

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 124**

51 Int. Cl.:
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07820364 .3**
96 Fecha de presentación: **19.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2089073**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **ESTRUCTURAS CORNEALES MULTICAPA SINTÉTICAS QUE COMPRENDEN FIBRAS DE COLÁGENO.**

30 Prioridad:
20.09.2006 EP 06291473

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, RUE MICHEL ANGE
75016 PARIS, FR**

72 Inventor/es:
**TORBET, James y
HULMES, David John Stuart**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

ES 2 373 124 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

Estructuras corneales multicapa sintéticas que comprenden fibras de colágeno.

5 La invención se refiere a un procedimiento para la preparación *in vitro* de una estructura corneal multicapa sintética que comprende fibras de colágeno, en la que las fibras en cada capa se encuentran orientadas unidireccional y uniformemente, comprendiendo la polimerización sucesiva de capas de una solución formadora de fibras de polímero biológico en presencia de un campo magnético, en la que la orientación de las fibras en por lo menos una capa difiere de la orientación en por lo menos una de las capas superiores y/o inferiores a la misma según un ángulo alfa. Asimismo, la invención se refiere a una estructura corneal multicapa similar a un tejido biológico, que comprende la estructura multicapa sintética y células inoculadas en la misma, tal como una córnea similar a un tejido multicapa ortogonal de colágeno, y al procedimiento para la preparación de la misma. La invención puede utilizarse para prevenir o tratar un tejido dañado, y para crear un modelo para la experimentación biológica, tal como los ensayos de toxicidad farmacológica.

15 El mercado mundial de productos de ingeniería de tejidos se estima en varios cientos de millones de euros. La ingeniería de tejidos está destinada a reparar, sustituir o restaurar la función de los tejidos, típicamente mediante la combinación de materiales biológicos y células vivas.

20 Más particularmente, aproximadamente 10 millones de personas en el mundo sufren de ceguera debida a lesiones o enfermedades de la córnea. El mercado mundial de córneas artificiales se estima en la actualidad en aproximadamente 100.000 unidades al año, incluyendo 25.000 en Europa. Debido a que el precio de venta actual de un implante de córnea artificial es de aproximadamente 2.000 euros, el mercado se estima en aproximadamente 120 millones de euros.

25 La córnea está constituida por tres capas celulares diferentes: el epitelio externo, la estroma central (compuesta de queratocitos en una matriz extracelular densa y muy organizada de fibrillas de colágeno y proteoglicanos) y el endotelio interno. La estroma se encuentra delimitada por estructuras acelulares especializadas, las membranas de Bowman y de Descemet, que se encuentran en la interfaz entre el epitelio y el endotelio, respectivamente (ver la figura 7).

30 La estroma constituye aproximadamente 90% del volumen corneal y 70% del peso seco de la córnea. Durante la embriogénesis, se forma una estroma primaria acelular muy estructurada que se cree que determina el patrón de organización de la estroma adulta (Trelstad y Coulombre, 1971a). Dentro de la estroma adulta, las fibrillas de colágeno, compuestas de los colágenos de tipos I y V, presentan un diámetro uniformemente estrecho (≈ 30 nm) y se encuentran dispuestas en lamelas, en las que las fibrillas se disponen en paralelo y se encuentran separadas por una matriz rica en proteoglicanos. Las fibrillas de colágeno son estabilizadas por enlaces cruzados covalentes intramoleculares e intermoleculares, que proporcionan resistencia ténsil y estabilizan las fibrillas frente a la degradación proteolítica. Se cree que la transparencia depende en gran medida de la arquitectura tridimensional ordenada de las fibrillas delgadas de colágeno. Los estudios de microscopía electrónica (Trelstad y Coulombre, 1971c) y de difracción de rayos X (Meek *et al.*, 1987) indican que las fibrillas en lamelas estromales contiguas son predominantemente ortogonales. El entrelazado de las lamelas estromales dota a la córnea de propiedades biomecánicas altamente no lineales, rigidificándose crecientemente al someterla a una presión intraocular elevada, lo que permite a la córnea sobrevivir a influencias anormales, tales como impactos, daños y cirugía, sin que estalle.

45 La construcción de un andamiaje que reproduzca estrechamente la arquitectura nativa de la estroma, incluyendo lamelas ortogonales que constan de fibrillas de colágeno alineadas, sería una baza importante en el desarrollo de implantes corneales biodiseñados. En vista de la escasez de donantes a nivel mundial, el creciente riesgo de enfermedades infecciosas, la utilización generalizada de cirugía correctora que inutiliza las córneas para el injerto, y las graves limitaciones de las córneas artificiales sintéticas basadas en polímero disponibles (queratoprótesis), existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

50 Además de sus potenciales usos clínicos como miméticos tridimensionales de tejidos, las córneas de ingeniería tisular deberían facilitar el estudio *in vitro* de la compleja fisiología del tejido vivo y resultarían asimismo alternativas a los modelos animales de experimentación de la toxicidad farmacológica (Germain *et al.*, 1999; Griffith *et al.*, 1999; Builles *et al.*, 2007). Aunque los dos modelos corneales humanos *in vitro* comercializados en la actualidad para este último propósito, de SkinEthic Laboratories (Nice, Francia) y de MatTek Corporation (EpiOcularTM; Ashland, MA, USA), proporcionan un epitelio similar a la córnea, los componentes clave estromal y endotelial se encuentran totalmente ausentes. La validez del ensayo de toxicidad únicamente puede mejorarse introduciendo modelos más completos más similares a la córnea humana normal, tanto en composición como en organización.

60 Los últimos avances en ingeniería tisular, tecnología de células madre y nanoingeniería han sido utilizados con éxito para reparar córneas humanas e incluso para recrear un tejido similar a la córnea humana *de novo*. Los injertos de láminas epiteliales del limbo de la córnea, cultivados en fibrina, han demostrado eficacia clínica a largo plazo en la regeneración de la superficie corneal dañada (Rama *et al.*, 2001; Pellegrini *et al.*, 1997). El tejido ocular dañado

también ha sido restaurado utilizando células epiteliales cultivadas sobre membranas amnióticas (Tsai *et al.*, 2000; Schwab *et al.*, 2000) y sobre superficies de cultivo celular sensibles a la temperatura (Nishida *et al.*, 2004).

También se han desarrollado matrices acelulares aisladas que presentan algunas propiedades de tipo estromal y que proporcionan soporte a la penetración celular y a la regeneración tisular tras su implantación, con algunos resultados alentadores (Li *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006). Este último enfoque supone proporcionar un andamiaje optimizado que facilita la colonización celular y el remodelado tisular tras la implantación. Si prospera, esta estrategia presentaría la virtud de resultar más fácil y económica de implementar en un contexto clínico que otras soluciones más complejas.

Sin embargo, todas las matrices biológicas creadas hasta el momento carecen por completo de la muy organizada arquitectura tridimensional basada en el colágeno presente en la estroma nativa.

El colágeno ha sido alineado con éxito utilizando varias técnicas. El flujo electrohidrodinámico o el electrohilado pueden generar láminas colágenas orientadas. La primera técnica da lugar a cintas ultrafinas de fibrillas de diámetro pequeño (~3 nm) muy orientadas (Jian *et al.*, 2004), mientras que el electrohilado resulta en fibras más gruesas menos bien orientadas de diámetro variable (Boland *et al.*, 2004; Matthews *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha demostrado que ninguna de estas técnicas pueda dar lugar a nada más que a materiales alineados unidireccionalmente. Otro enfoque aprovecha la ordenación cristalina líquida espontánea que tiene lugar con el tiempo en las soluciones de colágeno a elevada concentración. Se forma una fase colestérica en la que las moléculas se alinean en planos que giran continuamente de un modo helicoidal. Se forman matrices ordenadas tridimensionalmente mediante la inducción de fibrillogénesis (Besseau *et al.*, 2002; Mosser *et al.*, 2006). La colonización de estas matrices densas de colágeno (≤ 40 mg/ml) por fibroblastos dérmicos humanos hasta una profundidad de 400 μm en un mes demuestran que presentan potenciales aplicaciones de ingeniería tisular.

El colágeno altamente orientado (Torbet y Ronziere, 1984; Murthy, 1984) se produce al transformar una solución de moléculas en un gel en un campo magnético fuerte debido al efecto acumulado de la multitud de moléculas anisotrópicas débilmente diamagnéticas (Worcester, 1978). Muchos tipos celulares, entre ellos fibroblastos (Guido y Tranquillo, 1993), queratinocitos, osteoblastos (Kotani *et al.*, 2000), neuritas (Dubey *et al.*, 1999) y células endoteliales que experimentan angiogénesis (Torbet *et al.*, 2000), se alinean mediante guiado por contacto al sembrarse en estos sustratos de colágeno o fibrina orientados magnéticamente. Se han propuesto dos aplicaciones de ingeniería tisular basadas en la orientación magnética de estos polímeros biológicos: tubos huecos que presentan una pared exterior de colágeno de tipo I orientado circunferencialmente para arterias bioartificiales (Tranquillo *et al.*, 1996) y barras con fibrina o colágeno alineado uniaxialmente para la regeneración nerviosa (Ceballos *et al.*, 1999).

