

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 865**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/38** (2006.01)

**A61F 2/14** (2006.01)

**A61L 27/50** (2006.01)

**A61L 27/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2006 E 06781252 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1944045**

54 Título: **Composición en forma de lámina**

30 Prioridad:

**25.07.2005 JP 2005214339**

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

**14.01.2014**

73 Titular/es:

**FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RESEARCH  
AND INNOVATION (50.0%)  
2-2, Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku  
Kobe Hyogo 650-0047, JP y  
KINOSHITA, SHIGERU (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, TAKAHIRO;  
YOKOI, NORIHIKO;  
KURIHARA, EIJI y  
KINOSHITA, SHIGERU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 437 865 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**

Composición en forma de lámina

**Campo técnico**

5 Esta invención se refiere a una composición en forma de lámina utilizando un amnios y un método para producir la misma. La composición en forma de lámina según la invención tiene aplicación, por ejemplo, como sustrato de cultivo para la producción de tejidos artificiales (tales como epitelio de la cornea), materiales de trasplante para la reconstrucción de superficies oculares, pieles, etc., y como materiales antiadhesivos.

**Antecedentes de la técnica**

10 El amnios tiene propiedades preferibles como material de trasplante, tales como elevada biocompatibilidad y flexibilidad, y se ha descubierto su utilización en la reconstrucción del epitelio de la cornea y muchos otros tejidos (véanse los Documentos de Patente de 1 a 4). La utilización del amnios puede clasificarse en gran medida en dos grupos. Es decir, se puede aplicar directamente en cualquier zona lesionada para reconstruir los tejidos, o se puede utilizar como un sustrato de cultivo para el cultivo de células. La flexibilidad del amnios es una propiedad crucial para cualquiera de estas aplicaciones. Debido a su alta flexibilidad, el amnios puede tapar la zona lesionada sin ningún hueco, con una adherencia favorable y disponerse en el sitio lesionado, lo que da como resultado un efecto terapéutico favorable. Por otro lado, cuando el amnios se aplica como un sustrato de cultivo para el cultivo de células, su alta flexibilidad le permite lograr una amplificación celular favorable y una organización (diferenciación) normal.

20 [Documento de Patente 1] Publicación de Patente Japonesa N° 5-56987, Boletín  
[Documento de Patente 2] Publicación Internacional N° 03/043542, Folleto A1  
[Documento de Patente 3] Publicación Internacional N° 03/92762, Folleto A1  
[Documento de Patente 4] Publicación Internacional N° 2004/078225, Folleto A1

El documento EP1454600 A1 describe una membrana amniótica crioconservada antes de su utilización. La mezcla líquida utilizada para congelar la membrana incluye glicerol.

25 CROWE J.H. et al en "The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state" describe varias técnicas que utilizan trehalosa para la estabilización de biomateriales en un estado seco.

**Descripción de la invención**

[Problemas a resolver por la invención]

30 El amnios cubre la capa más externa del útero y de la placenta en los mamíferos, y se obtiene durante el parto. En consecuencia, puesto que el amnios fresco no puede estar siempre disponible, la conservación a largo plazo y la disponibilidad son muy solicitadas en la utilización del amnios para aplicación clínica. Por consiguiente, los derivados del amnios se han almacenado en estado desecado para mejorar la conservación y la disponibilidad de utilización. El proceso de desecación, sin embargo, aunque proporciona una conservación significativamente mejorada, reduce en gran medida la flexibilidad del amnios al volver de nuevo a un estado húmedo debido a las proteínas constituyentes desnaturalizadas. Esta baja flexibilidad puede disminuir la cobertura de toda la zona de lesión, y disminuye la adhesividad y disposición sobre la misma. Además, una vez desecado, el amnios tiene una tasa de proliferación celular baja, e impide la disposición en capas, no permitiendo de esta manera una organización (diferenciación) normal. Esto puede ser debido a la disminución drástica de la planicidad de la superficie de amnios que acompaña a la reducción de la flexibilidad.

40 La presente invención, en busca de disolución a los problemas anteriores, persigue proporcionar una composición en forma de lámina que comprenda un amnios que tenga una capacidad de conservación y una disponibilidad de utilización superior, así como flexibilidad al utilizarse.

[Medios para resolver los problemas]

45 Con el fin de lograr el objetivo anterior, los presentes inventores intentaron primero modificar el amnios para mejorar la flexibilidad. Como resultado, si se trata con trehalosa, un disacárido, el amnios restaura su flexibilidad cuando vuelve al estado húmedo, incluso si ha sido desecado. Por otra parte, se encontró que la flexibilidad se restauraba a un nivel equivalente al del amnios no tratado (amnios fresco). Por lo tanto, se reveló que el tratamiento con trehalosa es eficaz en la mejora de la flexibilidad del amnios.

50 Sorprendentemente, también se ha demostrado que el tratamiento con trehalosa tiene un efecto adicional de mejora de la transparencia del amnios. Por lo tanto, se demostró que el tratamiento del amnios con trehalosa es muy eficaz cuando se utiliza el amnios para cualquier aplicación donde se requiera la mayor transparencia posible (por ejemplo, en la reconstrucción de la córnea).

Además, ya que el tratamiento con trehalosa aumentó la resistencia a la tracción del amnios y proporcionó un amnios más resistente que el fresco crudo, se demostró que el tratamiento con trehalosa es eficaz al mejorar la disposición de manipulación y conservación después del trasplante del amnios.

5 Además, puesto que se determinó que la biocompatibilidad del amnios tratado con trehalosa era tan alta como la del amnios fresco, se demostró que el tratamiento con trehalosa nunca afecta negativamente a la biocompatibilidad.

10 Por lo tanto, con el conocimiento acumulado, se examinó el efecto de la trehalosa en la función de la membrana amniótica como sustrato de cultivo celular. Específicamente, se cultivaron células epiteliales de la córnea en amnios que había sido tratado con trehalosa, y se determinó la tasa de proliferación celular y la formación de capas sobre el mismo. Los resultados revelaron una proliferación celular favorable y la formación de 5-7 capas, lo que indica una mejora significativa comparada con la formación de capas (1-2 capas) en amnios que no había sido tratado con trehalosa. Por lo tanto, se demostró que el tratamiento con trehalosa es eficaz también en el uso de amnios como sustrato de cultivo celular.

15 A continuación, se trasplantó una lámina de amnios con capas de células formadas sobre la misma a la superficie de ojos animales para determinar el efecto de la reconstrucción. Como resultado de ello, se puso de manifiesto una adherencia y disposición favorable, sin defectos en la reconstrucción de la superficie del ojo, y sin embargo manteniendo una transparencia elevada.

La presente invención se basa principalmente en el conocimiento anteriormente indicado y proporciona una composición en forma de lámina tal como se describe a continuación.

- 20 [1] Una composición en forma de lámina que comprende un amnios al que se añade trehalosa.  
[2] La composición en forma de lámina según [1], en estado congelado o desecado.  
[3] La composición en forma de lámina según [2], en estado liofilizado.  
[4] La composición en forma de lámina según [1] a [3], en la que el amnios es un amnios del que se eliminado la capa de células epiteliales.  
25 [5] La composición en forma de lámina según [1] a [4], en la que el amnios tiene los componentes de la membrana basal Colágeno IV, Colágeno VII, y Laminina 5 que se detectan con una intensidad equivalente a la del amnios no tratado.  
[6] La composición en forma de lámina según [1] a [5], en la que el amnios es un amnios humano.  
[7] La composición en forma de lámina según [1] a [6], en la que la capa de células que consiste en células derivadas de tejidos se forma sobre el amnios.  
30 [8] La composición en forma de lámina según [7], en la que las células derivadas de tejidos se disponen en capas en la capa de células.  
[9] La composición en forma de lámina según [7], en la que las células derivadas de tejidos derivan del epitelio de la córnea, epitelio de la conjuntiva, epidermis de la piel, epitelio folicular, epitelio de la mucosa oral, el epitelio pigmentario del iris, epitelio pigmentario de la retina, epitelio de la mucosa de las vías respiratorias, o mucosa intestinal.  
35 [10] La composición en forma de lámina según [7], en la que la capa de células se compone de aproximadamente 5-7 capas de células, y tiene propiedades similares a las del epitelio de la córnea.  
[11] La composición en forma de lámina según [1] a [6], para uso como materiales antiadhesivos o materiales para la reconstrucción de los tejidos superficiales dañados durante invasión quirúrgica.  
40 [12] La composición en forma de lámina según [1] a [11], en la que el amnios tiene un componente adhesivo cualquiera que se fija a la superficie lateral corion.  
[13] La composición en forma de lámina según [12], en la que el componente adhesivo es fibrinógeno y trombina.  
[14] La composición en forma de lámina según [12], en la que el componente adhesivo es fibrinógeno, trombina y aprotinina.  
45 [15] La composición en forma de lámina según [1] a [14], en la que la superficie coriónica del amnios está recubierta con material bioabsorbible.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método de trasplante, de la siguiente manera.

[16] Método de trasplante que utiliza cualquier composición en forma de lámina como material de implante.

50 En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para producir una composición en forma de lámina de la siguiente manera.

[17] Un método para producir una composición en forma de lámina, que comprende las etapas:

- (a) preparación de un amnios;  
(b) adición de trehalosa a dicho amnios.

55

[18] El método según [17], que comprende además la etapa:

(c) congelar o desecar dicho amnios después de la etapa (b).

[19] El método según [18], que comprende además la etapa:

(d) esterilizar dicho amnios después de la etapa (c).

5 [20] El método según una cualquiera de [17] a [19], en el que la etapa (a) comprende la etapa:

(a1) eliminar el epitelio de dicho amnios.

[21] El método según [20], donde la etapa (a1) comprende las siguientes etapas:

(1) preparar un amnios separado de un organismo,

(2) congelar-descongelar dicho amnios,

10 (3) someter dicho amnios después de la congelación-descongelación a un tratamiento con tripsina,

(4) lavar dicho amnios después del tratamiento con tripsina.

[22] El método según [21], en el que la temperatura de congelación durante dicha congelación-descongelación es de aproximadamente -20°C a aproximadamente -80°C, y la temperatura de descongelación es de aproximadamente 4°C a aproximadamente 50°C.

15 [23] El método según [21] o [22], caracterizado por la repetición de dicho proceso de congelación-descongelación dos veces o más.

[24] El método según una cualquiera de [20] a [23], caracterizado por que el tratamiento con tripsina se realiza utilizando una disolución de tripsina que tiene una concentración de tripsina de aproximadamente 0,01% (p/v) a aproximadamente 0,05% (p/v).

20 [25] El método según [24], caracterizado por la disolución de tripsina comprende aproximadamente de 0,1 mM a aproximadamente 0,6 mM de un quelante seleccionado del grupo que consiste en EDTA, NTA, DTPA, HEDTA, GLDA, y cualquier combinación de los mismos.

[26] El método según una cualquiera de [20] a [25], caracterizado por que el tratamiento con tripsina se realiza de tal manera que la disolución de tripsina se pone en contacto solamente con la cara epitelial de dicho amnios.

25 [27] El método según una cualquiera de [20] a [26], en el que la siguiente etapa;

(A) formar una capa de células que consiste en células derivadas de tejidos sobre dicho amnios se lleva a cabo después de la etapa de (b).

### Breve descripción de los dibujos

30 [Fig. 1] La Fig. 1 es una tabla que muestra las aplicaciones (sitios utilizados, método de aplicación del ejemplo, forma preferida del amnios, y propósito principal) de la composición en forma de lámina como material de reconstrucción de tejidos.

[Fig. 2] Fig. 2 es una serie de gráficos que muestran el procedimiento para fijar los amnios. El amnios en (a) se sujeta entre un par de marcos, y que en (b) se sujeta entre un marco y un miembro en forma de placa.

35 [Fig. 3] La Fig. 3 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba de evaluación de las propiedades físicas (espesor) del amnios tratado con trehalosa y liofilizado.

[Fig. 4] La Fig. 4 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba de evaluación de las propiedades físicas (claridad) del amnios del amnios tratado con trehalosa y liofilizado.

[Fig. 5] La Fig. 5 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba de evaluación de las propiedades físicas (resistencia a la tracción) del amnios tratado con trehalosa y liofilizado.

40 [Fig. 6] La Fig. 6 es un gráfico que muestra el resultado de una prueba de evaluación de las propiedades físicas (flexibilidad) del amnios tratado con trehalosa y liofilizado.

[Fig. 7] La Fig. 7 es un par de fotografías que muestran el resultado de una prueba de evaluación de la biocompatibilidad del amnios tratado con trehalosa y liofilizado. El amnios tratado con trehalosa y liofilizado se trasplantó entre capas de parénquima de cornea de conejo y se controló el estado de la superficie del ojo. La fotografía de la izquierda en la izquierda muestra el estado de la superficie del ojo inmediatamente después del trasplante, y la de la parte derecha muestra el estado de la superficie del ojo 1 mes después del trasplante.

[Fig. 8] La Fig. 8 es una fotografía que muestra el resultado de una prueba de evaluación de la biocompatibilidad del amnios tratado con trehalosa y liofilizado. El amnios tratado con trehalosa y liofilizado se trasplantado entre capas de parénquima corneal de conejo, y una parte de la córnea incluyendo la región trasplantada se aisló y se sometió a tinción con HE 1 mes después del trasplante.

5 [Fig. 9] La Fig. 9 es una vista transversal que muestra esquemáticamente el estado del instrumental para el cultivo de las células epiteliales de la córnea sobre el amnios tratado con trehalosa y liofilizado. La inclusión del cultivo 12 se mantuvo sobre la placa de cultivo 11, en la superficie inferior de los cuales se formó la capa de células 3T3 15. Por otro lado, un amnios 13 se mantuvo en la superficie inferior de la inclusión del cultivo 12, para recibir y crecer las células epiteliales de la córnea 14 sobre la misma. El numero 16 se refiere a los medios de cultivo.

10 [Fig. 10] La Fig. 10 es un par de fotografías (imagen de la tinción con HE) que muestra la capa de células formada sobre tinción el amnios tratado con trehalosa y liofilizado. Para comparación, se muestra la capa de células formada sobre el amnios después de la liofilización, pero sin el tratamiento con trehalosa (amnios liofilizado no tratado).

[Fig. 11] La Fig. 11 es una serie de fotografías que muestran imágenes de la tinción con HE e imágenes de inmunotinción de la lámina (lámina de epitelio de la cornea cultivado) con la capa de células formada sobre el amnios tratado con trehalosa y liofilizado. Las señales para cada anticuerpo en las imágenes de inmunotinción están coloreadas de verde. Los núcleos celulares están coloreados de rojo. La queratina de la córnea se expresa (+), con el tipo de piel queratinizada de queratina 10 (-) y con el tipo de queratina de la córnea 13 (-) no se expresa.

15

[Fig. 12] La Fig. 12 es una serie de fotografías que muestran el efecto de la reconstrucción de la lámina epitelial de la córnea cultivada hecha del amnios tratado con trehalosa y liofilizado. Se muestran los estados de la superficie del ojo 2 días y 14 días después del trasplante de la lámina del epitelial de la cornea cultivado (superior) y las imágenes de tinción con fluoresceína (inferior).

20

[Fig. 13] Fig. 13 es una serie de fotografías que muestran las imágenes de la tinción con HE (arriba a la izquierda) e imágenes de la inmunotinción (superior derecha e inferior) para diversas queratinas de la lámina epitelial de la cornea cultivada 2 semanas después del trasplante. La marca\*\* indica el amnios tratado con trehalosa y liofilizado (TH -AM).

25

[Fig. 14] La Fig. 14 es una serie de fotografías que muestran los resultados de inmunotinción de los amnios tratados con trehalosa y liofilizados utilizando un anticuerpo dirigido contra un componente específico de la membrana basal y un anticuerpo dirigido contra un componente específico de estrato compacto. Las imágenes de inmunotinción (C) del amnios tratado con trehalosa y liofilizado se muestran en comparación con las de los amnios frescos (A) y del amnios liofilizado sin tratamiento de trehalosa (B). 1; imágenes de la tinción del Colágeno I, 2; Imágenes de la tinción del Colágeno III, 3; Imágenes de la tinción del Colágeno IV, 4; Imágenes de la tinción del Colágeno V, 5; Imágenes de la tinción del Colágeno VII, 6; Imágenes de la tinción de Laminina 5, y 7; Imágenes de la tinción de fibronectina.

30

[Fig. 15] La Fig. 15 es un diagrama de flujo que muestra el procedimiento de extracción del epitelio amniótico.

[Fig. 16] La Fig. 16 es un par de figuras que muestran el procedimiento del tratamiento con tripsina. En la figura (a), el amnios sujeto en un marco se sumerge en una disolución de tripsina con la cara epitelial hacia abajo. En la figura (b), la tripsina actúa sobre la cara epitelial del amnios mediante el vertido de la disolución de tripsina sobre el marco.

35

[Fig. 17] La Fig. 17 es una serie de fotografías que muestran las imágenes de la tinción con HE de amnios tratado con tripsina, fresco (con epitelio adjunto), y tratados de forma manual.

[Fig. 18] La Fig. 18 es una serie de fotografías que muestran las imágenes de inmunotinción del amnios tratado con tripsina.

40

[Fig. 19] La Fig. 19 es una serie de fotografías que muestran las imágenes de inmunotinción del amnios tratado con tripsina.

[Fig. 20] La Fig. 20 es una serie de fotografías que muestran las imágenes de inmunotinción del amnios fresco (con epitelio adjunto).

[Fig. 21] La Fig. 21 es una serie de fotografías que muestran las imágenes de inmunotinción del amnios tratado manualmente.

45

[Fig. 22] La Fig. 22 es una tabla que resume los resultados del experimento de tinción con HE y del experimento de inmunotinción.

[Explicación de los números]

50 1,2,3 marco  
4 : elemento de tipo placa  
5 : disolución de tripsina  
10 : amnios

- 11 : placa de cultivo (placa de cultivo)  
 12 : inserto de cultivo (insertar recipiente de cultivo )  
 13 : amnios  
 14 : células epiteliales de la córnea  
 5 15 : capa de células 3T3  
 16 : medio de cultivo

El mejor modo de llevar a cabo la invención

En una forma de realización, la presente invención se refiere a una composición en forma de lámina. Según la invención, la composición en forma de lámina utiliza un amnios como componente principal. Debido a su alta claridad y fuerza, el amnios puede formar la composición en forma de lámina con claridad y fuerza mejoradas. Además, una alta biocompatibilidad y una baja inmunogenicidad del amnios conducen a una mejor biocompatibilidad y a una baja inmunogenicidad de la composición en forma de lámina resultante. Se puede esperar que el uso del amnios intervenga en varias acciones, tales como la acción antiinflamatoria, la supresión de la formación de cicatrices, y la inhibición de la angiogénesis. El uso del amnios es preferible también respecto a la formación favorable de la capa de células, si está contenido en la composición en forma de lámina según la invención. Específicamente, como se describirá más adelante, si la composición en forma de lámina que comprende la capa de células se forma mediante la siembra y el cultivo de un tipo predeterminado de células en un amnios que sirve como sustrato (soporte), el uso del amnios da como resultado una adherencia y proliferación de las células favorable, además de la formación de capas de células ya que el amnios tiene la propiedad de permitir una adherencia y proliferación favorables de las células sobre el mismo.

(Origen del amnios)

"El amnios" es una membrana que cubre la capa más externa del útero y de la placenta en los mamíferos, y consiste en un parénquima rico en colágeno subyacente, una membrana basal sobre el mismo y la capa epitelial. Se puede utilizar el amnios de, por ejemplo, humanos, monos, chimpancés, cerdos, caballos y bovino. Entre ellos, se utiliza preferentemente el amnios humano porque su seguridad es fiable, incluida su baja inmunogenicidad y probabilidad de infección por virus.

[Adición de trehalosa]

La composición en forma de lámina según la presente invención utiliza un amnios al que se añade trehalosa. Los inventores han encontrado que la adición de trehalosa mejora la flexibilidad del amnios, especialmente cuando el amnios se liofiliza. Además, como se muestra en las formas de realización descritas más adelante, se encontró que el amnios con trehalosa añadida sirve favorablemente como un sustrato para el cultivo de células. La composición en forma de lámina según la invención que se construye sobre la base de tales conocimientos tiene una alta flexibilidad, y permite la proliferación y la disposición conveniente en capas de las células cuando se utiliza como un sustrato para el cultivo de células.

Se podría enfocar en la degradación de las proteínas de la matriz contenidas en un amnios, lo que lleva a la menor resistencia, haciendo al amnios más susceptible a daños. Además, el amnios, que tiene las proteínas de la matriz degradadas ya no puede mantener la humedad adecuada en el interior, se vuelve frágil y menos elástico. Se supone que la trehalosa añadida al amnios actúa sobre la zona de las proteínas de de la matriz donde la fijación se ha debilitado, reforzando de esta manera la fijación entre las proteínas, la normalización de la captura de la humedad en el interior del amnios, y manteniendo la humedad, la integridad y la flexibilidad natural del amnios. Además, mediante la adición de trehalosa, se podrá impedir que las proteínas de la matriz contenidas en el amnios se humedezcan durante el proceso de liofilización, y puedan ser eficazmente protegidas de la hinchazón y el debilitamiento en agua.

La trehalosa (nombre del material, nombre general) es un compuesto está representado por D-glucopiranosil-(1,1)-D-glucopiranosido.

La adición de trehalosa a un amnios se puede realizar mediante, por ejemplo, el tratamiento de los amnios con una disolución de trehalosa. El método a modo de ejemplo de la adición de trehalosa se describirá más adelante en detalle.

En una forma de realización de la invención, la composición consiste esencialmente de un amnios al que se añade trehalosa.

(Estado del amnios)

En una forma de realización de la invención, se utiliza un amnios del que se eliminado la capa de células epiteliales. Un amnios del que se eliminado la capa de células epiteliales es extremadamente seguro, ya que no causa ningún rechazo inmunológico u otros problemas que surgen contra las células epiteliales. Además, como la adherencia celular y la proliferación que puede tener lugar en el amnios del que se ha eliminado el epitelio produce resultados

superiores, se puede producir una lámina de células de calidad en un período de tiempo más corto, proporcionando así una ventaja en la fabricación de la composición en forma de lámina.

La ausencia de la capa epitelial en el amnios se puede confirmar mediante la determinación de la ausencia de cualquier célula de la capa epitelial del amnios en la composición en forma de lámina resultante según la invención.

- 5 Por otro lado, un amnios que retenga la capa epitelial puede ser utilizado en la construcción de la composición en forma de lámina según la invención. La retención de la capa epitelial del amnios permite realizar un procedimiento completo de esterilización tal como el tratamiento con rayos  $\gamma$ , garantizando así la seguridad de la composición en forma de lámina.

(Uso del amnios reconstruido)

- 10 Se puede utilizar un amnios reconstruido para la construcción de la composición en forma de lámina según la invención. Específicamente, un amnios puede ser sometido a un tratamiento homogeneizador, ultrasonido, enzimático o de otro tipo para descomponerlo, y luego reconstruirlo en una forma similar a una membrana. El tratamiento puede llevarse a cabo preferiblemente usando un homogeneizador puesto que se espera retener muy  
15 parcialmente una estructura que tenga una pequeña membrana basal. El tratamiento usando un homogeneizador se puede realizar a (una velocidad de revolución) 3000 rpm hasta 50.000 rpm, 10.000 rpm, preferiblemente hasta 40.000 rpm, más preferiblemente a aproximadamente 30.000 rpm.

(Espesor)

- El uso de un amnios para la composición en forma de lámina según la invención permite obtener una lámina extremadamente fina. La composición en forma de lámina según la invención puede prepararse para ser tan fina  
20 como, por ejemplo, de 10  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ . Esta delgadez extrema de la lámina permite un uso universal de la composición. Se puede utilizar un amnios del que se ha eliminado una parte (por ejemplo, aproximadamente de 10  $\mu\text{m}$  hasta 30  $\mu\text{m}$ ) del estrato compacto de la parte de la membrana coriónica para construir la composición en forma de lámina según la invención. Alternativamente, se puede recubrir cualquier material bioabsorbible para alcanzar el espesor, por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  hasta de 500  $\mu\text{m}$ .

- 25 (Uso del componente adhesivo)

- En una forma de realización de la presente invención, se adhiere a la superficie del amnios, fibrinógeno y trombina (a los que en lo sucesivo se hace referencia colectivamente también como "componentes adhesivos"). Por lo tanto, cuando se trasplanta la composición en forma de lámina de la presente invención, en primer lugar, el fibrinógeno es específicamente hidrolizado por la trombina para formar fibrina y, a continuación, la fibrina se polimeriza para formar  
30 un coágulo de fibrina estable, que presenta un efecto adhesivo. En virtud de la alta adhesividad, la composición en forma de lámina, una vez fijada sobre una lesión, puede alcanzar una adherencia suficiente sin sutura, facilitando de este modo el procedimiento quirúrgico. En la presente memoria descriptiva, un amnios que tiene epitelio y con cualquiera de los componentes adhesivos fijados a él se puede denominar "amnios con componentes adhesivos fijados y epitelio" y aquel sin epitelio pero con los componentes adhesivos fijados al mismo "amnios con  
35 componentes adhesivos fijados pero sin epitelio".

- El fibrinógeno y la trombina están fijados en uno o ambos lados del amnios dependiendo de la aplicación de la composición en forma de lámina de la presente invención. En el caso de fijación por un solo lado, la parte de la superficie coriónica del amnios (es decir, la superficie opuesta al epitelio) recibe el componente adhesivo, independientemente de la presencia o ausencia de epitelio del amnios. En consecuencia, en el momento de su  
40 utilización, una composición de este tipo en forma de lámina así construida se trasplanta a la zona de aplicación con la parte que tenía el epitelio hacia arriba. Del mismo modo, una composición en forma de lámina para uso como anti-adhesivo recibe los componentes adhesivos en cualquiera de los lados del amnios. Por otro lado, una composición en forma de lámina que se trasplanta en vivo como bioadhesivo recibe apropiadamente los componentes adhesivos a ambos lados del amnios.

- 45 Como se mencionado a continuación, la composición en forma de lámina de esta realización se prepara en un estado adecuado (por ejemplo, estado húmedo o estado seco) por medio de una etapa de fijación del fibrinógeno y de la trombina a la superficie de amnios teniendo en cuenta los usos previstos. Por lo tanto, se espera que la fibrina se genere a partir de una parte de fibrinógeno antes de que la composición en forma de lámina sea utilizada dependiendo del estado durante el proceso y/o del estado final. Por lo tanto, la composición en forma de lámina de  
50 la presente invención puede incluir fibrina o un coágulo de fibrina generado por este motivo.

- El origen del fibrinógeno y la trombina no está particularmente limitado. El fibrinógeno y la trombina se pueden preparar mediante el uso de sangre de, por ejemplo, humanos, monos, chimpancés, bovinos, caballos, ovejas, cerdos, y similares, como material de partida. Por otra parte, como fibrinógeno y trombina, se puede utilizar un recombinante obtenido mediante el uso de células cultivadas (por ejemplo, células CHO o células COS). Es  
55 preferible utilizar fibrinógeno y trombina derivada de humanos (en particular, recombinante de origen humano). Esto es ventajoso desde el punto de vista de la seguridad incluida la inmunogenicidad. Además, teniendo en cuenta la calidad estable y problemas de infecciones, es particularmente preferible usar un recombinante.

