 0,5 y el estado del epitelio es estable. Además, como el trasplante se llevó a cabo usando trasplante autólogo, no existe miedo de rechazo inmunológico, de manera que el
10 cuidado post-operatorio es más fácil comparado con el caso en la operación de trasplante.

15 La Fig. 14 muestra los estados de la superficie ocular antes de la operación (imagen de la izquierda) y dos meses después de la operación (imagen de la derecha) de un paciente con enfermedad epitelial queratoconjuntiva cicatricial en un estadio crónico de trauma químico. Antes de la operación, la condición de este paciente era demasiado seria como para obtener los descubrimientos de condición intraocular. Sin embargo, la adhesión pudo liberarse por la operación de trasplante, de manera que las lente cristalina pudo verse claramente. La agudeza visual mejoró desde el nivel de percepción de luz hasta un nivel de contar dedos. La operación se llevó a cabo para determinar el plan de operación siguiente, sin embargo el propósito original para llevar a cabo una observación intraocular se consiguió y además se obtuvo una mejora significativa en términos de apariencia bonita.

20 La Fig. 15 muestra los estados de la superficie ocular antes de la operación (imagen de la izquierda) y un mes después de la operación (imagen de la derecha) de un paciente con penfigoide ocular cicatricial. Se sabe que cuando se lleva a cabo una operación general para cataratas en un paciente con penfigoide ocular cicatricial, desde el momento de la operación, la conjuntiva invade para formar tejido cicatricial, causando de esta manera opacidad significativa en la córnea. En este caso, la adhesión del globo ocular debida al penfigoide ocular cicatricial se observó en la parte anterior, sin embargo, un mes después de la operación, el estado de la superficie ocular era estable. La agudeza visual se recupera desde 0,06 antes de la operación hasta 0,6 actualmente.
25

A partir de los resultados mencionados anteriormente, se demostró la eficacia de la lámina semejante al epitelio corneal (lámina de trasplante de epitelio corneal) en un ser humano.

30 La presente invención no está limitada a la descripción de las realizaciones y los ejemplos mencionados anteriormente. Pueden hacerse cambios y variaciones son apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones siguientes y en un rango que un experto en la técnica puede conseguir fácilmente.

De aquí de adelante, se describen las materias siguientes.

(11) Un método para construir una lámina de trasplante de epitelio corneal, incluyendo el método: a) cultivar células epiteliales mucosales orales en una capa de colágeno; y b) cuando las células epiteliales mucosales orales han proliferado y se ha formado una estructura en capas de las células, poner en contacto la capa más exterior con el aire.
35

(12) El método para construir una lámina de trasplante de epitelio corneal descrito en (11), en el que la etapa a) se lleva a cabo en coexistencia con células de apoyo.

40 (13) El método para construir una lámina de trasplante de epitelio corneal descrito en (11), en el que la etapa a) se lleva a cabo en coexistencia con células de apoyo y en un estado en el que existe una membrana de aislamiento, con un tamaño de poro a través del cual las células de apoyo no pueden pasar, entre las células de apoyo y la capa de colágeno.

(14) El método para construir una lámina de trasplante de epitelio corneal descrito en una cualquiera de (11) a (13), en el que la capa de colágeno se obtiene de membrana amniótica.

(15) El método para construir una lámina de trasplante de epitelio corneal descrito en una cualquiera de (11) a (13), en el que la capa de colágeno consiste en membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio.

45 (16) Un método para construir una lámina de trasplante de epitelio corneal, que incluye las etapas de:

inocular células de apoyo en un primer contenedor para formar una capa de células de apoyo;

disponer un segundo contenedor, que tiene una cara inferior hecha de una membrana de aislamiento con un tamaño de poro a través del cual las células de apoyo no pueden pasar, en el primer contenedor de manera que la cara inferior está localizada en un medio de cultivo;

formar una capa de colágeno en la cara inferior del segundo contenedor;

inocular células epiteliales mucosales orales en la capa de colágeno;

cultivar las células epiteliales mucosales orales para formar una estructura en capas de las células; y

poner en contacto la capa más exterior de la estructura en capas de las células epiteliales mucosales orales con el aire.

5 (17) El método para construir una lámina de trasplante de epitelio comeal descrito en (16), en el que la capa de colágeno se obtiene de membrana amniótica.

