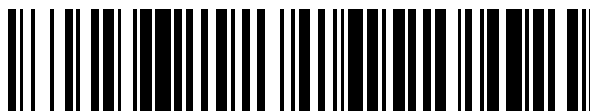


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 290**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2003 E 10182011 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2267115**

54 Título: **Láminas celulares relacionadas con el segmento ocular anterior, estructuras tridimensionales, y procesos para producir las mismas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.07.2014**

73 Titular/es:

**CELLSEED INC. (100.0%)  
33-8, Wakamatsu-cho  
Shinjuku-ku, Tokyo 162-0056, JP**

72 Inventor/es:

**YAMATO, MASAYUKI y  
OKANO, TERUO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 475 290 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

Láminas celulares relacionadas con el segmento ocular anterior, estructuras tridimensionales, y procesos para producir las mismas

5

**Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere a láminas celulares relacionadas con el segmento ocular anterior y estructuras tridimensionales en biología, medicina y otros campos, así como procesos para producir dichas láminas, y métodos terapéuticos que las usan.

10

**Técnica antecedente**

Con los marcados avances en tecnología médica, recientemente ha llegado a ser popular realizar trasplantes de órganos, es decir, reemplazar un órgano difícil de tratar con un órgano de otra persona. Los órganos que pueden trasplantarse son bastante diversos e incluyen la piel, córnea, riñón, hígado y corazón, y además, el progreso postoperatorio de los trasplantes de órgano ha mejorado tan remarcablemente que ya se han llegado a establecer como procedimiento médico. La queratoplastia es un ejemplo y tan pronto como hace 40 años, se organizó un banco de ojos en Japón para comenzar actividades de trasplante. Sin embargo, hoy en día, la cantidad de donantes en Japón es muy pequeña y a pesar del hecho de que hay anualmente aproximadamente 20.000 pacientes que necesitan queratoplastia, solamente una décima parte de ellos (aprox. 2.000 en cantidad) puede realmente tratarse por ese procedimiento. Aunque la queratoplastia es un procedimiento virtualmente establecido, tiene el problema de la escasez de donantes, dando lugar a la necesidad del desarrollo de un procedimiento médico de nueva generación.

15

20

25

Con estos antecedentes, se ha puesto atención al procedimiento de trasplantar directamente sustitutos o células artificiales que se cultivaron en ensamblaje. Ejemplos típicos de este enfoque son la piel artificial y la piel cultivada. Sin embargo, la piel artificial que usa polímeros sintéticos tiene el potencial de causar rechazo y otros efectos secundarios que lo hacen indeseable como injertos de piel. Por otro lado, la piel cultivada se prepara cultivando una parte de piel normal del paciente hasta que crece a un tamaño deseado, de modo que pueda usarse sin el riesgo de causar rechazo y cualquier otro efecto secundario y puede describirse bien como el agente de cubrimiento más natural.

30

Convencionalmente, dicho cultivo celular se ha realizado sobre la superficie de vidrio o sobre la superficie de polímeros sintéticos que se sometieron a una diversidad de tratamientos. Por ejemplo, una diversidad de recipientes de poliestireno que se sometieron a tratamientos superficiales tales como irradiación con rayos- $\gamma$  y recubrimiento con silicona han llegado a ser populares para su uso en cultivo celular. Las células que se han cultivado para crecer en esos recipientes para cultivo celular se desprenden y recuperan de las superficies de los recipientes por tratamiento con proteinasas tales como tripsina o reactivos químicos.

35

40

Sin embargo, se ha señalado que la recuperación de células cultivadas por tratamiento con reactivos químicos implica algunas desventajas tales como las etapas de procesamiento que llegan a ser complejas por aumentar la probabilidad de contaminación por impurezas y que las células cultivadas llegan a desnaturalizarse o dañarse por el tratamiento químico hasta tener sus funciones inherentes lesionadas. Para superar estas desventajas, se han propuesto hasta la fecha varias técnicas.

45

Nishida, Medical Science Digest, 2002, analiza la posibilidad de establecer ingeniería tisular del epitelio de la córnea para trasplantar una lámina celular cultivada con el uso de una placa de cultivo sensible a temperatura.

50

Nishida, Journal of Japanese Society of Biomaterials, 2002, también analiza la ingeniería tisular de la córnea para trasplante. El documento se refiere a la posibilidad del desarrollo futuro de ingeniería tisular del endotelio de la córnea sobre la *substantia propria*, y un método para inyectar células endoteliales en la cámara anterior del ojo.