Es particularmente preferible utilizar fibrinógeno y trombina derivada de la sangre del paciente (receptor) que va a ser sometido al trasplante de la composición en forma de lámina de la presente invención. Esto es ventajoso porque puede no inducirse el rechazo inmunológico.

5 Nótese aquí que el origen del fibrinógeno y de la trombina puede no ser necesariamente el mismo. Por ejemplo, se puede utilizar una combinación de fibrinógeno derivado de sangre humana y trombina derivada de sangre bovina.

La cantidad de fibrinógeno y trombina unida no está especialmente limitada. Por ejemplo, la cantidad de fibrinógeno unido se puede establecer dentro del intervalo de 0,1 mg a 50 mg por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. Del mismo modo, la cantidad trombina unida se puede establecer dentro del intervalo de 0,5 μm a 10 mg por 1 cm<sup>2</sup> de amnios.

10 La fuerza de adherencia se considera principalmente al establecer la cantidad de fibrinógeno y trombina unida. Es decir, con el fin de obtener la fuerza de adherencia necesaria, es necesario establecer las cantidades unidas de estos componentes. Por otro lado, cuando la cantidad de fibrinógeno y trombina unida es demasiado grande, puede haber una tendencia a inducir la reacción inmune o la angiogénesis, aunque depende del origen del fibrinógeno utilizado.

15 Aquí, un caso en el que una composición en forma de lámina se aplica a la reconstrucción de la superficie ocular (por ejemplo, cuando puede producirse angiogénesis debido a estos componentes después del trasplante) con el fin de suprimir la inducción de la angiogénesis tanto como sea posible, es preferible que se reduzca la cantidad de los componentes que se une. Estableciendo la cantidad unida de estos componentes tan baja como sea posible, se puede suprimir la angiogénesis después de un trasplante y se puede esperar un efecto terapéutico alto. Como se describe en el ejemplo mencionado a continuación, como resultado de la investigación realizada por los presentes inventores, cuando la cantidad de fibrinógeno unido es aproximadamente de 0,5 μg o más por 1 cm<sup>2</sup> de amnios, se observa una excelente fuerza adhesiva con respecto a la superficie ocular. En cuanto a la trombina, incluso cuando la cantidad unida de la trombina es de 1 μg por cm<sup>2</sup> de amnios, se observa una excelente fuerza adhesiva con respecto a la superficie ocular. Basándose en estos hallazgos, el intervalo preferible de cantidad de fibrinógeno unido es de 0,5 mg a 20 mg por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. Además el intervalo preferible es de 0,5 mg a 10 mg por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. El intervalo más preferible es de 0,5 mg a 6 mg (concretamente, por ejemplo, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg y aproximadamente 2 mg) por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. Del mismo modo, el intervalo preferible de la cantidad de trombina unida es de 1 μg a 1 mg por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. Además el intervalo preferible es de 5 μg a 200 μg por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. El intervalo más preferible es de 10 μg a 100 μg (concretamente, por ejemplo, aproximadamente 10 μg, aproximadamente 20 μg, y aproximadamente 30 μg) por 1 cm<sup>2</sup> de amnios.

30 En una forma de realización de la presente invención, además de fibrinógeno y trombina, la aprotinina está unida a la superficie de amnios. La aprotinina inhibe el coágulo de fibrina formado por el efecto de la trombina disuelta por la plasmina. Por lo tanto, mediante el uso conjunto de aprotinina, se puede suprimir la descomposición del coágulo de fibrina. Como resultado, se puede mantener o reforzar la fuerza adhesiva.

35 El origen de la aprotinina no está particularmente limitado. La aprotinina deriva del páncreas, por ejemplo, bovino, de caballo, de oveja, de cerdo, de mono, de chimpancé, y similares. Además, se puede utilizar una aprotinina recombinante obtenido mediante la utilización de células cultivadas (por ejemplo, células CHO o células COS). Es preferible usar un recombinante del punto de vista de una calidad estable y de problemas de infecciones.

40 Cuando se utiliza la aprotinina, la cantidad de la misma unida no está particularmente limitada. Por ejemplo, la cantidad de aprotinina unida se puede establecer en un intervalo de 0,1 KUI a 200 KUI por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. Examinamos cómo un cambio en la cantidad de aprotinina unida afecta a la fuerza de adherencia, además de la investigación de la cantidad de fibrinógeno unida antes mencionada. Como resultado, incluso cuando la cantidad de la aprotinina se establece en el intervalo de 1 KUI a 2 KUI, se observa una fuerza adhesiva suficiente para la superficie ocular. Con base en este hallazgo, el intervalo preferible de la cantidad de aprotinina unida es de 1 KUI a 100 KIU por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. Además el intervalo preferido es de 1 KUI a 20 KUI por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. Más preferiblemente el intervalo es de 1 KUI a 10 KUI (concretamente, por ejemplo, de aproximadamente 1 KUI, aproximadamente 2 KUI, y aproximadamente 3 KUI) por 1 cm<sup>2</sup> de amnios. Cuando la cantidad de la aprotinina es demasiado grande, el coste de fabricación se incrementa y, además, el efecto secundario causado por la inmunogenicidad, etc. de la aprotinina en sí puede incrementarse. Por otro lado, cuando la cantidad de aprotinina es demasiado pequeña, el efecto de la aprotinina de suprimir la descomposición de coágulo de fibrina puede manifestarse suficientemente.

55 Con finalidades diversas, el coágulo de fibrina se utiliza como un adhesivo, generalmente con aprotinina. Como resultado de la investigación realizada por los presentes inventores, en la composición en forma de lámina de la presente invención, incluso si no se utiliza la aprotinina, se ha encontrado que se puede obtener suficiente fuerza de adherencia en relación con un cuerpo vivo. Cuando no se puede utilizar aprotinina, la disposición se puede simplificar, por lo que se pueden lograr ventajas en términos de fabricación y el costo. Además, se hace necesario examinar el efecto secundario causado por la inmunogenicidad, etc. de la aprotinina en sí.

(Refuerzo con materiales bioabsorbibles)

La parte coriónica del amnios se puede recubrir con cualquier material bioabsorbible para reforzar la composición en forma de lámina de la invención. Los materiales bioabsorbibles a tal efecto son preferiblemente cualquier material que se degrade y se absorba más rápidamente en relación con el amnios. Por ejemplo, se pueden utilizar preferiblemente poligractina 910, gelatina, colágeno y ácido poliláctico como material bioabsorbible descrito en este documento. La forma del material bioabsorbible para el refuerzo no está limitada. Se pueden utilizar biomateriales en forma por ejemplo, de malla o de lámina para recubrir la parte coriónica del amnios para reforzar el amnios. El amnios durante el proceso de refuerzo puede estar bien en un estado húmedo o en estado desecado, aunque el amnios en el producto final está preferiblemente en un estado desecado en el que el amnios es superior en cuanto a disponibilidad y conservación. El amnios con dicho refuerzo se denomina en la presente memoria como "amnios híbrido".

(Capa de células)

En otra forma de realización de la presente invención, la composición en forma de lámina comprende una capa de células sobre el amnios. Si se utilizan componentes adhesivos en forma en una composición de este tipo, estos componentes adhesivos (tales como el fibrinógeno) están fijados en la parte de la amnios donde no se forma capa de células.

En esta forma de realización, se utiliza generalmente amnios del que ha sido eliminado el epitelio. Entonces, en la parte en que estaba el epitelio, se forma una capa de células. Esta capa de células se forma a partir de células de origen biológico. El origen de las células que constituyen la capa de células no está particularmente limitado. Entre los ejemplos de estas células se incluyen células derivadas de epitelio de la cornea, epitelio de la conjuntiva, epidermis de piel, epitelio del folículo piloso, epitelio de la mucosa oral, epitelio pigmentario del iris, epitelio pigmentario de la retina, epitelio de la mucosa del tracto respiratorio o epitelio de la mucosa del tracto intestinal, y similares. Se puede formar una capa de células utilizando dos tipos de células o más que sean diferentes unas de otras. La formación a partir de dos o más tipos de células que derivan de diferentes orígenes también se denomina "hibridación" en esta memoria. La forma en la que las células están contenidas en la capa híbrida de células (estado de hibridación) no está particularmente limitado y, por ejemplo, las células pueden estar dispersas o algunas células (o varios tipos de células) pueden estar presentes como un grupo. Además, el contenido de las células puede no ser uniforme en toda la capa de células. La capa de células puede ser una capa sencilla o (capas estratificadas) multicapa.

El tipo de células que forman la capa de células, en su caso, sobre el amnios se describirá a continuación, tomando un ejemplo de una composición en forma de lámina para la reconstrucción del epitelio de la córnea.

La capa de células híbrida contiene dos tipos de células o más. Un tipo de células se conoce como células primeras y el otro tipo de células que son diferentes de las células primeras se conocen como células segundas para conveniencia de la explicación. En primer lugar, se utilizan células autólogas como células primeras. En esta memoria descriptiva, "autólogo" indica un sujeto al que se le ha aplicado la composición en forma de lámina de la presente invención, es decir, un sujeto que se somete a trasplante (receptor). Por el contrario, los que no es "autólogo" se denomina "alógeno". El tipo de células primeras no está particularmente limitado, siempre y cuando las células primeras pueden formar un epitelio similar a la capa mucosa del epitelio de la cornea cuando se hibridan con las células segundas que se mencionan a continuación. Entre los ejemplos de células primeras se incluyen células derivadas de epitelio de la mucosa, tales como el epitelio de la mucosa oral, el epitelio de la conjuntiva, y epitelio de la mucosa nasal, o células derivadas de células no diferenciadas capaces de construir los epitelios de la mucosa (es decir, células madre epiteliales de la mucosa). En la presente memoria, el término "derivado de o de origen" se utiliza con el propósito de especificar un material de partida. Por lo tanto, por ejemplo, las células derivadas de (de origen de) el epitelio de la mucosa oral, indica células obtenidas utilizando células epiteliales de la mucosa oral como material de partida. Además, en la presente invención, el término "células no diferenciadas capaces de construir el epitelio de la mucosa" indica células que tienen la capacidad de diferenciarse en células que constituyen el epitelio de la mucosa. Por ejemplo, células no diferenciadas capaces de construir el epitelio de la mucosa oral, indica células capaces de diferenciarse en las células epiteliales de la mucosa oral. Ejemplos específicos de células no diferenciadas incluyen una célula precursora o una célula madre de las células que constituyen el tejido específico, por ejemplo, el epitelio de la mucosa oral o epitelio de la conjuntiva, y similares, o una célula madre epitelial con poca diferenciación.

La capa de células híbrida puede incluir dos o más tipos diferentes de las células primeras. Por ejemplo, se puede construir una capa de células puede a partir de células derivadas de epitelio de la mucosa oral y de células derivadas de epitelio de la conjuntiva.

El "epitelio de la mucosa bucal" en la presente invención puede incluir la parte del epitelio de la mucosa crevicular oral, parte labial, parte palatal, parte bucal, y similares. El que las células se deriven de epitelio de la mucosa oral o no, se puede confirmar mediante utilizando, como indicador, la expresión de queratina 4 o queratina 13 específico para el epitelio de la mucosa oral. Alternativamente, se puede utilizar la expresión de la queratina 3 como un indicador. Esta queratina 3 es conocido por ser una de las queratinas específicas de la córnea. Sin embargo, se

sabe que la queratina 3 se expresa también en la célula epitelial de la mucosa oral. Téngase en cuenta que es preferible que las células epiteliales de la mucosa oral se utilicen como material para producir una composición para el trasplante de epitelio de la córnea desde el punto de vista de que expresan esta queratina específica de la córnea, la queratina 3.

- 5 Por otro lado, mediante el examen de la expresión de los genes específicos de una célula epitelial de la mucosa oral, se puede confirmar que las células derivan del epitelio de la mucosa oral.

Del mismo modo, en el caso de las células derivadas de un tejido distinto de epitelio de la mucosa oral, mediante el examen de la expresión del marcador o del gen específico del tejido, se puede confirmar el origen de los mismos.

- 10 Ejemplos específicos de células segundas incluyen células derivadas del epitelio de la córnea, epitelio de la conjuntiva o epitelio del amnios. Entre ellos, es preferible que las células segundas sean células derivadas de epitelio de la córnea o epitelio de la conjuntiva. Esto es ventajoso debido a que la capa de células construida por las células derivadas de tejido de la superficie ocular puede tener unas propiedades más cercanas a las del epitelio de la córnea. Es particularmente preferible que las células segundas deriven de epitelio de la córnea. Esto es ventajoso porque se puede obtener una capa que es más similar al epitelio de la córnea.

- 15 Las células segundas pueden ser células autólogas o células alogénicas. Cuando se utilizan células autólogas, se puede obtener una capa de células con poco o ningún problema de rechazo inmunológico. Cuando se utilizan células alogénicas, puesto que son células más fáciles de preparar, es ventajoso desde el punto de vista de la fabricación. La capa de células de la presente invención puede incluir dos o más tipos diferentes de células segundas. Por ejemplo, la capa de células se puede construir en de forma que incluya, por ejemplo, células  
20 derivadas de epitelio de la córnea y células derivadas de epitelio de la conjuntiva.

El que la capa de células en la composición en forma de lámina de la presente invención incluya células que se derivan del epitelio de la córnea o no, se puede confirmar utilizando, como un indicador, la expresión de la queratina 3 o de la queratina 12 específica de epitelio de la córnea. Alternativamente, se puede utilizar la expresión de la queratina 4 como un indicador.

- 25 Del mismo modo, en el caso de las células derivadas de tejidos diferentes del epitelio de la córnea, mediante el examen de la expresión del marcador o gen específico del tejido, se puede confirmar el origen de los mismos.

- Dado que la composición en forma de lámina de la presente invención emplea el amnios como soporte, que puede ser construida en una forma muy delgada. Cuando la composición en forma de lámina de la presente invención no incluye una capa de células, la composición en forma de lámina se puede preparar con un espesor, por ejemplo, en  
30 el intervalo de 10 µm a 100 µm. Cuando la composición en forma de lámina incluye una capa de células, se puede preparar con un espesor, por ejemplo, en el intervalo de 20 µm a 200 µm. Por lo tanto, la forma muy delgada es también una de las principales características de la presente invención. Con esta característica, la composición se convierte en aplicable para un espectro amplio de usos. En particular, aprovechando la alta transparencia, se puede aplicar a la reconstrucción de la superficie ocular.

- 35 (Estado de la composición en forma de lámina)

- El estado de la composición en forma de lámina según la invención no está limitado, y se puede encontrar ya sea en un estado húmedo (mediante, por ejemplo, la inmersión en cualquier disolución), en un estado congelado, o en un estado desecado (incluyendo estado semi-desecado). El estado congelado o deshidratado es ventajoso en cuanto a la disposición de manipulación y almacenamiento. Si está desecada, la composición se puede almacenar a una  
40 temperatura normal (por ejemplo, aproximadamente de 10° C a aproximadamente 35° C). Específicamente, ya no se requiere el almacenamiento en un congelador o en un refrigerador hasta su uso, y la composición será más fácilmente manejable (almacenamiento, transporte, etc.) Por supuesto, la composición en un estado desecado se puede almacenar en un congelador o en el refrigerador, si fuese necesario.

- 45 Ante todo, el estado liofilizado proporciona una disposición de manipulación y fijación favorable para la lesión donde se aplica (donde se filtra y ejerce su adhesividad), con lo que hace innecesaria una sutura después de la aplicación (por supuesto, la sutura se puede realizar para garantizar la fijación a la lesión). La supresión de sutura reduce enormemente la presión sobre pacientes y médicos.

- Preferiblemente, la composición en forma de lámina según la invención se construye utilizando un amnios, con una capa epitelial en estado congelado, con una capa epitelial en estado desecado (estado liofilizado), sin una capa epitelial en estado húmedo, o sin una capa epitelial en estado desecado (estado liofilizado). En la presente memoria descriptiva, un amnios con una capa epitelial estado congelado también se conoce como "amnios almacenado congelado con epitelio", aquel con una capa epitelial en estado liofilizado como "amnios liofilizado con epitelio", y aquel sin una capa epitelial en estado liofilizado como "amnios liofilizado sin un epitelio".

- 55 La composición en forma de lámina en estado desecado está lista para su manipulación, y, específicamente, se puede almacenar también a una temperatura normal (por ejemplo, aproximadamente de 10° C a aproximadamente 35° C). Por lo tanto, ya no es necesario el almacenamiento en un congelador o en un refrigerador hasta su uso,

estando preparada para su manipulación (almacenamiento o transporte). Por otra parte, la desecación hace que sea posible esterilizar eficazmente el amnios sin afectar a su uso. Además, puesto que la degradación del amnios en un estado desecado es extremadamente baja, su alta calidad se puede mantener durante un período de tiempo más largo.

- 5 Se cree que la conservación de la estructura de la membrana basal es crucial para que la composición en forma de lámina de la invención desempeñe la función prevista para ella (tal como una función como un sustrato para formar una capa de células y como material de reconstrucción de tejidos). En una forma de realización preferible de la presente invención, se utiliza un amnios con sus componentes de la membrana basal (colágeno IV ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\alpha 5$ ), colágeno VII, laminina 5) conservados. La presencia o ausencia de los componentes de la membrana basal se pueden comprobar mediante la realización de una tinción inmunológica dirigida a los componentes en cuestión para su detección. En una realización de la invención, se detectan al menos uno, preferiblemente varios de estos componentes, o incluso la totalidad de estos componentes. También es preferible que estos componentes se detecten con intensidad no significativamente diferente de los detectados en un amnios no tratado (es decir, amnios, que hayan sido objeto de tratamiento, tales como la congelación, posterior al aislamiento de un organismo).
- 10
- 15 Además, puede utilizarse preferentemente amnios conservados con componentes de estrato compacto (colágeno I, III, V y fibronectina). El estado de conservación de los componentes estrato compacto se puede detectar por tinción inmunológica, de manera similar a la detección de los componentes de la membrana basal descrita anteriormente.

Mediante la adición de trehalosa al amnios, las estructuras de la membrana basal y del estrato compacto están altamente conservadas, incluso después del proceso de liofilización.

- 20 (Forma de presentación)

La composición en forma de lámina de la invención puede presentarse en cualquier recipiente, tal como recipientes hechos de vidrio o de plástico, o en una forma de envase con una película transparente o una lámina bloqueadora solar.

- 25 Preferiblemente, la composición en forma de lámina de la invención se presenta en forma envasada de modo que no tiene sustancialmente contacto con el oxígeno. En tales condiciones, la calidad de la composición no sufrirá ningún deterioro debido al oxígeno, sino que se mantendrá en un nivel alto durante un período de tiempo más largo. Se consigue un estado de "no tener sustancialmente contacto con el oxígeno" mediante la utilización de un embasado al vacío o con gas nitrógeno (es decir, agotado con nitrógeno), o en forma de embasado hermético al aire usando una película o lámina. En cualquier caso, la composición en forma de lámina de la invención generalmente se esteriliza antes de su uso.
- 30

(Aplicación)

- La composición en forma de lámina según la invención se puede utilizar, por ejemplo, como material de trasplante para la reconstrucción de tejidos, y material anti-adhesivo. Entre los campos de la medicina, donde se puede aplicar la composición en forma de lámina de la invención se incluyen la oftalmología, cirugía digestiva, ginecología y dermatología.
- 35

A continuación se describen ejemplos de aplicación (por ejemplo, sitios y métodos de aplicación) de la composición en forma de lámina según la invención en relación con situaciones (A) en las que la composición en forma de lámina de la invención no comprende ninguna capa de células y (B) aquellas en las que comprende una capa de células.

A. Situaciones en las que la composición en forma de lámina no comprende ninguna capa de células.

- 40 La composición en forma de lámina sin capa de células se puede aplicar para uso, por ejemplo, en la reconstrucción de la esclerótica y de la córnea (tratamiento de pterigión y de defectos epiteliales de la córnea), y en la cobertura de úlceras y quemaduras de la piel (epidermis). También es aplicable como material de reconstrucción de tejidos. El término "material de reconstrucción de tejidos" en este documento se refiere a cualquier material que pueda ser utilizado para la reconstrucción (regeneración) de cualquier tejido de un organismo. La composición en forma de
- 45 lámina de la invención se puede utilizar favorablemente en una terapia para la reconstrucción de la superficie de tejidos de un órgano o de un aparato dañados durante la invasión quirúrgica. La composición en forma de lámina de la invención es particularmente preferible para la reconstrucción de tejidos de superficie que podría causar adherencias durante un proceso de cicatrización normal. El término "reconstrucción del tejido" en este documento se refiere normalmente a la recuperación de la lesión del tejido de superficie dañado hasta un estado normal.
- 50 Alternativamente, el término puede comprender la recuperación de un órgano o aparato hasta un estado normal impidiendo la de adherencia del los tejidos de superficie (por ejemplo, impidiendo la adherencia de una trompa después de una adhesiotomía para volver a un estado normal).

- Ejemplos de tejidos para la reconstrucción según la invención incluyen tejidos de órganos o aparatos de la superficie abdominal, torácica o intrapélvica (por ejemplo, estómago, colon, intestino delgado, intestino ciego, duodeno, corazón, pulmón, oviducto, recto, hígado, ovario, útero), o de la superficie de los tejidos intraperitoneales, intratorácicos, intrapélvicos, orales, nasales, del oído, de la cavidad de la garganta o, tejidos oculares. En
- 55

consecuencia, la composición en forma de lámina de la invención se puede utilizar en el campo de la cirugía digestiva, obstetricia y ginecología, cirugía torácica, cirugía oral, y cirugía del oído, de la nariz, y cirugía oftálmica. La composición en forma de lámina de la invención es particularmente adecuada como un material para la reconstrucción de tejidos de superficie de órganos o aparatos abdominales, torácicos o intrapélvicos, o de la cavidad abdominal, de la cavidad torácica o tejidos de superficie. Por otra parte, en la presente invención es también aplicable a los otros campos que acompañan a la operación quirúrgica. A continuación se describirán detalles de las zonas, métodos, etc., de aplicación de la composición en forma de lámina de la invención.

El uso de la composición en forma de lámina de la invención aplicada como material de reconstrucción de tejidos se puede generalmente clasificar según el método de aplicación y el objetivo de aplicación en las tres clases siguientes.

- 5 (1) La cobertura (método de aplicación) como material de reconstrucción de tejidos/ la reconstrucción de tejidos (objetivo de aplicación)  
Uso (utilización) de la composición con el fin de reconstruir la superficie dañada del tejido aplicando el material de reconstrucción de tejidos en la superficie de un órgano, peritoneo, etc. A continuación se proporcionan ejemplos específicos de este uso en 1-1-1 – 1-4, 1-5 y 1-6.
- 15 (2) La cobertura (método de aplicación) como material de reconstrucción de tejidos (propósito de la aplicación)/Anti-adherencia (objeto de aplicación)  
Uso (utilización) de la composición con el fin de suprimir la formación de adherencias con los tejidos circundantes mediante la aplicación de un amnios sobre las superficies de un órgano, peritoneo, etc. A continuación se proporcionan ejemplos específicos de este uso en 2-1, 3 -1, 3-2, y 3-3.
- 20 (3) El implante (método de aplicación) de un material de reconstrucción de un tejido/ Anti-adherencia (propósito de la aplicación)  
El uso (utilización) de la composición con el fin de suprimir la formación de adherencias por implante de un amnios en el sitio donde se forma una adherencia con una frecuencia mayor. A continuación se proporcionan ejemplos específicos de este uso en 1-2, 1-3, y 2-2. Muchos anti-adhesivos convencionales tiene esta forma. Por ejemplo, el Seprafilm utilizado normalmente como anti-adhesivo tiene una forma similar a 1-2 descrito a continuación. Sin embargo, el Seprafilm no se puede utilizar en las aplicaciones 1-3 y 2-2 descritas a continuación.

A continuación se describirán específicamente ejemplos de aplicación de la composición en forma de lámina como material de reconstrucción de tejidos (véase fig. 1).

## 30 1. Aplicación en el campo de la Cirugía Digestiva

### 1.1 Aplicación en la reconstrucción del órgano dañado y anti-adherencias

Muchas operaciones quirúrgicas en general dejar pequeños daños en los órganos durante el procedimiento. A menos que se restaure adecuadamente en cualquier etapa temprana después de la cirugía, la estructura coriónica destruida de la lesión dañada tiende a formar una adherencia entre los órganos, y, ocasionalmente, puede tener como resultado una pérdida de las funciones básicas. Tal problema se puede resolver aprovechando la capacidad del amnios para reconstruir tejidos y para evitar la adherencia. Específicamente, el material de reconstrucción de tejidos se utiliza para cubrir la superficie dañada de un órgano para facilitar la reconstrucción de tejidos y evitar la adherencia. Para ello, se puede utilizar favorablemente el material de reconstrucción de tejidos construido con, por ejemplo, amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios liofilizado con epitelio, amnios con componentes adhesivos fijados pero sin epitelio, etc. A pesar de que es preferible utilizar materiales de reconstrucción de tejidos construidos con un amnios desecado (por ejemplo amnios liofilizado con epitelio, amnios liofilizado sin epitelio) debido a su disposición de manipulación, aquellos que se construyen con amnios liofilizado se puede seleccionar (por ejemplo, amnios liofilizado con epitelio, amnios liofilizado sin epitelio) para utilizarlos en zonas, tales como el corazón, donde el portador requiere una capacidad de recuperación. En cuanto al método de aplicación, el material de reconstrucción de tejidos se coloca en posición una vez terminada la cirugía de tal manera que cubre directamente el área dañada del órgano con su membrana basal amniótica hacia la cavidad peritoneal, y, si es necesario, es inmovilizada, para que se pueda utilizar un hilo de sutura como el Vicryl. Cuando se utiliza un material de reconstrucción de tejido construido con un amnios desecado, se puede efectuar un proceso de inmovilización sin sutura ya que se espera una alta avidéz. Del mismo modo, también se espera que un material de reconstrucción de tejidos construido con componentes adhesivos tenga una alta avidéz. Por lo tanto, es preferible que la inmovilización del material de reconstrucción de tejidos aplicada en cualquier sitio se pueda conseguir sin ninguna sutura específica u otro proceso de inmovilización puesto que una sutura u otra inmovilización hacen que el procedimiento sea laborioso, y pueden inducir la inflamación promoviendo así la formación de adherencias. En particular, es más preferible el uso de material de reconstrucción de tejidos construido con amnios liofilizado con epitelio, ya que ejerce una alta avidéz hacia el sitio de aplicación sin posibilidad de provocar una reacción hacia un cuerpo extraño contra los componentes adhesivos.

Se espera que el procedimiento descrito anteriormente proporcione la reconstrucción de la estructura coriónica en una etapa temprana después de la cirugía, y consiga la reconstrucción del órgano dañado, evitando la adherencia.

1-2. Órgano dañado—Aplicación para evitar la adherencia entre las heridas.

Muchas operaciones quirúrgicas dejan a veces adherencias entre el órgano intraperitoneal y la herida. La adherencia del órgano intraperitoneal a la herida fija físicamente el órgano, suprime su movilidad y causa la obstrucción de la cavidad interna, dando como resultado una enterostasis parálitica. La capacidad del amnios para evitar la adherencia se puede utilizar para resolver el problema. Con este propósito, pueden utilizarse los materiales de reconstrucción de tejidos contruidos con amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios liofilizado con epitelio, amnios híbrido reforzado, etc. Dado que se requiere suficiente firmeza para evitar las arrugas, se utilizan preferiblemente materiales para la reconstrucción de tejidos contruidos con amnios desecado, siendo más preferidos los materiales para la reconstrucción de tejidos contruidos con amnios desecado y amnios híbrido reforzado. Los métodos de aplicación son los siguientes. Al término de una operación quirúrgica, se inserta un material de reconstrucción de tejido inmediatamente por debajo de la herida, y se deja que injerte. El material de reconstrucción de tejido se coloca en posición tal que la parte de la membrana basal del amnios se enfrente al lado peritoneal, y la membrana coriónica se enfrente a la pared abdominal. Después de la aplicación, se puede fijar, por ejemplo, mediante sutura, aunque es preferible dejar simplemente que injerte sin ninguna fijación.