Existe una necesidad de desarrollar estructuras multicapas similares a tejidos que puedan utilizarse como implantes en medicina. Además, estas estructuras multicapa similares a tejidos deberían adaptarse a la anatomía de los tejidos naturales, tal como la estructura ortogonal de la córnea.

La solicitud de patente internacional publicada el 17 de junio de 2004 con el número WO 2004/050134 y el documento Ruberti *et al.* (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44:E-resumen nº 4.218, 2003) proceden ambos del Cambridge Polymer Group y entre los autores de Ruberti *et al.* se incluyen los inventores del documento WO 2004/050134. Estos dos documentos dan a conocer la misma técnica, es decir, la rotura para obtener lamelas corneales. Sin embargo, Ruberti *et al.* dan a conocer la existencia de parches de alineación aleatoria de las fibrillas en algunas áreas y la falta de control sobre el diámetro de las fibrillas del constructo.

Además, ninguno de dichos documentos da a conocer que las células se alineen uniformemente en el constructo.

En el contexto de la presente invención se ha resuelto este problema mediante el desarrollo de un procedimiento que comprende la polimerización sucesiva de capas de una solución formadora de fibras de colágeno en presencia de un campo magnético. De esta manera se obtiene un andamiaje lamelar que comprende fibras que se encuentran orientadas unidireccional y uniformemente dentro de cada capa, tal como puede observarse en la figura 3, que son similares a las presentes *in vivo*. Esta solución ofrece la gran ventaja de que las capas de fibras polimerizadas orientadas no resultan alteradas por aplicaciones posteriores del campo magnético y de esta manera su orientación no resulta modificada.

Además, el andamiaje lamelar de la presente invención puede comprender una orientación diferente de las fibras de colágeno de una capa y la siguiente. De esta manera, pueden crearse andamiajes laminados similares a la estroma corneal que constan de múltiples capas ortogonales entrelazadas de fibras de colágeno orientadas. Los queratocitos sembrados en geles de colágeno orientados unidireccionalmente se orientan uniformemente a lo largo de la dirección de las fibrillas de colágeno y penetran en el gel de colágeno, en el que se alinean siguiendo la dirección de las fibrillas de colágeno dentro de las lamelas. Debido a que las células epiteliales y endoteliales también migran y proliferan en este andamiaje, pueden formar la base para la reconstrucción de equivalentes corneales hemicompletos o completos para la utilización en la queratoplastia lamelar o penetrativa, respectivamente.

Pueden utilizarse andamiajes en forma de implantes aislados, o sembrarse con células previamente a la implantación o implantarse tras dejar un periodo de maduración *in vivo* hasta el desarrollo de propiedades de tipo tisular. Además de sus potenciales usos clínicos, los equivalentes corneales humanos de ingeniería tisular también pueden servir como alternativas a modelos animales para la experimentación cosmética y de toxicidad farmacológica. Como miméticos tridimensionales de órganos, también pueden facilitar el estudio *in vitro* de la compleja fisiología del tejido vivo.

De esta manera, en un primer aspecto, la invención tiene como objetivo un procedimiento para la preparación *in vitro* de una estructura corneal multicapa sintética que comprende o consta de fibras de colágeno, en la que las fibras en cada capa se encuentran orientadas unidireccional y uniformemente, que comprende las etapas siguientes:

a) colocar un soporte que contiene una capa de una solución formadora de fibras de colágeno en un campo magnético e inducción de la formación de fibras, con el fin de obtener fibras que se encuentren orientadas unidireccional y uniformemente en la capa,

b) introducir una capa adicional de la solución formadora de fibras de colágeno en el soporte, introduciendo dicha capa adicional sobre la capa obtenida en la etapa a),

c) colocar el soporte en el campo magnético e inducir la formación de fibras, con el fin de obtener fibras que se encuentren orientadas unidireccional y uniformemente en dicha capa adicional,

d) opcionalmente, repetir las etapas anteriores,

obteniendo de esta manera una estructura corneal multicapa sintética,

en el que la orientación de las fibras en por lo menos una capa difiere de la de por lo menos una de las capas situadas en posición superior y/o inferior a la misma según un ángulo alfa, y dicha orientación diferencial resulta de modificar mediante rotación según el ángulo alfa la posición del soporte de la etapa c) respecto a la posición del soporte en la etapa a).

La expresión "multicapa" se refiere a una estructura que comprende dos o más capas.

La expresión "orientada" o "unidireccionalmente orientada" se refiere en la presente memoria a fibras de polímero biológico que se encuentran sustancialmente alineadas en una dirección específica. Esta orientación puede comprobarse utilizando birrefringencia y/o microscopía electrónica y/o microscopía óptica. El término "uniformemente" se refiere a que la orientación es uniforme en toda una lamela dada, sin parches de alineación aleatoria de las fibras.

El soporte se refiere a cualquier recipiente que resulte apropiado para la utilización en la presente invención, en particular que permita la orientación del polímero biológico al aplicar el campo magnético. Puede ser de cualquier forma, tal como de pocillo con una base plana, o de molde, tal como un molde cilíndrico de sección transversal anular. El molde cilíndrico puede situarse verticalmente en un campo magnético horizontal. Dichos moldes cilíndricos que presentan una sección transversal anular encuentran aplicación en la preparación de huesos compactos o discos intervertebrales de tipo tisular. El pocillo que presenta una base plana puede situarse horizontalmente en un campo magnético horizontal. Los pocillos se utilizan preferentemente para preparar córneas de tipo tisular.

Ventajosamente, el soporte presenta una base impermeable o semipermeable.

En una forma de realización preferida, la orientación de las fibras en cada capa difiere de la de por lo menos una de las capas superiores y/o inferiores a la misma según el ángulo alfa.

El colágeno se encuentra en forma de una solución bajo determinadas condiciones y puede formar fibras mediante la modificación de dichas condiciones. El procedimiento de la invención también requiere que el colágeno se oriente en una única dirección al aplicar un campo magnético. Preferentemente, las fibras de colágeno son fibras de colágeno de tipo I y/o IV, y/o cualquier otro colágeno formador de fibras.

El grosor de las capas de la solución formadora de fibras de polímero biológico en el soporte es ventajosamente inferior a 3 mm.

Es bien conocido en la técnica que la solución formadora de fibras de colágeno es ácida y fría, y que las fibras de colágeno se obtienen elevando el pH y la fuerza iónica del colágeno soluble en ácido, así como mediante precipitación por calor del colágeno neutro soluble en sales (ver, por ejemplo, Murthy, 1984). En una forma de realización preferida, la formación de fibras de colágeno se induce, de esta manera, neutralizando y/o calentando la solución formadora de fibras de colágeno, ventajosamente hasta un pH comprendido entre 7 y 8, y/o a una temperatura comprendida entre 28°C y 35°C, ventajosamente 30°C.

Tal como es bien conocido en la técnica, las condiciones para inducir la formación de fibras de fibrina son diferentes de las del colágeno, debido a que se utiliza fibrinógeno para obtener las fibras de fibrina, mediante la acción del enzima trombina. De manera similar, también resulta posible inducir la formación de fibras de colágeno mediante el procesamiento proteolítico de precursores procolágeno solubles utilizando enzimas específicos. Dichos procedimientos de inducción de la formación de fibras también podrían utilizarse para obtener estructuras multicapa utilizando la metodología descrita en la presente memoria.

Existen varias publicaciones que describen cómo preparar fibrina orientada, tal como Torbet *et al.*, 1981; Freyssinet *et al.*, 1983; Ueno y Masakazu, 1993; Torbet, 1995; y Dubey *et al.*, 2001.

Ventajosamente, la concentración de la solución formadora de fibras de colágeno se encuentra comprendida entre 1 y 10 mg/ml.

Más preferentemente, la solución se neutraliza antes de la etapa de calentamiento, permitiendo de esta manera la introducción de la solución neutralizada formadora de fibras de polímero biológico en el soporte para formar una capa, y la etapa de calentamiento se lleva a cabo en presencia de un campo magnético con el fin de obtener fibras que se encuentren orientadas unidireccionalmente en la capa.