(18) El método para construir una lámina de trasplante de epitelio comeal descrito en (16), en el que la capa de colágeno consiste en membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

10 Hasta la fecha, la operación para la reconstrucción de la superficie ocular ha incluido: recoger células madre del epitelio corneal de una persona autóloga (auto) o de otra persona (alo); y trasplantarlas a un paciente. Sin embargo, la recogida de las células madre del ojo normal autólogo puede causar agotamiento de las células madre en el ojo normal en el futuro. Además, el trasplante de células madre de otra persona, habitualmente está acompañado de rechazo inmunológico. Además, existe un problema de escasez de donantes. Según la lámina semejante al epitelio comeal y la
15 lámina de trasplante de epitelio comeal, como puede usarse epitelio mucosal oral autólogo como una fuente de células para un material de trasplante, no existe riesgo de causar el agotamiento de las células madre, y existe un riesgo extremadamente pequeño de rechazo inmunológico. Además, la operación de trasplante puede llevarse a cabo sin preocupaciones respecto a la escasez de donantes. En particular, en pacientes a partir de los cuales es difícil o imposible recoger células madre del epitelio corneal, es decir, en un paciente con enfermedad corneal ocular bilateral, la
20 presente invención es significativa porque puede usarse para el trasplante un material de trasplante construido usando una célula autóloga.

La lámina semejante al epitelio corneal (lámina de trasplante de epitelio corneal) de la presente invención tiene una toma excelente después del trasplante y tiene una adhesión lo suficiente como para resistir el parpadeo. Además, en la capa de células basales, se mantiene la propiedad de proliferación predeterminada, mientras que se forma una capa de
25 células semejante al epitelio en la que las células se disponen en capas y se diferencian en la dirección vertical y la capa de células semejante al epitelio tiene una estructura que es extremadamente similar a la del epitelio corneal. Además, también se proporciona una función de barrera necesaria para que el epitelio comeal ejerza la función. Además, la transparencia es alta. Así, la lámina semejante al epitelio comeal (lámina de trasplante de epitelio comeal) de la presente invención es extremadamente excelente como un material de trasplante para reconstruir el epitelio corneal.