Yamato et al, Tissue Engineering, 2001, describe el cultivo y recolección de láminas multiestratificadas de queratinocitos usando placas de cultivo termosensibles sin el uso de la enzima proteolítica dispasa.

55

Kinoshita, Nippon Ganka Gakkai zasshi, 2002, describe la fabricación de una lámina celular endotelial corneal humana sobre una membrana amniótica.

60

El documento JP 2-23191 B describe un método para producir una membrana trasplantable de tejido de queratina que comprende las etapas de cultivar células epidérmicas queratinizadas neonatales humanas en un recipiente de cultivo en condiciones que posibilitan que se forme una membrana de tejido de queratina sobre la superficie del recipiente y desprender la membrana de tejido de queratina usando una enzima. Específicamente, con células 3T3 usadas como capa de alimentación, las células epidérmicas se cultivan y estratifican como una lámina celular que se recupera usando la proteinasa dispasa. Sin embargo, el método descrito en el documento JP 2-23191 B ha tenido los siguientes defectos.

65

- (1) La dispasa es de origen microbiano y la lámina celular recuperada tiene que lavarse minuciosamente.  
 (2) Las condiciones para el tratamiento con dispasa difieren de un lote de cultivo celular a otro y se requiere una gran habilidad en el tratamiento.  
 (3) Las células epidérmicas cultivadas se activan patológicamente por el tratamiento con dispasa.  
 (4) La matriz extracelular se descompone por el tratamiento con dispasa.  
 (5) Como resultado, el sitio enfermo en el cual se ha injertado la lámina celular es propenso a infección.

Sin embargo, las células relacionadas con el segmento ocular anterior que se contemplan en la presente invención, es decir, células endoteliales de la córnea no tienen una unión intracelular tan fuerte como las células dérmicas y ha sido imposible desprender y recuperar células cultivadas como una única lámina incluso si se emplea la dispasa.

Para resolver este problema, recientemente se ha ideado una técnica, de acuerdo con la cual se cultivan células epiteliales de la córnea o células epiteliales de la conjuntiva en ensamblaje sobre un amnios desprovisto de la capa esponjosa y la capa epitelial y el ensamblaje se usa como injerto celular junto con el amnios (documento JP 2001-161353 A o Kinoshita Shipero, 2002). Como el amnios tiene resistencia adecuada como membrana pero no tiene antigenicidad, es favorable como soporte de injertos celulares; sin embargo, el amnios no está de forma inherente en el ojo y para construir un tejido intraocular más preciso, se ha deseado la preparación de una lámina satisfactoriamente fuerte solamente a partir de células intraoculares.

La presente invención se ha conseguido con una visión para resolver los problemas mencionados anteriormente de la técnica previa. Por lo tanto, la presente invención tiene como objeto proporcionar una lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior que tiene solamente unos pocos defectos estructurales ya que se han recuperado reteniendo la estructura intercelular de desmosoma y la proteína tipo membrana basal entre la célula y el sustrato. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso mediante el cual puedan desprenderse células cultivadas y crecidas y recuperarse de una superficie de sustrato fácilmente y como una única lámina satisfactoriamente fuerte cambiando la temperatura ambiental sin tratamiento con una enzima tal como dispasa.

#### Sumario de la invención

Para conseguir los objetos indicados, los presentes inventores participaron en actividades de I+D adoptando diversos ángulos de estudio. Como resultado, los inventores descubrieron que una lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior que tiene menos defectos estructurales podría obtenerse mediante un proceso que comprende las etapas de cultivar células relacionadas con el segmento ocular anterior en un soporte de cultivo celular que comprende un sustrato que tiene su superficie cubierta con un polímero sensible a temperatura, después de ello ajustar la temperatura de la solución de cultivo hasta por encima de una temperatura de disolución crítica superior o por debajo de una temperatura de disolución crítica inferior, poner la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior cultivada o estructura tridimensional en estrecho contacto con una membrana polimérica, y desprender la lámina o estructura tridimensional junto con la membrana polimérica. La presente invención se ha conseguido en base a este hallazgo, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

Por tanto, la presente invención proporciona en primer lugar:

1. Un proceso para producir una lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior, que comprende las etapas de:

cultivar células relacionadas con el segmento ocular anterior en un soporte de cultivo celular que comprende un sustrato que tiene su superficie cubierta con un polímero sensible a temperatura que tiene una temperatura de disolución crítica superior o inferior de 0-80°C con respecto al agua, para formar una lámina celular de células relacionadas con el segmento ocular anterior,  
 ajustar la temperatura de la solución de cultivo hasta por encima de la temperatura de disolución crítica superior o por debajo de la temperatura de disolución crítica inferior,  
 poner la lámina celular de células relacionadas con el segmento ocular anterior en estrecho contacto con una membrana polimérica,  
 desprender la lámina celular de células relacionadas con el segmento ocular anterior junto con la membrana polimérica del soporte de cultivo celular sin tratamiento con proteinasa,  
 donde:

las células relacionadas con el segmento ocular anterior son células endoteliales de la córnea;  
 el polímero sensible a temperatura es poli(N-isopropilacrilamida); y la membrana polimérica está hecha de difluoruro de polivinilideno convertido en hidrófilo.

2. El proceso de acuerdo con el punto 1, donde una cobertura del polímero sensible a temperatura está en el intervalo de 0,8 a 3,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

3. Una lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior que se puede obtener mediante el proceso de acuerdo con el punto 1 o 2.

4. La lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior de acuerdo con el punto 3, donde la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior está en estrecho contacto con la membrana polimérica hecha de difluoruro de polivinilideno convertido en hidrófilo.

5 5. La lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior de acuerdo con el punto 3 o 4, para su uso en el tratamiento de un sitio enfermo en el cual parte o todo el tejido del segmento ocular anterior se ha dañado o ha llegado a ser deficiente.

**Mejores modos de realizar la invención**

10 Las células que pueden usarse adecuadamente en la preparación de la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior o estructura tridimensional de la presente invención son células endoteliales de la córnea. En la presente invención, la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior significa una lámina obtenida por cultivo de una única capa de los diversos tipos descritos anteriormente de células que forman el segmento ocular anterior en el organismo vivo sobre un soporte de cultivo y después de ello desprender la capa del soporte;

15 La lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior en la presente invención es tal que no se ha dañado durante el cultivo por proteinasas tipificadas por dispasa y tripsina. Por lo tanto, la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior desprendida del sustrato retiene la estructura intercelular de desmosoma, tiene solamente unos pocos defectos estructurales, y tiene grandes características de resistencia. Esto significa que si la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior obtenida se aplica para propósitos tales como injerto, la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior o estructura tridimensional de la presente invención que tiene suficiente resistencia ayuda al sitio enfermo a aislarse completamente del exterior. Además, la lámina de la presente invención se **caracteriza porque** la proteína tipo membrana basal formada entre la célula y el sustrato durante el cultivo no se ha destruido por enzimas. Por tanto, la lámina puede unirse satisfactoriamente al tejido vivo del sitio enfermo en el cual se ha injertado y esto posibilita realizar un tratamiento eficaz. Esto se describe a continuación más específicamente. Si se emplea una proteínasa ordinaria tal como tripsina, la estructura intracelular de desmosoma y la proteína tipo membrana basal entre la célula y el sustrato se retienen apenas y, por tanto, la lámina celular se desprende con las células separadas en masas concretas. En cuanto a la proteínasa dispasa, destruye casi toda la proteína tipo membrana basal entre la célula y el sustrato pero la lámina celular puede desprenderse con un 10-60% de la estructura intercelular de desmosoma retenida y además la lámina celular obtenida tiene solamente baja resistencia. En contraste, la lámina celular de la presente invención mantiene al menos el 80% de la estructura de desmosoma y la proteína tipo membrana basal intacta, proporcionando de este modo las diversas ventajas descritas anteriormente.

20 Como se ha descrito anteriormente, la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior en la presente invención es una lámina celular que retiene tanto la estructura intercelular de desmosoma como la proteína tipo membrana basal entre la célula y el sustrato y que aún tiene grandes características de resistencia; y no ha sido posible en absoluto obtenerla mediante la técnica previa.

25 El polímero sensible a temperatura que se usa para cubrir el sustrato del soporte de cultivo celular se caracteriza por tener una temperatura de disolución crítica superior o inferior de 0°C - 80°C, más preferiblemente de 20°C - 50°C, en solución acuosa. Si la temperatura de disolución crítica superior o inferior excede de 80°C, las células pueden morir, lo que no es preferido. Si la temperatura de disolución crítica superior o inferior está por debajo de 0°C, la tasa de crecimiento celular generalmente bajará en gran medida o las células morirán, lo que no es preferido.

30 El polímero sensible a temperatura a usarse en la presente invención es poli(N-isopropilacrilamida).

35 El sustrato que es para cubrirse con el polímero sensible a temperatura puede elegirse entre vidrio, vidrio modificado, compuestos tales como poliestireno y poli(metil metacrilato), y todas las demás sustancias que pueden generalmente conformarse, como por ejemplo compuestos poliméricos diferentes a esos compuestos, y cerámicas.