Las propiedades físicas y/o biológicas de la estructura multicapa sintética pueden modificarse mediante la adición de compuestos, preferentemente compuestos biocompatibles. Por ejemplo, pueden añadirse proteoglicanos en solución para mejorar la transparencia óptica de la estructura multicapa sintética. De esta manera, ventajosamente, la estructura multicapa sintética comprende además proteoglicanos. Más ventajosamente, dichos proteoglicanos se añaden antes de la formación de las fibras. Todavía más ventajosamente, dichos proteoglicanos se añaden a la solución neutralizada formadora de fibras de polímero biológico.

Ventajosamente, se introducen enlaces cruzados covalentes con el fin de proporcionar resistencia ténsil y estabilizar las fibras frente a la degradación proteolítica. La introducción se lleva a cabo ventajosamente en la estructura multicapa sintética obtenida.

De esta manera, en otra forma de realización, la estructura multicapa sintética comprende además enlaces cruzados covalentes obtenidos utilizando compuestos químicos, tales como hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EC) o éster de N-hidroxisuccinimida (NHS).

En otra forma de realización, la estructura multicapa sintética comprende además unos enlaces cruzados covalentes obtenidos utilizando enzimas tales como la transglutaminasa o la lisilo oxidasa.

Las fibras de colágeno que se utilizarán en la invención pueden resultar de un extracto de un tejido biológico, o pueden ser recombinantes. Preferentemente, las fibras de colágeno son fibras de colágeno recombinante, ventajosamente fibras de colágeno recombinante humano. Las fibras de colágeno recombinante pueden obtenerse de FIBROGEN Inc.

Ventajosamente, la estructura multicapa sintética se deshidrata mediante evaporación o transferencia (blotting) utilizando un soporte semipermeable. La deshidratación permite concentrar la estructura multicapa sintética con el fin de obtener una estructura que sea similar a las presentes *in vivo*. Ventajosamente, la concentración de la estructura multicapa sintética se encuentra comprendida entre 100 y 200 mg/ml, ventajosamente es de 160 mg/ml.

Más ventajosamente, la estructura multicapa sintética se liofiliza. Las estructuras multicapa sintéticas liofilizadas de la invención resultan muy apropiadas para el almacenamiento. La liofilización permite además crear más porosidad en la estructura.

Un campo magnético apropiado para la utilización en la presente invención es generalmente un campo magnético de alta intensidad (4,7 a 9 Tesla). Preferentemente, el campo magnético es un campo magnético estático, y puede generarse con un electroimán de túnel horizontal, tal como los de la compañía Oxford Company of the United Kingdom.

Preferentemente, el ángulo alfa se encuentra comprendido entre 30° y 150°. En una forma de realización particularmente ventajosa, el ángulo alfa es de aproximadamente 90°, obteniendo de esta manera una estructura multicapa ortogonal sintética.

En un segundo aspecto, la invención tiene como objeto una estructura corneal multicapa sintética que comprende o que consiste de fibras de colágeno, en la que las fibras de colágeno en cada capa se encuentran orientadas unidireccional y uniformemente, pudiendo obtener dicha estructura mediante el procedimiento para la preparación *in vitro* de una estructura corneal multicapa sintética según la invención.

En una forma de realización ventajosa, la orientación de las fibras en por lo menos una capa, preferentemente cada capa, difiere de la de por lo menos una de las capas superiores y/o inferiores a la misma según el ángulo alfa.

Preferentemente, las fibras de colágeno son fibras de colágeno de tipo I y/o V.

En otra forma de realización, la estructura multicapa sintética comprende además proteoglicanos.

5 En una forma de realización adicional, la estructura multicapa sintética comprende además unos enlaces cruzados covalentes obtenidos utilizando compuestos químicos tales como hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) o éster de N-hidroxisuccinimida (NHS).

10 En otra forma de realización, la estructura multicapa sintética comprende además unos enlaces cruzados covalentes obtenidos utilizando enzimas tales como la transglutaminasa o lisilo oxidasa.

Ventajosamente, las fibras de colágeno son fibras de colágeno recombinantes, ventajosamente fibras de colágeno recombinantes humanas.

15 En una forma de realización ventajosa particular, la estructura multicapa sintética según la invención se liofiliza.

Preferentemente, el ángulo alfa se encuentra comprendido entre 30° y 150°. Más preferentemente, el ángulo alfa es de 90°, y la estructura es una estructura multicapa ortogonal sintética.

20 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación *in vitro* de una estructura multicapa corneal similar a un tejido biológico, que comprende la preparación de una estructura corneal multicapa sintética según el procedimiento de la presente invención, y la inoculación de células en la misma.

25 Las células que deben inocularse pueden ser de cualquier tipo. El tipo celular generalmente es del tejido que se pretende recrear, por ejemplo células musculares lisas para un tejido de tipo muscular. Preferentemente, las células son células de mamífero, más preferentemente células humanas.

30 Más preferentemente, la estructura corneal similar a tejido multicapa de colágeno es una etroma corneal, una hemicórnea o una córnea completa. Preferentemente, las células son queratocitos, células endoteliales, células epiteliales o una combinación de las mismas.

35 Pueden añadirse células a la solución formadora de fibras de polímero biológico previamente al ensamblaje de las fibras y tras ajustar a condiciones prácticamente fisiológicas de pH y fuerza iónica. También pueden añadirse células a la estructura multicapa previamente formada. De esta manera, en una forma de realización preferida, la inoculación de células se realiza mediante la adición de las células a la solución neutralizada formadora de fibras de colágeno y/o mediante la adición de las células a la estructura similar a tejido multicapa de colágeno.

40 En un aspecto adicional, la invención tiene como objeto una estructura corneal similar a un tejido biológico que comprende la estructura corneal multicapa sintética según la invención y las células inoculadas en la misma. Dicha estructura corneal similar a un tejido biológico multicapa puede obtenerse mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Preferentemente, las células son células de mamífero, ventajosamente células humanas.

45 En una forma de realización preferida, la estructura similar a un tejido biológico multicapa según la invención es una estructura corneal similar a tejido multicapa de colágeno, ventajosamente una córnea similar a tejido multicapa de colágeno ortogonal, tal como una etroma corneal, una hemicórnea o una córnea completa. Preferentemente, las células son queratocitos, células endoteliales, células epiteliales o una combinación de las mismas.

50 La estructura multicapa similar a un tejido biológico puede ser similar además a cualquier tejido que presente una estructura multicapa, tal como aquéllas en las que la dirección se alterna de una capa a la siguiente, incluyendo, por ejemplo, además de la córnea, el hueso compacto o los discos intervertebrales.

55 En un aspecto adicional, la invención tiene como objeto la utilización de la estructura multicapa sintética según la invención para la preparación de una estructura multicapa similar a un tejido biológico.

Además, la presente invención tiene como objeto la estructura corneal multicapa similar a un tejido biológico según la invención para la utilización como medicamento.

60 En un aspecto adicional, la invención tiene como objeto la utilización de la estructura corneal multicapa similar a un tejido biológico según la invención para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o tratamiento de un tejido biológico dañado en un sujeto, tal como un mamífero, preferentemente un ser humano.

También se encuentra comprendido en la presente memoria un procedimiento de tratamiento y/o prevención de un tejido biológico dañado en un sujeto utilizando la estructura corneal multicapa similar a un biológico según la invención.

5 Además, la presente invención tiene como objeto la utilización de la estructura corneal multicapa similar a un tejido biológico según la invención como modelo para la experimentación biológica, tal como la experimentación de la toxicidad farmacológica.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a la utilización de la córnea similar a tejido multicapa ortogonal de colágeno según la invención para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o tratamiento de un tejido corneal dañado en un sujeto, tal como estroma corneal, hemicórnea, córnea completa o una combinación de las mismas. La invención también se refiere a la utilización de la córnea similar a tejido multicapa ortogonal de colágeno según la invención para el tratamiento de un tejido corneal dañado en un sujeto, tal como estroma corneal, hemicórnea, córnea completa o una combinación de las mismas. Preferentemente, las células son queratocitos, células endoteliales, células epiteliales o una combinación de las mismas.

15 También se encuentra comprendido en la presente memoria un procedimiento de tratamiento y/o prevención de un tejido corneal dañado en un sujeto utilizando la córnea similar a tejido multicapa ortogonal de colágeno según la invención.

20 Se proporcionan otras formas de realización de la invención en los ejemplos y figuras siguientes.

Leyenda de las figuras

25 **Figura 1.** Cambio de turbidez al ensamblarse colágeno de tipo 1 (c=1,84 mg/ml) de rata soluble en ácido formando fibrillas tras la neutralización con tampón.

Figura 2. SEM de fibras de colágeno: A, lamelas de orientación única; B, dos lamelas ortogonales.

30 **Figura 3.** Micrografía óptica que desciende verticalmente a través de un gel (2 mg/ml) que consiste de tres lamelas. La lamela intermedia es perpendicular a las otras dos. También se observa un cambio de orientación de 90° de capa intermedia a capa del fondo.