30

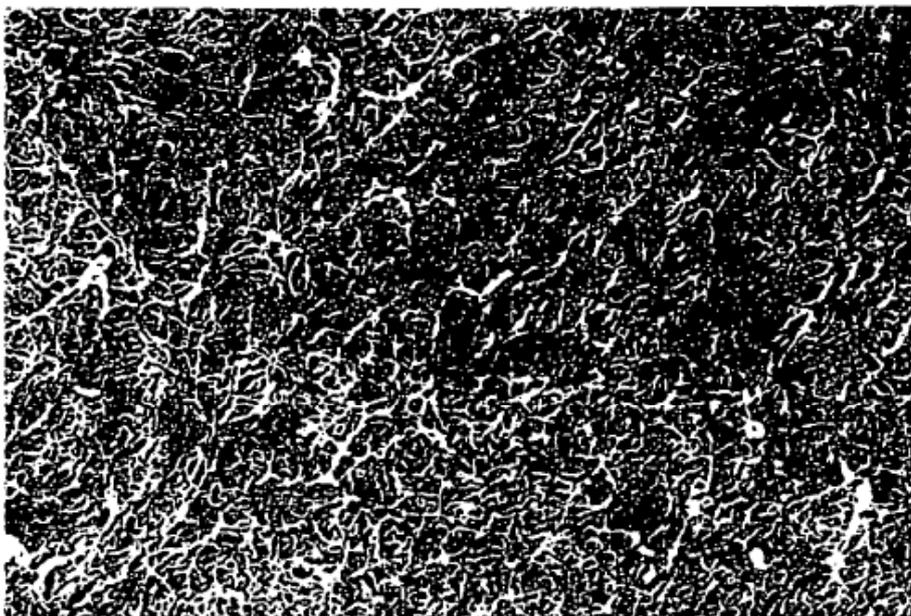
REVINDICACIONES

1. Una lámina semejante al epitelio corneal, que comprende una capa de células en la que se forma una estructura en capas de células obtenidas de las células epiteliales mucosales orales.
- 5 2. La lámina semejante al epitelio corneal según la reivindicación 1, en la que las células de la capa más exterior no están cornificadas y/o tienen forma plana.
3. La lámina semejante al epitelio corneal según la reivindicación 1 ó 2, en la que la lámina semejante al epitelio corneal tiene una función de barrera.
4. Una lámina de trasplante de epitelio corneal que comprende una capa de células como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2, en la que se forma una estructura en capas de células en una capa de colágeno.
- 10 5. La lámina de trasplante de epitelio corneal según la reivindicación 4, en la que dicha lámina tiene una función de barrera.
6. Un método para construir una lámina semejante al epitelio corneal, comprendiendo el método:
 - a) cultivar células epiteliales mucosales orales en una capa de colágeno; y
 - 15 b) cuando las células epiteliales mucosales orales han proliferado y se ha formado forma una estructura en capas de células, poner en contacto la capa más exterior con el aire.
7. El método según la reivindicación 6, en el que la etapa a) se lleva a cabo en coexistencia con células de apoyo.
8. El método según la reivindicación 6 ó 7, en el que la etapa a) se lleva a cabo en coexistencia con células de apoyo y en un estado en el que una membrana de aislamiento con un tamaño de poro a través del cual las células de apoyo no pueden pasar existe entre las células de apoyo y la capa de colágeno.
- 20 9. El método de la reivindicación 6, que comprende la etapas de:
 - (i) inocular células de apoyo en un primer contenedor para formar una capa de células de apoyo;
 - (ii) disponer un segundo contenedor, que tiene una cara inferior hecha de una membrana de aislamiento con un tamaño de poro a través del cual las células de apoyo no pueden pasar, en el primer contenedor de manera que la cara inferior está localizada en un medio de cultivo;
 - 25 (iii) formar una capa de colágeno en la cara inferior del segundo contenedor;
 - (iv) inocular células epiteliales mucosales orales en la capa de colágeno;
 - (v) cultivar las células epiteliales mucosales orales para formar una estructura en capas de las células; y
 - (vi) poner en contacto la capa más exterior de la estructura en capas de las células epiteliales mucosales orales con el aire.
- 30 10. La lámina de trasplante de epitelio corneal de la reivindicación 4 ó 5 o el método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la capa de colágeno se obtiene de membrana amniótica, y/o consiste en membrana amniótica a la que se ha quitado el epitelio.