El procedimiento anterior puede conseguir con éxito la prevención de la adherencia entre un órgano y una herida después de una cirugía.

1-3. Aplicación para la prevención de adherencia al suelo pélvico

El colon, el útero y otros órganos extraperitoneales una parte de los cuales no está cubierta por el peritoneo residen en el espacio intrapélvico. Ocasionalmente se puede realizar cirugía en un órgano extraperitoneal en el espacio de la pelvis donde no existe peritoneo, dejando que el intestino delgado se caiga sobre el suelo pélvico formando una adherencia con la pared pélvica. Puesto que la adherencia, una vez formada, es generalmente difícil de separar, cualquier procedimiento preventivo es esencial. La capacidad del amnios para reconstruir la membrana coriónica se puede utilizar para evitar la adherencia del suelo pélvico. Para tal propósito, se puede utilizar favorablemente los materiales de reconstrucción de tejidos contruidos con, por ejemplo, amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios liofilizado con epitelio, y amnios híbrido reforzado. Las propiedades requeridas para los materiales de reconstrucción de tejidos son similares a las mencionadas en 1-2. El método de aplicación es el siguiente. El material de reconstrucción de tejidos se inserta en suelo pélvico al finalizar la operación quirúrgica, y se presiona ligeramente sobre el peritoneo para asegurar la cobertura. El material de la reconstrucción de tejidos se coloca de tal manera que la parte de la membrana basal del amnios se enfrenta a la cavidad abdominal y la parte de la membrana coriónica se enfrenta al peritoneo. Después de la colocación, el material de reconstrucción de tejidos puede ser inmovilizado por medio de, por ejemplo, hilo de sutura, preferiblemente se deja no inmovilizado, sirviendo solamente para cubrir.

El procedimiento anterior puede conseguir con éxito la prevención de la adherencia al suelo pélvico después de una cirugía.

1-4. Aplicación para la reconstrucción de la pared peritoneal

La pared peritoneal puede estar dañada y tener defectos por múltiples cirugías o enfermedades peritoneales como hernia incisional abdominal. El amnios se puede utilizar como un portador para complementar el peritoneo dañado. Con tal propósito, pueden utilizarse favorablemente los materiales de reconstrucción de tejidos contruidos con, por ejemplo, amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios liofilizado con epitelio, y amnios con componentes adhesivos fijados pero sin epitelio. Si el defecto del peritoneo es extenso y severo, es preferible en lo relación con la resistencia utilizar un material de reconstrucción de tejido contruido con amnios crioconservado con epitelio. Está sujeto a aplicación al finalizar la cirugía. El material de la reconstrucción de tejidos se coloca primero sobre la zona peritoneal defectuosa con el fin de cubrir dicha zona, con la parte de la membrana basal del amnios enfrentado a la cavidad peritoneal, y después, de forma alternativa, el material de reconstrucción de tejidos se puede inmovilizar por medio de, por ejemplo, sutura. Si se utiliza un material de reconstrucción de tejido contruido de amnios con componentes adhesivos fijados al mismo, los componentes del adhesivo pueden conseguir la inmovilización. Se espera que el procedimiento anterior pueda conseguir la reconstrucción de la pared abdominal

1-5. Aplicación para la supresión de Metástasis Peritoneal

La metástasis peritoneal es un caso en el que la metástasis está causada por la progresión de cáncer de estómago, cáncer de colon y cáncer de ovario que da como resultado la propagación de las células cancerosas desde un tejido en particular a través del líquido pleural o líquido de ascitis hasta el celoma. Puesto que los cánceres que acompañan a la metástasis peritoneal tienen muy mal pronóstico, los métodos para la supresión de la metástasis están muy demandados. Sin embargo, aún no se conocen medidas eficaces que satisfagan esta demanda. Se espera que las propiedades de amnios puedan ser aprovechadas para suprimir la metástasis. El mesogastrio dorsal, el diafragma, y el mesenterio, entre otros, se sabe que son zonas donde las células cancerígenas causan metástasis con una mayor frecuencia. Estas manchas lechosas, por así decirlo, pueden ser cubiertas previamente con el material de reconstrucción de tejidos para formar una barrera para obtener sucesivamente la supresión de la

metástasis. Con tal propósito, pueden ser utilizados favorablemente los materiales de reconstrucción de tejidos  
 5 construidos con, por ejemplo, amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios  
 liofilizado con epitelio, y amnios con componentes adhesivos fijados pero sin epitelio. Sin embargo, se prefiere el uso  
 de materiales para la reconstrucción de tejidos construidos con amnios liofilizado con epitelio debido a su disposición  
 de manipulación. Como ejemplo de un método de aplicación, el material de reconstrucción de tejidos se puede  
 10 colocar de tal manera que se envuelve alrededor del tejido de interés y cubre el sitio de aplicación. Alternativamente,  
 el material de la reconstrucción de tejidos puede ser inmovilizado en el sitio de aplicación por medio de sutura con  
 un parche insertado en parte de él, o por medio de componentes adhesivos fijados al amnios. El momento para la  
 aplicación del material de la reconstrucción de tejido puede ser después de la metástasis como resultado de la  
 15 progresión del cáncer, o antes de cualquier propagación (uso preliminar).

#### 1-6. Aplicación de prevención de la adherencia recurrente

Se puede provocar una obstrucción intestinal después de una laparotomía, por adherencia entre los intestinos o  
 entre el intestino y la pared abdominal, lo que lleva a una torsión sobre sí mismo que causa un trastorno de paso y la  
 15 disfunción resultante. Incluso si la adherencia se separa con éxito, los tejidos adheridos, especialmente los tejidos  
 que causaron una inflamación severa y cicatrizan tienen una membrana coriónica defectuosa, y, por lo tanto,  
 normalmente causan otra vez adherencias después de la cirugía. El amnios se puede utilizar para evitar que  
 después de la cirugía se vuelvan a formar adherencias, y facilitar la reparación y el refuerzo de la membrana  
 20 coriónica defectuosa. Para tal propósito, se pueden utilizar favorablemente los materiales de reconstrucción de  
 tejidos construidos con, por ejemplo, amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios  
 liofilizado con epitelio, y amnios con componentes adhesivos fijados pero sin epitelio. Sin embargo, se prefiere el uso  
 de materiales para la reconstrucción de tejidos construidos con amnios liofilizado con epitelio debido a su disposición  
 de manipulación. Como ejemplo de un método de aplicación, después de la laparotomía y cuando la adherencia se  
 25 ha interrumpido físicamente, el material de reconstrucción de tejidos se puede colocar de tal manera que se pliegue  
 alrededor de los intestinos como un tubo. El material de la reconstrucción de tejidos se coloca en posición tal que la  
 parte de la membrana basal del amnios se enfrente a la cavidad abdominal. La inmovilización que se produce  
 normalmente después de la colocación puede ser en forma de sutura entre el órgano y el amnios o entre los amnios  
 (haciendo el amnios un tubo) utilizando una sutura como Vicryl. Alternativamente, el material de reconstrucción de  
 30 tejidos puede dejarse injertado sin ninguna sutura. Cuando se utilizan materiales de reconstrucción de tejidos  
 construidos con un amnios con componentes adhesivos fijados al mismo, los componentes adhesivos pueden servir  
 para lograr la inmovilización. Es preferible que la inmovilización del material de reconstrucción de tejidos al sitio  
 aplicado se consiga sin un proceso de inmovilización separado, como la sutura, ya que una sutura u otra  
 inmovilización hacen que el procedimiento sea laborioso, y puede inducir la inflamación promoviendo así la  
 35 formación de adherencias. En particular, es más preferible el uso del material de reconstrucción de tejidos construido  
 con amnios desecado, ya que ejerce una gran afección hacia el sitio de aplicación sin ninguna posibilidad de provocar  
 una reacción hacia un cuerpo extraño contra los componentes del adhesivo.

Se espera que el procedimiento descrito anteriormente proporcione la reconstrucción de la estructura coriónica en  
 una etapa temprana después de la cirugía, al mismo tiempo que previene que aparezcan otra vez adherencias.

### 2. Aplicación en Obstetricia y Ginecología

#### 2-1. Aplicación a las Trompas de Falopio

La adherencia de las Trompas de Falopio a órganos como el peritoneo causa la obstrucción de las trompas y hace  
 40 difícil el paso del huevo, lo que tiene como consecuencia la infertilidad. El amnios se puede utilizar para evitar la  
 adherencia de las trompas. Se pueden aplicar los materiales para la reconstrucción de tejidos de la invención con  
 este fin con el procedimiento siguiente. En primer lugar se separa la adherencia y se lleva a cabo un fimbrioplastia  
 45 típica. Después de la cirugía, pero antes de cerrar la herida quirúrgica, la zona de la trompa se cubre con el material  
 de reconstrucción de tejidos. Para tal propósito, se pueden utilizar favorablemente los materiales de reconstrucción  
 de tejidos construidos con, por ejemplo, amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio,  
 amnios liofilizado con epitelio, y amnios con componentes adhesivos fijados pero sin epitelio. Sin embargo, se  
 50 prefiere el uso de materiales para la reconstrucción de tejidos construidos con amnios liofilizado con epitelio debido a  
 su disposición de manipulación. Como un método de aplicación de ejemplo, el material de la reconstrucción de tejido  
 se puede colocar de tal manera que se pliegue alrededor del tejido de interés y cubra el sitio de aplicación.  
 Alternativamente, el material de reconstrucción de tejidos puede ser inmovilizado en el sitio de aplicación, por medio  
 de sutura con un parche con un parche insertado en parte de él, o por medio de componentes adhesivos fijados al  
 amnios.

#### 2-2. Aplicación para evitar la adherencia del Suelo Pélvico

La pelvis interna uterina es un órgano extraperitoneal, y aproximadamente un 50 % de su superficie no está cubierto  
 55 por el peritoneo. Por lo tanto, la histerectomía produce zonas donde no existe peritoneo, causando la adherencia  
 entre el suelo pélvico y el intestino delgado. Se puede utilizar el amnios para evitar la adherencia del suelo pélvico.  
 La forma y los métodos de aplicación de los materiales para la reconstrucción de tejidos utilizados para tal propósito  
 son similares a los descritos en 1-3.

3. Aplicación en el campo oftálmico

3-1. Aplicación a la cirugía para tratar el glaucoma

El glaucoma es una enfermedad en la que los nervios ópticos se ven afectados a causando el estrechamiento del campo visual y baja visión. El glaucoma se trata mediante el corte en la trabécula para formar un nuevo sistema de descarga del humor acuoso. Sin embargo, esta operación a veces tiene como resultado la adherencia entre la esclerótica y la conjuntiva y produce secuelas. El uso del amnios puede ser eficaz para este problema. En particular, después de una operación típica en la que se corta la trabécula, se inserta el material de reconstrucción de tejidos debajo de la conjuntiva. Para tal propósito, se pueden utilizar favorablemente los materiales de reconstrucción de tejidos construidos, por ejemplo, con amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios liofilizado con epitelio, y amnios con componentes adhesivos fijados pero sin epitelio. Sin embargo, se prefiere el uso de materiales para la reconstrucción de tejidos construidos con amnios liofilizado con epitelio debido a su disposición de manipulación. Después de la aplicación, el material de reconstrucción de tejidos se puede inmovilizar en el sitio de aplicación, por ejemplo, mediante sutura.

3-2. Aplicación al simbléfaron

El simbléfaron es un trastorno en el que se forman cicatrices entre conjuntiva palpebral y el globo ocular, causando la adherencia entre el párpado y el globo ocular. El simbléfaron normalmente va acompañado de un extenso daño en la superficie del ojo, y cualquier alteración del tejido adherido implica la recurrencia del simbléfaron. Se pueden utilizar el amnios para suprimir el simbléfaron. Como ejemplo de un método de aplicación, se interrumpe la adherencia que se extiende entre el párpado y el globo ocular, y el tejido conjuntival cicatrizado se separa, exponiendo de esta manera la esclerótica, que se cubre a continuación con el material de reconstrucción de tejidos. Para tal propósito, se pueden utilizar favorablemente los materiales de reconstrucción de tejidos construidos con, por ejemplo, amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios liofilizado con epitelio, y amnios con componentes adhesivos fijados pero sin epitelio. Sin embargo, es preferible el uso de materiales para la reconstrucción de tejidos construidos con amnios con componentes adhesivos fijados sin un epitelio, por ejemplo, por su disposición de manipulación. La inmovilización del material utilizado en la reconstrucción de tejidos en la zona aplicada se consigue normalmente por los componentes adhesivos. El sitio, cubierto por el material de reconstrucción de tejidos, puede estar a cualquier lado del párpado o de la esclerótica.

3-3. Aplicación para el pterigión recidivante

El pterigión es un trastorno del tejido conjuntival debido a una hiperplasia anormal, y aquellos tejidos hiperplásicos se adhieren a la córnea, dando como resultado astigmatismo y baja visión. El amnios puede ser eficaz para este trastorno. Como ejemplo de un método de aplicación, el tejido del pterigión se separa para dejar al descubierto la esclerótica, que se cubre a continuación con el material de reconstrucción de tejidos. Para tal propósito, se pueden utilizar favorablemente los materiales de reconstrucción de tejidos construidos con, por ejemplo, amnios crioconservado con epitelio, amnios crioconservado sin epitelio, amnios liofilizado con epitelio, y amnios con componentes adhesivos fijados pero sin epitelio. Sin embargo, se prefiere el uso de materiales para la reconstrucción de tejidos, que se construyen con componentes adhesivos fijados sin un epitelio, debido a su disposición de manipulación. La inmovilización del material utilizado en la reconstrucción de tejidos en la zona aplicada se logra normalmente por los componentes adhesivos.

B. Aplicación de la composición en forma de lámina que comprende una capa de células

Estas composiciones en forma de lámina, que comprenden una capa de células, se pueden aplicar en la reconstrucción de la córnea y la retina (en el tratamiento, por ejemplo, del síndrome de Stevens-Johnson, lesiones termoquímicas, penfigoide oftalmológico, ablación de la retina, degeneración senil de la mácula lútea, glaucoma, y degeneración pigmentaria de la retina), tratamiento de la úlcera diabética epidérmica (epidermis), epidermolísis bullosa, o quemaduras.

(Método de producción de la composición en forma de lámina)

Otra realización de la presente invención se refiere a un método de producción de una composición en forma de lámina. El método de producción según la invención comprende las siguientes etapas: (a) preparar un amnios, y (b) añadir trehalosa al amnios.

1. Preparación del amnios: etapa (a)

El "amnios" es una membrana que cubre la capa más externa del útero y la placenta en los mamíferos, e incluye una membrana basal y una capa de epitelio formado en el tejido del parénquima rico en colágeno. Es preferible que el amnios utilizado sea amnios humano. El amnios humano puede ser recogido, por ejemplo, de la membrana embrionaria humana, de la placenta, etc. obtenido en el momento después del parto. Específicamente, el amnios humano se puede preparar mediante el tratamiento y purificación del material integrado que incluye la membrana embrionaria humana, la placenta y el cordón umbilical obtenido inmediatamente después del parto. Como método de tratamiento y purificación se puede emplear un método bien conocido, por ejemplo, un método descrito en la

Publicación No Examinada de Patente Japonesa N<sup>o</sup> JPH5-5698, etc. Es decir, el amnios se separa de la membrana embrionaria obtenida en el parto y el tejido restante se elimina mediante un tratamiento físico tal como la limpieza ultrasónica y un tratamiento con enzimas, y similares. A continuación, se lleva a cabo un proceso de lavado apropiado y de este modo se puede preparar el amnios humano.

- 5 El amnios humano preparado de este modo se puede crioconservar antes de su uso. El amnios humano se puede congelar en una mezcla de líquido de igual proporción en volumen de DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) y glicerol, por ejemplo, a -80° C. Mediante la crioconservación, no sólo se puede esperar una mejora de las propiedades de la intervención, sino también la reducción de la antigenicidad.

- 10 Se puede usar un amnios intacto pero es preferible utilizar un amnios del que se ha eliminado el epitelio por un tratamiento de raspado, etc. Mediante la eliminación del epitelio, se reduce la antigenicidad. Por ejemplo, un amnios humano crioconservado se descongela y luego se somete a un tratamiento con EDTA o con una enzima proteolítica a fin de debilitar la adherencia entre las células. A continuación, el epitelio se raspa mediante el uso de un raspador de células, etc. De este modo, se puede preparar un amnios humano del cual se ha eliminado el epitelio.

Preferiblemente, se elimina un epitelio de amnios mediante un método que comprende las siguientes etapas;

- 15 (1) preparar un amnios aislado a partir de un organismo;  
 (2) someter el amnios a un proceso de congelación y descongelación;  
 (3) someter el amnios después del proceso de congelación y descongelación a un tratamiento con tripsina, y  
 (4) lavar el amnios después del tratamiento con tripsina.

- 20 De manera similar a la eliminación del epitelio manual convencional, la eliminación del epitelio según la presente invención permite una eliminación completa del epitelio con un daño mínimo en la membrana basal. En particular, la eliminación del epitelio permite una eliminación completa del epitelio, al mismo tiempo que proporciona un amnios que tiene una membrana basal con la estructura nativa conservada favorablemente. Este amnios puede servir favorablemente, por ejemplo, como medio (base) para el cultivo de células. Por otro lado, el siguiente método de eliminación del epitelio está muy preparado para su uso y consume menos tiempo, si se compara con a la eliminación manual convencional. Además, facilita el tratamiento de varios amnios a la vez. Asimismo, puesto que  
 25 no requiere habilidades especiales, la automatización del mismo está preparada.

A continuación se describirá en detalle cada etapa del presente método para la eliminación del epitelio.

(Preparación del amnios: Etapa 1)

- 30 En la etapa (1), se prepara un amnios, que en este documento es preferiblemente amnios humano. El amnios humano puede ser cultivado a partir, por ejemplo, de la membrana fetal o de placenta humana obtenida después de un parto. En concreto, una masa sólida que comprende la membrana fetal humana, la placenta y el cordón umbilical obtenido inmediatamente después de un parto es tratada y purificada para preparar un amnios humano. El método para la preparación de amnios humano puede llevarse a cabo por cualquier método conocido, tal como el descrito en la Publicación de Patente Japonesa N<sup>o</sup> JP-5-56987. Estas etapas se realizan normalmente en el siguiente  
 35 procedimiento.

(1) La recolección del amnios

Se recoge una parte del tejido de la placenta durante el parto y el tejido amniótico se separa manualmente de ese tejido placentario. Alternativamente, el tejido amniótico puede estar congelado temporalmente.

(2) Eliminación de los componentes sanguíneos celulares y otros

- 40 Las células sanguíneas que permanecen en el amnios se lavan con disolución salina fisiológica y se eliminan. Además, la membrana coriónica se separa y se elimina manualmente. Por lo tanto, aunque es preferible hacer que el amnios esté libre de los componentes celulares de la sangre y de la membrana coriónica en esta etapa, la eliminación de los componentes celulares de la sangre y/o el desprendimiento de la membrana coriónica puede tener lugar después del proceso de congelación-descongelación (etapa 2).

- 45 El amnios humano preparado de este modo se puede congelar y almacenar hasta el próximo proceso. La congelación de amnios humano se puede llevar a cabo a -80° C en una mezcla de DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) y glicerol en una cantidad equivalente en relación volumétrica. Mediante la crioconservación, no sólo se puede esperar una mejora de la disposición de manipulación, sino también la reducción de la antigenicidad.

- 50 (Fijación en un marco)

El amnios preparado por el procedimiento anterior se fija preferentemente a un marco, y se somete al siguiente proceso, puesto estando fijado a un marco, el amnios se encuentra preparado para su utilización.

En la Fig. 2 se muestran ejemplos de métodos para fijar el amnios. En la Fig. 2a, se utilizan dos piezas del marco (1, 2). Un amnios 10 se extiende y se fija en los dos marcos con su borde sujeto entre los marcos. En la Fig. 2b, se utilizan un marco 3 y un elemento tipo placa 4 para fijar un amnios 10. El amnios 10 se coloca y se extiende sobre elemento tipo placa 4, con la parte superior de la amnios 10 mirando hacia arriba. Entonces, el marco 3 se monta sobre el amnios 10, sujetando el borde del amnios 10 entre elemento tipo placa 4 y el marco 3. Como resultado, sólo la cara epitelial del amnios 10 queda expuesta. Por consiguiente, sólo la cara epitelial del amnios 10 puede ser puesta en contacto con la disolución de tripsina en el siguiente tratamiento con tripsina (por ejemplo mediante la adición de disolución de tripsina en el interior del marco 3). Esto permite que el tratamiento con tripsina se realice sin afectar otras partes (estrato compacto y membrana basal del amnios) que no sean el epitelio. En otras palabras, el epitelio del amnios puede ser sometido a la acción de la tripsina, mientras que se protege al estrato compacto y a otras partes del amnios de la acción de la tripsina.

(Proceso de congelación-descongelación: Etapa 2)

En esta etapa, el amnios se congela temporalmente, y luego se descongela. Este proceso de congelación-descongelación facilita la eliminación del epitelio amniótico en el siguiente tratamiento con tripsina. Esto se cree que es debido a la distensión de la adherencia (estado de fijación) entre el epitelio amniótico y la membrana basal.

La temperatura de congelación puede estar en un intervalo de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$ . Teniendo las condiciones de congelación adecuadas y la disponibilidad de congeladores universales, es preferible la congelación a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, para la descongelación se puede realizar a una temperatura en un intervalo de aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $50^{\circ}\text{C}$ . La temperatura de descongelación es preferiblemente de aproximadamente  $37^{\circ}\text{C}$ .

Es preferible repetir el proceso de congelación-descongelación. La repetición de este proceso se añade al efecto del proceso de congelación-descongelación, facilitando la eliminación del epitelio en el siguiente tratamiento con tripsina. Sin embargo, se espera que la repetición más allá de lo necesario afecte adversamente a otras partes distintas del epitelio. En consecuencia, el proceso de congelación-descongelación se repite preferiblemente entre dos y cuatro veces. Las invenciones han puesto de manifiesto que la repetición del proceso congelación-descongelación dos veces con una congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y una descongelación a  $37^{\circ}\text{C}$  es una condición necesaria y suficiente. En base a este conocimiento, se cree que, en condiciones de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y descongelación a  $37^{\circ}\text{C}$ , es preferible la repetición de la congelación-descongelación dos veces.

Las condiciones para cada ronda de repeticiones del proceso de congelación-descongelación (temperatura de congelación y temperatura descongelación) pueden ser completamente iguales, en parte iguales, o totalmente diferentes. En vista de la disposición de manipulación, las condiciones son preferiblemente las mismas.

(Tratamiento con tripsina: Etapa 3)

En esta etapa, el amnios tras el proceso de congelación y descongelación se trata con tripsina. El tratamiento con tripsina se lleva a cabo poniendo en contacto el amnios con una disolución de tripsina. Un ejemplo de disolución de tripsina es aquella con una concentración de tripsina de aproximadamente 0,01 % (p/v) a aproximadamente 0,05 % (p/v). Preferiblemente, se utiliza una disolución de tripsina a una concentración de tripsina de aproximadamente 0,02 % (p/v). Si la concentración de tripsina de una disolución de tripsina es demasiado baja, la acción de la tripsina no se ejerce suficientemente. Por otro lado, si la concentración tripsina es demasiado alta, la acción de la tripsina se ejerce favorablemente sobre el epitelio amniótico, pero extiende de manera desfavorable más allá del epitelio para dañar el estrato compacto amniótico subyacente y la membrana basal.

La tripsina puede ser de cualquier origen, incluyendo bovina, porcina, humana y de cualquier otro origen disponible comercialmente. Se pueden utilizar favorablemente por ejemplo, Tripsina-EDTA (Invitrogen), y Tripsina 1:250 (Sigma).

Normalmente a la disolución de tripsina se le puede añadir cualquier quelante, lo que no siempre es necesario. Son ejemplos de quelantes EDTA, NTA, DTPA, EDTA, GLDA o cualquier combinación de los mismos. Los quelantes pueden tener una concentración, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,6 mM.

Es preferible que el tratamiento con tripsina se lleve a cabo en condiciones tales que sólo la cara epitelial del amnios se ponga en contacto con la disolución de tripsina con el fin de proteger otras partes del epitelio amniótico contra la acción de la tripsina. Exclusivamente la cara epitelial del amnios, puede ser puesta en contacto con una disolución de tripsina, por ejemplo, sumergiendo la cara epitelial del amnios en la disolución de tripsina, añadiendo o aplicando la disolución de tripsina a la cara epitelial del amnios, o bloqueando la parte coriónica del amnios, de manera que no se ponga en contacto con la disolución de tripsina antes de sumergirla totalmente en una disolución de tripsina. Como se describió anteriormente, el uso de un amnios pre-fijado en un marco como se muestra en la Fig. 2b (amnios enmarcado) puede conseguir el contacto exclusivo de la cara epitelial del amnios con la disolución de tripsina, por ejemplo sumergiendo el amnios enmarcado en la disolución de tripsina ya que sólo la cara epitelial está expuesta. Este método también tiene la ventaja de simplificar el tratamiento con tripsina haciendo que sea una simple operación de inmersión de un amnios enmarcado. Además, al uso de un amnios enmarcado se le pueden aplicar otras formas distintas de tratamiento con tripsina diferentes de la inmersión del amnios enmarcado, en su

totalidad junto con el marco, en una disolución de tripsina, por ejemplo mediante la inmersión de sólo la cara epitelial del amnios en la disolución de tripsina (por ejemplo, con la cara epitelial del amnios mirando hacia abajo para ser sumergida en la disolución de tripsina), mediante la adición de la disolución de tripsina al marco, o mediante la aplicación de la disolución de tripsina en la cara epitelial del amnios, para poner sólo la cara epitelial en contacto con la disolución de tripsina.

5 El período de tiempo para el tratamiento con tripsina (período de tiempo para entrar en contacto con una disolución de tripsina) puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos. Preferiblemente, el período de tiempo es aproximadamente de 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, más preferiblemente aproximadamente de 15 minutos. Si el período de tiempo de tratamiento es demasiado corto, la acción de la tripsina no se ejerce suficientemente, lo da como resultado una eliminación insuficiente del epitelio amniótico. Por otra parte, si el período de tiempo es demasiado largo, la acción de la tripsina se puede extender y dañar la membrana basal y el estrato compacto del amnios.

La temperatura a la que se lleva a cabo el tratamiento con tripsina es de aproximadamente 25° C a aproximadamente 42° C de manera que la tripsina actúe favorablemente.

15 Durante el contacto con la disolución de tripsina, es preferible mantener el amnios en una condición de reposo en la que la disolución de tripsina apenas puede permear a través de la membrana basal y el estrato compacto. Alternativamente, el tratamiento con tripsina se puede realizar en una varias de etapas.