35 **Figura 4.** Sección teñida que muestra un andamiaje de tres lamelas. El colágeno en la lamela intermedia se encuentra orientado horizontalmente. Las tres capas se muestran a partir de la variación en la distribución de la tinción. Grosor total: 38 µm. El grosor antes del secado era de ≈600 µm.

40 **Figura 5.** Queratocitos sembrados en geles de colágeno no orientados (izquierda) y orientados (derecha). Las células se alinean con las fibrillas orientadas (flechas).

45 **Figura 6.** Se sembraron queratocitos sobre un andamiaje de tres lamelas. Las células sobre las capas superior e inferior se encuentran alineadas perpendicularmente a la superficie; la capa intermedia se encuentra orientada horizontalmente. Las células han infiltrado la matriz y su forma indica que se han alineado mediante guiado por contacto. El soporte semipermeable es visible al fondo.

Figura 7. Estructura de la córnea.

Ejemplos

50 **Materiales y procedimientos**

Andamiajes de colágeno 3-D orientados:

55 Se utilizó colágeno de tipo I de cola de rata soluble en ácido (ácido acético 0,2 N, ≈4 mg/ml) de BD Biosciences y colágeno de tipo I de piel bovina proporcionado por Symatase biomatériaux. Esta solución se neutralizó a 4°C con un volumen igual de tampón (fosfato 60 mM, HEPES 60 mM, NaCl 270 mM, pH=7,4). A continuación, se pipetearon alícuotas sobre el soporte para muestras previamente enfriado y se colocaron horizontalmente en la región central del imán recto que se encontraba a 20°C. Tras unos cuantos minutos, se elevó la temperatura progresivamente a 30°C durante un periodo de aproximadamente 10 minutos. El paso por el imán duró un total de aproximadamente 30 minutos. Durante este periodo las moléculas de colágeno se ensamblaron formando fibrillas y fibras, transformando la solución en un gel viscoso. Con el fin de crear lamelas ortogonales, se retiró del imán el gel que ya se había orientado y se recubrió con una alícuota de solución de colágeno neutralizado frío y se colocó nuevamente en el imán que se había girado en el ángulo deseado con respecto a la orientación anterior. Mediante la utilización de este procedimiento, se construyeron andamiajes organizados en un patrón ortogonal.

65

Los soportes para muestras eran placas de cultivo de plástico de fondo de vidrio (MatTek Co.) o soportes de policarbonato semipermeables Transwell® (Corning Co.). Las placas de cultivo (diámetro exterior: 35 mm) presentaban un pocillo central de vidrio (diámetro: 14 mm) poco profundo (profundidad: 1,5 mm). Se cortaron las placas Transwell, produciendo pocillos individuales. Los pocillos (diámetro interior: 12 mm) se introdujeron en placas de Petri de plástico estándares de 35 mm. El diámetro de poro de la membrana semipermeable era de 0,4, 3 ó 12 μm . El volumen de solución de colágeno neutralizada añadido a los pocillos variaba entre 80 y 200 μl , lo que corresponde a un grosor totalmente hidratado de entre 0,5 y 1,3 mm. Se controló el grosor del gel a partir del volumen de solución inicial.

Se utilizó un imán superconductor de bobina con derivaciones (Thor Cryogenics) con el túnel a temperatura ambiente. El túnel era horizontal, de 5 cm de diámetro y presentaba una longitud total de 40 cm. La camisa estabilizadora de la temperatura reducía el diámetro efectivo a aproximadamente 4,5 cm. El perfil del campo se elevó a un nivel constante plano que se extendía ± 5 cm en torno al centro del túnel, permitiendo colocar simultáneamente hasta tres muestras de 35 mm de diámetro en el campo máximo. Se controló la temperatura del espacio de muestras haciendo circular agua procedente de un baño de temperatura controlada. El campo utilizado para el procesamiento presentaba prácticamente el máximo de intensidad (7 Tesla). Este imán fue proporcionado por el Grenoble High Magnetic Field Laboratory, financiado por el CNRS.

La turbidez, definida como la densidad óptica, se midió a 400 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman. Las soluciones se mezclaron en frío y se transfirieron a una celda para muestras calentada previamente (celdas de cuarzo de 1 mm de camino óptico) colocadas en el espectrofotómetro.

Se pudieron conservar andamiajes deshidratados durante varios meses, pero tras rehidratarlos con medio de conservación se utilizaron dentro de los 7 días posteriores. El medio de conservación eran 200 μl de DMEM utilizando una concentración doble de antibiótico a $+4^{\circ}\text{C}$. DMEM, 50 ml; penicilina G, 50 μl (200 UI/ml); gentamicina, 100 μl (40 $\mu\text{g/ml}$); fungizona, 100 μl (2 $\mu\text{g/ml}$).

Se aislaron queratocitos a partir de córneas humanas extraídas siguiendo normas éticas. Las córneas se almacenaron a 31°C en cultivo de órganos, aunque no eran utilizables para el tratamiento debido a que la densidad endotelial era excesivamente baja. Se realizó el aislamiento con colagenasa A (Roche, ref. n° 10103586), 3 mg/ml durante 3 horas a 31°C bajo agitación a 200 rpm. Se purificó el dígido a través de un tamiz celular de 70 μm (BD Falcon, ref. n° 352350) y se sometió inmediatamente a cultivo en monocapa.

Los queratocitos se sembraron a una densidad de 10.000 células/ cm^2 y después se cultivaron en un medio especialmente diseñado que permitía un crecimiento óptimo y la conservación del fenotipo: DMEM/F12 de Ham 1:1, NCS al 10%, bFGF 5 ng/ml y antibióticos. Se cambió el medio cada dos días hasta alcanzar la confluencia celular. En la confluencia, las células se resuspendieron en tripsina-EDTA (0,5 g de tripsina/l y 0,2 g de EDTA/l) (Sigma, ref. n° CR0303) y se amplificaron en 3 pases (de P0 a P2) y se sembraron en P3 dentro de la matriz. Procedimientos SEL, TEM.

Resultados

[Figuras 1 y 2A] En la figura 1 se muestra una curva de ensamblaje típica del colágeno de tipo I obtenida tras la neutralización de colágeno soluble en ácido con tampón. El gel resultante (2 mg/ml, 1 mm de grosor) era translúcido. Al producirse este proceso de ensamblaje en un campo magnético fuerte, se produce un gel alineado (fig. 2A). Aunque las moléculas de colágeno se orientan perpendicularmente a la dirección del campo aplicado debido al valor negativo de su anisotropía diamagnética (Worcester, 1978c), resulta un elevado nivel de alineación gracias a la influencia de restricciones de superficie (Torbet y Ronziere, 1984a). Las fibrillas son dos a cuatro veces más gruesas (60 a 110 nm) que las de la estroma nativa y frecuentemente también se agregan en grandes racimos que generalmente se encuentran mejor orientados que las fibrillas separadas. El grado de orientación resulta suficiente para inducir la guía por contacto de los queratocitos, tal como se muestra posteriormente. Los procedimientos de preparación necesarios para la visualización por SEM compactan significativamente, y posiblemente distorsionan, el gel.

[Figuras 2B, 3 y 4] Debido a que los geles de colágeno son estables, no pierden orientación al sacarlos del campo, de manera que pueden utilizarse como andamiajes orientados en su estado altamente hidratado inicial o deshidratarse y después rehidratarse. Su estabilidad también implica que pueden crearse multicapas con cualquier orientación relativa deseada adoptando un procedimiento de fabricación de capa por capa. Esto se consigue simplemente mediante recubrimiento de un gel ya formado con una solución fresca de colágeno neutralizado y repitiendo el proceso de ensamblaje en el campo magnético con la muestra girada respecto a la dirección del campo. Mediante la combinación de una serie de ciclos de gelación-rotación-gelación, se construyeron andamiajes de lamelas ortogonales. Este procedimiento de fabricación también garantiza que las capas contiguas se encuentren íntimamente interconectadas al penetrar la solución recién neutralizada de colágeno añadida en las capas superficiales del gel existente, formando de esta manera una capa límite entrelazada similar a la córnea nativa (fig. 2).

La concentración final de colágeno en los geles orientados (≈ 2 mg/ml) es claramente inferior a la presente en la estroma corneal, que es del orden de 160 mg/ml. Sin embargo, los andamiajes hidratados pueden concentrarse fácilmente en láminas en cualquier grado deseado con poca o ninguna pérdida de orientación, mediante evaporación o transferencia, del soporte semipermeable. La evaporación es lenta y resulta en la acumulación de sales y tampón, mientras que la transferencia es rápida y no provoca ningún cambio de las condiciones osmóticas, y en consecuencia puede utilizarse en presencia de células. Los andamiajes totalmente hidratados también se han liofilizado para proporcionar esponjas porosas, aunque hasta el momento no se han llevado a cabo estudios de crecimiento celular sobre este tipo de soporte.