Fig.1



A



B

Fig.2

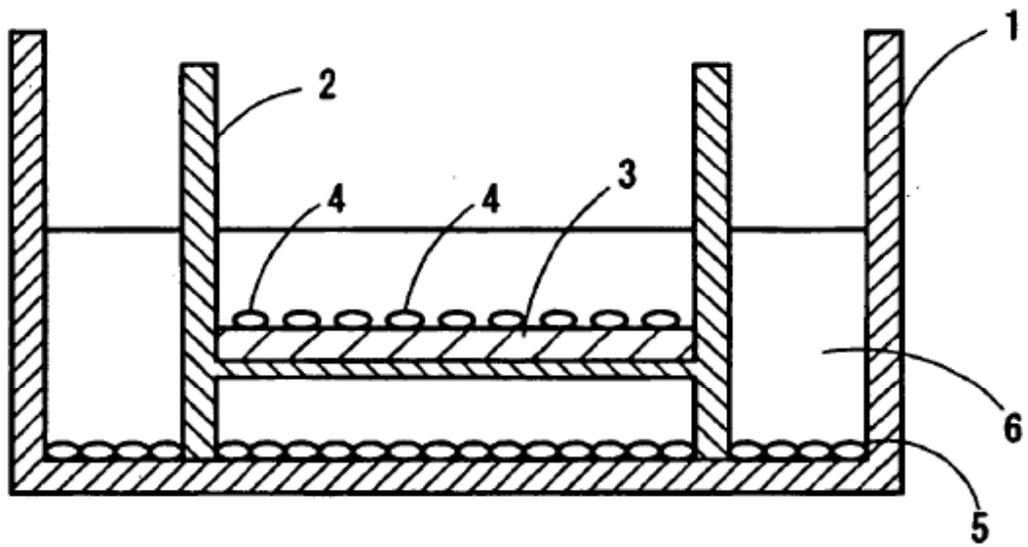


Fig.3

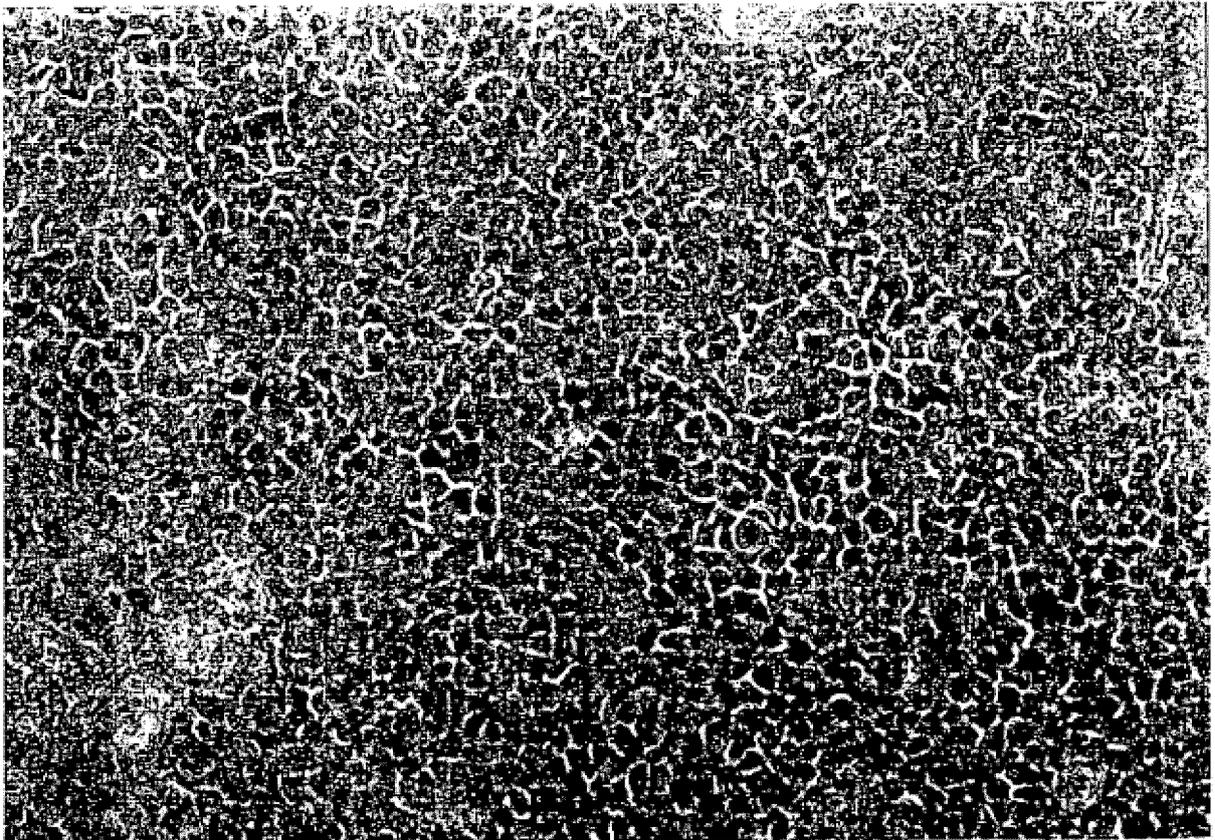


Fig.4