40 El método para cubrir el soporte con el polímero sensible a temperatura no está limitado de ningún modo particular pero pueden seguirse los métodos descritos en el documento JP 2-211865 A. Específicamente, la operación de cobertura puede conseguirse sometiendo el sustrato y los monómeros o polímeros mencionados anteriormente a exposición de haces de electrones (EB), irradiación de rayos-γ, irradiación ultravioleta, tratamiento con plasma, tratamiento corona o reacción de polimerización orgánica o mediante absorción física realizada por aplicación de soluciones de recubrimiento o la etapa de amasado.

45 El material de soporte mostrado en la presente invención se caracteriza por tener dos regiones, la región A cubierta con el polímero sensible a temperatura, y la siguiente región B sobre su superficie:

- (1) una región cubierta con un polímero que tiene menos afinidad por células;
- (2) una región cubierta con una cantidad diferente del polímero sensible a temperatura que en la región A;
- (3) una región cubierta con un polímero sensible a una temperatura diferente que en la región A; o una combinación de dos cualesquiera de las regiones (1)-(3) o una combinación de las tres.

El método para preparar el material de soporte no se limita en absoluto siempre que el producto final tenga las estructuras mencionadas anteriormente; por mencionar unos pocos ejemplos, se incluyen (1) un método que comprende las etapas de formar primero la región B sobre la superficie completa del sustrato y después superponer la región A con el área enmascarada que sirve finalmente como región B, o viceversa, (2) un método que comprende las etapas de cubrir el sustrato con dos capas de A y B y raspar cualquier capa mediante un dispositivo ultrasónico o de escaneo, y (3) un método para la fotoimpresión de las sustancias de cobertura, pudiendo emplearse estos métodos en solitario o en combinación.

La morfología de las regiones cubiertas no se limita de ningún modo y puede incluir los siguientes patrones observados anteriormente: (1) una combinación de líneas y espacios, (2) lunares, (3) una rejilla, o patrones hechos de otras formas especiales, o patrones de sus mezclas. Considerando el estado de cada tejido intraocular, se prefiere el patrón de puntos (2).

El tamaño de las áreas cubiertas no se limita de ningún modo pero considerando el tamaño de cada tejido intraocular y la posibilidad de que una lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior cultivada o estructura tridimensional pueda encoger según se desprende del soporte, puede decirse al menos lo siguiente acerca del patrón de puntos: si tienen que usarse las células dentro de cada punto, el diámetro del punto es generalmente de no más de 5 cm, preferiblemente no más de 3 cm, y más preferiblemente de 2 cm o menos; si tiene que usarse las células fuera de cada punto, el diámetro del punto es generalmente de no más de 1 mm, preferiblemente no más de 3mm, y más preferiblemente de 5 mm o menos.

La cobertura del polímero sensible a temperatura está adecuadamente en el intervalo de 0,3-6,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , preferiblemente de 0,5-3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , más preferiblemente de 0,8-3,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Si la cobertura del polímero sensible a temperatura es de menos de 0,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , las células en el polímero no se desprenderán fácilmente incluso si se les da un estímulo y la eficacia de funcionamiento disminuye considerablemente, lo que no se prefiere. Si, por otro lado, la cobertura del polímero sensible a temperatura es mayor de 6,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , las células no se adherirán fácilmente al área cubierta y la adhesión adecuada de las células llega a ser difícil de conseguir.

El polímero que tiene alta afinidad por células usado en la presente invención no se limita de ningún modo siempre que esté libre de adherencia celular; ejemplo incluyen polímeros hidrófilos tales como poli(acrilamida, poli(dimetil acrilamida), polietilenglicol y celulosas, o polímeros altamente hidrófobos tales como polímeros de silicona y fluoropolímeros.

En la presente invención, el cultivo celular se realiza sobre el soporte de cultivo celular (por ejemplo, placa de cultivo celular) que se ha preparado del modo descrito anteriormente. La temperatura del medio de cultivo no se limita de ningún modo particular, excepto que depende de si el polímero mencionado anteriormente con el que se ha cubierto la superficie del sustrato tiene una temperatura de disolución crítica superior o una temperatura de disolución crítica inferior; en el primer caso, la temperatura del medio no debe ser mayor de la temperatura de disolución crítica superior y, en el último caso, debe ser menor que la temperatura de disolución crítica inferior. Huelga decir que es inapropiado realizar el cultivo en un intervalo de temperatura inferior donde las células de cultivo no crezcan o en un intervalo de temperatura superior donde las células cultivadas mueran. Las condiciones de cultivo diferentes a temperatura pueden adoptarse en el método habitual y no se limitan de ningún modo particular. Por ejemplo, el medio de cultivo a usar puede ser uno que está suplementado con suero tal como suero de ternera fetal (FCS) conocido; como alternativa, puede ser un medio libre de suero.