[Figura 5] Se sembraron queratinocitos a la misma densidad sobre geles de colágeno tanto no orientados como orientados unidireccionalmente que se encontraban a la concentración original de 2 mg/ml o habían experimentado la deshidratación y rehidratación con medio de crecimiento previamente a la siembra celular. Las células en el gel no orientado siguieron encontrándose distribuidas aleatoriamente tras tres días, mientras que sobre el soporte orientado, la células se encontraban alineadas uniformemente a lo largo de la dirección de las fibrillas de colágeno. La densidad celular era más alta en el sustrato orientado, sugiriendo que la proliferación era más rápida sobre este soporte. La figura 5 se obtuvo utilizando geles que no habían experimentado deshidratación antes de la preparación para el estudio de SEM. Se obtuvieron resultados similares utilizando láminas secas rehidratadas con medio de crecimiento. De esta manera, tras confirmar que la deshidratación no perjudicaba a las propiedades de guiado celular, se utilizaron láminas secas como material de partida para todos los experimentos posteriores.

[Figura 6] No resulta inesperado a la luz de los resultados anteriores que los queratocitos se alineen sobre la superficie del colágeno orientado (fig. 5). Desde el punto de vista de la reconstrucción de la córnea, resulta vital que las células penetren en el andamiaje similar a estroma y continúen siendo conducidas mediante la guía por contacto. La figura 6 muestra un ejemplo de tres lamelas ortogonales soportadas sobre una membrana semipermeable sembrada con queratocitos. Resulta evidente a partir de esta imagen que las células penetran en la matriz y se alinean a lo largo de la dirección del colágeno que constituye cada lamela.

Se ha demostrado asimismo que el crecimiento de las células epiteliales y endoteliales también se encuentra soportado por esta matriz.

Discusión

Utilizando la orientación magnética, se construyó un andamiaje de base colágeno lamelar ortogonal que soportaba el crecimiento orientado y penetración *in vitro* de los queratocitos. Este andamiaje puede formar la base de un implante que estimulará la regeneración de la córnea dañada de manera que dé lugar a las propiedades esenciales inherentes a la estroma nativa. Existen varias razones para el optimismo. Una matriz colágena acelular de lamelas ortogonales constituye la estroma primaria que sirve como molde sobre la que se organiza la estroma infiltrada de células adulta (Trelstad y Coulombre, 1971b). También se ha demostrado (Hu *et al.*, 2005) que las propiedades de la estroma corneal reconstruida tras el injerto de una matriz artificial es similar (claridad óptica, diámetro de las fibrillas) a las de la estroma nativa. Finalmente, la síntesis de colágeno por parte de las células orientadas se ha demostrado que se alinea a lo largo de la dirección de las células (Wang *et al.*, 2003). De esta manera, los queratocitos pueden infiltrarse en el andamiaje acelular, degradándolo a medida que construyen una etroma transparente con una organización prácticamente nativa.

Existen dos maneras por las que podrían construirse compuestos de células-andamiaje *in vitro*. Podrían dirigirse queratocitos al interior de andamiajes diluidos soportados sobre una membrana semipermeable mediante un flujo, con la condición de que el andamiaje sea suficientemente poroso. En segundo lugar, podrían añadirse células a la solución neutralizada de colágeno antes de la exposición al campo magnético. Aunque existen datos que sugieren que la exposición a un campo magnético fuerte podría perjudicar la función y viabilidad celular, las células supervivientes aparentemente se recuperan tras retirar el campo (Valiron *et al.*, 2005). La exposición prolongada a campos intensos se ha demostrado que induce la orientación celular (Eguchi *et al.*, 2003; Iwasaka *et al.*, 2003), aunque es improbable que este efecto resulte importante en el presente contexto ya que las muestras permanecen en el campo durante un tiempo relativamente corto antes de girarse con respecto al campo. Ambos procedimientos de creación de compuestos de células-andamiaje resultan inicialmente en compuestos bastante diluidos; sin embargo, pueden compactarse mediante transferencia a través del soporte semipermeable sin exponer las células a un estrés osmótico significativo. El procedimiento de flujo, en caso de ser viable, es más probable que presente aplicaciones clínicas, debido a que el andamiaje libre de células podría construirse, transportarse y almacenarse hasta la utilización.

[Mejora de la transparencia] Ni los geles diluidos ni los andamiajes concentrados presentados en la presente memoria son transparentes. Resultaría mejor para el paciente disponer de un implante prácticamente transparente desde el mismo inicio. Afortunadamente, los andamiajes orientados pueden hacerse más transparentes mediante la adición de proteoglicanos (PG). En un estudio separado, se ha observado que la transparencia mejora en gran medida mediante la adición de PG corneales a la solución de partida de colágeno neutralizado. En contraste con publicaciones anteriores, los resultados preliminares sugieren que los PG no presentan una influencia significativa sobre el diámetro medio de las fibrillas sino que incrementan la transparencia al romper los agregados de fibrillas.

Hasta aproximadamente 10% de PG/colágeno (p/p), la orientación resultante producida por un campo de 7 Tesla resultó suficiente para provocar la guía por contacto de queratocitos sembrados en la superficie. A las concentraciones más altas de PG necesarias para prácticamente la transparencia se pierde esta propiedad. Únicamente puede conseguirse una orientación magnética elevada bajo condiciones que favorecen la cooperatividad ordenada, de manera que se maximiza la anisotropía diamagnética efectiva. Aparentemente, la presencia de los PG reduce este efecto, posiblemente reduciendo la agregación de fibrillas, lo que en consecuencia resulta en una menor orientación. La utilización de un campo magnético más fuerte podría mejorar la orientación alcanzable en presencia de concentraciones más altas de PG (la torca magnética se doblaría incrementando el campo hasta sólo 10 Tesla, al ser proporcional al cuadrado de la intensidad de campo).

[Producción en masa] Para que un material biológico presente la posibilidad de procesamiento de laboratorio a la clínica, resulta esencial la fabricación rentable. Las muestras habitualmente se dejó que se orientasen en el imán durante un tiempo total de aproximadamente 30 minutos. Sin embargo, la exposición óptima al campo que resulta necesaria probablemente es significativamente más corta. La curva de turbidez (fig. 1) se caracteriza por una etapa de retardo durante la que no se produce ningún cambio detectable de turbidez, una etapa de crecimiento de cambios rápidos de turbidez y una región de meseta en la que la turbidez se mantiene prácticamente constante. Aunque el procedimiento completo dura por lo menos 15 minutos, no resulta necesario mantener las muestras en el campo máximo durante toda la fibrillogénesis para obtener la máxima orientación. Las moléculas individuales sólo presentan una anisotropía muy débilmente diamagnética (Worcester, 1978), de manera que un nivel elevado de orientación depende de la formación de matrices ordenadas, sumándose las anisotropías moleculares y dando lugar a un valor global suficiente para promover un nivel elevado de orientación. Durante el periodo de retardo, los componentes de la solución interactúan débilmente, por lo que, bajo estas condiciones de cooperatividad pobre, el campo magnético resulta ineficaz. De esta manera, la presencia del campo durante toda esta etapa aporta poco en cuanto a una orientación mejorada. Durante la etapa de crecimiento rápido, las moléculas de colágeno interactúan creando fibrillas y fibras, dando lugar la adición de anisotropías diamagnéticas moleculares a una anisotropía diamagnética relativamente grande y, en consecuencia, a un nivel elevado de orientación. Al igual que con la fibrina (Freysinnet *et al.*, 1983), el grado de alineación probablemente "se congela" aproximadamente en el momento en que la solución se convierte en un gel. El punto exacto de gelación no se conoce, pero probablemente se produce mucho antes de que la turbidez haya alcanzado su valor máximo. Estas consideraciones sugieren que la muestra debe permanecer en el campo máximo sólo durante aproximadamente 5 minutos, es decir el tiempo entre el final del periodo de retardo hasta que la turbidez ha alcanzado aproximadamente la mitad de su valor máximo. Con el imán utilizado actualmente el área máxima de colágeno orientado que puede producirse simultáneamente es de aproximadamente 20 cm².

[Lamelas alternativas] Debido a que la fibrina, otro material biológico utilizado frecuentemente, también experimenta la orientación magnética durante la polimerización, pueden crearse andamiajes de lamelas apiladas de fibrina orientada de la manera descrita en la presente memoria para el colágeno. También pueden producirse compuestos de colágeno-fibrina laminados en los que las capas alternativas presentan diferentes propiedades físicas y bioactivas.