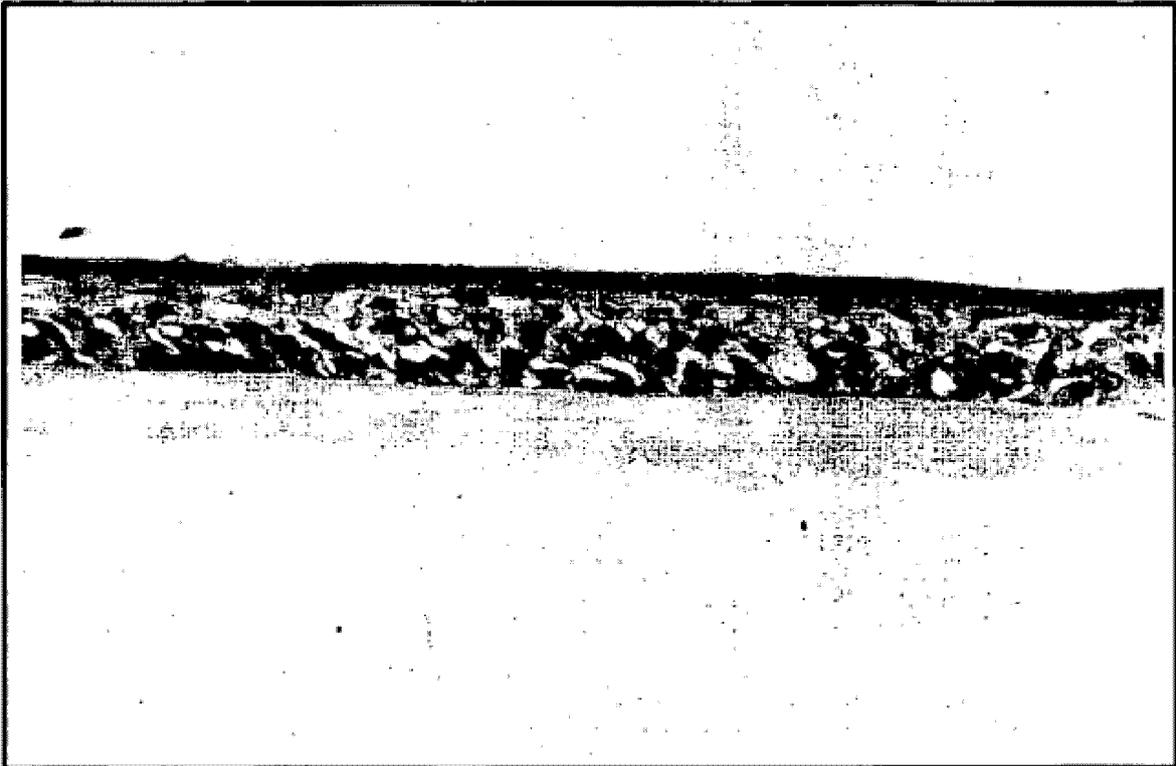


Fig.5

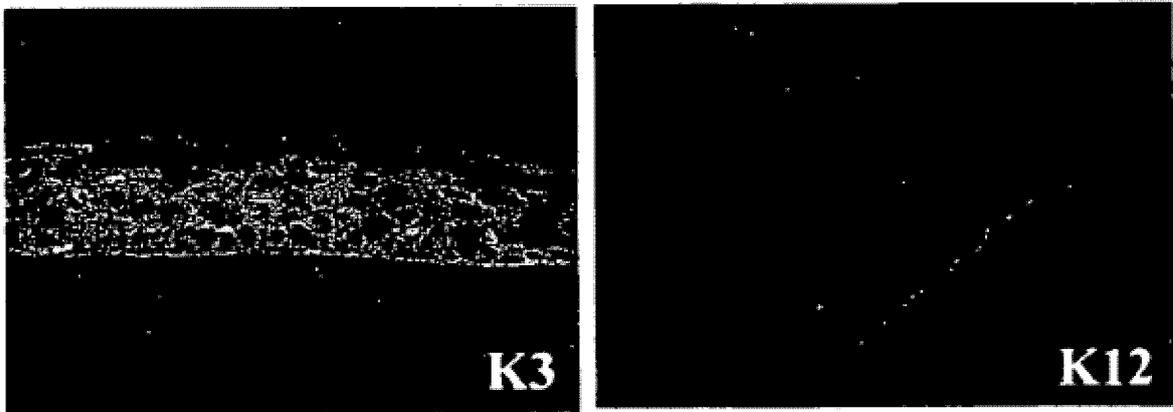


Fig. 6