(Lavado: etapa 4)

20 Después de que el amnios se pone en contacto con una disolución de tripsina en la forma descrita anteriormente, se somete a lavado en el que se elimina la disolución de tripsina y, al mismo tiempo, también el epitelio amniótico (células epiteliales). Este lavado del amnios después del tratamiento con tripsina se puede hacer dejándolo bajo una corriente adecuada de una disolución (por ejemplo agua corriente), por agitación (por ejemplo agitándolo hacia arriba y hacia abajo) mientras se sumerge en una disolución apropiada y, o sometiendo a ultrasonido u a otra vibración mientras que se sumerge en una disolución apropiada. La disolución de lavado puede ser, por ejemplo, disolución salina, disolución salina amortiguada con fosfato, agua pura y DMEM.

El amnios después del lavado se puede almacenar en un refrigerador o congelador hasta su uso. Por ejemplo, el amnios se puede almacenar sumergido en una disolución que contenga glicerol (por ejemplo, DMEM (Dulbecco Modificado Medio Eagle: GIBCOBRL) que contiene 50 % de glicerol).

2. Adición de trehalosa: etapa (b)

30 La adición de trehalosa al amnios se puede realizar mediante la inmersión del amnios en una disolución de trehalosa. Por ejemplo, el amnios se sumerge en una disolución de 5 % (p/v) -20 % (p/v) de trehalosa en agua destilada o en una disolución salina amortiguada con fosfato (PBS (-)). La temperatura durante la inmersión es, por ejemplo, aproximadamente de 4° C a aproximadamente 37° C. El período de tiempo de inmersión es, por ejemplo, desde aproximadamente una hora a un día. La trehalosa utilizada puede ser, por ejemplo, "Toreha" (Marca Registrada) disponible de Hayashibara Corp. o "Torehainochi" disponible de H plus V Lifescience Corp.

La adición de trehalosa al amnios puede ser de otra forma, tales como, por ejemplo, aplicación de la disolución de trehalosa a la superficie del amnios, pulverización de la disolución de trehalosa a la superficie del amnios y adición de trehalosa directamente sobre la superficie del amnios.

40 La etapa de eliminación del epitelio del amnios (por ejemplo, las etapas 2 a 4 anteriormente citadas) puede estar precedida de una etapa anterior de adición de trehalosa.

3. Proceso de congelación o proceso de desecación: Etapa (c)

En una forma de realización de la invención, el amnios, una vez que se le ha añadido trehalosa, se congela o deseca. Este proceso mejora la conservabilidad y la disposición de manipulación. Además, el proceso de desecación mejora en gran medida la conservabilidad y la disposición de manipulación de la composición en forma de lámina resultante. Además, se espera que el cambio del perfil de la superficie del amnios que acompaña a la desecación incrementa la afinidad (adhesividad) del amnios hacia los tejidos de un organismo vivo. El proceso de desecación del amnios se lleva a cabo preferiblemente por liofilización ya que este proceso mitiga la reducción de la flexibilidad del amnios. Además, el proceso de liofilización es el preferible en relación con el mantenimiento de la estructura de los componentes de la membrana basal del amnios. El proceso de liofilización elimina la humedad contenida en una muestra congelada (por ejemplo, una muestra congelada a aproximadamente -40° C) mediante la sublimación en condiciones a atmosfera baja (vacío) en la que el punto de ebullición se encuentra en un intervalo aproximado de -20° C (107 Pa, 0,8 Torr) a aproximadamente -50° C (4 Pa, 0,03 Torr). Puesto que la liofilización deshidrata uniformemente desde el interior, y consigue una alta sequedad, la función y el perfil nativos se pueden mantener muy bien incluso después de la desecación. Además, la liofilización tiene las ventajas de, por ejemplo, 1. tener un menor deterioro durante el proceso, 2. disponibilidad para hacerlo aséptico, 4. y producir un producto desecado mejorado que tiene una alta capacidad para recuperar el perfil original.

5 La liofilización puede realizarse en un liofilizador que comprende una cámara de vacío, aparatos de refrigeración y de calefacción, y una instalación de aspiración (trampa de frío y bomba de vacío). Numerosos liofilizadores están disponibles comercialmente, cualquiera de los cuales puede ser utilizado para llevar a cabo la liofilización instantánea. Las condiciones para la liofilización se pueden establecer según las instrucciones del liofilizador utilizado y teniendo en consideración el tamaño y el nivel de humedad deseado de la muestra que se somete a la desecación. La sequedad se puede ajustar de manera que, por ejemplo, la actividad del agua (AW) sea inferior a 0,5.

Se pueden obtener amnios desecados con el tamaño y forma deseados cortando o recortando el amnios desecado. El amnios desecado obtenido de este modo se puede fijar a un soporte o marco.

10 En una forma de realización de la presente invención, el amnios desecado obtenido a través del proceso de desecación está contenido en un recipiente adecuado cualquiera de manera que principalmente no haya contacto con el oxígeno. El confinamiento en un envase en un estado en el que el oxígeno está secuestrado consigue un amnios desecado sin epitelio que tiene una conservabilidad extremadamente alta.

15 Por ejemplo, el amnios después de la desecación se aloja en un recipiente adecuado y, por ejemplo, el aire dentro del recipiente se aspira y se retira para desalojarlo o reemplazarlo por nitrógeno, poniendo así el amnios en un envase con el oxígeno esencialmente secuestrado. Como alternativa, el recipiente puede contener también desoxidantes para eliminar el oxígeno restante. Opcionalmente estos métodos se pueden combinar. Un ejemplo de envase sería, por ejemplo, una bolsa o envase en forma de tubo (dos láminas superpuestas la una a la otra con los bordes sellados) hechos de resina sintética o un envase similar a una botella de plástico hecho de vidrio u otro material inorgánico.

20 El proceso de congelación o el proceso de desecación pueden ir precedidos o seguidos de una etapa de recubrimiento de la parte coriónica del amnios con un material bioabsorbible para fortalecer el amnios. Ejemplos de materiales bioabsorbibles son poliglactina 910, gelatina, colágeno, y ácido poli-láctico.

#### 4. Etapa del proceso de esterilización: Etapa (d)

25 El proceso de esterilización reduce al mínimo el riesgo de contaminación bacteriana. Por ejemplo, se puede utilizar el tratamiento con EOG (gas de óxido de etileno), UV (ultravioleta), rayos  $\gamma$  para esterilizar el amnios. La esterilización con rayos  $\gamma$  es la más preferible de ellas debido a su baja tendencia a disminuir las propiedades físicas del amnios. La dosis para la esterilización con los rayos  $\gamma$  puede ser, por ejemplo, de 2 kGy a 50 kGy, preferiblemente de 10 kGy a 30 kGy, más preferiblemente de 15 kGy a 5 kGy. Es preferible llevar a cabo el proceso de esterilización del amnios que ha pasado por varios procesos con posterioridad a su confinamiento en un recipiente o envoltura con una película o lámina, etc. Por consiguiente, el proceso de esterilización está precedido preferentemente de una etapa en la que el amnios se confina en un recipiente, etc. El amnios se confina o se envuelve de manera que sustancialmente no tiene contacto con oxígeno para reducir al mínimo el deterioro de la calidad y permitir el almacenamiento durante un período de tiempo preferentemente más largo.

#### 35 5. Componentes adhesivos de fijación: Etapa (e)

En una forma de realización de la invención, el fibrinógeno y la trombina están fijados a la superficie del amnios. La fijación de estos componentes se puede realizar después del proceso de desecación que se ha descrito anteriormente. El uso de amnios desecado permite una fijación favorable del fibrinógeno y de otros componentes adhesivos.

40 La fijación del fibrinógeno y de la trombina a la superficie del amnios se lleva a cabo de forma independiente o simultáneamente. Los métodos de fijación no están limitados. Un ejemplo de método de fijación es mediante aplicación, goteo o pulverización de una disolución de los componentes fijados a la superficie de amnios, o por inmersión del amnios en una disolución de los componentes que se van a fijar. Alternativamente, el fibrinógeno en sí (o la propia trombina) o cualquiera de los componentes depositados después de la disolución del fibrinógeno (o de la trombina) en un disolvente apropiado se añade (rociado) sobre la superficie del amnios para fijar el fibrinógeno (o la trombina) a la superficie del amnios.

Preferiblemente, se prepara una mezcla de estos dos componentes y, por ejemplo, mediante aplicación o goteo de la mezcla se fija el fibrinógeno y la trombina a la superficie del amnios. A continuación se describen ejemplos de métodos específicos de fijación de forma simultánea los dos componentes.

50 En primer lugar se prepara una disolución de fibrinógeno. Específicamente, el fibrinógeno se disolvió en etanol (por ejemplo, etanol 94 %) u otro disolvente (medio disolvente) a una concentración deseada. Además de etanol, se puede utilizar como disolventes alcoholes tales como etanol anhidro, isopropanol, metanol y acetona. Mientras tanto, la disolución de trombina se prepara por separado de la misma manera. Ejemplos de disolventes que se pueden utilizar en este caso son el etanol (etanol 99,5 %), etanol anhidro, isopropanol, metanol y otros alcoholes y acetona.

55 A continuación, se mezcla una disolución de fibrinógeno y una disolución de trombina preparadas de la manera descrita anteriormente. La mezcla así obtenida se utiliza para llevar a cabo la aplicación, goteo u otro procedimiento

sobre el amnios como se describió anteriormente. Si se utiliza la mezcla descrita de una disolución de fibrinógeno y una disolución de trombina para el procedimiento de fijación, es preferible asegurarse de que la mezcla no tenga un contenido en agua alto en exceso. Si el contenido de agua es demasiado alto, se produce una reacción entre el fibrinógeno y la trombina antes del proceso de fijación, lo que dificulta el procedimiento. Además, con el fin de lograr una adhesividad favorable después del trasplante, es preferible que el fibrinógeno y la trombina fijados en el amnios no reaccionen entre ellos previamente. Teniendo en cuenta los factores anteriormente mencionados, es preferible un disolvente para cada uno de ellos, fibrinógeno y trombina, soluble en agua y volátil, y tener menos contenido en agua.

Si bien se realiza normalmente la aplicación o goteo, por ejemplo, de la disolución de fibrinógeno y de la disolución de trombina, o de una mezcla de fibrinógeno y trombina de manera uniforme sobre la totalidad de la superficie del amnios, se puede llevar a cabo sobre una región limitada (por ejemplo, aplicando en varias zonas con una distancia entre ellas, o aplicándolas sólo sobre la periferia), o variando la densidad de fijación.

En el procedimiento anterior, la fijación de fibrinógeno y trombina se lleva a cabo simultáneamente. Sin embargo, cada uno de estos componentes se puede fijar en etapas separadas. En concreto, la fijación del fibrinógeno y la fijación de la trombina puede tener lugar en dos etapas. Sin embargo, respecto a la simplificación del procedimiento y la consecución de una distribución uniforme del fibrinógeno y de la trombina fijada, es preferible utilizar una mezcla de fibrinógeno y de trombina para llevar a cabo la fijación en una sola etapa.

El fibrinógeno y la trombina se pueden preparar a partir de la sangre según los métodos convencionales. Alternativamente, se puede utilizar fibrinógeno recombinante y otros componentes, en cuyo caso se pueden utilizar cualquier disolución de cultivo o disolución de lisis de las células cultivadas adecuada según métodos convencionales. Alternativamente, se pueden utilizar cualquier fibrinógeno disponible comercialmente, u otros componentes. Por ejemplo, el fibrinógeno humano se puede adquirir de Baxter Corp. Del mismo modo, la trombina humana se puede adquirir de Baxter Corp.

Además de fibrinógeno y trombina, se puede fijar aprotinina a la superficie del amnios. Específicamente, en la presente realización, se lleva a cabo además una etapa de fijación de aprotinina (etapa b-1). La fijación de aprotinina se puede realizar de manera y con procedimientos similares a la fijación de fibrinógeno, etc. Específicamente, la aplicación, goteo, pulverización, inmersión y otros procedimientos que utilicen una disolución de aprotinina tiene como resultado la fijación de la aprotinina a la superficie del amnios. La disolución de aprotinina se puede preparar disolviendo la aprotinina en una disolución de cloruro de sodio (por ejemplo, una disolución de 0,85 %), en una disolución de cloruro de potasio, en una disolución de cloruro de calcio, en una disolución de cloruro de magnesio, etc.

La aprotinina se puede preparar a partir de páncreas bovino según los métodos convencionales. Alternativamente, se puede utilizar aprotinina recombinante, en cuyo caso se pueden utilizar cualquier disolución de cultivo o disolución de lisis de las células cultivadas adecuada según métodos convencionales. Alternativamente, se puede utilizar cualquier aprotinina disponible comercialmente. Por ejemplo, se pueden comprar aprotinina de origen bovino de Bayer Pharmaceuticals. Aunque la etapa de fijar la aprotinina se puede realizar de manera independiente, las etapas de fijación de fibrinógeno y trombina se realizan preferiblemente de forma simultánea ya que el procedimiento para fijar los componentes adhesivos se facilita en su conjunto. Debido a ello, además se puede conseguir una distribución más uniforme del fibrinógeno, de la trombina y de la aprotinina fijadas a la superficie de amnios. Por ejemplo, preparando una mezcla de fibrinógeno, trombina y aprotinina y, por ejemplo, aplicando la mezcla, se puede obtener la fijación simultánea de estos componentes en el amnios. El orden de mezcla de estos tres componentes no está limitado.

La fijación de fibrinógeno, etc. se lleva a cabo en uno o en ambos lados del amnios. En el primer caso, la fijación de fibrinógeno, etc. se lleva a cabo en la superficie (es decir, parte coriónica) opuesta al epitelio (la parte en el que un epitelio estaba presente), independientemente de la presencia o ausencia del epitelio en el amnios.

Después de que se hayan fijado el fibrinógeno y la trombina (además de aprotinina en alguna ocasión), se lleva a cabo proceso de desecación, según sea necesario, para producir una composición en forma de lámina con una alta estabilidad de almacenamiento y con una forma favorable para la manipulación (transporte, trasplante, etc.).

El proceso de desecación puede ser cualquier procedimiento de desecación típico, tal como el secado con aire, el secado al vacío, el secado por aspiración, la liofilización, etc.

(Método para producir una composición en forma de lámina que comprende una capa de células)

En una forma de realización de la invención, se forma sobre el amnios una capa de células que utiliza células derivadas de tejidos. La etapa de formación de la capa de células se puede llevar a cabo según el siguiente procedimiento. Se preparan las células derivadas de tejido adecuadas (etapa de preparación de células derivadas de tejidos). Las células derivadas de tejido se seleccionan para que se adapten a la aplicación de la composición en forma de lámina resultante. Por ejemplo, con el fin de producir una lámina para la reconstrucción de los tejidos epidérmicos de la piel, se utilizan preferentemente células epidérmicas de la piel (incluyendo células madre y células precursoras) y células epiteliales foliculares. Del mismo modo, con el fin de reconstruir los tejidos epiteliales de la

córnea, se utilizan preferiblemente células epiteliales de la córnea (incluyendo células madre y células precursoras), y, con el fin de reconstruir los tejidos epidérmicos de las mucosas, se utilizan preferiblemente células epiteliales de la mucosa (incluyendo células madre y células precursoras). Ejemplos de células epiteliales de la mucosa de son las células epiteliales de la mucosa bucal, células epiteliales de la mucosa intestinal y células epiteliales de la mucosa las vías respiratorias.

Los métodos para la preparación de las células derivadas de tejidos se describen a continuación, con ejemplos de células de la epidermis, células epiteliales de la córnea, células epiteliales de la mucosa bucal, células epiteliales de la mucosa intestinal, y células epiteliales de la mucosa de las vías respiratorias.

(Células epidérmicas de la Piel)

En primer lugar, cuando se recoge la piel, previamente el lugar donde va a ser recogida se desinfecta profilácticamente con un desinfectante como la povidona yodada y se aplica un agente antimicótico externamente a la misma, seguido de la recogida de un pequeño trozo de piel por medio de una biopsia de la piel. En el cultivo de queratinocitos epidérmicos, el tejido adiposo y de la dermis se retiran del trozo de piel tanto como sea posible utilizando tijeras y se lava varias veces con un amortiguador de fosfato de Dulbecco (PBS) y se sumerge en etanol 70 % durante un minuto para la esterilización. La pieza se corta en forma de tira, se impregna de una disolución de Dispasa y se mantiene durante la noche a 4° C. A continuación, la epidermis se despegue de la dermis. La epidermis despegada se lava, y a continuación se separa de la epidermis con el fin de preparar la disolución de queratinocitos epidérmicos en suspensión. Las células se suspenden en un medio de cultivo sin suero y se siembran en una placa recubierta con colágeno, y se lleva a cabo subcultivo.

(Células epiteliales de la cornea)

Las células epiteliales de la cornea pueden obtenerse a partir de un tejido limbo corneal. Por ejemplo, las células endoteliales se separan y se eliminan del tejido limbo corneal, y la conjuntiva se escinde para formar una suspensión de células individuales. A continuación, esta se conserva en un tanque de nitrógeno, y a continuación, se disuelve rápidamente a 37° C con el fin de ajustar una disolución de células epiteliales corneales en suspensión. Si es necesario, se lleva a cabo un subcultivo. Para el subcultivo, por ejemplo, se puede utilizar EpiLife™ (Cascade), un medio de cultivo MCDB153 (Nissui Pharmaceutical Co., LTD.), que son medios de cultivo sin suero, y medios de cultivo producidos modificando la composición de aminoácidos, etc., de los medios de cultivo anteriormente mencionados.

(Células epiteliales de la mucosa oral)

Como las células epiteliales de la mucosa oral, se pueden utilizar células existentes en la zona de la raíz dental (células del epitelio crevicular de la mucosa oral), células de la parte labial, células de parte paladar, células de la parte bucal, y similares. Entre ellas, es particularmente preferible utilizar células del epitelio crevicular de la mucosa oral, debido a su alta capacidad de proliferación y baja antigenicidad. Las células epiteliales de la mucosa oral se pueden recoger extirpándolas del sitio donde existan células diana con el uso de un escalpelo, o por raspado de las mismas. Las células del epitelio crevicular de la mucosa oral se pueden recoger mediante la separación de las células epiteliales de la mucosa oral de la parte de transición cemento esmalte y recoger las células del trozo de tejido obtenido. Téngase en cuenta que con el fin de eliminar impurezas tales como el tejido conjuntivo, preferiblemente, se lleva a cabo un tratamiento de filtración con enzimas tal como la dispasa o tripsina, etc.

(Célula epiteliales de la mucosa del tracto intestinal)

Las células epiteliales de la mucosa del tracto intestinal se recogen del tejido epitelial del tracto intestinal por medio de una endoscopia del intestino grueso, o por técnicas habituales en una operación abdominal. Además, las células epiteliales pueden ser eliminadas del tejido por captura por microdissección por láser. La técnica de la presente invención se puede aplicar a una composición en forma de lámina producida mediante el uso de células epiteliales de todo el tracto digestivo humano, como esófago, estómago superior, duodeno, intestino delgado e intestino grueso. Cuando una úlcera, inflamación, o similares, provocan lesiones en el epitelio del tracto digestivo humano, las células derivadas de la médula ósea juegan un papel de rescate de emergencia, para reparar el epitelio. Las células epiteliales de las vías digestivas, aunque solo parte de ellas, se forman también a partir médula ósea. En este sentido, la presente invención se puede considerar que tiene una importancia que es equivalente a la del uso de células epiteliales de la córnea. En general, una célula epitelial se forma a partir de la médula ósea, lo que generalmente supone sólo varias células para 1000 células, se incrementa de 50 a 100 veces en el proceso de curación de úlceras (heridas) de la superficie interna del tracto digestivo, que se producen, por ejemplo, por una úlcera gástrica y colitis. Se determinó que aproximadamente de 1 a 10 células epiteliales del tracto digestivo derivan de la médula ósea. La composición en forma de lámina derivada de las células epiteliales de la mucosa del tracto digestivo son extremadamente importantes porque instan a la regeneración del epitelio del tracto intestinal en relación con úlceras y lesiones inflamatorias del intestino que se consideran enfermedades intratables, es decir, enfermedades infecciosas del tracto intestinal graves, tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de Behçet, y similares. Se puede suponer su eficacia con respecto a las alergias del tracto intestinal.

(Células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio)

Las células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio se pueden obtener fácilmente de biopsias de los tejidos de la mucosa del tracto respiratorio. Se llevan a cabo tratamientos al igual que en el tejido mencionado anteriormente, con el fin de eliminar impurezas tales como el tejido conectivo, es preferible el tratamiento con enzimas tales como la dispasa, tripsina, y similares, o tratamientos de filtración. Las células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio juegan un papel importante en los estados patológicos de diversas enfermedades infecciosas a través de la biosíntesis y la liberación de defensina  $\beta$ . Además, el epitelio de la mucosa del tracto respiratorio también desempeña un papel importante en el asma o enfermedades alérgicas. El suministro de las composiciones en forma de lámina producidas por células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio según la presente invención a la mucosa del tracto respiratorio que tenga un trastorno de los tejidos conduciría no sólo a llevar a cabo un tratamiento de emergencia, sino que también proporciona un tracto respiratorio artificial. En particular, es beneficioso el efecto de inmunosupresión de la lámina de amnios.

Es preferible que después de recogerse el tejido, las células epiteliales de la mucosa bucal, las células epiteliales de la mucosa del tracto intestinal, y similares, se sometan a un tratamiento con enzimas como la dispasa, tripsina, y tratamientos de filtración, con el fin de eliminar las impurezas tales como el tejido conectivo.

Es preferible que las células de origen biológico se obtengan a partir de la persona (receptor) que se somete al trasplante. Es decir, es preferible que el donante de las células de origen biológico sea idéntico al destinatario de la composición en forma de lámina. Mediante el uso de estas células autólogas, se evita el problema del rechazo inmunológico.

Las células preparadas de origen biológico se siembran en el amnios (etapa de la siembra de células de origen biológico en el amnios), seguido por el cultivo de las mismas (etapa de cultivar y de proliferación de las células de origen biológico sembradas).

En esta forma de realización, es particularmente preferible utilizar amnios de cual se ha eliminado el epitelio. Mediante la eliminación del epitelio, se puede esperar la reducción de la antigenicidad. Además, ya que las células innecesarias se eliminan con antelación, las láminas de las células diana se pueden formar excelentemente. Cuando se utiliza amnios del cual se ha eliminado el epitelio, es preferible que las células de origen biológico se siembren en la parte de la superficie expuesta de la que se ha eliminado el epitelio (es decir, lado de la membrana basal). Se cree que este lado de la superficie es rico en colágeno de tipo IV, de modo que la proliferación y estratificación de las células de origen biológico sembradas puede evolucionar excelentemente.

En la presente memoria, mediante el uso de dos tipos de células, se puede formar una capa de células híbrida. El método de formación de la capa de células en tal caso se describe en detalle a continuación, tomando como ejemplo el caso de una composición en forma de lámina para reconstruir el epitelio de la cornea.

En primer lugar, se pueden utilizar preferiblemente uno de los tipos de células utilizadas para la formación de una capa de células (las células primeras), células derivadas de epitelio de la mucosa, tales como el epitelio de la mucosa oral, el epitelio de la conjuntiva, y el epitelio de la mucosa nasal, o células no diferenciadas capaces de construir estos epitelios de las mucosas. Por otro lado, como tipos de células (las células segundas) que se utilizan para la formación de una capa de células, junto con las células primeras, se puede utilizar preferentemente células epiteliales de la córnea, células epiteliales de la conjuntiva, o células epiteliales amnióticas. Estas células se pueden recoger a partir de un tejido vivo en el que estas células estén presentes. Específicamente, por ejemplo, se recoge una parte del tejido en el que se encuentran estas células diana mediante el uso de un bisturí quirúrgico y similares, para tratamientos tales como eliminación del tejido conectivo, separación de las células, y similares, y se forma una suspensión de células en estado de disolución (suspensión). Aquí debe tenerse en cuenta que se pueden usar como células primeras, dos o más tipos diferentes de células. Del mismo modo, se pueden usar células segundas, dos o más tipos diferentes de células.

Se sugiere que el epitelio de la mucosa oral que es adecuado como fuente de recolección de células primeras incluye células madre. Por lo tanto, se cree que el epitelio de la mucosa oral puede fácilmente inducir la diferenciación para formar células capaces de formar una capa de células similar al epitelio. Además, el uso de células epiteliales de la mucosa oral tiene la ventaja de que se recogen fácilmente, se pueden recoger un gran número de células, y además, incluso en el caso del tratamiento de enfermedades de la córnea que se producen en ojos bilaterales, se pueden utilizar las células autólogas para preparar material de trasplante, y similares. En particular, también para pacientes de los cuales no se pueden recolectar células epiteliales de la córnea, se puede proporcionar material de trasplante derivado de las células autólogas. Se espera que esta ventaja elimine radicalmente el problema del rechazo importante clínicamente.

Como células epiteliales de la mucosa oral, se pueden utilizar células existentes en la zona de raíz dental (células epiteliales de la mucosa crevicular oral), células de la zona labial, células de la zona del paladar, células de la zona bucal, y similares. Entre ellas, es particularmente preferible utilizar células epiteliales de la mucosa crevicular oral, debido a su alta capacidad de proliferación y baja antigenicidad. Las células epiteliales de la mucosa oral se pueden

recoger mediante la extirpación de una zona donde existen células diana con el uso de un escalpelo, o por raspado. Las células epiteliales de la mucosa crevicular oral pueden recogerse separando el epitelio de la mucosa oral unida a un diente extraído de la parte de transición del cemento esmalte y recogiendo las células del epitelio de la mucosa oral. Téngase en cuenta aquí que con el fin de eliminar impurezas tales como el tejido conjuntivo, se lleva a cabo preferiblemente, un tratamiento con enzimas tales como dispasa o tripsina, etc., tratamiento de filtración.

Se pueden utilizar células epiteliales de la mucosa oral recogidas de una persona distinta del paciente que está destinado a someterse a un trasplante de la composición en forma de lámina de la presente invención. Sin embargo, teniendo en consideración el rechazo inmunológico, es preferible que las células epiteliales de la mucosa oral se obtengan de la cavidad oral del paciente y se utilicen para el cultivo.

La mucosa oral tiene alta capacidad de proliferación. En la mucosa oral, generalmente, puesto que la lesión se cura después de la operación mediante la administración interna de fármacos antimicrobianos y llevando a cabo una desinfección con Isodine, y similares, durante varios días, el proceso invasivo para el paciente que se somete a la recolección de la mucosa parece a ser escaso.

Por otra parte, como células segundas, se puede utilizar preferentemente las células epiteliales de la córnea de otro individuo (alo). Como células epiteliales de la córnea, están disponibles las células de donantes de ojos sin infectar, por ejemplo, de un banco de ojos (Northwest eye bank etc.). Las células que se pueden utilizar como segundas células no se limitan a las células epiteliales de la córnea. Se pueden utilizar células epiteliales de la conjuntiva, células epiteliales del amnios, y similares. Sin embargo, cuando se emplean células epiteliales de la córnea que constituyen el epitelio de la córnea en un organismo vivo o células epiteliales de la conjuntiva existentes en los alrededores de la misma, se cree que se forma una composición en forma de lámina capaz de reproducir las propiedades del epitelio de la córnea más excelente. Como resultado de la investigación del presente inventor, cuando se utilizan células epiteliales de la córnea como segundas células se confirma que se forma una capa de células similar a la del epitelio de la córnea. Este hecho apoya la predicción mencionada anteriormente y afirma el que las células epiteliales de la córnea son particularmente preferibles para células segundas. Por otro lado, se confirma que cuando se utilizaron las células epiteliales amnióticas como segundas células, se forma una capa de células capaces de reproducir de manera excelente las propiedades requeridas por la córnea. Este hecho demuestra que las células epiteliales del amnios pueden ser también utilizadas preferiblemente como células segundas.