En los procesos de la presente invención, el tiempo de cultivo puede establecerse de acuerdo con el método descrito anteriormente dependiendo del objetivo de uso de la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior. Las células cultivadas pueden desprenderse y recuperarse del material de soporte poniendo primero la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior cultivada en estrecho contacto con la membrana polimérica, después ajustando la temperatura del material de soporte con células adherentes hasta por encima de la temperatura de disolución crítica superior del polímero subyacente en el sustrato de soporte o por debajo de su temperatura de disolución crítica inferior, tras lo cual las células pueden desprenderse juntas con la membrana polimérica. El desprendimiento de la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior puede realizarse dentro de solución de cultivo en que las células se han cultivado o en otros fluidos isotónicos, lo que sea más adecuado dependiendo del objetivo. La membrana polimérica a poner en estrecho contacto con la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior es difluoruro de polivinilideno (PVDF) convertido en hidrófilo.

Para desprender y recuperar la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior con alto rendimiento, el soporte de cultivo celular puede golpearse suavemente o balancearse o el medio de cultivo puede agitarse con la ayuda de una pipeta; estos y otros métodos pueden aplicarse independientemente o en combinación, además, las células cultivadas pueden lavarse opcionalmente con un fluido isotónico o similar de modo que se desprendan para su recuperación.

La lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior obtenida por el proceso descrito anteriormente aventaja por mucho a lo obtenido por los métodos de la técnica previa en términos tanto de facilidad de desprendimiento como de alto grado de no invasividad y tiene un gran potencial en aplicaciones clínicas,

ejemplificadas por injertos de córnea.

Obsérvese que el soporte de cultivo celular usado en el proceso de la presente invención permite un uso repetido.

## 5 Ejemplos

En las siguientes páginas, la presente invención se describe en mayor detalle por referencia a ejemplos que no pretenden de ningún modo limitar el alcance de la invención.

### 10 Ejemplos 1 y 2 (Referencia)

A una placa de cultivo celular de poliestireno comercial (placa Petri FALCON 3001 con un diámetro de 3,5 cm fabricada por Beckton Dickinson Labware), se aplicó una solución de recubrimiento que tenía monómero de N-isopropilacrilamida disuelto en alcohol isopropílico para dar una concentración del 40% (Ejemplo 1) o del 50% (Ejemplo 2) en un volumen de 0,10 ml. Había una máscara metálica colocada sobre la superficie recubierta de la placa Petri que tenía un diámetro de 3,5 cm con un orificio central que tenía un diámetro de 2 cm. Manteniéndolo en ese estado, la superficie de la placa de cultivo se expuso a haces de electrones con una intensidad de 0,25 MGy, tras lo cual se inmovilizó un polímero de N-isopropilacrilamida (PIPAAm) en una forma circular (como una isla, con el área bajo la máscara dejada como el área que se cubrió sin nada ya que no se expuso a los haces de electrones). Después, la máscara metálica se retiró y se aplicó una solución de recubrimiento que tenía monómero de N-isopropilacrilamida disuelto en alcohol isopropílico para dar una concentración del 20% en un volumen de 0,10 ml. Esta vez, se colocó una máscara metálica circular que tenía un diámetro de 2 cm justo para cubrir el área circular. Manteniéndola en ese estado, la placa de cultivo se expuso a haces de electrones con una intensidad de 0,25 MGy, tras lo cual se inmovilizó un polímero de acrilamida fuera de la capa de PIPAAm circular. Después de la irradiación, se retiró la máscara metálica y se lavó la placa de cultivo con agua de intercambio iónico para retirar el monómero residual y el PIPAAm que no se unió a la placa de cultivo; la placa de cultivo después se secó en una poyata limpia y se esterilizó con un gas de óxido de etileno para proporcionar un material de soporte de cultivo celular. La cobertura de PIPAAm en el área de isla se determinó a partir de un material de soporte de cultivo celular preparado en condiciones idénticas a las anteriores excepto en que no se usó máscara. Como resultado, se descubrió que en las condiciones empleadas, la superficie del sustrato se cubría con el polímero sensible a temperatura en una cantidad de 1,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Ejemplo 1) o 2,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Ejemplo 2). En el material de soporte de cultivo celular obtenido, se cultivaron células epiteliales de córnea de conejo normales por el método habitual (medio usado: CORNEPAK (producto de KURABO INDUSTRIES, LTD.); 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%). Como resultado, cada uno de los materiales de soporte de cultivo celular era tal que las células epiteliales de la córnea se adherían y crecían de forma normal en el área circular central. En el día 14 del cultivo, se colocó una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de  $\phi$  2 cm sobre las células cultivadas y el medio de cultivo, aspirando suavemente, se sometió a incubación y refrigeración a 20°C durante 30 minutos junto con el material de soporte de cultivo celular, tras lo cual las células en cada uno de los materiales de soporte de cultivo celular se desprendieron juntas con la membrana subyacente. La membrana subyacente pudo extraerse fácilmente de cada una de las láminas celulares. Las láminas celulares de este modo desprendidas retenían la estructura intercelular de desmosoma y la proteína tipo membrana basal entre la célula y el sustrato y tenía resistencia adecuada como lámina individual.