Las lamelas compuestas de fibrina o de colágeno-fibrina también presentan el potencial de resultar útiles en la medicación de la córnea. Ya se utiliza fibrina no orientada como soporte para células epiteliales limbales de la córnea humana, que se injertan sobre la superficie corneal dañada (Rama *et al.*, 2001; Pellegrini *et al.*, 1997). Esta aplicación podría mejorarse mediante la utilización de láminas individuales orientadas o multicapas ortogonales, que imitarían más estrechamente la estructura de la estroma subyacente.

[Entrecruzamiento] Los estudios anteriormente indicados se llevaron a cabo con colágeno no entrecruzado. Los andamiajes pueden entrecruzarse químicamente o mediante la utilización de enzimas, tales como la transglutaminasa o la lisilo oxidasa. Este último probablemente puede utilizarse en presencia de células si se desea. El entrecruzamiento rigidifica el andamiaje, facilitando su manipulación y también alterando la tasa de degradación de la matriz.

[Número necesario de lamelas] La estroma humana contiene aproximadamente 200 lamelas cada una de las cuales presenta un grosor aproximado de 2 µm compuestas de 160 mg/ml de colágeno.

[Conformado del andamiaje] Debido a que el andamiaje se encuentra inicialmente muy diluido, resulta posible conformarlo en el momento de la concentración.

Conclusiones

Se ha desarrollado un nuevo procedimiento para la producción de andamiajes basados en colágeno orientado para la utilización en la ingeniería de tejidos. El procedimiento resulta en una estructura de capas; dentro de cada capa, las fibrillas de colágeno se encuentran orientadas uniaxialmente, mientras que el ángulo entre las fibrillas en cada capa sucesiva puede seleccionarse a voluntad. Dicha estructura de contrachapado trenzado se observa en varios tejidos conectivos (por ejemplo en la córnea, hueso compacto, disco intervertebral). También se han producido esponjas y láminas basadas en colágeno que podrían presentar otras aplicaciones en la reconstrucción de tendón y

músculo. La alineación de los queratocitos está dirigida por la orientación del colágeno, tanto sobre la superficie como dentro de la masa del andamiaje. La totalidad de los tres tipos celulares corneales crece sobre este andamiaje. De esta manera, el andamiaje presenta el potencial de actuar como una matriz aislada o proporcionar la base para constructos de soporte celular más sofisticados.

5

Referencias

- 10 1. Besseau, L., B.Coulomb, C.Lebretton-Decoster, and M.M.Giraud-Guille. 2002. Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* 23:27-36.
- 15 2. Boland, E.D., J.A.Matthews, K.J.Pawlowski, D.G.Simpson, G.E.Wnek, and G.L.Bowlin. 2004. Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering. *Front Biosci.* 9: 1422-1432.
3. Builles N, Bechetoille N, Justin V, Andre V, Barbaro V, Iorio ED, et al. Development of a hemicornea from human primary cell cultures for pharmacotoxicology testing. *Cell Biol Toxicol* 2007; 23(4): 279-92.
- 20 4. Geballos, D., X.Navarro, N.Dubey, G.Wendelschafer-Crabb, W.R.Kennedy, and R.T.Tranquillo. 1999. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 158:290-300.
5. Dubey, N., P.C.Letourneau, and R.T.Tranquillo. 1999. Guided neurite elongation and schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 158:338-350.
- 25 6. Dubey, N., P.C.Letourneau, and R.T.Tranquillo 2001. Neuronal contact guidance in magnetically aligned fibrin gels: effect of variation in gel mechanostuctural properties. *Biomaterials* 22, 1065-1075.
7. Eguchi, Y., M.Ogiue-Ikeda, and S.Ueno. 2003. Control of orientation of rat Schwann cells using an 8-T static magnetic field. *Neurosci. Lett.* 351: 130-132.
- 30 8. Freyssinet, J.M., J.Torbet, G.Hudry-Clergeon, and G.Maret. 1983. Fibrinogen and fibrin structure and fibrin formation measured by using magnetic orientation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80: 1616-1620.
- 35 9. Germain, L., F.A.Auger, E.Grandbois, R.Guignard, M.Giasson, H.Boisjoly, and S.L.Guerin. 1999a. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 67:140-147.
10. Griffith, M., R.Osborne, R.Munger, X.Xiong, C.J.Doillon, N.L.Laycock, M.Hakim, Y.Song, and M.A.Watsky. 1999a. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286: 2169-2172.
- 40 11. Guido, S. and R.T.Tranquillo. 1993. A methodology for the systematic and quantitative study of cell contact guidance in oriented collagen gels. Correlation of fibroblast orientation and gel birefringence. *J. Cell Sci.* 105 (Pt 2):317-331.
- 45 12. Hu, X., W.Lui, L.Cui, M.Wang, and Y.Cao. 2005. Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma. *Tissue Eng* 11:1710-1717.
13. Iwasaka, M., J.Miyakoshi, and S.Ueno. 2003. Magnetic field effects on assembly pattern of smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 39: 120-123.
- 50 14. Jiang, F., H.Horber, J.Howard, and D.J.Muller. 2004. Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes. *J. Struct. Biol.* 148: 268-278.
15. Kotani,H., M.Iwasaka, S.Ueno, and A.Curtis. Magnetic orientation of collagen and bone mixture. 87[9], 6191-6193. 2000. AIP.
- 55 16. Li, F., M.Griffith, Z.Li, S.Tanodekaew, H.Sheardown, M.Hakim, and D.J.Carlsson. 2005. Recruitment of multiple cell lines by collagen-synthetic copolymer matrices in corneal regeneration. *Biomaterials* 26:3093-3104.
- 60 17. Liu, Y., L.Gan, D.J.Carlsson, P.Fagerholm, N.Lagali, M.A.Watsky, R.Munger, W.G.Hodge, D.Priest, and M.Griffith. 2006. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 47:1869-1875.
18. Matthews, J.A., G.E.Wnek, D.G.Simpson, and G.L.Bowlin. 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules.* 3:232-238.