Las células autólogas pueden ser utilizadas como células segundas. Sin embargo, cuando se utilizan células de otros individuos, se pueden obtener las células más fácilmente. Por ejemplo, incluso cuando se produce una composición en forma de lámina para el tratamiento de un paciente con enfermedad ocular bilateral, las células epiteliales de la córnea están disponibles como células segundas.

Las células primeras y las células segundas preparadas por separado (en adelante, también referido como "células primeras y similares") se siembran en el amnios y se cultivan. En general, las células primeras y las células segundas, que se preparan en una forma de disolución de células en suspensión, se aplican por goteo sobre el amnios y se cultivan.

Normalmente, la siembra de las células primeras y la siembra de las células segundas se lleva a cabo al mismo tiempo (en este documento, "simultáneamente" incluye no sólo el caso en el que la siembra se lleva a cabo al mismo tiempo, literalmente, sino también un caso en el que se lleva a cabo la primera siembra y a continuación, se lleva a cabo la segunda siembra sin intervalo sustancial de tiempo). Las primera y segunda células pueden ser sembradas en diferentes momentos. Por ejemplo, las células segundas se pueden sembrar varios de minutos a varias horas después de sembrar las células primeras. Este retraso de tiempo de la siembra permite, por ejemplo, construir una capa de células no uniforme de manera que se localiza una capa de células que tenga zonas ricas en células derivadas de las células primeras.

La proporción para la siembra de células primeras y células segundas no está particularmente limitada. Normalmente, se siembran sustancialmente el mismo número de células primeras y segundas. En un experimento en el que se utilizaron células epiteliales de la mucosa oral como células primeras y células epiteliales de la córnea se utilizaron como células segundas, la relación entre el número de células primeras: las células segundas se cambió a 3:7, 5:5, y 7:3 y se llevó a cabo la comparación. Como resultado, no se observó diferencia en términos de proliferación celular y estratificación claramente entre ellas (datos no mostrados).

Cuando las células primeras y segundas se cultivan en el amnios, las células proliferan y se forma una capa de células (en este proceso, al menos una parte de las células se cree que están diferenciadas). Después de la formación de una capa de células, se lleva a cabo la etapa de poner la capa superficial de la capa de células en contacto con el aire. Esta etapa también se conoce en esta memoria descriptiva como levantamiento por aire. Esta etapa se lleva a cabo para la diferenciación de las células que forman una capa celular y para inducir la función de barrera.

Esta etapa se puede llevar a cabo disminuyendo la superficie del medio de cultivo mediante la eliminación temporal de una parte del medio de cultivo utilizando un cuentagotas, una pipeta, y similares, exponiendo de este modo temporalmente la capa más externa de la capa de células al exterior del medio de cultivo. Alternativamente, esta

etapa se puede llevar a cabo levantando la capa de células junto con el amnios, exponiendo de este modo temporalmente la capa más externa de la superficie del medio de cultivo. Además, mediante el uso de un tubo, etc., se puede insuflar aire en el medio de cultivo con el fin poner la capa superior de la capa de células en contacto con el aire. Desde el punto de vista de facilitar la operación, es preferible reducir la superficie del medio de cultivo, exponiendo de esta manera la capa más externa de la capa de células hacia el exterior.

La duración para la realización de esta etapa, es decir, el período de tiempo durante el que la capa superior de la capa de células se pone en contacto con el aire difiere dependiendo del estado de las células, las condiciones de cultivo, y similares, pero la duración puede ser, por ejemplo, de tres días a dos semanas, preferentemente en una semana, y aún más preferiblemente en tres días.

Según el método de la presente invención anteriormente mencionado, se forma sobre el amnios, una capa de células similar al epitelio de la cornea, en la que las células primeras y células segundas están estratificada. La composición obtenida de este modo en forma de lámina junto con el amnios utilizado como sustrato de las células primeras y de células segundas puede ser utilizada como material de trasplante (sustituto del epitelio de la cornea) para pacientes con la córnea lesionada o dañada. En este caso, la composición en forma de lámina se trasplanta en la zona del epitelio de la cornea defectuosa de manera que el amnios se encuentre en el lado del globo ocular.

En una forma de realización de la presente invención, las células de origen biológico se cultivan en presencia de las células soporte. La célula de soporte también se conoce como célula de alimentación y proporciona al medio de cultivo un factor de crecimiento, etc. Cuando las células de origen biológico se cultivan en coexistencia con las células de soporte, se mejora la eficiencia de la proliferación de las células. Se pueden usar como células de soporte, por ejemplo, células 3T3 (células de ratón Swiss 3T3, células de ratón NIH3T3, células 3T3J2, etc.) y similares. Entre ellas, es preferible utilizar las células de ratón NIH3T3 como células de soporte desde el punto de vista de la eficiencia de la proliferación, facilidad en la manipulación, etc.

Es preferible que las células de soporte se inactiven mediante el uso de mitomicina C, etc., Esto es ventajoso porque se evita la inhibición de la proliferación de las células de origen biológico debido a la proliferación de las propias células de soporte, y se ve reforzada la eficiencia de la proliferación de las células de origen biológico. Esta inactivación se puede llevar a cabo por un tratamiento de radiación, y similares.

La densidad celular de las células de soporte puede ser, por ejemplo, aproximadamente de  $1 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup> o más, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup> a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/cm<sup>2</sup>, y aún más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> a aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. En cuanto a la relación en relación con el número de células primeras y células segundas, el cultivo puede llevarse a cabo en unas condiciones en las que el número de las células de soporte utilizadas pueda ser, por ejemplo, de  $1/10^3$  veces a  $1 \times 10^2$  veces, y preferiblemente de  $1/10^2$  veces a 1 vez el número total de células de origen biológico. Cuando el número de las células de soporte es pequeño, la tasa de proliferación de las células primeras y similares disminuye, y cuando es demasiado pequeña, no se puede obtener una proliferación y estratificación excelente de las células de origen biológico. Por otra parte, no es preferible que el número de las células de soporte sea demasiado grande, debido a que la tasa de proliferación de las células epiteliales de la mucosa oral disminuye.

Cuando las células de origen biológico se cultivan en coexistencia con las células de soporte, es preferible que se proporcione una membrana de aislamiento que tenga un tamaño de poro para que las células de soporte no puedan pasar entre las células de soporte y el amnios. El uso de la membrana de aislamiento hace que sea posible evitar que las células de soporte entren en la zona del amnios (es decir, la parte de las células de organismos vivos) en el momento del cultivo. Como resultado, las células de soporte no pueden mezclarse con la composición en forma de lámina obtenida finalmente. Esto significa se puede construir una composición en forma de lámina libre de problemas de rechazos inmunológicos por las células de soporte. Clínicamente, esto es extremadamente importante.

Como membrana de aislamiento, se puede utilizar, una membrana de aislamiento que tenga un tamaño de poro a través del cual las células de soporte no pueden pasar seleccionado adecuadamente entre las membranas conocidas. Por ejemplo, se puede utilizar una membrana de policarbonato que tenga un tamaño de poro aproximadamente de 0,4 μm a 3,0 μm. El material de la membrana de aislamiento no está particularmente limitado. Además de policarbonato, se pueden usar poliéster y similares. Tales membranas de aislamiento están en el mercado y están disponibles fácilmente.

Se incluye un ejemplo del método de cultivo utilizando una membrana de aislamiento en el siguiente método. En primer lugar, las células de soporte inactivadas se siembran y cultivan en un recipiente tal como una placa (un primer recipiente), formando de este modo una capa de células de soporte sobre la superficie del recipiente. A continuación, un segundo recipiente, que tenga una cara inferior hecha de una membrana de aislamiento, se coloca en el primer recipiente de manera que la cara inferior del segundo recipiente se encuentre en el medio de cultivo. Entonces, el amnios se forma en la cara inferior, es decir, sobre la membrana de aislamiento. Entonces, las células de origen biológico se siembran y se cultivan sobre la capa de colágeno.

En un ejemplo, se forma el amnios previamente, sobre la superficie inferior del segundo recipiente, (por ejemplo, en la superficie inferior del segundo recipiente, se coloca un amnios del que se ha eliminado el epitelio. En este estado, se lleva a cabo el proceso de secado). Este segundo recipiente se coloca dentro del primer recipiente en el que se siembran las células de soporte, y a continuación, las células primeras y similares se pueden sembrar y cultivar sobre la capa de colágeno.

El medio de cultivo utilizado para cultivar las células de origen biológico no está particularmente limitado siempre que las células pueden proliferar y formar capas. Por ejemplo, se puede utilizar un medio de cultivo, en el que se mezclen entre sí DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) que se utiliza generalmente para el cultivo de células epiteliales y un medio F12 de Ham en una relación predeterminada, y se añade FBS, factor de crecimiento, antibióticos, y similares. Los ejemplos específicos incluyen un medio de cultivo mixto con DMEM y medio de cultivo F12 de Ham (proporción en volumen de la mezcla 1:1) a la que se añaden FBS (10 %), insulina (5 mg/ml), toxina del cólera (0,1 nM), factor de crecimiento de las células epiteliales (EGF) (10 ng/ml) y penicilina- estreptomycin (50 IU/ml). Además, puede utilizarse un medio de cultivo mixto de DMEM y medio de cultivo de HAM F12 al que se añade además triiodotironina (por ejemplo, 2 nM), glutamina (por ejemplo, 4 mM), transferrina (por ejemplo, 5 mg/ml), adenina (por ejemplo, 0,18 mM), y/o hidrocortisona (por ejemplo 0,4 mg/ml).

Las células de origen biológico se pueden cultivar en ausencia de células xenogénicas. La "ausencia de células xenogénicas" en la presente invención significa que no se utilizan células de animales diferentes de las células de origen biológico, como condición para el cultivo de células de origen biológico. Específicamente, cuando se utilizan células humanas (por ejemplo, células de la epidermis de piel humana o células epiteliales de la córnea humana), la condición es que no estén presentes (no coexistan) células de especies animales distintas a la humana, por ejemplo, un ratón, una rata, o similares. Cuando las células se cultivan con esta condición, los componentes xenogénicos (incluidas las mismas células xenogénicas) no pueden estar contaminados en el material de trasplante obtenido finalmente (es decir, la composición en forma de lámina).

El medio de cultivo utilizado para el cultivo de células de origen biológico no está particularmente limitado siempre que permita que las células proliferen. Por ejemplo, se puede utilizar en una relación predeterminada un medio MCDB153 (Nissui Pharmaceutical Co., LTD.), EpiLife (Cascade), y medios de cultivo producidos modificando la composición de aminoácidos, etc. de estos medios de cultivo, un medio de cultivo mixto de DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) y medio de cultivo F12 de Ham, que por lo general se utilizan para el cultivo de células epiteliales. En particular, en la presente invención, es preferible utilizar un medio de cultivo que no contenga suero ni proteínas xenogénicas. Por otra parte, se puede utilizar un medio de cultivo que contenga factores de crecimiento, antibióticos, y similares. Sin embargo, es preferible utilizar un medio de cultivo que no contenga ningún suero. Es decir, es preferible emplear un medio de cultivo sin suero como método de cultivo en la presente invención. Esto es ventajoso porque se pueden evitar problemas tales como el rechazo inmunológico debido a la contaminación de los componentes derivados del suero. Téngase en cuenta que el cultivo puede llevarse a cabo en un medio de cultivo que contenga suero, en este caso, sin embargo, es preferible utilizar suero alogénico (cuando se usan células de origen humano, suero de origen humano) o usar suero autólogo. Huelga decir que, si es posible, es preferible utilizar suero autólogo capaz de evitar el rechazo inmunológico.

Las condiciones de cultivo pueden ser modificados en el transcurso del cultivo con el fin de la proliferación excelente de células de origen biológico.

Como resultado de la etapa de cultivo, las células de origen biológico proliferan en el amnios. Cuando se necesita queratinizar una capa superficial de la capa de células obtenida de este modo (por ejemplo, un caso en el que se utilicen células de la epidermis con el fin de formar una capa de epidermis de la piel o un caso en el que se usen células epiteliales de la córnea con el fin de formar una capa de epitelio de la cornea), se puede llevar a cabo el mencionado levantamiento por aire.

Las células de origen biológico se siembran en el amnios de manera que, por ejemplo, la densidad celular sea aproximadamente de  $1 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> o más, preferiblemente en el intervalo aproximadamente de  $1 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/cm<sup>2</sup>, y aún más preferiblemente en el intervalo aproximadamente de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> a aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>.

En una forma de realización preferible, el amnios se coloca en una matriz de colágeno que contiene fibroblastos humanos, que se ha preparado anteriormente, y luego las células de origen biológico se siembran en el amnios y se cultivan. Es decir, en esta realización se llevan a cabo, una etapa de cultivo de fibroblastos humanos en un gel de colágeno (la etapa B) y una etapa de colocación del amnios en el gel de colágeno, seguida de la siembra o colocación de las células de origen biológico en el amnios (la etapa C). La composición en forma de lámina que ha sido producida por este procedimiento ha llegado a contener células de origen biológico que proliferan en un amnios colocado en gel de colágeno que contiene fibroblastos humanos. La composición en forma de lámina de esta forma de realización puede también ser utilizada como un material de trasplante después eliminar la matriz de colágeno. Alternativamente, la composición en forma de lámina de esta forma de realización se puede utilizar también como material de trasplante en una forma en el que se incluye la matriz de colágeno.

El "gel de colágeno" funciona como un sustrato de cultivo de fibroblastos humanos. Los tipos de colágeno como un material de gel de colágeno no están particularmente limitados, y pueden ser utilizados el colágeno tipo I, colágeno de tipo III, y el colágeno tipo IV, y similares. Se puede utilizar combinaciones de varios. Estos colágenos pueden ser extraídos y purificados a partir del tejido conjuntivo de la piel y del cartílago, etc., de animales tales como el cerdo, bovino, ovejas, etc., mediante un método de disolución ácido, un método de disolución alcalino, y un método de disolución con oxígeno, y similares. A efectos de la alteración de la antigenicidad, es preferible utilizar el denominado llamada aterocolágeno obtenido eliminando los telopeptidos por un tratamiento con el uso de enzimas catabólicas tal como la pepsina, tripsina, etc. Como materiales del gel de colágeno se pueden utilizar un colágeno derivado del amnios, en particular un derivado del amnios humano. En la presente memoria, la capa de colágeno "deriva del amnios" significa que el gel de colágeno se obtiene mediante el uso de amnios como material de partida.

El origen de los fibroblastos humanos contenidos en el gel de colágeno no está particularmente limitado y pueden derivar de cualquier tejido, siempre y cuando el tejido produzca colágeno. Se pueden utilizar Los fibroblastos humanos preparados a partir de, por ejemplo, tejido de la piel, tejido de la mucosa oral, y similares.

Se expone un ejemplo específico del método de producción de una matriz de colágeno. En primer lugar, los fibroblastos humanos se preparan por el siguiente procedimiento. La piel se recoge, y luego la dermis se despegar de la piel. La dermis se corta en tiras y se pone en estrecho contacto con una placa recubierta con colágeno de tipo I. Después de un cultivo estático, se subcultivan los fibroblastos humanos que se desplazaron de las tiras de la dermis. Las células se despegaron de la superficie de fondo de la placa y se preparo una disolución de células en suspensión. La disolución de células en suspensión se sembró en una placa de cultivo celular. Las células son crioconservadas adecuadamente (por ejemplo, almacenándolas en nitrógeno líquido).

Mientras tanto, se prepara una disolución de colágeno neutralizado usando colágeno tipo I (véase el ejemplo mencionado más adelante). Este se añade en un recipiente de cultivo (por ejemplo, un inserto de cultivo) y se mantuvo en reposo durante diez minutos a temperatura ambiente para gelificar. A continuación, los fibroblastos humanos en una fase de crecimiento logarítmico, que se han cultivado por el método anteriormente mencionado, se mezclan con este gel y gelifican de nuevo. A partir de entonces, se lleva a cabo un cultivo estático. Se puede obtener una matriz de colágeno que contiene fibroblastos humanos por el procedimiento mencionado anteriormente. Esta invención permite a la matriz de colágeno tener la resistencia suficiente para tener la lámina de amnios o de células de origen biológico dispuesta sobre ella, lo que representa la base de la presente invención. Un amnios preparado por separado puede ser colocado sobre (puesto en contacto con) la matriz de colágeno. A continuación, las células se siembran y cultivan de conformidad con el procedimiento antes mencionado.

Si se realiza el proceso de fijación de componentes adhesivos (fibrinógeno, etc.) a la superficie amniótica, la formación de la capa de células precede a la fijación de componentes adhesivos. En otras palabras, en esta forma de realización, la capa de células se forma sobre el amnios, y luego el fibrinógeno y los otros componentes adhesivos se unen a la superficie del amnios (superficie donde no se forma capa de células).

#### [Ejemplo 1]

#### 1. Tratamiento con trehalosa/Preparación de amnios liofilizado

##### 1-1. Recolección del amnios

Se obtiene con suficiente antelación el consentimiento informado de una mujer embarazada que no tuvo complicaciones sistémicas, pero estaba sufriendo una operación de cesárea, en presencia de un obstetra. Se obtuvo el amnios de la mujer durante la operación de cesárea en la sala de operación. La operación se realizó con la limpieza garantizada, y con la ropa quirúrgica según el procedimiento quirúrgico. Antes del parto, se preparo un recipiente limpio para la recogida de amnios y suero fisiológico salino para el lavado. Después del parto, el tejido de la placenta se transfirió al recipiente y el tejido amniótico fue separado manualmente de la placenta. Cualquier adherencia entre el amnios y la placenta se cortó utilizando una tijera.

##### 1-2. Tratamiento del amnios

El tratamiento de amnios se llevó a cabo en el siguiente orden (1) lavado, (2) recorte, y (3) almacenamiento. En cualquiera de estas etapas, el procedimiento se realiza preferiblemente bajo una, el recipiente y los instrumentos que se utilizaron habían sido esterilizados previamente, y se utilizaron placas desechables, etc. Los componentes sanguíneos fijados al amnios obtenido se lavaron con una disolución salina fisiológica, y una cantidad adicional suficiente de disolución salina fisiológica (0,005 % ofloxacinina añadida) se usó para lavar mas a fondo. A continuación, se utilizó una disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) con penicilina-estreptomicina (50 UI) añadida para lavar tres veces en total. Entonces, el amnios se transfirió a la placa, y se corto en trozos de unos 4 X 3 cm con unas tijeras. Después del corte, se seleccionaron los amnios en buenas condiciones en base a la forma y el grosor.

1-3. Almacenamiento de los amnios

En criotubos estériles de 2 cc se puso 1 cc de una disolución de conservación en cada uno, dentro de cada uno de los cuales se puso un trozo de amnios cultivado y lavado. Los criotubos se etiquetaron y se almacenan a -80°C en un congelador. Como disolución de conservación, se utilizó una disolución de glicerol esterilizado al 50% en DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco: GIBCOBRL). Se determinó que la duración de uso del amnios conservado que era de tres meses, y al final de este periodo, los criotubos se quemaron y se desecharon. El proceso de almacenamiento descrito se puede obviar, y se puede realizar el siguiente tratamiento del epitelio.

1-4. Tratamiento del epitelio amniótico

El amnios que había sido almacenado a -80° C se descongelado a una temperatura ambiente, y se lavó dos veces con un disolución amortiguada de fosfato (PBS) con penicilina-estreptomina (50 UI) añadida. El amnios lavado se sumerge en una disolución de EDTA 0,02 % (Nacalai Tesque) (placa de 100 mm), y se hizo reaccionar en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37° C durante una hora. Después de la reacción, el amnios se lavó dos veces con una cantidad suficiente de PBS, y el epitelio se separó manualmente (eliminó) con rascador de células (Nunc, EE.UU.) con un microscopio estereoscópico. La eliminación completa por separación del epitelio amniótico adicional mediante este proceso está garantizada por examen con un microscopio de luz y microscopio electrónico (microscopio electrónico de barrido).

1-5. El tratamiento con trehalosa/Producción de Amnios liofilizado

Un amnios del que se ha eliminado el epitelio se sumerge en una disolución de trehalosa 10 % (p/v) a 37° C. C durante dos horas. La disolución de trehalosa se preparó diluyendo trehalosa (Trehainochi, H plus V Lifescience, Hayashibara) con agua destilada. Se mantuvo el pH de la disolución en un intervalo de 7 a 10. El amnios se sujetó con un par de marcos de plástico esterilizados, y se aseguró con clip. Cada grupo de marcos se transfirió a un congelador a -80° C, y, después una vez congelado el amnios, se realizó proceso de liofilización (-110° C, aproximadamente una hora) utilizando un liofilizador de vacío (Yamato, NEOCOOL). La condiciones se establecen según las instrucciones del fabricante de tal manera que se puedan conseguir productos suficientemente desecados. Después de el proceso de liofilización el amnios fue separado del marco, se transfirió a una bolsa de dos capas hecho de nylon de poliamida en el exterior y de polietileno en el interior, y se envasa al vacío usando un envasador de vacío de uso domestico (Framenova, Magicpack). El amnios envasado al vacío se irradió con rayos gamma (aproximadamente 25 kGy) para esterilizarlo. El amnios esterilizado se almacena en el envase al vacío a una temperatura normal hasta inmediatamente antes de su uso. El estado inmediatamente posterior al proceso de liofilización todavía se mantuvo incluso 12 meses después del inicio del almacenamiento. Se realizaron experimentos adicionales usando amnios desecado que se almacenó a una temperatura normal durante un mes

2. Tratamiento con trehalosa/Evaluación de las propiedades físicas de la membrana del amnios liofilizada

El amnios tratado con trehalosa y liofilizado (también denominado FD trehalosa-tratado-AM) preparado en el procedimiento anterior, se sumergieron en PBS a una temperatura ambiente hasta una recuperación suficiente, y se evaluaron sus propiedades físicas. Los elementos evaluados y el método son los siguientes. El material utilizado para la evaluación fueron cinco trozos de amnios tratados con trehalosa y liofilizados que habían sido preparados por separado. El promedio de las mediciones obtenidas se utilizó para la evaluación. Además, se prepararon los amnios (amnios frescos) que no se habían sometido a ninguno de tratamiento epitelial, tratamiento con trehalosa ni liofilización y los amnios que se habían preparado mediante procedimientos similares, excepto el tratamiento con trehalosa, y sirvieron como un estándar (control para la comparación) en la evaluación de las propiedades físicas.

(1) (Espesor)

La medición del espesor se realizó utilizando medidor láser de doble barrido de alta precisión (LT - 9010M) de Keyence.

(2) (Transparencia)

Se utilizó un turbidímetro (NDH2000) de Nihon-Denshoku para medir la turbidez para evaluar de la transparencia. La turbidez se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Turbidez} = \text{Factor de transmisión difusa (DF)} / \text{Transmitancia luminosa total (TT)}$$

(3) Resistencia a la tracción

Se utilizó un medidor de resistencia a la tracción (Tensilon RTC- 1210A) de A & D para medir la resistencia a la tracción.

(4) Flexibilidad

Se utilizó un microscopio de microcirugía del Karlzeiss para medir la flexibilidad mediante la detección macroscópica de la presencia de arrugas. Se contabilizaron el número de arrugas en toda la superficie del globo ocular de tres personas, y su promedio fue utilizado para evaluar la flexibilidad.

5 Los resultados de la prueba se muestran en las Fig. 3 a 6. Como se muestra en la Fig. 3, el amnios tratado con trehalosa y liofilizado resulta ser más grueso que el amnios liofilizado. Esto se cree que es debido a la capacidad de retención de agua más alta proporcionada por el tratamiento trehalosa. La eliminación del epitelio se ve reflejada en la reducción significativa del espesor del amnios tratado con trehalosa y liofilizado en comparación con amnios fresco (AM).

10 También se observa que, tal como se muestra en la Fig. 4, que el amnios tratado con trehalosa y liofilizado tiene una transparencia mayor que el amnios liofilizado. Sorprendentemente, se reveló que el tratamiento con trehalosa aumenta la transparencia. La menor transparencia del amnios fresco en comparación con el amnios tratado con trehalosa y liofilizado es debida a la presencia de epitelio.

15 Por otro lado, como se muestra en la Fig.4 el amnios tratado con trehalosa y liofilizado tiene una resistencia a la tracción mayor que amnios liofilizado. Sorprendentemente, el amnios tratado con trehalosa y liofilizado tiene una mayor resistencia en comparación incluso al amnios que tiene epitelio (amnios fresco). Por lo tanto, se reveló que el tratamiento con trehalosa es extremadamente eficaz en la mejora de la resistencia del amnios.

20 Además, como se muestra en la Fig. 6, la flexibilidad de amnios tratado con trehalosa y liofilizado está lejos de la de amnios liofilizado, pero es equivalente a la de amnios fresco. Por lo tanto, se reveló que el tratamiento con trehalosa es extremadamente eficaz en la mejora de la flexibilidad de amnios.

3. Evaluación de la biocompatibilidad del amnios tratado con trehalosa y liofilizado

Los materiales que se trasplantan en un organismo requieren tener una alta biocompatibilidad. Por lo tanto, se evaluó la biocompatibilidad del amnios tratado con trehalosa y liofilizado mediante el siguiente procedimiento.

25 Un conejo japonés de 6 semanas de edad recibió una incisión con un escalpelo en la superficie del ojo en la capa del parénquima de la córnea. A continuación, un amnios tratado con trehalosa y liofilizado de tamaño apropiado se inserta en la incisión de la capa de parénquima. Después del trasplante, se controló el estado de la superficie del ojo durante un período de tiempo. Los estados de la superficie del ojo inmediatamente después y un mes después del trasplante se muestran en la Fig. 7. Un mes después del trasplante, se parece que tenga lugar ninguna angiogénesis en la zona circundante, ni reacción inflamatoria. La transparencia de la superficie del ojo se incremento en gran medida en comparación con aquella inmediatamente después del trasplante. Por lo tanto, se determinó que la biocompatibilidad de amnios tratado con trehalosa y liofilizado es equivalente a la de amnios no tratado.

30 Con el fin de examinar la biocompatibilidad con mayor detalle, una parte de la córnea incluyendo la parte trasplantada se sometió a tinción con HE un mes después del trasplante. La imagen de la tinción con HE se muestra en la Fig. 8. El injerto (es decir, el amnios tratado con trehalosa y liofilizado) se indica con una flecha. Como se muestra claramente en la Fig. 8, no se reconoce ninguna diferenciación anormal, angiogénesis intracorneal, edema o infiltración celular en el epitelio. Por consiguiente, se ha demostrado que el amnios tratado con trehalosa y liofilizado tiene una antigenicidad extremadamente baja, y por lo tanto la biocompatibilidad es superior.

4. Producción de una lamina de epitelio de la cornea utilizando amnios tratado con trehalosa y liofilizado

4-1. Recuperación de las células epiteliales de la córnea

40 Una cornea recogida de un conejo blanco japonés de 6 semanas de edad fue sumergida en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS), y de la que se había separado la conjuntiva, el endotelio corneal y otros tejidos innecesarios. A continuación, el tejido se lavó con una disolución amortiguada de fosfato (PBS) y se sumergió en una disolución amortiguada de fosfato (PBS) que contenía 1,2 U/ml de dispasa (Nacalai tesque) a 37° C durante una hora. Después del tratamiento el tejido se retiró, y se sumergió en EDTA al 0,02 % a una temperatura ambiente durante dos minutos, y luego en una disolución amortiguada con fosfato a una temperatura ambiente durante dos minutos para detener la actividad dispasa. Las células epiteliales de la cornea se despegaron en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS), y se sometieron a centrifugación para concentrar y recuperar las células epiteliales de la córnea.