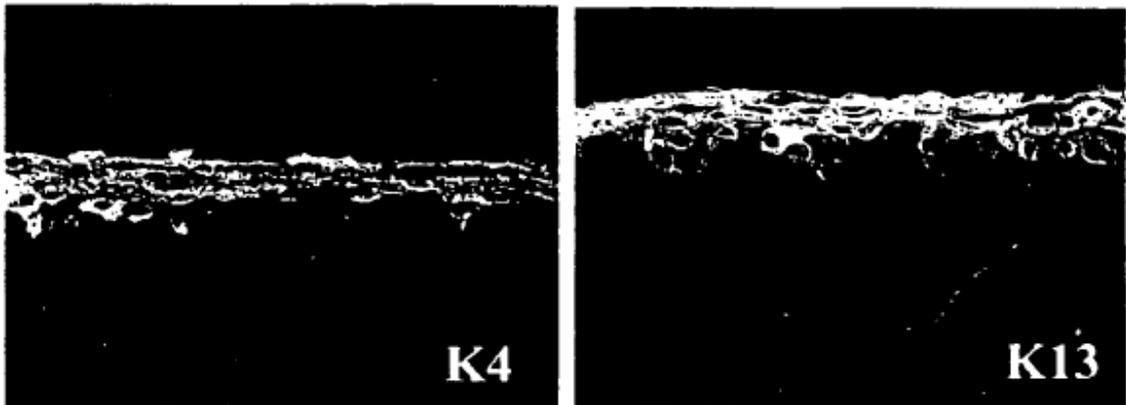


Fig. 7

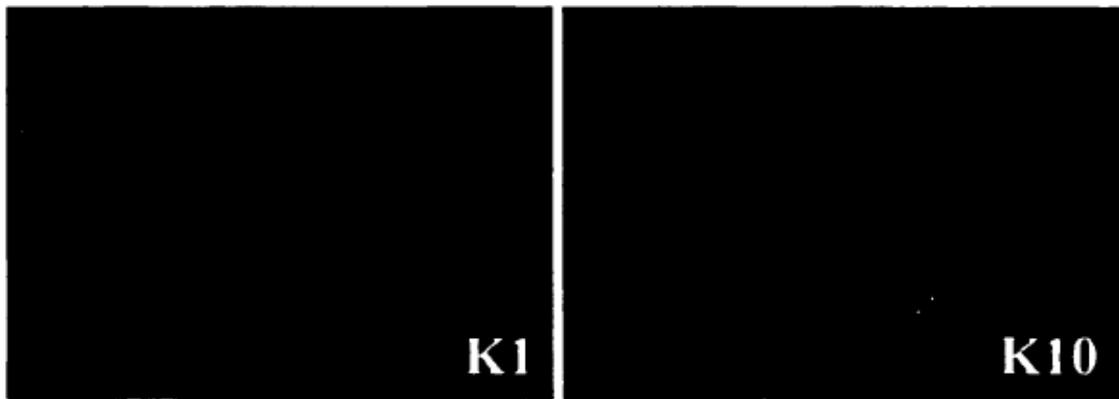


Fig. 8



Fig. 9

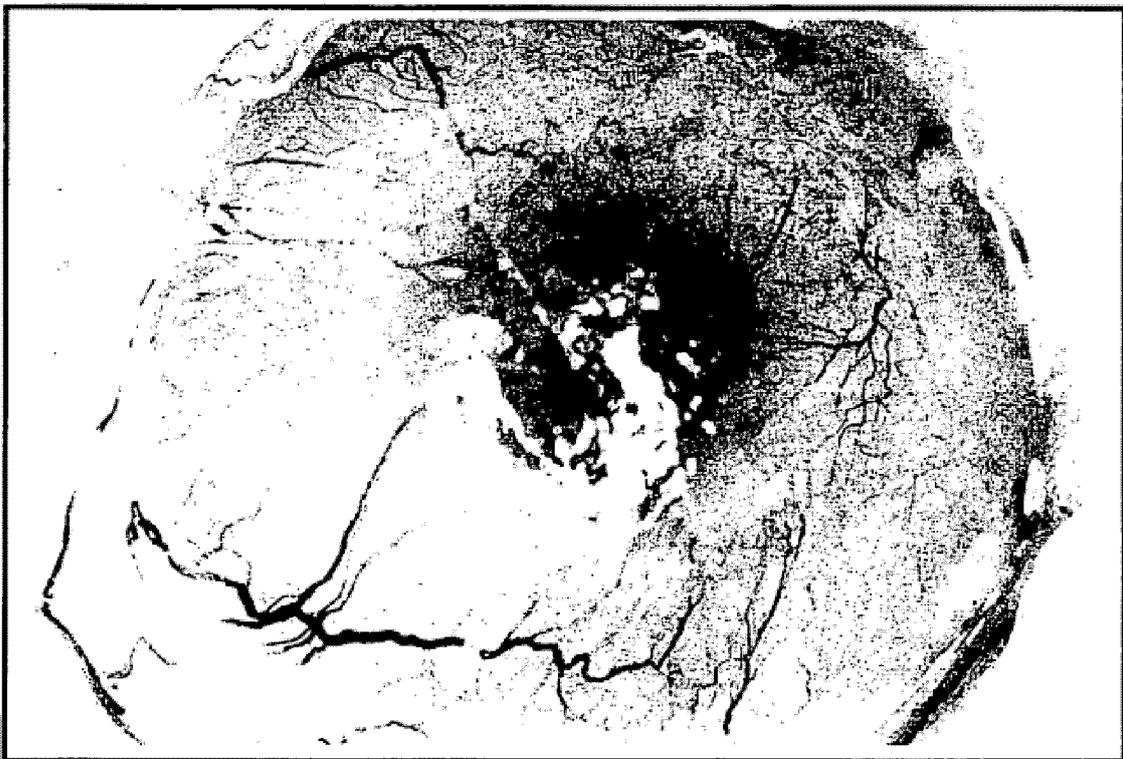