En cada uno de los ejemplos 1 y 2, se realizó un "tratamiento de baja temperatura" incubando a 20°C durante 30 minutos pero el "tratamiento de baja temperatura" a realizar en la presente invención no se limita a la temperatura y tiempo indicados anteriormente. La condición de temperatura preferida para el "tratamiento de baja temperatura" que tiene que realizarse en la presente invención está en el intervalo de 0°C - 30°C y el tiempo de tratamiento preferido está en el intervalo de dos minutos a una hora.

### 50 Ejemplo 3 (Referencia)

Repitiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se cultivaron células epiteliales de córnea de conejo normales en el mismo soporte de cultivo celular, excepto que el medio se cambió al medio ordinario de Green et al. que contenía mitomicina C (DMEM+AB (para preparar una capa de alimentación); para células epiteliales queratinizadas neonatales humanas). Como resultado, las células epiteliales de la córnea en el material de soporte de cultivo celular se adherían y crecían normalmente en el área circular central, y la capa celular incluso se estratificaba. En el día 16 del cultivo, las células se incubaron y refrigeraron a 20°C durante 30 minutos junto con el material de soporte de cultivo celular, tras lo cual se desprendió la lámina celular epitelial de la córnea estratificada. La lámina celular epitelial de la córnea estratificada (estructura tridimensional) desprendida era de forma circular y retenía la estructura intercelular de desmosoma y la proteína tipo membrana basal entre la célula y el sustrato para tener una resistencia adecuada como lámina individual.

### Ejemplos comparativos 1 y 2

Se prepararon materiales de soporte de cultivo celular como en el Ejemplo 1, excepto en que la solución de monómero para preparar el soporte de cultivo celular en el Ejemplo 1 se ajustó al 5% (Ejemplo comparativo 1) o al 60% (Ejemplo comparativo 2). La cobertura resultante sobre los soportes de cultivo celular fue respectivamente de

0,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Ejemplo comparativo 1) y de 6,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Ejemplo comparativo 2). Después de ello, se cultivaron células epiteliales de córnea de conejo normal por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 y se hizo un intento de desprenderlas. Como resultado, las células en el soporte del Ejemplo comparativo 1 fueron difíciles de desprender incluso si se les daba el tratamiento a baja temperatura; por otro lado, las células fueron difíciles de adherir al soporte del Ejemplo comparativo 2 y, por tanto, fue difícil cultivarlas satisfactoriamente. Por tanto, ninguno de los soportes de cultivo celular comparativos se prefirió como sustrato celular.

#### Ejemplo 4

Se recubrieron células endoteliales de la córnea de una córnea de conejo por el método habitual. La placa de cultivo del Ejemplo 1 que se había injertado con poliisopropilamida (PIPAAM) se inoculó con esas células a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/ $\text{cm}^2$  y se realizó el cultivo por el método habitual (medio usado: DMEM que contenía suero de ternera fetal al 10%; 37°C en  $\text{CO}_2$  al 5%). De nuevo, las células endoteliales de la córnea se adherieron normalmente y crecieron solamente en el área circular central. Diez días después, se confirmó que las células endoteliales de la córnea habían llegado a ser confluyentes; después de ello, como en el Ejemplo 1, se colocó una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de  $\phi$  2 cm sobre las células cultivadas y el medio de cultivo, aspirando suavemente, se sometieron a incubación y refrigeración a 20°C durante 30 minutos junto con el material de soporte de cultivo celular, tras lo cual las células se desprendieron junto con la membrana subyacente. La membrana subyacente podía extraerse fácilmente de la lámina celular. La lámina celular desprendida de este modo retenía la estructura intercelular de desmosoma y la proteína tipo membrana basal entre la célula y el sustrato y tenía resistencia adecuada como lámina individual.