4-2. Preparación de las células cocultivadas

50 Las células NIH-3T3 (en lo sucesivo, denominadas simplemente como "células 3T3") se utilizaron como células cocultivadas (células de soporte). Las células 3T3 cultivadas previamente hasta confluencia en un matraz de 75F (BD Falcon) se sumergieron en una disolución de mitomicina C al 0,05 % durante dos horas para suprimir la actividad proliferativa de 3T3. A continuación, las células se lavaron varias veces con una disolución amortiguada de fosfato

(PBS) para eliminar la mitomicina C. Las células se trataron entonces con una disolución de tripsina-EDTA al 0,05 %, y se pipetearon para proporcionar una suspensión de células (suspensión de células 3T3).

#### 4-3. Formación de la capa de células

5 El amnios tratado con trehalosa y liofilizado obtenido en 1 se sumergió a una temperatura ambiente en PBS hasta una recuperación suficiente. El amnios preparado de esta manera se utilizó como sustrato para el cocultivo de células epiteliales de la córnea y células 3T3 según el siguiente procedimiento. Como instrumentos de cultivo, se utilizaron placas de cultivo de 6 pocillos (Corning, NY) e insertos de cultivo (recipiente de insertos de cultivo) (de policarbonato, tamaño promedio de poro 3,0 µm, Corning, NY).

10 La placa de cultivo se sembró primero con la suspensión de células 3T3 hasta una densidad celular de aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron a 37° C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Mientras tanto, el amnios se fijo en el inserto de cultivo, con su lado de la membrana basal (donde el epitelio estaba presente) orientado hacia arriba, y se secó a temperatura ambiente durante diez minutos. A continuación, el inserto de cultivo que con el amnios fijado se sembró con una suspensión de células epiteliales de la córnea a una densidad celular de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>.

15 Siguiendo el procedimiento anterior, el inserto de cultivo se colocó en el interior de la placa de cultivo, como se muestra en la Fig. 9 células, y se cultivaron las células 3T3 y las células epiteliales de la córnea en el mismo medio de cultivo. La Fig. 9 es una sección que muestra esquemáticamente el estado durante el cultivo. El inserto de cultivo 12 se permanece en el interior placa de cultivo 11, en la parte inferior del cual se forma la capa de células 15 de 3T3. En la parte inferior del inserto de cultivo 12 permanece el amnios 13, sobre el que se cultivan las células epiteliales de la córnea 14. El número 16 representa el medio de cultivo.

20 El medio de cultivo utilizado fue un medio mixtos DMEM/ham F12 (relación de volumen de la mezcla 01:01) al que se añade 10% de FBS, insulina (5 mg/ml), toxina del cólera (0,1 nM), penicilina estreptomycin (50 UI/ml), factor de crecimiento de células epiteliales humana recombinante (EGF) (10 ng/ml).

25 Se llevó a cabo el cultivo durante 3 semanas en el medio anterior (Sumergido). A continuación, con el fin de inducir la diferenciación de epitelio de la mucosa, se utiliza el denominado método de "levantamiento con aire" para continuar el cultivo durante una semana más. En el método de levantamiento con aire, el nivel de la superficie del medio de cultivo se lleva hasta el de nivel de la capa de células derivada de células del epitelio de la córnea formada en el amnios, al tiempo que se expone la superficie de la capa de células al aire. Durante el proceso de inmersión, el medio de cultivo se cambian días alternos, y, después de que el proceso de levantamiento con aire, se cambia todos los días para llevar a cabo el cultivo. Como resultado, se forma una capa de células sobre el amnios.

#### 5. Verificación de las propiedades histológicas de láminas de epitelio de la córnea cultivadas.

35 A los 2 días de cultivo tras del levantamiento con aire, se forma una capa de células similar al epitelio de la córnea (Fig. 10, derecha). Se puede ver en la capa de células que las células están formando 5-7 capas de la misma forma que un epitelio normal de la córnea. El lado del amnios de la capa de células tenía células similares a las células basales en una forma relativamente en forma de columna. Las células de la capa más externa eran planas y tenían núcleos, aunque no estaban queratinizadas en su superficie a diferencia de la piel. Por lo tanto, se comprobó que se forma una capa de células similar al epitelio de la córnea (capa similar al epitelio de la córnea) sobre el amnios. Por otro lado, cuando se utilizó amnios liofilizado sin tratamiento trehalosa (amnios liofilizado) como sustrato para cultivar las células epiteliales similares a las de la córnea, la formación de la capa de células se produce sólo de forma limitada, dando como resultado de 1-2 capas (fig. 10 izquierda). Por lo tanto, se puede determinar que el amnios tratado con trehalosa y liofilizado puede ejercer la función de facilitar una diferenciación normal de la córnea.

45 A continuación, se realizó una tinción inmunológica para investigar más a fondo las propiedades histológicas de la capa de células. En primer lugar, la capa de células obtenida se cortó junto con el amnios a un tamaño apropiado, se congeló incorporándolo en compuesto OCT, y luego se laminó en un criostato para formar láminas. La diana de la inmunotinción era la queratina, proteína representativa del citoesqueleto. En particular, se examinó la expresión de la queratina 3 específica de la córnea, la queratina 10 específica de la epidermis, y la queratina 13 específica de la conjuntiva de según el siguiente método. Las láminas cortadas se lavaron con una disolución amortiguada de fosfato (PBS) y se bloquearon con 1 % de suero fetal bovino (FBS) para inhibir la reacción de los anticuerpos no específicos. Entonces, se hicieron reaccionar los anticuerpos (primer anticuerpo) específicos de cada una de las queratinas a una temperatura ambiente durante una hora. Después de la reacción, se efectuó el lavado en PBS con Triton-X durante 15 minutos tres veces, y los anticuerpos marcados con fluorescencia (segundo anticuerpo) se hicieron reaccionar a una temperatura ambiente durante una hora. Después de la reacción, se realizó el lavado durante 15 minutos tres veces en una disolución amortiguada de fosfato (PBS), y, tras montarse, los tejidos se visualizaron en un microscopio confocal.

55 Las reacciones de los anticuerpos con cada una de las queratinas que se encuentran en la capa de células fueron las siguientes. En primer lugar, no había tinción evidente de la queratina 10 específica de la epidermis ni de la queratina 13 específica de la conjuntiva (Fig. 11, abajo). Por otra parte, la tinción de la queratina 3 específica de la córnea era muy evidente (Fig. 11 arriba a la derecha). La tinción de la queratina 3 era intensa en la parte superior

de la capa de células. En base a estos resultados, se demostró que se había formado una capa de células epiteliales similares al epitelio normal de la córnea.

#### 6. Experimento de trasplante utilizando la lámina de epitelio de la cornea cultivado

5 Se utilizó la lámina producida en 4 formada por una capa de células similar al epitelio de la cornea (lámina de epitelio de la cornea cultivado) para llevar a cabo el siguiente experimento de trasplante.

10 En primer lugar, al conejo del que se habían cultivado las células epiteliales de la córnea se le hizo un corte con un bisturí curvo para eliminar completamente la zona que abarca 4 mm desde el limbo al epitelio de la córnea y de la conjuntiva con una profundidad de 100 µm. Dado que este corte elimina las células epiteliales incluyendo las células madre epiteliales de la córnea, se cree que se reproduce el agotamiento artificial de las células madre de la superficie del ojo. A continuación, la lámina de epitelio de la cornea cultivado fue trasplantada a una región ligeramente hacia el interior desde el limbo. Se utilizaron 10 hilos de nylon para realizar la sutura del trasplante con los tejidos circundantes. Después del trasplante, se suturó una lente de contacto terapéutica sobre el injerto. Al término de la cirugía, se aplicaron antibióticos y una loción para los ojos con esteroides dos veces al día. La superficie del ojo después del trasplante tenía una transparencia similar a la de la lámina del epitelio de la cornea cultivado antes del trasplante.

15 La superficie de los ojos que se habían sometido al trasplante se examinó dos días y 14 días después del trasplante. Al mismo tiempo, se realizó una prueba de tinción con fluoresceína mediante un ensayo aplicando un papel de fluoresceína que contiene humedad, así como gotas antibióticas para los ojos aplicadas directamente sobre la superficie del ojo, haciendo que abrir y cerrar varias veces los ojos al sujeto, y visualizando la tinción con fluoresceína en la superficie del ojo. Si el epitelio de la cornea se mantiene, su estructura adhesiva intercelular impide que la tinción de fluoresceína se infiltre, no produciéndose de este modo tinción por fluoresceína.

20 Dos días después del trasplante, la superficie del ojo mantiene su transparencia (Fig. 12, parte superior izquierda). Además, se reveló por la tinción con fluoresceína que la lámina de la córnea cultivada se mantuvo en la superficie del ojo sin ningún defecto (Fig. 12, abajo a la izquierda). Por otra parte, sobre la base de la observación de que la lámina de epitelio de la cornea cultivado trasplantado no muestra tinción con fluoresceína, se demostró que la lámina de epitelio de la cornea cultivado tenía una función de barrera similar a la del epitelio de la cornea. Además, se observó que la tinción con fluoresceína era evidente alrededor de toda la periferia de la lámina de trasplante del epitelio de la cornea cultivado, demostrando así que los tejidos que estaban presentes en el trasplante no se debían a la contaminación por el epitelio de la conjuntiva residual que les rodea.

25 Dado que las células en el epitelio de la córnea se unen normalmente entre sí en una estructura adhesiva firme, el colorante de fluoresceína no se infiltra en la superficie. Específicamente, no se muestra que haya manchas en la prueba de tinción con fluoresceína. En contraste, cuando la adherencia de estas células se debilita o su función de barrera está alterada debido a la separación entre sí de las células, la infiltración de colorante de fluoresceína permite teñir el tejido. En consecuencia, mediante el examen de cualquier tinción de fluoresceína, se puede determinar si la lámina de epitelio de la cornea cultivado trasplantado tiene o no una función de barrera similar a la del epitelio de la cornea.

30 Por otro lado, se observó que 14 días después del trasplante, la lámina del epitelio de la córnea cultivado permanecía todavía en la superficie del ojo, y, además, se extendía hacia la periferia al compararse con el estado 2 días después del trasplante, cubriendo toda la superficie del ojo (Fig. 12, arriba a la derecha). Además, se observó que la propia superficie del ojo no mostraba tinción con fluoresceína, lo que indica que la lámina de epitelio de la cornea cultivado conserva su función de barrera (fig. 12 parte inferior derecha). La transparencia no sufría cambios 2 días después del trasplante, y se mantuvo en un nivel alto (fig. 12 superior derecha).

35 En base a los resultados anteriores, se demostró que la lámina de epitelio de la cornea cultivado obtenida utilizando amnios tratado con trehalosa y liofilizado como sustrato proporciona una parte adecuada de la superficie del ojo, que se mantiene durante un período de tiempo prolongado. Además, se observó que la lámina se extiende a la periferia tras el trasplante para ejercer la función de barrera requerida como epitelio de la cornea durante un período de tiempo prolongado, mientras que se mantiene una alta transparencia. Específicamente, se observó que la lámina de epitelio de la cornea cultivado obtenido según el método anterior sirve favorablemente como sustituta del epitelio de la cornea, y se puede utilizar favorablemente como injerto para la reconstrucción de la superficie ocular, por ejemplo, en el caso de que la córnea haya sufrido cualquier daño o tenga un defecto.

#### 7. Evaluación de las propiedades histológicas de una lámina de epitelio de la cornea cultivado trasplantada.

40 La lámina de epitelio de la cornea cultivado se retiró dos semanas después del trasplante para la inspección de sus propiedades histológicas. La Fig. 13 muestra en la imagen superior izquierda la imagen de la tinción HE de una lámina de epitelio de la cornea cultivado. Se puede encontrar capas de células donde las células se disponen regularmente, de manera similar a las del epitelio de la cornea normal, en el amnios tratado con trehalosa y liofilizado (TH-AM, marcado con\*\*). En esa imagen, la capa de células superior tiene muchas más células planas, y mantiene una estructura muy similar a la del epitelio de la cornea.

Se muestran los resultados de la prueba de tinción para cada una de las queratinas en la imagen derecha superior e inferior de la Fig. 13. Se muestran generalmente tinciones similares a las de la lámina de epitelio de la cornea cultivado antes del trasplante. En concreto, no era evidente la tinción de la queratina 10 específica de la epidermis y de la queratina 13 específica de la conjuntiva (Fig. 13, abajo), mientras que la tinción de la queratina 3 específica de la córnea sólo resultó evidente para toda la capa de células (Fig. 13, arriba a la derecha). Por lo tanto, se determinó que la lámina de epitelio de la cornea cultivado, incluso después del trasplante, mantiene la queratina específica de la córnea. Este resultado apoya desde el punto de vista histológico que la lámina de epitelio de la córnea cultivado ejerce una función similar al epitelio de la cornea durante un período prolongado de tiempo.

8. Tinción inmunológica de los componentes la membrana basal y del estrato compacto

Con el fin de que el amnios actúe favorablemente como un sustrato para el cultivo celular, se cree que la membrana basal y el estrato compacto han retenido preferentemente sus estructuras innatas. Se pueden evaluar si la membrana basal y estrato compacto han conservado sus estructuras innatas o no examinando la presencia o ausencia (si se conservan o no) de los componentes característicos de cada uno de estos. Por lo tanto, se utilizó el siguiente método de tinción inmunológica para examinar si los componentes de la membrana basal y del estrato compacto se mantienen o no en el amnios tratado con trehalosa y liofilizado. En este método, se comparo el amnios que no se había sometido a ningún de proceso epitelial, proceso de tratamiento con trehalosa o proceso de liofilización (amnios fresco) y el amnios que se había preparado de la misma manera que el amnios tratado con trehalosa y liofilizado excepto que no se había sometido a tratamiento de trehalosa (amnios liofilizado).

En primer lugar, cada amnios se cortó a un tamaño de 1,5x1,5 cm, se incorporó a un compuesto de OCT, y se congeló a -80° C para proporcionar preparados congelados. Estos preparados en estado congelado se cortaron a un espesor de 8 µm en dirección vertical a la superficie del amnios con un criostato (Leica CM1900), y se montaron en un portaobjetos de vidrio proporcionando una sección congelada. Estas secciones se utilizan en la tención inmunológica según el siguiente procedimiento.

1. Fijación con acetona, 5 min., 2. Lavado con PBS, 30 min., 3. Bloqueo con PBS/BSA al 3% 15 min., 4. Primer anticuerpo, una hora, 5. Lavado con PBS, 30 min. 6. Bloqueo con PBS/BSA al 3%, 15 min., 7. Segundo anticuerpo, una hora, 8. Lavado con PBS, 30 min., y 9. Montado.

Se visualizaron las muestras tras el montado con un microscopio de fluorescencia (Leica DMIRB).

Los anticuerpos que se han utilizado son los siguientes. Las dosificaciones se determinan según las instrucciones de los fabricantes.

Colágeno I (colágeno I) : LSL LB-1190, Colágeno III (colágeno III) : LSL LB1300, Colágeno IV (colágeno IV) : LSL LB-1407, Colágeno V (colágeno V) : LSL LB1581, Colágeno VII (colágeno VII) : Chemicon MAB1345, Laminina 5 (laminina-5) : Chemicon MAB19562, Fibronectina (fibronectina) : LSL LB-1021.

La capa de la membrana basal del amnios tiene expresiones de Colágeno IV, VII y Laminina 5, mientras que la capa de estrato compacto tiene expresiones de colágeno I, III, V, y Fibronectina. Por lo tanto, la tinción inmunológica usando anticuerpos para cada uno de ellos permite la visualización de cualquier membrana basal del amnios y del estrato compacto conservado. Además, puesto que también se lleva a cabo en el presente experimento una tinción PI, se pueden determinar simultáneamente la presencia o ausencia de células epiteliales del amnios.

Los resultados de la tinción inmunológica se muestran en la Fig. 14. Las imágenes de la columna A tiñen imágenes del amnios fresco, las de la columna B tiñen imágenes del amnios liofilizado, y las de la columna C tiñen imágenes del amnios tratado con trehalosa y liofilizado. Las imágenes de cada columna son, por orden de la parte superior a la parte inferior, (1) imágenes de tinción del Colágeno I, (2) imágenes de tinción del Colágeno III, (3) imágenes de tinción del Colágeno IV, (4) imágenes de tinción del Colágeno V, (5) imágenes de tinción del Colágeno VII, (6) imágenes de tinción de Laminina 5, y (7) imágenes de tinción de Fibronectina.

Se revelaron los siguientes resultados como resultado de la tinción. En primer lugar, en comparación con el amnios liofilizado, el amnios tratado con trehalosa liofilizado y el amnios liofilizado presentaban señales más fuertes para los componentes de la membrana basal (Colágeno IV, Colágeno VII, Laminina 5), mostrando una tinción de los componentes de la membrana basal similar a la de amnios fresco. Esto indica que el amnios tratado con trehalosa y liofilizado mantiene bastante la estructura innata de la membrana basal. En parte (Colágeno IV y Fibronectina) de los resultados de la tinción, la tinción era evidente en todo el amnios liofilizado, mientras que el amnios tratado con trehalosa tratada y liofilizado presentaba límites relativamente claros entre las zonas teñidas y las zonas no teñidas, de manera similar al amnios fresco. Esto indica que el amnios tratado con trehalosa tratada y liofilizado conserva bastante las estructuras innatas de la membrana basal y del estrato compacto.

Como se puede ver de forma aparente como resultado de la tinción del estrato compacto, el amnios tratado con trehalosa tratada y liofilizado tiene un estrato compacto más grueso que el del amnios liofilizado. Se puso de manifiesto que, cuando se restablecía el estado húmedo, el resultado era un engrosamiento del estrato compacto así como una recuperación del espesor a un nivel similar al de amnios fresco debido al tratamiento trehalosa.

Por lo tanto, se ha puesto de manifiesto por lo tanto que el amnios tratado con trehalosa tratada y liofilizado tiene estructuras de la membrana basal y del estrato compacto que son similares a los de amnios fresco. Específicamente, se comprobó que el tratamiento con trehalosa impide que las estructuras de la membrana basal y del estrato compacto se dañen durante la liofilización, proporcionando de este modo amnios con estructuras de membrana basal y del estrato compacto similares al amnios fresco.

## 9. Revisión del procedimiento para eliminar epitelio

### 9-1. Recolección de amnios

El amnios se procesó según el procedimiento que se muestra en la Fig. 15 para preparar amnios del que se ha eliminado el epitelio (amnios que no contiene epitelio). Método de la operación (método de procesamiento), condiciones de funcionamiento (condiciones de procesamiento), y otros detalles se describirán ahora.

Se obtuvo con suficiente antelación el consentimiento informado de una mujer embarazada que no tuvo complicaciones sistémicas, pero estaba sufriendo una operación de cesárea, en presencia de un obstetra. Se obtuvo el amnios de la mujer durante la operación de cesárea en la sala de operación. La operación se realizó con la limpieza garantizada, y con la ropa quirúrgica según el procedimiento quirúrgico. Antes del parto, se preparó un recipiente limpio para la recogida de amnios y suero fisiológico salino para el lavado. Después del parto, el tejido de la placenta se transfirió al recipiente y el tejido amniótico fue separado manualmente de la placenta. Cualquier adherencia entre el amnios y la placenta se cortó utilizando una tijera.

### 9-2. La eliminación de los componentes sanguíneos y desprendimiento de la membrana coriónica

Los componentes sanguíneos fijados al amnios obtenido se lavaron con una disolución salina fisiológica, y una cantidad adicional suficiente de disolución salina fisiológica (0,005 % ofloxacin añadida) se usó para lavar más a fondo.

### 9-3. Aseguramiento de Amnios

El amnios se aseguró según el método que se muestra en la Fig. 2b. En primer lugar, el amnios se dispuso sobre una película esterilizada hecha de resina de fluorocarbono con la cara epitelial hacia arriba. El amnios se extendió a continuación para eliminar cualquier arruga y se aplanó, y se montó el marco laminar esterilizado hecho de resina de fluorocarbono sobre el amnios. Se utilizaron clips u otros dispositivos para asegurar la lámina de resina de fluorocarbono y el marco laminar de resina de fluorocarbono, sujetando de esta manera el amnios entre la lámina de resina hecha de fluorocarbono y el marco laminar hecho de resina de fluorocarbono (aseguramiento del marco). La parte sobrante del amnios que sobresale se cortó. La parte del epitelio que queda hacia arriba se aseguró mediante observación al microscopio estereoscópico.

### 9-4. Proceso de congelación-descongelación

El amnios asegurado en un marco fue trasladado a un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se mantuvo en reposo durante unos 30 minutos (congelación). A continuación, el amnios se sacó del congelador, se transfirió a una incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$ , y se mantuvo en reposo durante unos 30 minutos (descongelación). El procedimiento anterior se realizó otra vez.

### 9-5. Tratamiento con tripsina

Tras el proceso de congelación-descongelación, el amnios se sumergió en una disolución de tripsina (0,02 % de tripsina, disolución que contenía EDTA 0,2 mM - amortiguada con fosfato) con la parte del epitelio del amnios hacia arriba, y se dejó en reposo durante aproximadamente 15 minutos ( $37^{\circ}\text{C}$ ). El método de inmersión se llevó a cabo como se muestra en la Fig. 16a. Específicamente, el amnios 10 asegurado en el marco se mantuvo, con la lámina hecha de resina de fluorocarbono 4 hacia abajo, y se añadió la disolución de tripsina 5 al marco 3 hecho de resina de fluorocarbono. Esto dio como resultado la inmersión de sólo la cara epitelial de amnios 10 en la disolución de tripsina 5. Como se muestra en la Fig. 16b, el amnios 10 asegurado en un marco se puede poner en el recipiente 6 con la cara epitelial hacia abajo, logrando así la inmersión en la disolución de tripsina 5. En el presente ejemplo, enganchando los salientes al interior del recipiente 6 con el marco hecho con resina de fluorocarbono 3, se consigue la posición relativa deseada entre la superficie de líquido 5a de la disolución de tripsina 5 y el amnios 10.

### 9-6. Lavado

Después del tratamiento con tripsina, el amnios se retiró de la lámina hecha de resina de fluorocarbono y del marco hecho de resina de fluorocarbono, se transfirió a PBS, y se lavó por agitación del mismo (140 rpm, 15 minutos, dos veces). Este procedimiento elimina la disolución de tripsina y las células epiteliales del amnios.

### 9-7. Liofilización

El amnios después del lavado se sujetó por un par de marcos de plástico esterilizados, y se aseguró. Cada uno de los marcos se transfirió por separado a un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y, tras determinar la congelación del amnios, se llevó a cabo el proceso de liofilización ( $-110^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente una hora) con secador de vacío (Yamato,

NEOCOOL). Las condiciones se establecen según las instrucciones del fabricante de tal manera que se puedan conseguir productos desecados suficientemente. Tras el proceso de liofilización el amnios fue liberado del marco de plástico, se transfirió a una bolsa de dos capas hecha de nylon de poliamida en el exterior y polietileno en el interior, y se envasa al vacío usando una envasadora de vacío de uso doméstico (Framenova, Magicpack). El amnios envasado al vacío se irradió con rayos  $\gamma$  (aproximadamente 25 kGy) para esterilizarlo. El amnios esterilizado se almacena envasado al vacío a una temperatura normal hasta inmediatamente antes de su uso. El estado inmediatamente posterior al proceso de liofilización se mantuvo todavía incluso 12 meses después del comienzo del almacenamiento.

9-8. Revisión del proceso de congelación-descongelación y del método de eliminación del epitelio mediante tratamiento con tripsina

Se evaluó el método de eliminación del epitelio descrito anteriormente según el siguiente procedimiento. El experimento de evaluación utilizó un amnios sin epitelio (amnios tratado con tripsina) que se obtiene por lavado del amnios después del tratamiento con tripsina.

(1) Tinción con HE

El amnios sin epitelio (amnios tratado con tripsina) se tiñó con HE según el siguiente método. Se utilizó un amnios que no se habían sometido a la eliminación del epitelio (amnios fresco) y un amnios cuyo epitelio se había retirado manualmente (amnios tratado manualmente) como sujetos en comparación.

En primer lugar, cada epitelio sin amnios (amnios tratada con tripsina), amnios fresco y amnios con su epitelio retirado manualmente (amnios tratado manualmente) se cortó a un tamaño de 1,5x1,5 cm, se incorporó a un compuesto OCT y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para proporcionar los preparados congelados. Estos preparados en el estado congelado se cortaron a un espesor de 8  $\mu\text{m}$  en dirección vertical a la superficie del amnios en un criostato (Leica CM 1900), y se montaron en un portaobjetos de vidrio para proporcionar un corte congelado.

Los procedimientos y condiciones para la tinción con HE fueron los siguientes. 1. Disolución de formaldehído al 10 % 5 min., 2. Lavado en agua corriente, 15 min., 3. Disolución de hematoxilina, 10 seg., 4. Lavado en agua corriente, 15 min., 5. Disolución de eosina, 10 min., 6. Lavado en agua corriente, 15 min., 7. 70 % de etanol, 10 seg., 8. 90 % de etanol, 10 seg., 9. 95 % de etanol, 10 seg., 10. 100 % de etanol, 10 seg., 11. 100 % de xileno, 10 seg., 12. 100 % de xileno, 30 min. y 13. Montado.

Las muestras se visualizaron después del montado con microscopio óptico (Olympus BX50).

Si se utiliza hematoxilina para la tinción del amnios, las células epiteliales del amnios que son células nucleadas del estrato compacto se tiñen. Por el contrario, si se utiliza eosina para la tinción, el estrato compacto se tiñe. Por lo tanto, por medio de la tinción con HE, se pueden identificar la presencia o ausencia de desprendimiento de las células epiteliales, así como la presencia o ausencia de cualquier daño del estrato compacto.

Los resultados de la tinción con HE se muestran en la Fig. 17. La capa de células (epitelio) se puede observar en amnios fresco. En amnios tratado con tripsina, no se puede observar ninguna capa de células (epitelio), de manera similar al amnios tratado manualmente. Como resultado, se determinó que el epitelio se puede quitar completamente y de manera uniforme con el método anterior. Mientras tanto, no se encontró ninguna lesión en el estrato compacto.

(2) Tinción inmunológica de los componentes de la membrana basal y del estrato compacto

Para que el amnios actúe favorablemente como un sustrato para el cultivo celular, se piensa que la membrana basal y el estrato compacto han mantenido preferentemente sus estructuras innatas, además del requisito de la eliminación completa del epitelio. El que la membrana basal y el estrato compacto hayan conservado sus estructuras innatas o no, se puede evaluar mediante el examen de la presencia o ausencia (si se conservan o no) de los componentes característicos de cada uno de estos. Por lo tanto, se utilizó el siguiente método de tinción inmunológica para examinar si los componentes de membrana basal y del estrato compacto mantienen o no en el amnios tratado con tripsina. Al igual que en el caso de la tinción con HE, el amnios que no se había sometido a la eliminación del epitelio (amnios fresco) y aquel cuyo epitelio se había retirado manualmente (amnios tratado manualmente) se utilizaron como sujetos de comparación. El método para la producción de los cortes de amnios congelados es similar a la de la tinción con HE. Estos cortes se utilizan para llevar a cabo la inmunotinción según el siguiente procedimiento. 1. Fijación con acetona, 5 min., 2. Lavado con PBS, 30 min., 3. Bloqueo con PBS/BSA al 3%, 15 min., 4. Primer anticuerpo, 1 hora, 5. Lavado con PBS, 30 min., 6. Bloqueo con PBS/BSA al 3%, 15 min., 7. Segundo anticuerpo, 1 hora, 8. Lavado con PBS, 30 min. y 9. Montado.