Fig. 1 0

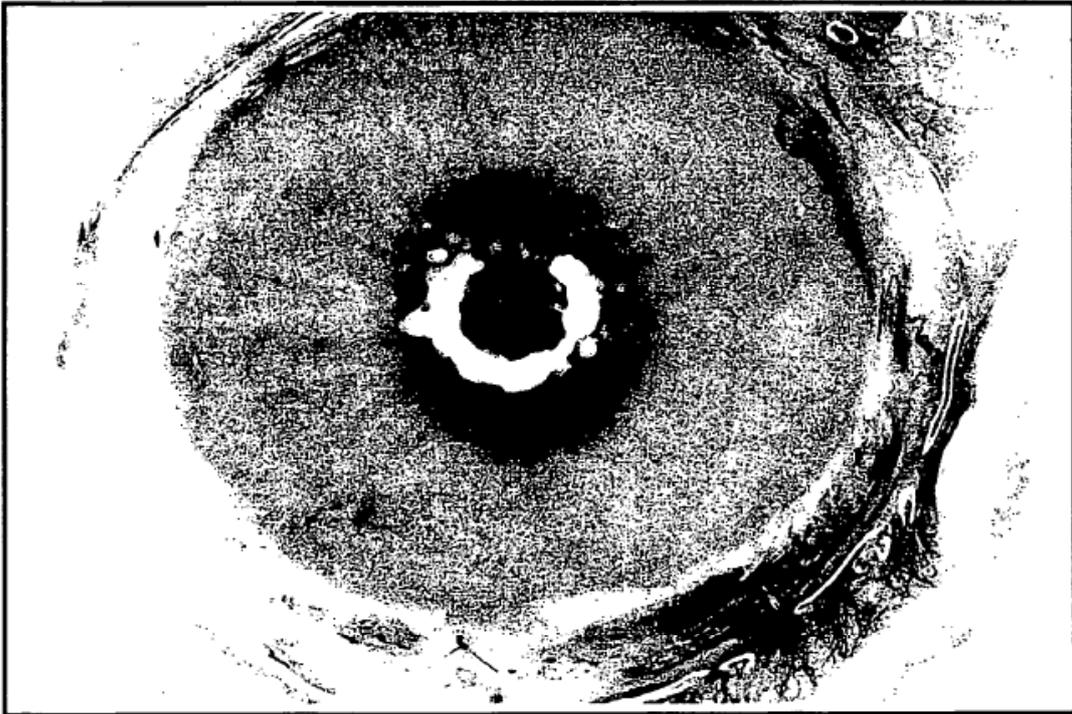


Fig. 1 1

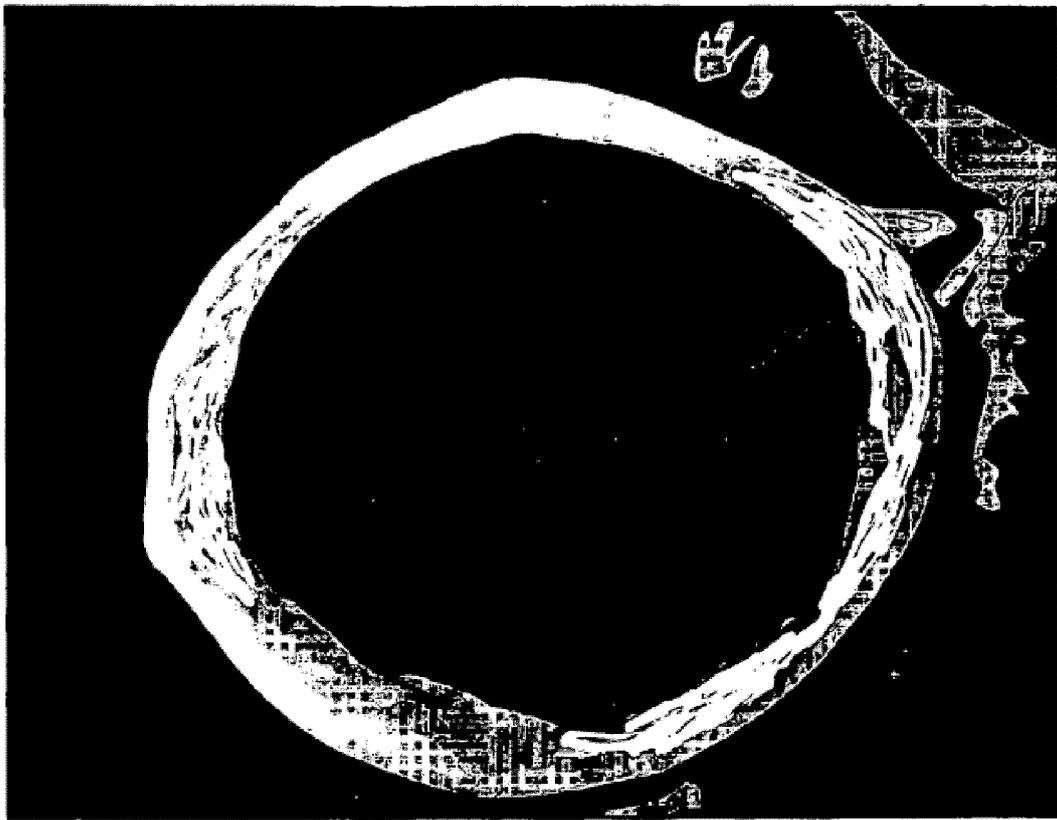