65

19. Meek, K.M., T.Blamires, G.F.Elliott, T.J.Gyi, and C.Nave. 1987. The organisation of collagen fibrils in the human corneal stroma: a synchrotron X-ray diffraction study. *Curr. Eye Res.* 6:841-846.
- 5 20. Minami, Y., H.Sugihara, and S.Oono. 1993. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 2316-2324.
21. Mosser, G., A.Anglo, C.Helary, Y.Bouligand, and M.M.Giraud-Guille. 2006. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biol.* 25:3-13.
- 10 22. Murthy, N.S. 1984. Liquid crystallinity in collagen solutions and magnetic orientation of collagen fibrils. *Biopolymers* 23:1261-1267.
23. Nishida, K., M.Yamato, Y.Hayashida, K.Watanabe, N.Maeda, H.Watanabe, K.Yamamoto, S.Nagai, A.Kikuchi, Y.Tano, and T.Okano. 2004. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature- responsive cell culture surface. *Transplantation* 77:379-385.
- 15 24. Pellegrini, G., C.E.Traverso, A.T.Franzi, M.Zingirian, R.Cancedda, and M.De Luca. 1997. Longterm restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349:990-993.
- 20 25. Rama, P., S.Bonini, A.Lambiase, O.Golisano, P.Paterna, M.De Luca, and G.Pellegrini. 2001. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency1. *Transplantation* 72: 1478-1485.
26. Schwab, I.R.; M.Reyes, and R.R.Isseroff. 2000. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 19:421-426.
- 25 27. Torbet J, J-M. Freyssinet and G. Hudry-Clergeon 1981. Oriented fibrin gels formed by polymerization in a strong magnetic field. *Nature* 289, 91-93;
- 30 28. Torbet, J. and M.C.Ronziere. 1984. Magnetic alignment of collagen during self-assembly. *Biochem. J.* 219:1057-1059.
29. Torbet, J. 1995 The Thrombin Activation Pathway Modulates the Assembly, Structure and Lysis of Human Plasma Clots In Vitro. *Thromb. Haemostasis.* 73, 785-792
- 35 30. Torbet,J., L.Tranqui, and C.Bureau. Magnetic processing of biological and synthetic polymers and crystals. The 3rd International Symposium on Electromagnetic Processing of Materials , 133-137. 2000.
31. Tranquillo, R.T., T.S.Girton, B.A.Bromberek, T.G.Triebes, and D.L.Mooradian. 1996. Magnetically orientated tissue-equivalent tubes: application to a circumferentially orientated media-equivalent. *Biomaterials* 17:349-357.
- 40 32. Trelstad, R.L. and A.J.Coulombre. 1971. Morphogenesis of the collagenous stroma in the chick cornea. *J Cell Biol.* 50:840-858.
- 45 33. Tsai, R.J., L.M.Li, and J.K.Chen. 2000. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* 343:86-93.
34. Ueno, S and I. Masakazu 1993. Effects of magnetic fields on fibrin polymerisation and fibrinolysis; *IEEE Trans. Magnetics* 29 3352-3354.
- 50 35. Valiron, O., L.Peris, G.Rikken, A.Schweitzer, Y.Saoudi, C.Remy, and D.Job. 2005. Cellular disorders induced by high magnetic fields. *J. Magn Reson. Imaging* 22:334-340.
36. Wang, J.H., F.Jia, T.W.Gilbert, and S.L.Woo. 2003. Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix. *J Biomech.* 36: 97-102.
- 55 37. Worcester, D.L. 1978. Structural origins of diamagnetic anisotropy in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75:5475-5477.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación *in vitro* de una estructura corneal multicapa sintética que comprende fibras de colágeno, en el que dichas fibras en cada capa se encuentran orientadas unidireccional y uniformemente, que comprende las etapas siguientes:
- 10 a) colocar un soporte que contiene una capa de una solución formadora de fibras de colágeno en un campo magnético e inducir la formación de fibras mediante la neutralización y el calentamiento de la solución formadora de fibras de colágeno, con el fin de obtener unas fibras que se encuentran orientadas unidireccional y uniformemente en la capa,
- 15 en el que la neutralización de la solución se lleva a cabo previamente a la etapa de calentamiento, permitiendo así introducir la solución formadora de fibras de colágeno neutralizada en el soporte para formar una capa, y la etapa de calentamiento se lleva a cabo en presencia del campo magnético, con el fin de obtener unas fibras que se encuentran orientadas unidireccionalmente en la capa,
- 20 b) introducir una capa adicional de la solución formadora de fibras de colágeno en el soporte, siendo dicha capa adicional introducida sobre la capa obtenida en la etapa a),
- 25 c) colocar el soporte en el campo magnético e inducir la formación de fibras mediante la neutralización y el calentamiento de la solución formadora de fibras de colágeno, con el fin de obtener fibras que se encuentran orientadas unidireccional y uniformemente en dicha capa adicional,
- en el que la neutralización de la solución se lleva a cabo previamente a la etapa de calentamiento, permitiendo así introducir la solución formadora de fibras de colágeno neutralizada en el soporte para formar una capa, y la etapa de calentamiento se lleva a cabo en presencia del campo magnético, con el fin de obtener unas fibras que se encuentran orientadas unidireccionalmente en la capa,
- 30 d) opcionalmente, repetir las etapas anteriores,
- obteniendo así una estructura corneal multicapa sintética,
- en el que la orientación de las fibras en por lo menos una capa difiere de aquella en por lo menos una de su capa superior y/o inferior según un ángulo alfa, y en el que dicha orientación diferencial resulta de cambiar mediante una rotación según el ángulo alfa la posición del soporte de la etapa c) respecto a la posición del soporte de la etapa a).
- 35 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la orientación de las fibras en cada capa difiere de aquella en por lo menos una de su capa superior y/o inferior según el ángulo alfa.
- 40 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la estructura corneal multicapa sintética comprende además proteoglicanos.
- 45 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la estructura corneal multicapa sintética comprende además unos enlaces cruzados covalentes obtenidos utilizando compuestos químicos tales como hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) o éster de N-hidroxisuccinimida (NHS).
- 50 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la estructura corneal multicapa sintética comprende además unos enlaces cruzados covalentes obtenidos utilizando enzimas tales como la transglutaminasa o la lisilo oxidasa.
- 55 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la estructura corneal multicapa sintética se deshidrata mediante evaporación o transferencia utilizando un soporte semipermeable.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la estructura corneal multicapa sintética se liofiliza.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ángulo alfa es de 90°, obteniendo así una estructura corneal multicapa ortogonal sintética.
- 60 9. Estructura corneal multicapa sintética que comprende fibras de colágeno, en el que dichas fibras en cada capa se encuentran orientadas unidireccional y uniformemente y en la que la orientación de las fibras en por lo menos una capa difiere de aquella en por lo menos una de su capa superior y/o inferior según un ángulo alfa, pudiéndose obtener dicha estructura mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Procedimiento para la preparación *in vitro* de una córnea similar a un tejido multicapa de colágeno, que comprende la preparación de una estructura corneal multicapa sintética de acuerdo con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y la inoculación de las células en la misma.
- 5 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha córnea similar a un tejido multicapa de colágeno es la estroma corneal, la hemicórnea o la córnea completa.
12. Procedimiento según la reivindicación 10 ó 11, en el que las células son queratocitos, células endoteliales, células epiteliales o una combinación de las mismas.
- 10 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la inoculación de células se lleva a cabo mediante la adición de las células a la solución formadora de fibras de colágeno neutralizada y/o añadiendo las células a la córnea similar a un tejido multicapa de colágeno.
- 15 14. Córnea similar a un tejido multicapa de colágeno que comprende la estructura corneal multicapa sintética según la reivindicación 9 y las células inoculadas en la misma.
15. Córnea similar a un tejido multicapa de colágeno según la reivindicación 14, que es una córnea similar a un tejido multicapa ortogonal de colágeno, tal como una estroma corneal, una hemicórnea o una córnea completa.
- 20 16. Córnea similar a un tejido multicapa de colágeno según la reivindicación 15, en la que las células son queratocitos, células endoteliales, células epiteliales o una combinación de las mismas.
17. Utilización de la estructura corneal multicapa sintética según la reivindicación 9, para la preparación de una córnea similar a un tejido multicapa de colágeno.
- 25 18. Córnea similar a un tejido multicapa de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, para su utilización como medicamento.
- 30 19. Utilización de la córnea similar a un tejido multicapa de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, como modelo para la experimentación biológica, tal como la experimentación de la toxicidad farmacológica.
20. Utilización de la córnea similar a un tejido multicapa ortogonal de colágeno según la reivindicación 15 ó 16, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de un tejido corneal dañado en un sujeto, tal como la estroma corneal, la hemicórnea, la córnea completa o una combinación de las mismas.
- 35