Las muestras después del montado se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DMIRB).

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes, y las dosis se determinaron según las instrucciones del fabricante.

Colágeno I (Colágeno I) : LSL LB-1190, Colágeno III (Colágeno III) : LSL LB1300, Colágeno IV (Colágeno IV) : LSL LB-1407, Colágeno V (Colágeno V) : LSL LB1581, Colágeno VII (Colágeno VII) : Chemicon MAB1345, Laminina 5 (Laminina-5) : Chemicon MAB19562, Fibronectina (fibronectina) : LSL LB-1021.

5 La capa de la membrana basal del amnios expresa Colágeno IV, II y Laminina 5, mientras que el estrato compacto expresa colágeno I, III, V y Fibronectina. Por lo tanto, la tinción inmunológica usando anticuerpos para cada uno de ellos permite la visualización de cualquier membrana basal del amnios y del estrato compacto que hay sido mantenido. Además, puesto que la tinción con PI también se lleva a cabo en el presente experimento, la presencia o ausencia de células epiteliales amnióticas se pueden determinar simultáneamente.

10 Se muestran los resultados de la tinción inmunológica en la Fig. 18 a 21. Las Fig. 18 y 19 son imágenes de la tinción inmunológica de amnios tratados con tripsina, la Fig. 20 es una imagen de la tinción inmunológica de amnios frescos (con epitelio), y la Fig. 21 es una imagen de tinción inmunológica de amnios tratado manualmente. Un resumen de los resultados de la tinción inmunológica se muestra en la Fig. 22. Como es evidente a partir de estos resultados, el amnios tratado con tripsina mantiene los componentes de la membrana basal y del estrato compacto en un grado similar a los del amnios tratado manualmente. Específicamente, el método de tratamiento anterior permite mantener  
15 los componentes de la membrana basal y del estrato compacto de forma equivalente al método de tratamiento convencional manual.

#### 9-9. Compendio

20 Se observó en los resultados experimentales anteriores que, mediante el procesamiento del amnios por congelación-descongelación y tratamiento con tripsina de forma combinada, el epitelio se puede quitar totalmente sin dañar sustancialmente la membrana basal del amnios ni el estrato compacto (es decir, con un mantenimiento favorable de la estructura innata).

#### [Aplicación industrial]

25 La lámina formada según la invención puede ser útil en unos muchos sectores, como material de trasplante para la reconstrucción de tejidos, y como material antiadhesivo. Ejemplos de campos de aplicación de la composición en forma de lámina según la invención son los campos de la oftalmología, cirugía digestiva, ginecología y dermatología.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición en forma de lámina que comprende un amnios con trehalosa añadida.
2. La composición en forma de lámina según la reivindicación 1, en un estado congelado o desecado.
3. La composición en forma de lámina según la reivindicación 2, en un estado liofilizado.
- 5 4. La composición en forma de lámina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el amnios es un amnios del que se eliminado la capa de células epiteliales.
5. La composición en forma de lámina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el amnios tiene los componentes de la membrana basal Colágeno IV, Colágeno VII, y Laminina 5 que se detectan con una intensidad equivalente a la del amnios no tratado.
- 10 6. La composición en forma de lámina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el amnios es un amnios humano.
7. La composición en forma de lámina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la capa de células que consiste en células derivadas de tejido se forma sobre dicho amnios.
8. La composición en forma de lámina según la reivindicación 7, en la que las células derivadas de tejido se disponen en capas en la capa de células.
- 15 9. La composición en forma de lámina según la reivindicación 7, en la que dichas células derivadas de tejidos derivan del epitelio de la cornea, del epitelio de la conjuntiva, de la epidermis de la piel, del epitelio folicular, del epitelio de la mucosa oral, del epitelio pigmentario del iris, del epitelio pigmentario de la retina, del epitelio de la mucosa de las vías respiratorias, o de la mucosa intestinal.
- 20 10. La composición en forma de lámina según la reivindicación 7, en la que la capa de células se compone de aproximadamente 5-7 capas de células, y tiene propiedades similares a las del epitelio de la córnea.
11. La composición en forma de lámina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como materiales antiadhesivos o materiales para la reconstrucción de los tejidos superficiales dañados durante invasión quirúrgica.
- 25 12. La composición en forma de lámina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el amnios tiene un componente adhesivo cualquiera que se fija a la superficie del lado del corion.
13. La composición en forma de lámina según la reivindicación 12, en la que dicho componente adhesivo es fibrinógeno y trombina.
14. La composición en forma de lámina según la reivindicación 12, en la que dicho componente adhesivo es fibrinógeno, trombina y aprotinina.
- 30 15. La composición en forma de lámina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la superficie coriónica del amnios está recubierta con material bioabsorbible.
16. Método de trasplante que utiliza una cualquiera de las composiciones en forma de lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 como material de implante.
- 35 17. Un método para producir una composición en forma de lámina, que comprende las etapas de:
  - (a) preparación de un amnios; y
  - (b) adición de trehalosa a dicho amnios.
18. El método según la reivindicación 17, que comprende además la etapa de: (c) congelación o desecación de dicho amnios después de la etapa (b).
- 40 19. El método según la reivindicación 18, que comprende además la etapa de: (d) esterilización dicho de amnios después de la etapa (c).
20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que la etapa (a) comprende la etapa de:
  - (a1) eliminación del epitelio de dicho amnios.
21. El método según la reivindicación 20, donde la etapa (a1) comprende las siguientes etapas de:
  - (1) preparación de un amnios separado de un organismo,
  - (2) congelación-descongelación de dicho amnios,
- 45

- (3) exposición de dicho amnios después de la congelación-descongelación a un tratamiento con tripsina,
- (4) lavado de dicho amnios después del tratamiento con tripsina.

5 22. El método según la reivindicación 21, en el que la temperatura de congelación durante el proceso de congelación-descongelación es de aproximadamente -20° C a aproximadamente -80° C, y la temperatura de descongelación es de aproximadamente 4° C a aproximadamente 50° C.

23. El método según la reivindicación 21 o 22, caracterizado por la repetición de dicho proceso de congelación-descongelación dos veces o más.

10 24. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizado por que el tratamiento con tripsina se realiza utilizando una disolución de tripsina que tiene una concentración de tripsina de aproximadamente 0,01% (p/v) a aproximadamente 0,05% (p/v).

25. El método según la reivindicación 24, caracterizado porque la disolución de tripsina comprende aproximadamente de 0,1 mM a aproximadamente 0,6 mM de un quelante seleccionado del grupo que consiste en EDTA, NTA, DTPA, HEDTA, GLDA, y cualquier combinación de los mismos.

15 26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, caracterizado por que el tratamiento con tripsina se realiza de tal manera que la disolución de tripsina se pone en contacto solamente con cara epitelial de dicho amnios.

27. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, en el que la siguiente etapa;

- (A) formación de una capa de células que consiste en células derivadas de tejidos sobre dicho amnios se lleva a cabo después de la etapa de (b).

20

	Sitio de aplicación principal	Ejemplo de método de aplicación	Forma de amnios deseada	Objetivo principal
1-1	Organ. abdominal y torácico	Aseguramiento después de la cobertura	Desecación/crioconservación	Reconstrucción, antiadhesivo
1-2	Inmediatamente después de la herida	Injerto	Desecación reforzada	Antiadhesivo
1-3	Suelo Pélvico	Injerto	Desecación reforzada	Antiadhesivo
1-4	Peritoneo	Aseguramiento después de la cobertura	Desecación/crioconservación	Reconstrucción
1-5	Peritoneo y órgano, etc.	Aseguramiento después de la cobertura	Desecación/crioconservación	Reconstrucción
1-6	Organ. abdominal y torácico	Aseguramiento después de la cobertura	Desecación/crioconservación	Reconstrucción, antiadhesivo
2-1	Salpínx	Aseguramiento después de la cobertura	Desecación/crioconservación	Antiadhesivo
2-2	Suelo Pélvico	Injerto	Desecación reforzada	Antiadhesivo
3-1	Conjuntiva	Aseguramiento después de la cobertura	Desecación/crioconservación	Antiadhesivo
3-2	Esclerótica y párpado	Aseguramiento después de la cobertura	Desecación/crioconservación	Antiadhesivo
3-3	Esclerótica	Aseguramiento después de la cobertura	Desecación	Antiadhesivo

FIG.1

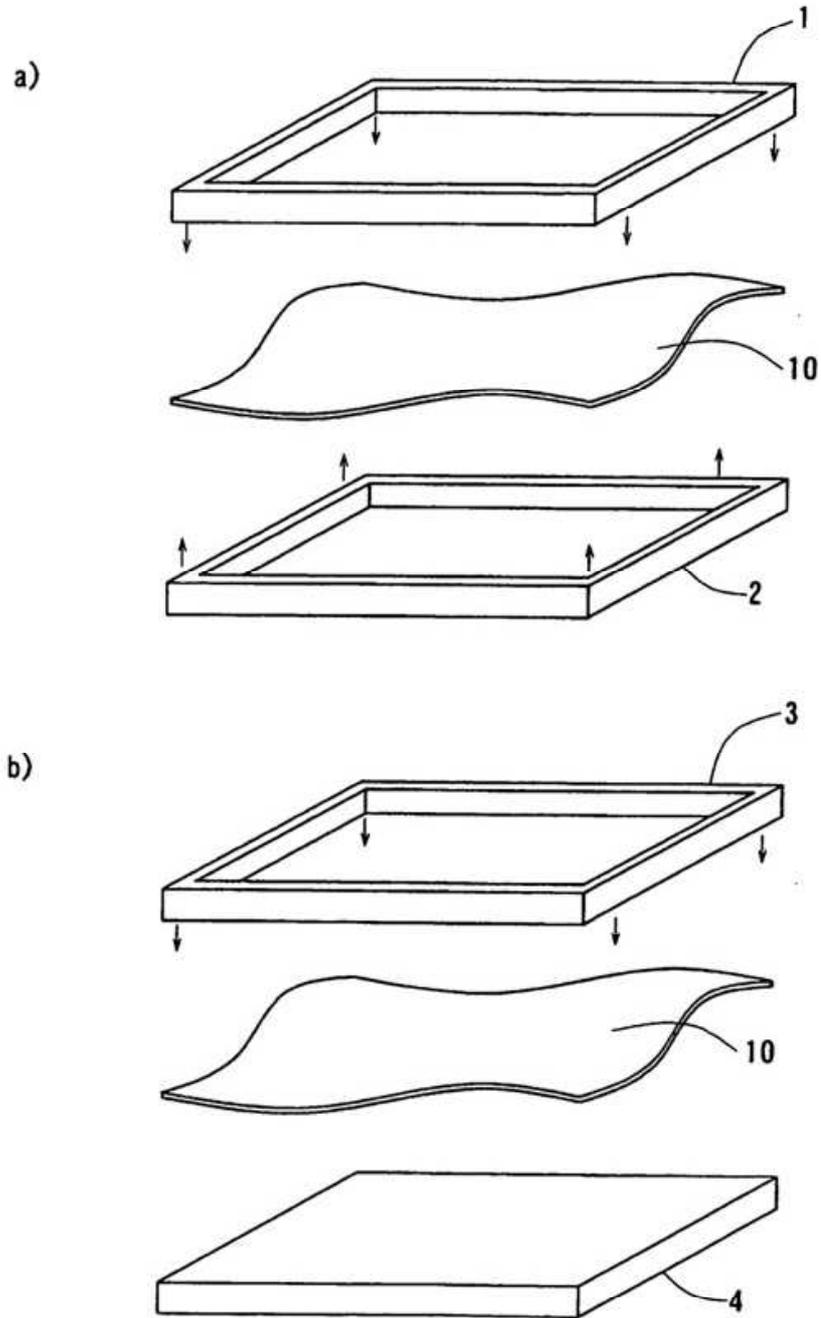


FIG.2

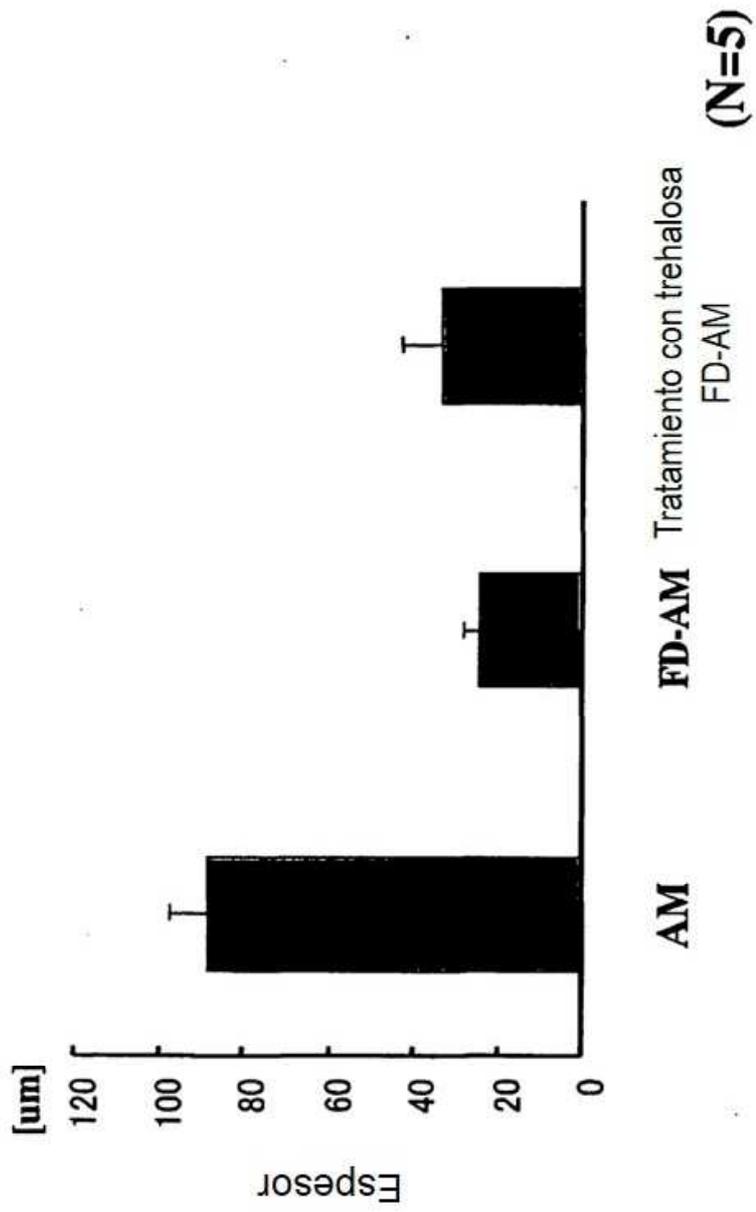


FIG.3

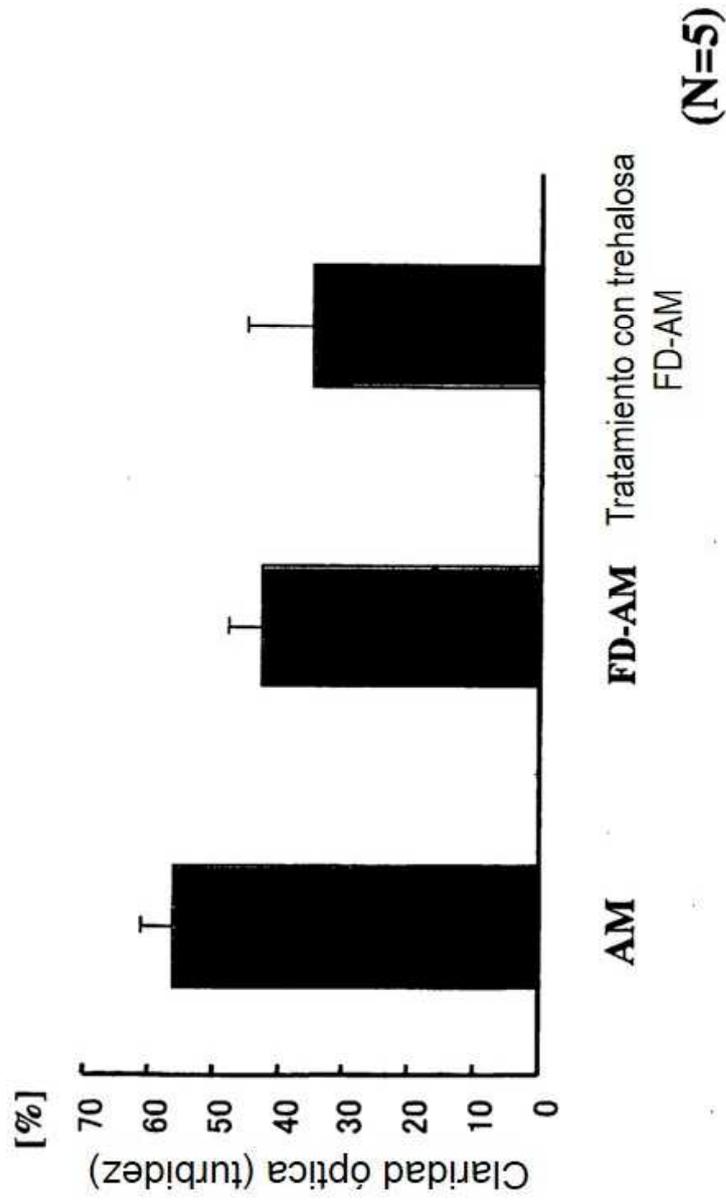


FIG.4

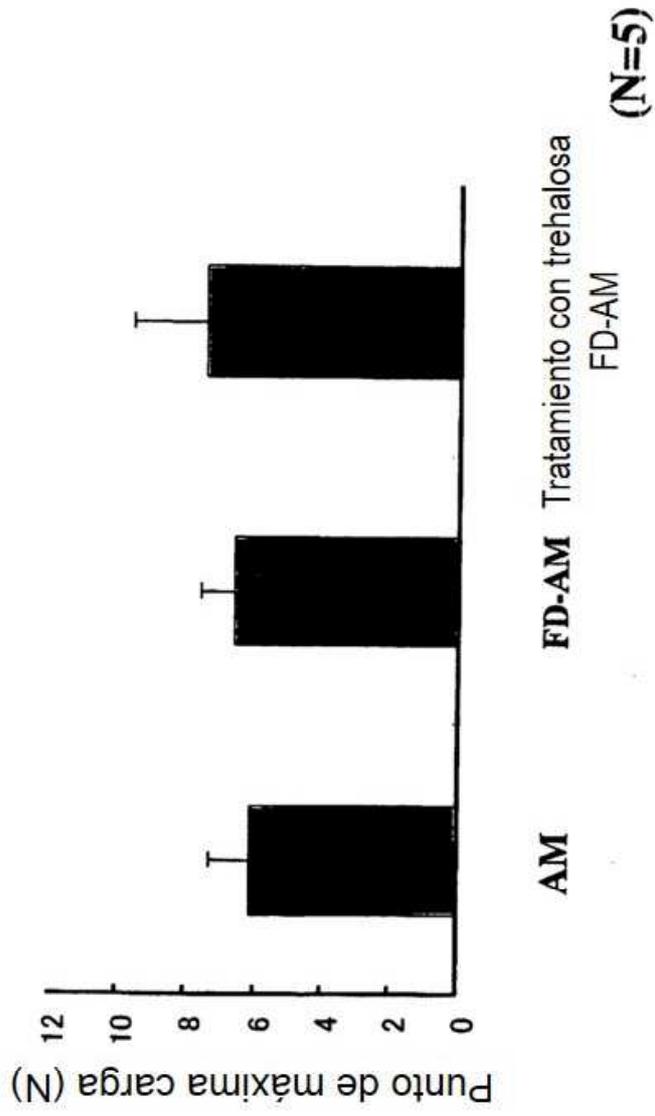
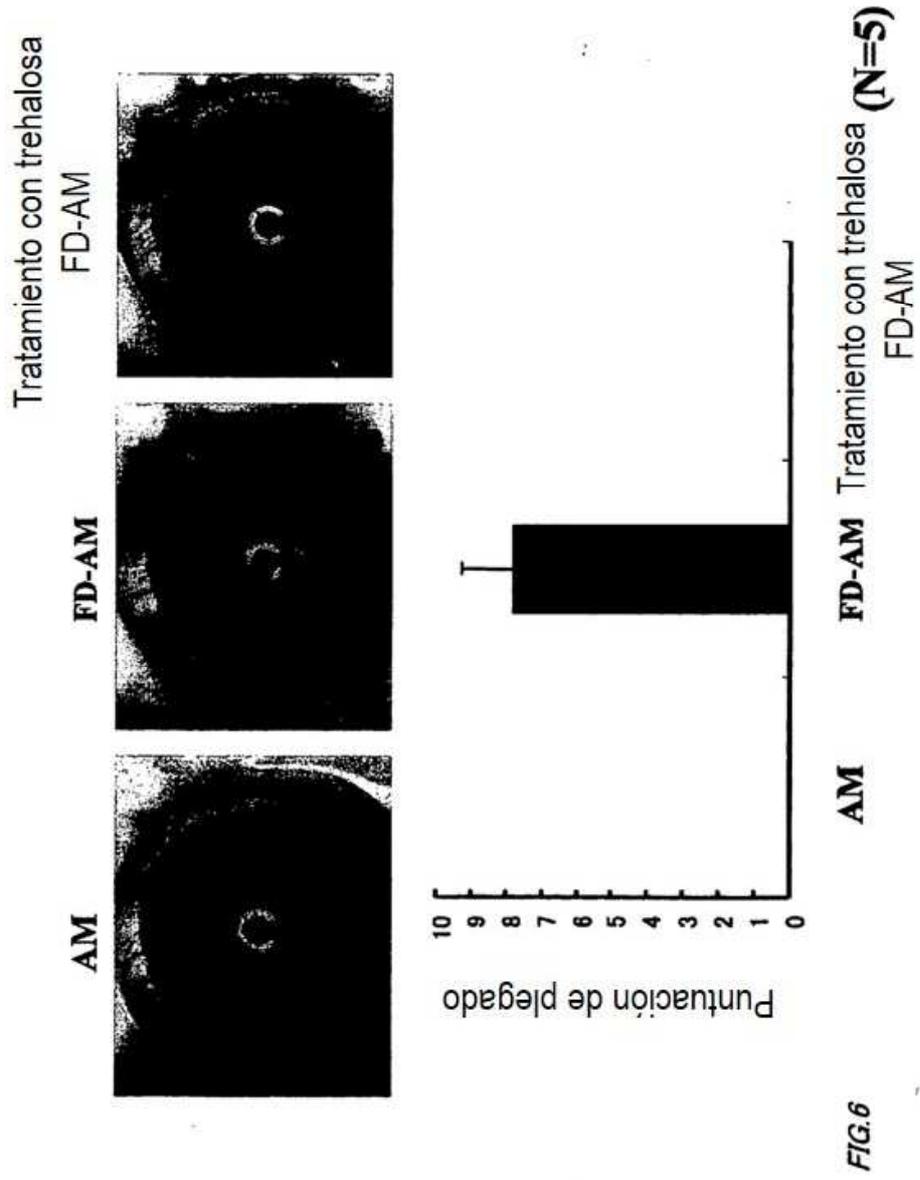


FIG.5



Un mes después del trasplante

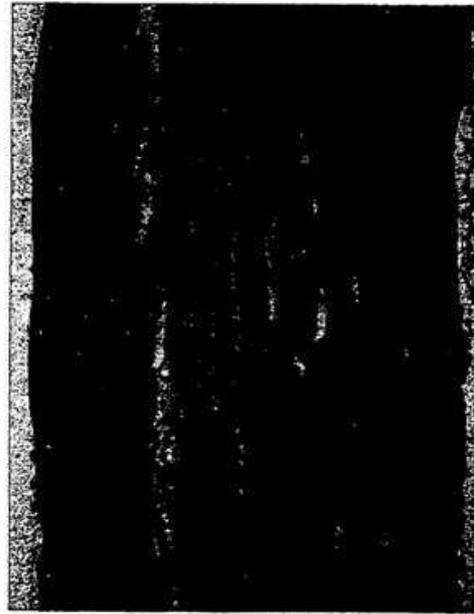


Inmediatamente después del trasplante



FIG. 7

Un mes después del trasplante



Diferenciación anormal del epitelio (-)

Angiogénesis intracorneal (-)

Edema epitelial, infiltración celular (-)

FIG.8

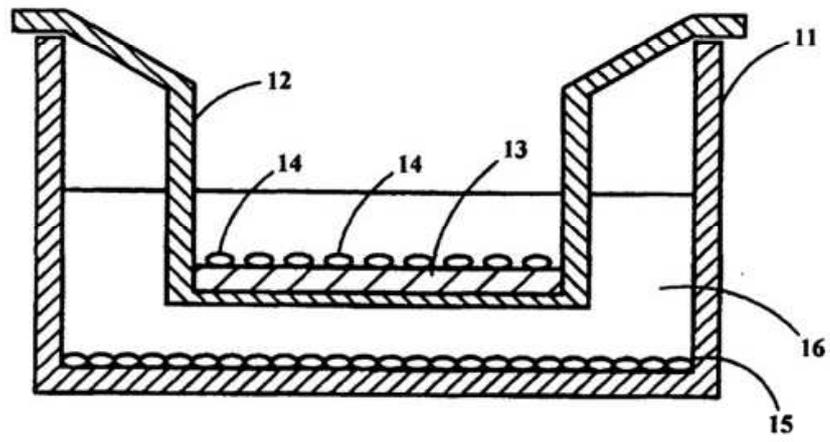


FIG.9

Amnios liofilizado tratado con trehalosa



Amnios liofilizado sin tratar

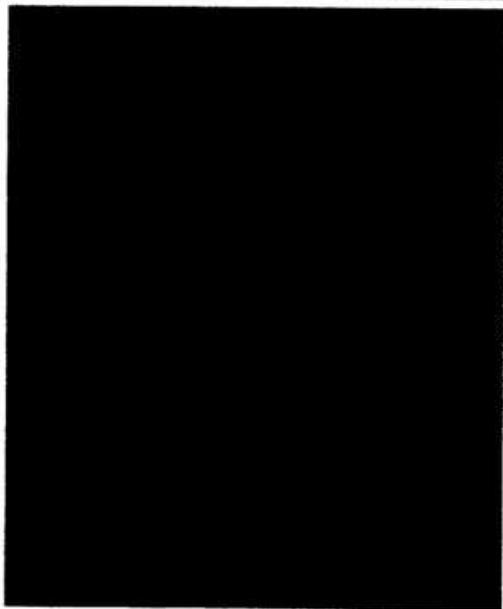
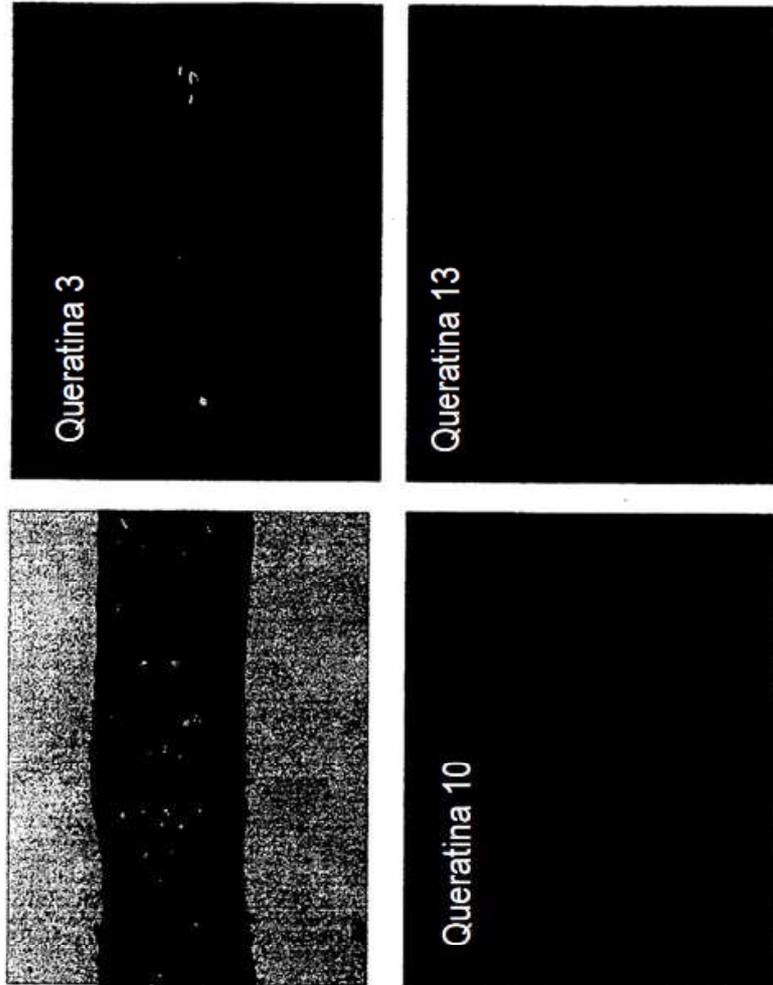