Fig. 1 2

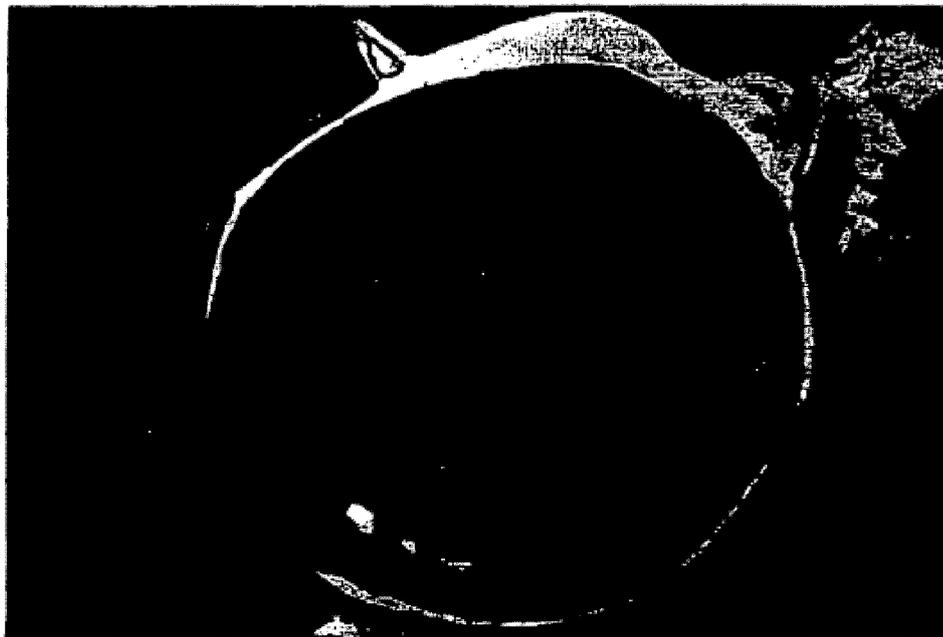


Fig.13

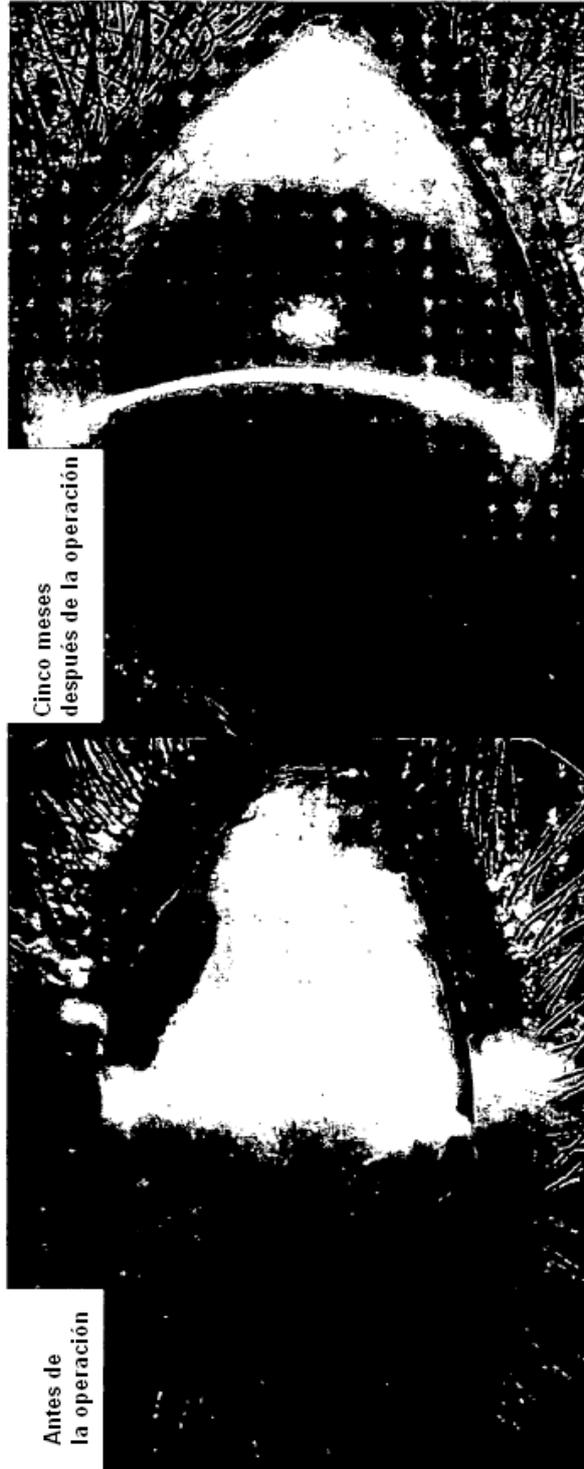


Fig.14



Fig.15