#### Ejemplo 5

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 2 para preparar un material de soporte de cultivo celular, excepto que se puso una máscara metálica circular que tenía un diámetro de 2 cm en el centro de la placa de cultivo, se inmovilizó PIPAAm alrededor de la máscara, después se superpuso una máscara metálica con un orificio central que tenía un diámetro de 2 cm, haciendo de este modo que el material de soporte de cultivo celular tuviera la poli(acrilamida inmovilizada en el área central (como en el Ejemplo 1, excepto que la capa polimérica interna estaba colocada fuera y la capa polimérica externa, dentro). La cobertura de PIPAAm fuera del orificio fue de 2,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Posteriormente, se recuperaron células endoteliales de córnea de una córnea de conejo por el método habitual. La placa de cultivo del Ejemplo 1 que se había injertado con poliisopropilamida (PIPAAM) se inoculó con esas células a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/ $\text{cm}^2$  y se realizó el cultivo por el método habitual (medio usado: DMEM que contenía suero de ternera fetal al 10%; 37°C en  $\text{CO}_2$  al 5%). De nuevo, las células endoteliales de la córnea se adherieron normalmente y crecieron solamente en el área circular central. Diez días después, se confirmó que las células endoteliales de la córnea habían llegado a ser confluyentes; después de ello, como en el Ejemplo 1, se colocó una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de  $\phi$  2 cm sobre las células cultivadas y el medio de cultivo, aspirando suavemente, se sometieron a incubación y refrigeración a 20°C durante 30 minutos junto con el material de soporte de cultivo celular, tras lo cual las células se desprendieron junto con la membrana subyacente. La membrana subyacente podía extraerse fácilmente de la lámina celular. La lámina celular desprendida de este modo retenía la estructura intercelular de desmosoma y la proteína tipo membrana basal entre la célula y el sustrato y tenía resistencia adecuada como lámina individual.

#### Ejemplo 6 (Referencia)

La lámina celular epitelial de córnea sobre la placa de cultivo del Ejemplo 2 de la cual se había retirado suavemente el medio sin refrigeración se superpuso inmediatamente con la lámina celular epitelial de córnea desprendida en el Ejemplo 1. Después de ello, el medio de cultivo usado en el Ejemplo 3 se colocó suavemente para desprender la membrana polimérica del estrecho contacto con la lámina celular. Mantenedas de este modo, las células se cultivaron durante 2 días para preparar una lámina estratificada (estructura tridimensional) de células epiteliales de córnea. A la lámina estratificada de células epiteliales de córnea se le aplicó el mismo tratamiento de baja temperatura que en Ejemplo 3, tras lo cual se desprendió de la superficie del soporte. La lámina estratificada (estructura tridimensional) de células epiteliales de córnea así desprendida tenía resistencia satisfactoria como lámina individual.

#### Ejemplo 7 (Referencia)

La lámina celular endotelial de córnea sobre la placa de cultivo del Ejemplo 4 de la cual se había retirado suavemente el medio sin refrigeración se superpuso inmediatamente con la lámina estratificada de células epiteliales de córnea que se había desprendido en el Ejemplo 3. Después de ello, el medio de cultivo usado en el Ejemplo 3 se colocó suavemente para desprender la membrana polimérica del estrecho contacto con la lámina celular. Mantenedas de este modo, las células se cultivaron durante 2 días para preparar una lámina estratificada (estructura tridimensional) de células epiteliales de córnea que tenía la capa celular endotelial de córnea. A la lámina estratificada de células epiteliales de córnea se le aplicó el mismo tratamiento de baja temperatura que en Ejemplo 3, tras lo cual se desprendió de la superficie del soporte. La estructura tridimensional desprendida, que retenía la estructura intercelular de desmosoma y la proteína tipo membrana basal entre las células y el sustrato, tenía

resistencia satisfactoria como lámina individual.