FIG.10



*FIG.11*

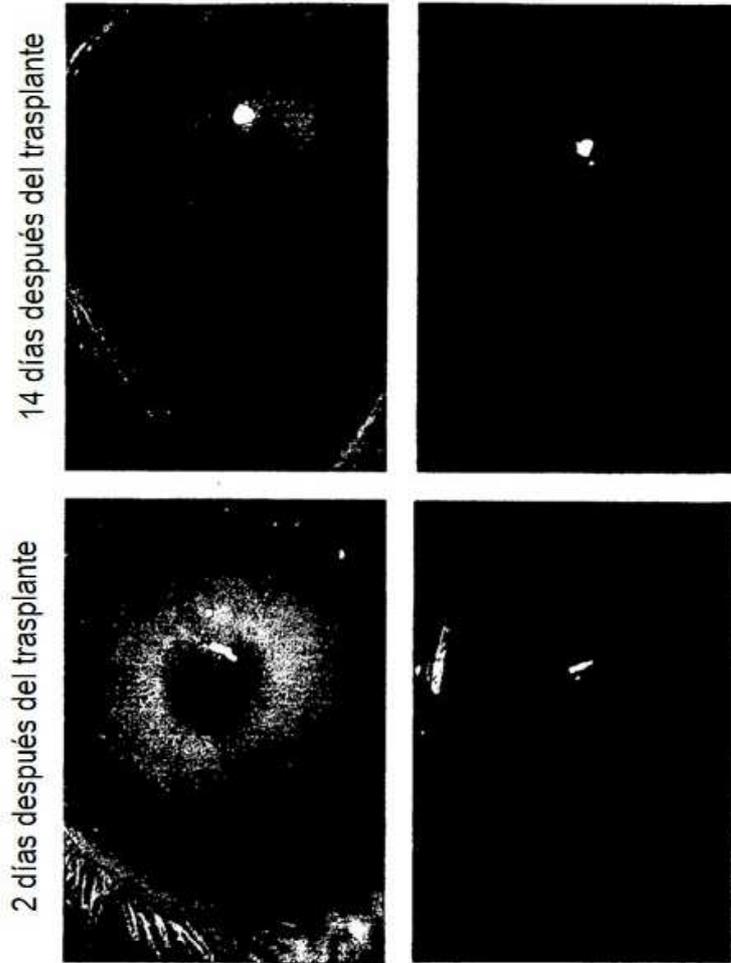
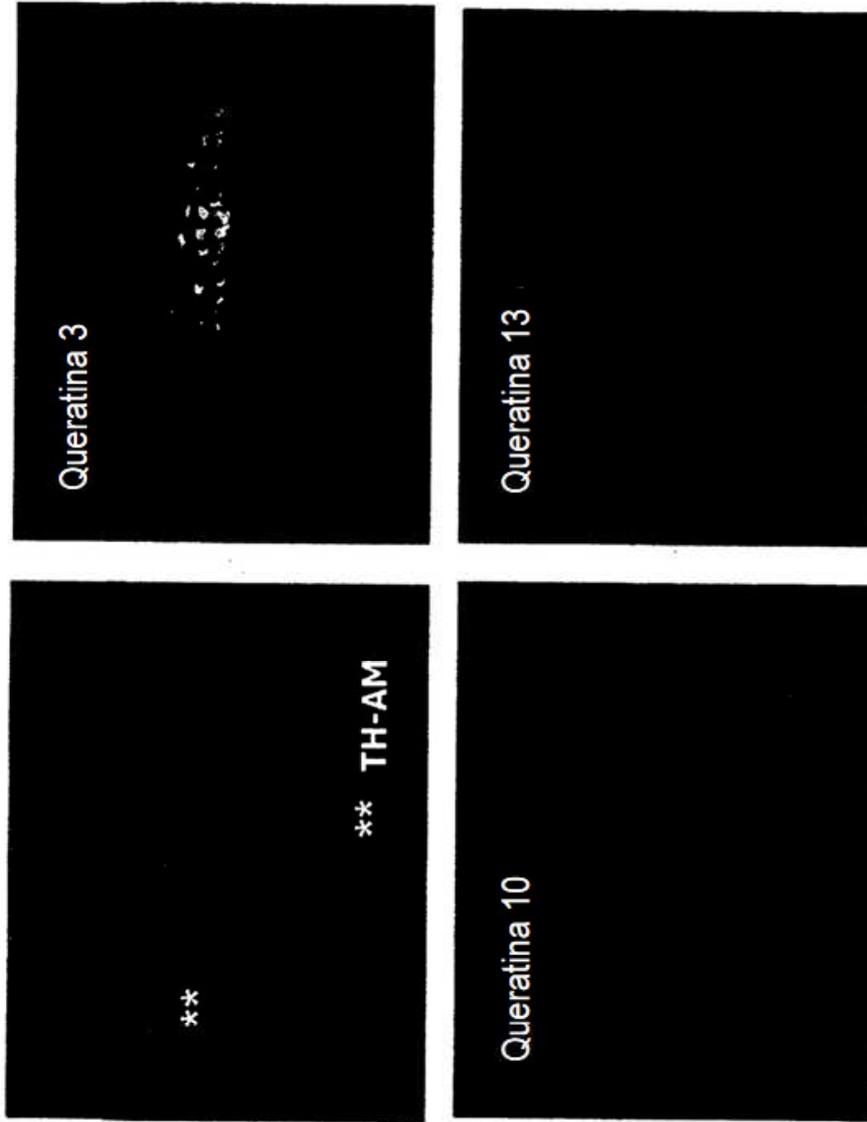
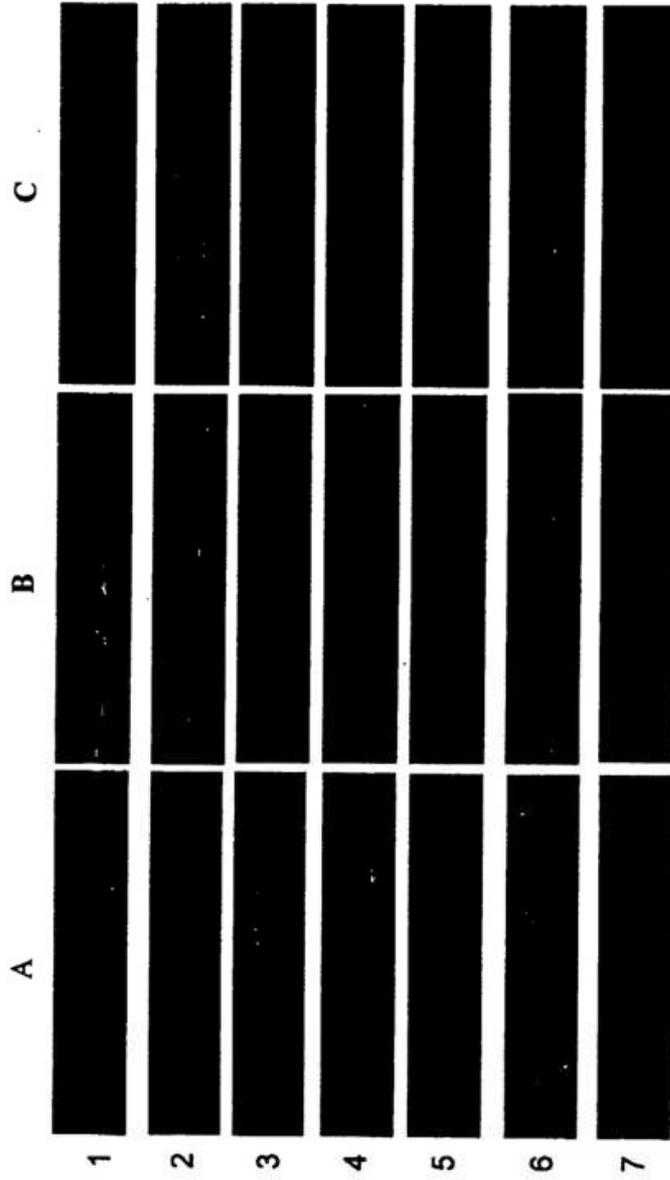


FIG.12



**FIG.13**



A: amnios, B: amnios desecado, C: amnios tratado con trehalosa y desecado  
1: colágeno I, 2: colágeno III, 3: colágeno IV, 4: colágeno V, 5: colágeno VII,  
6: fibronectina, 7: laminina V **FIG.14**



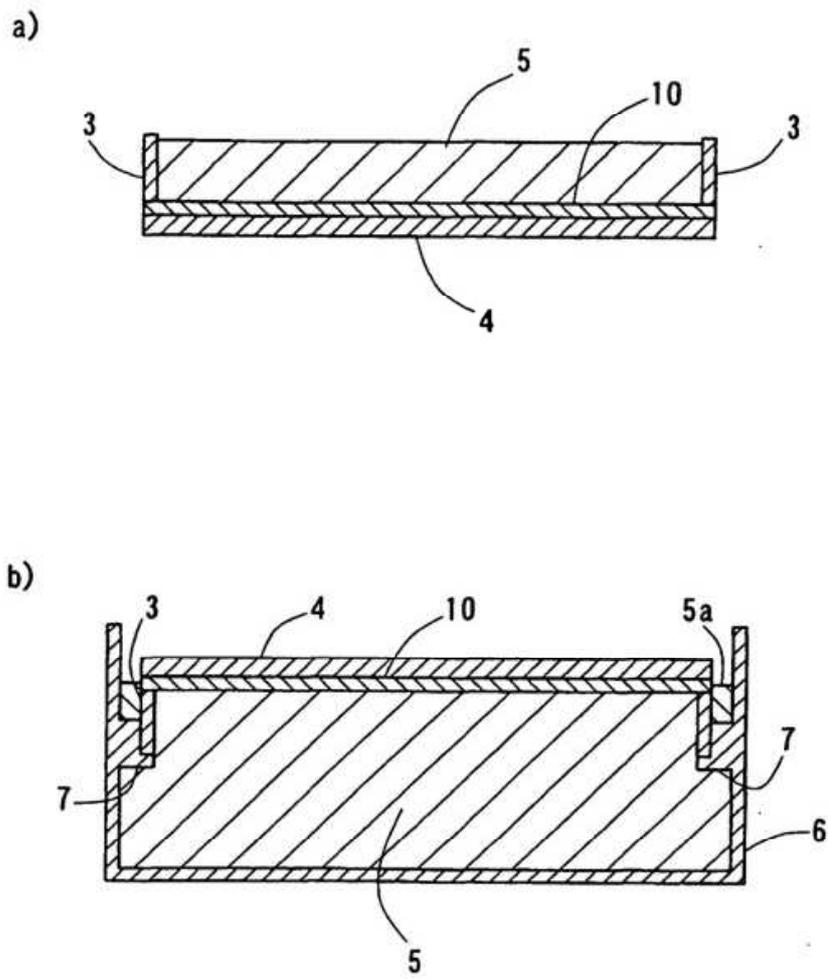
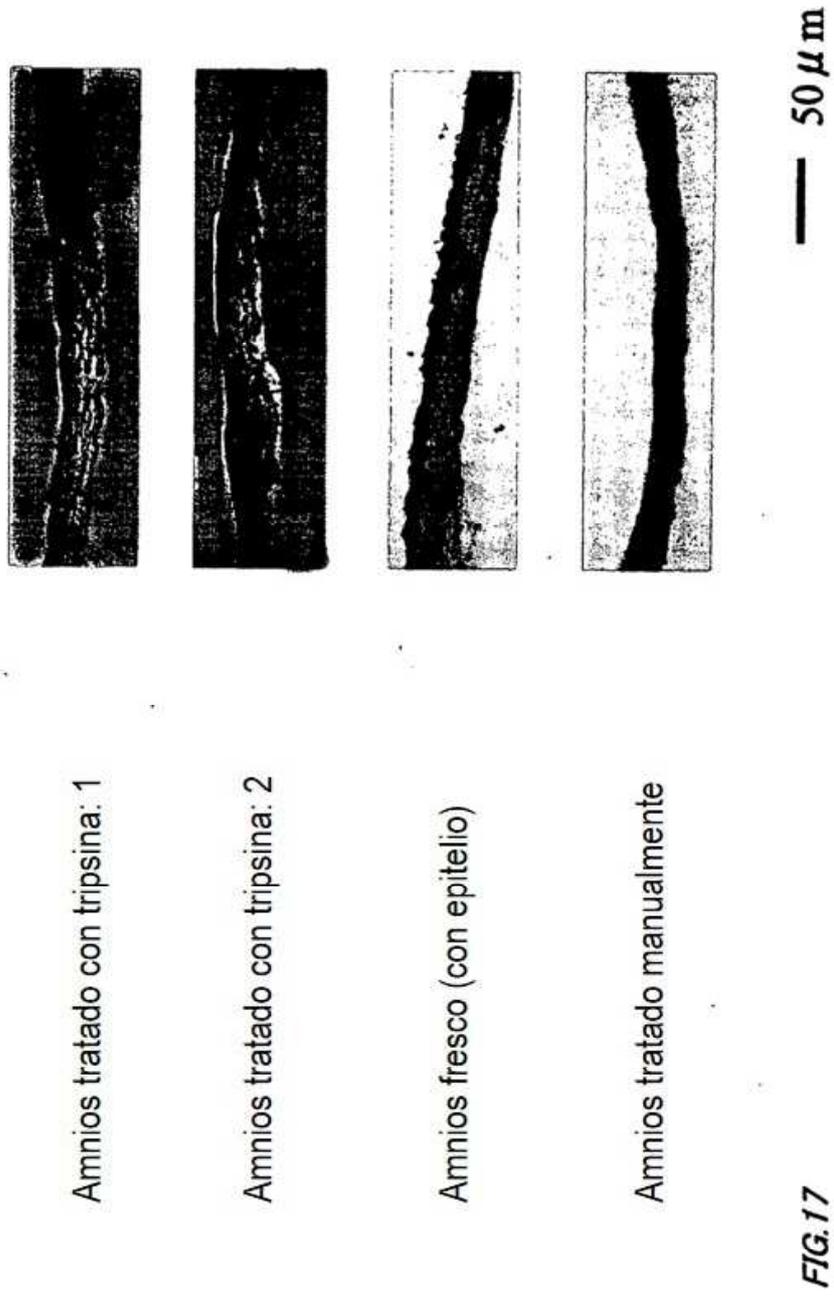
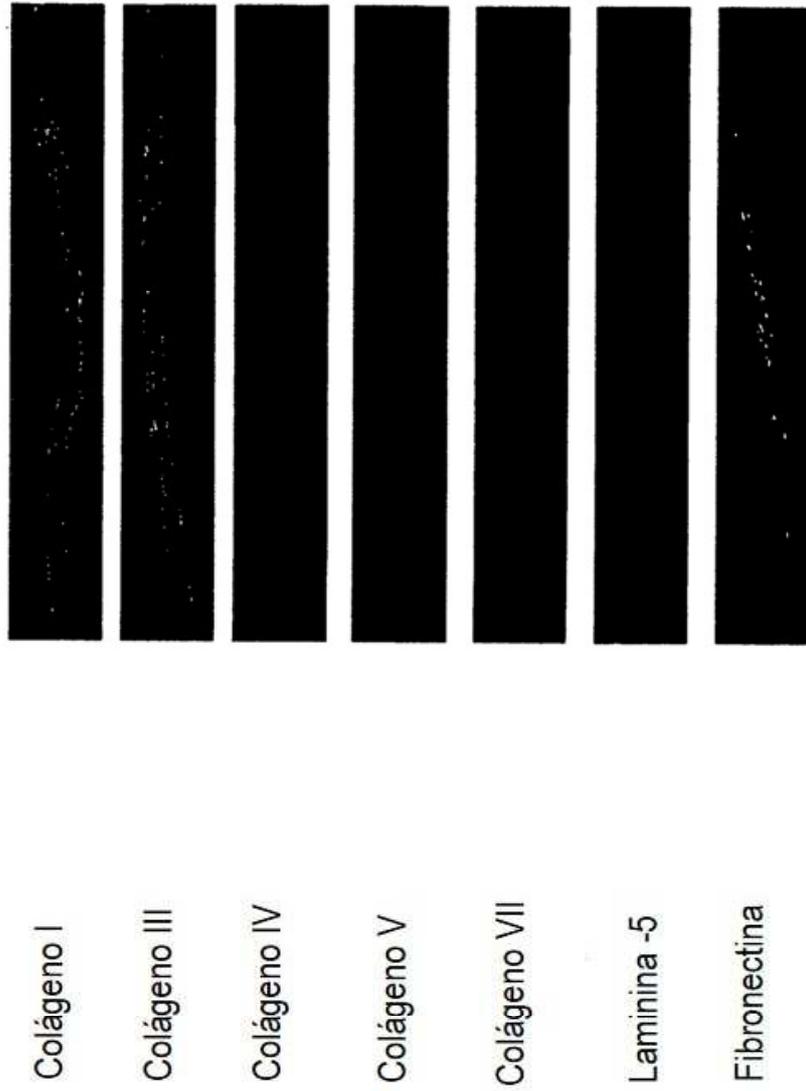
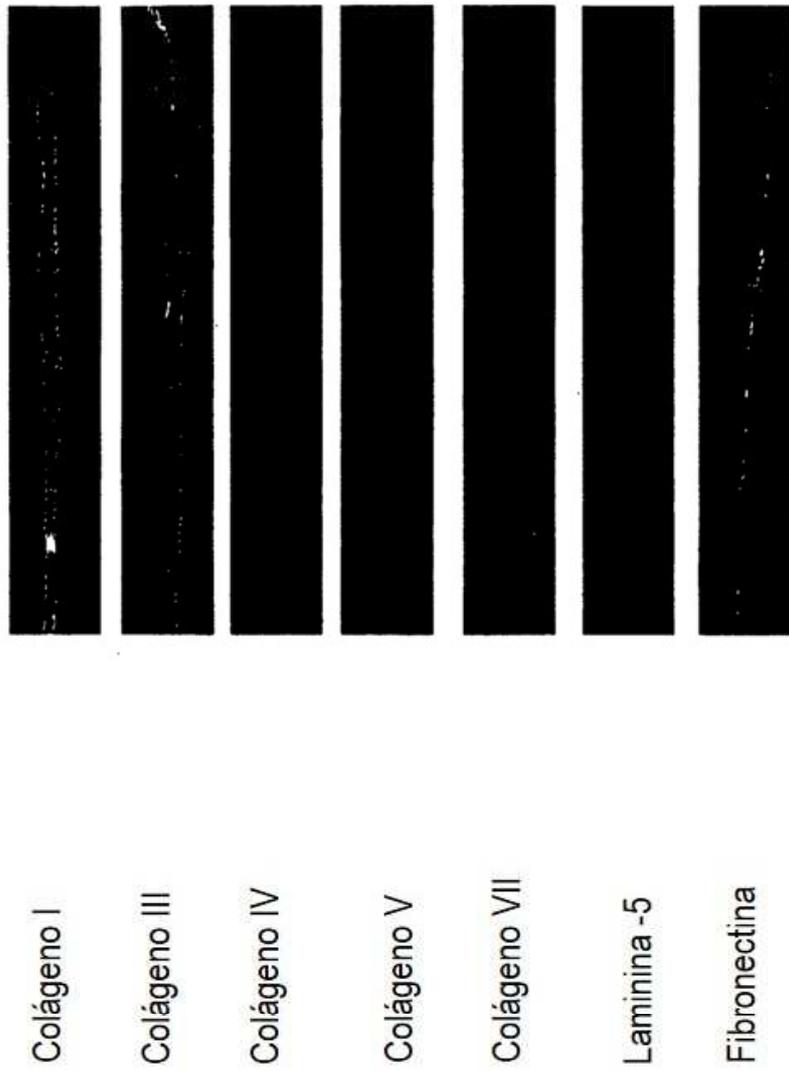


FIG.16

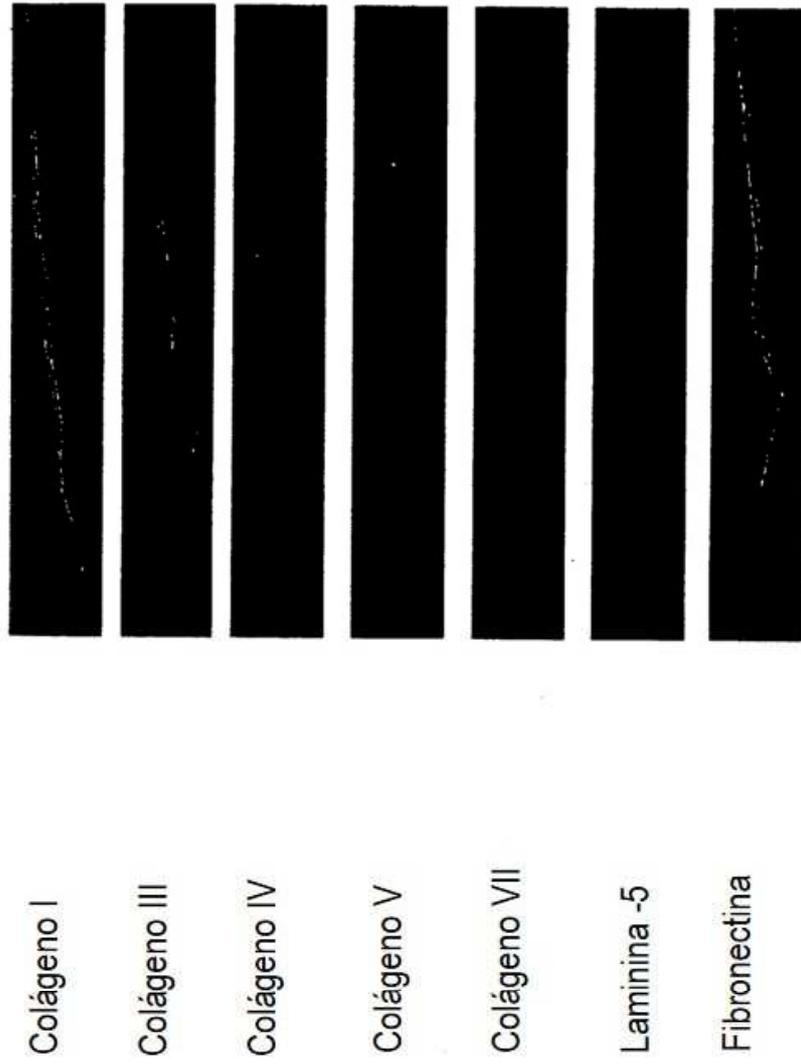




*FIG.18*



*FIG. 19*



*FIG.20*

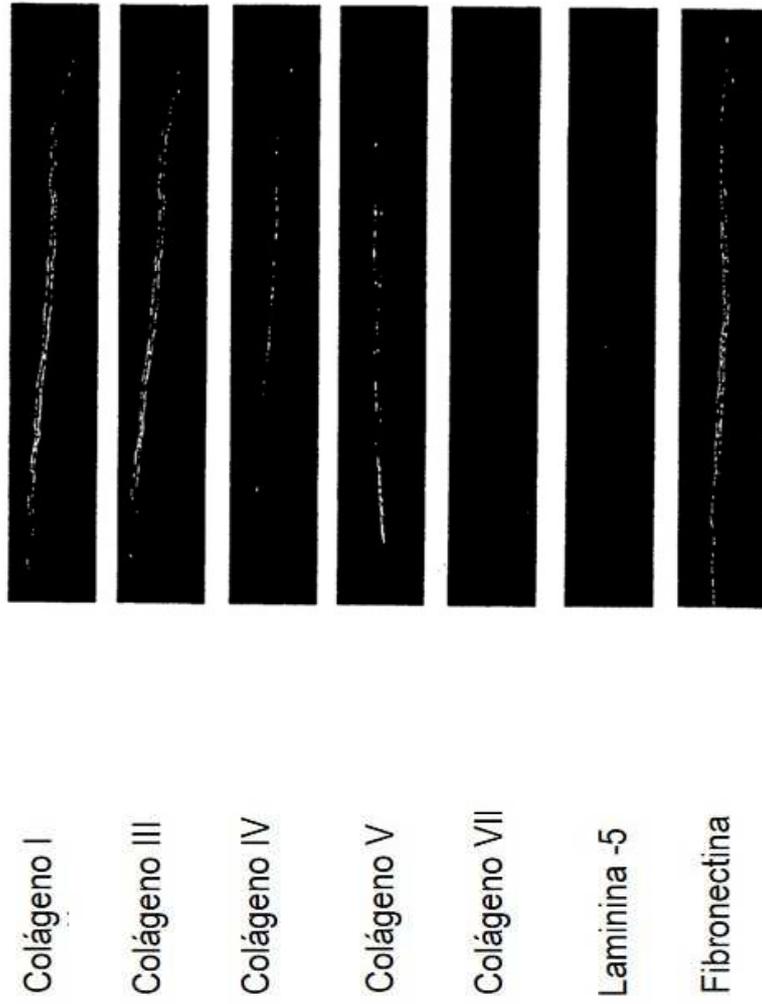


FIG.21

	Amnios fresco (con epitelio)	Amnios tratado manualmente	Amnios tratado con tripsina
Células epiteliales del amnios	+	-	-
Componentes de la membrana basal			
Colágeno IV	+	+	+
Colágeno VII	+	+	+
Laminina -5	+	+	+
Componentes del estrato compacto			
Colágeno I	+	+	+
Colágeno III	+	+	+
Colágeno V	+	+	+
Fibronectina	+	+	±

**FIG.22**