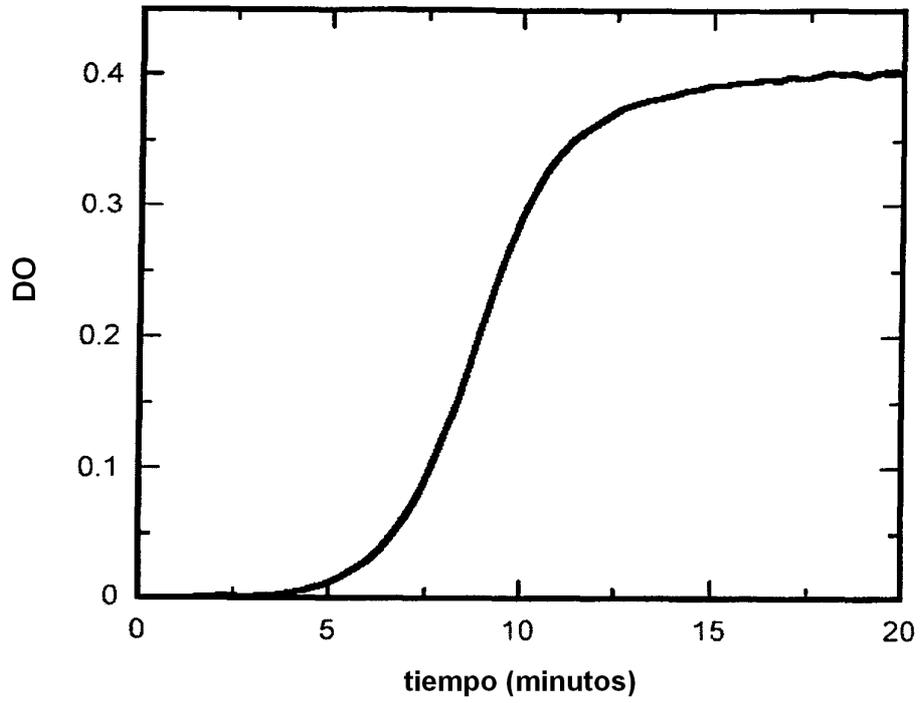


Figura 1

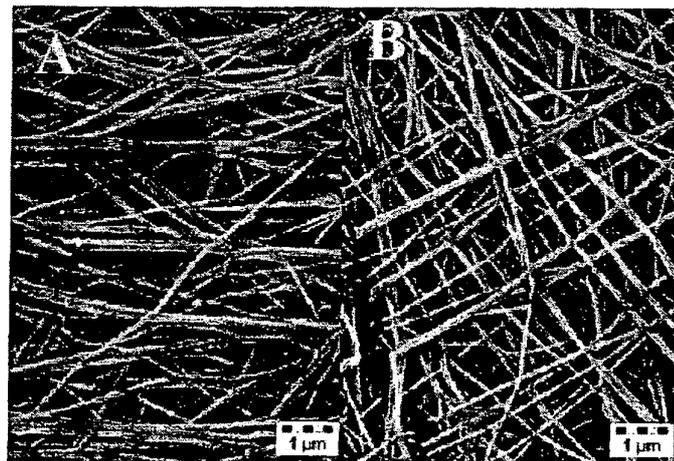


Figura 2

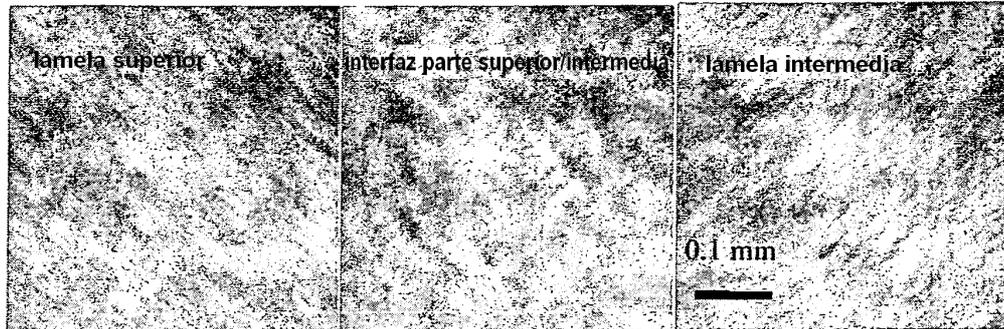


Figura 3

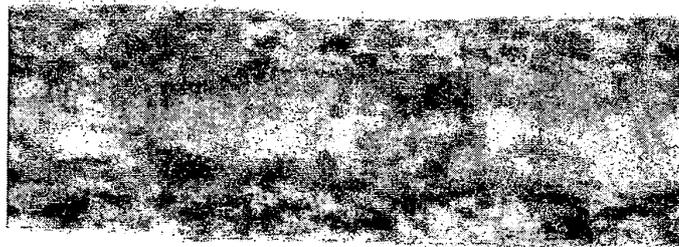


Figura 4

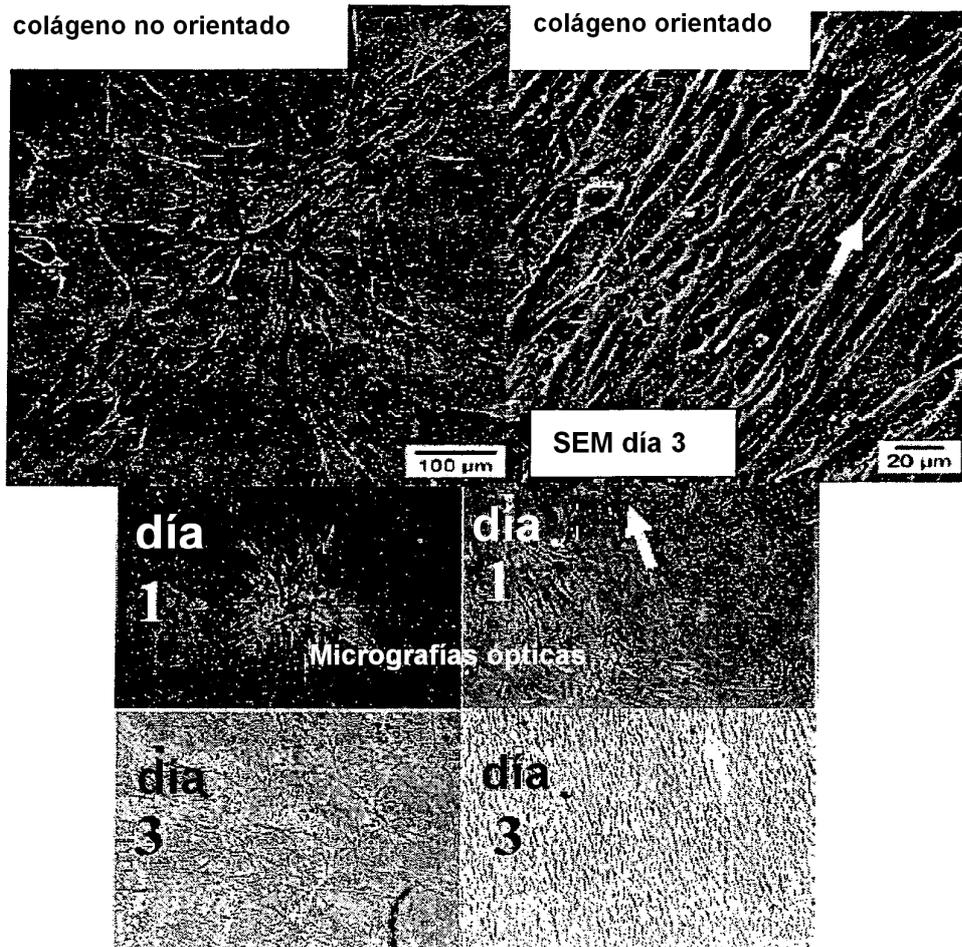


Figura 5

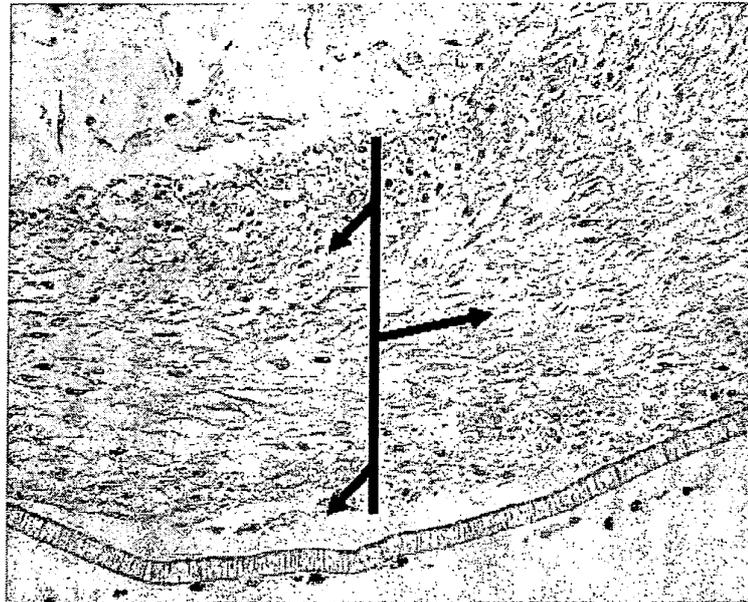


Figura 6

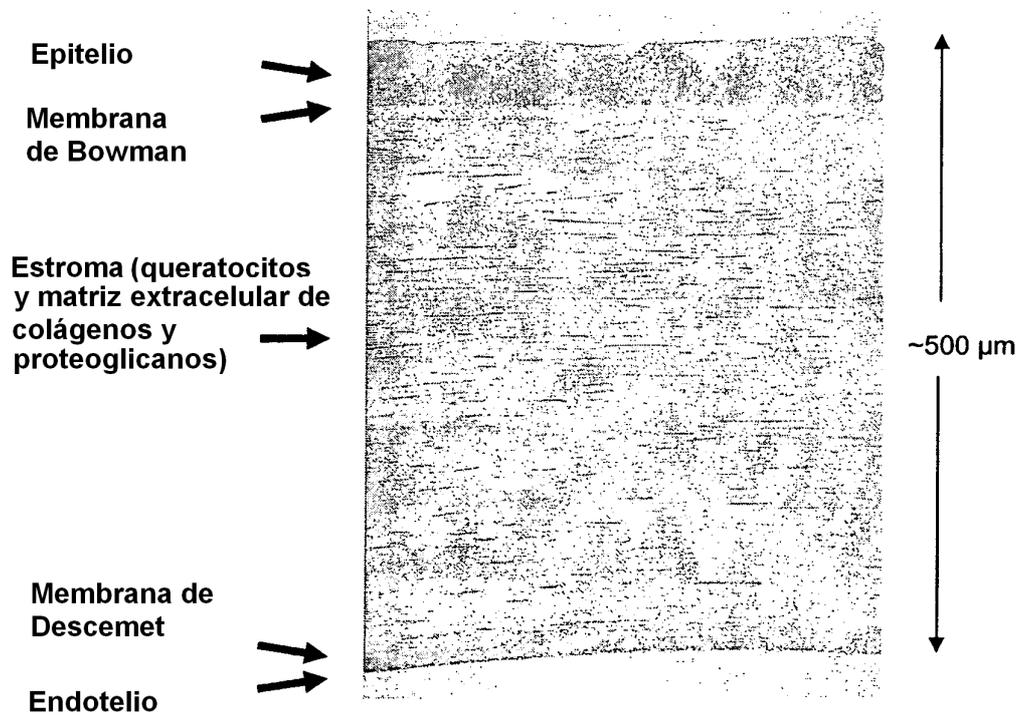


Figura 7