Ejemplo 8 (Referencia)

5 La lámina celular endotelial de córnea sobre la placa de cultivo del Ejemplo 4 de la cual se había retirado suavemente el medio sin refrigeración se alimentó con un medio que contenía colágeno disuelto tipo IV al 5% (el mismo medio que el usado en el Ejemplo 4, excepto que contenía colágeno), y se dejó reposar tal cual durante 20 minutos. Después de ello, el medio se retiró suavemente de nuevo sin refrigeración. La lámina celular endotelial de  
 10 córnea restante sobre la placa de cultivo se superpuso inmediatamente con la lámina estratificada de células epiteliales de córnea que se había desprendido en el Ejemplo 3. Después de ello, el medio de cultivo usado en el Ejemplo 3 se colocó suavemente para desprender la membrana polimérica del estrecho contacto con la lámina celular. Mantenidas de este modo, las células se cultivaron durante 2 días para preparar una lámina estratificada (estructura tridimensional) de células epiteliales de córnea que tenía la capa celular endotelial de córnea. A la lámina  
 15 estratificada de células epiteliales de córnea se le aplicó el mismo tratamiento de baja temperatura que en el Ejemplo 3, tras lo cual se desprendió de la superficie del soporte. La estructura tridimensional desprendida tenía resistencia satisfactoria como lámina individual.

Ejemplo 9 (Referencia)

20 La lámina celular epitelial conjuntiva perforada sobre la placa de cultivo del Ejemplo 5 de la cual se había retirado suavemente el medio sin refrigeración se superpuso de forma parcial inmediatamente con la lámina estratificada (estructura tridimensional) de células epiteliales de córnea que tenían la capa celular endotelial de córnea que se había desprendido en el Ejemplo 7. Después de ello, el medio de cultivo usado en el Ejemplo 3 se colocó suavemente para desprender la membrana polimérica del estrecho contacto con la lámina celular. Mantenidas de  
 25 este modo, las células se cultivaron durante 2 días para preparar una lámina estratificada (estructura tridimensional) de células epiteliales de córnea que tenía la capa celular endotelial de córnea a la cual se había adherido la lámina celular epitelial conjuntiva. A la estructura tridimensional obtenida se le aplicó el mismo tratamiento de baja temperatura que en el Ejemplo 3, tras lo cual se desprendió de la superficie del soporte. La estructura tridimensional desprendida tenía resistencia satisfactoria como lámina individual.

Ejemplo 10 (Referencia)

La lámina estratificada (estructura tridimensional) de células epiteliales de córnea obtenida en el Ejemplo 3 se injertó en un conejo deficiente de una parte de las células epiteliales de la córnea de acuerdo con el método habitual.  
 35 Después del injerto, la lámina estratificada de células epiteliales de córnea se suturó al sitio de la herida. Aproximadamente 3 semanas después, la sutura se retiró y la lámina estratificada de células epiteliales de córnea tenía buen aspecto sobre el globo ocular.

A partir de los resultados anteriores, queda claro que usando el procedimiento de la presente invención, puede fabricarse satisfactoriamente láminas robustas únicamente a partir de células intraoculares. Se cree que esto proporciona una técnica muy eficaz para reducir la carga en pacientes haciendo el protocolo de tratamiento más eficaz, y para construir tejidos incluso más precisos.

**Aplicabilidad industrial**

45 Las láminas celulares relacionadas con el segmento ocular anterior de la presente invención no descomponen E-cadherina o laminina 5, en oposición al caso del tratamiento con dispasa, y además tienen cantidades extremadamente pequeñas de defectos estructurales, teniendo de este modo un gran potencial para su uso en aplicaciones clínicas incluyendo injerto cutáneo. Por tanto, la presente invención ha demostrado ser muy útil en los  
 50 campos médico y biológico tal como ingeniería celular e ingeniería médica.



**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para producir una lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior, que comprende las etapas de:
- 5 cultivar células relacionadas con el segmento ocular anterior en un soporte de cultivo celular que comprende un sustrato que tiene su superficie cubierta con un polímero sensible a temperatura que tiene una temperatura de disolución crítica superior o inferior de 0-80°C con respecto al agua, para formar una lámina celular de células relacionadas con el segmento ocular anterior,
- 10 ajustar la temperatura de la solución de cultivo hasta por encima de la temperatura de disolución crítica superior o hasta por debajo de la temperatura de disolución crítica inferior,
- poner la lámina celular de células relacionadas con el segmento ocular anterior en estrecho contacto con una membrana polimérica,
- 15 desprender la lámina celular de células relacionadas con el segmento ocular anterior junto con la membrana polimérica del soporte de cultivo celular sin tratamiento con proteinasa,
- donde:
- 20 las células relacionadas con el segmento ocular anterior son células endoteliales de la córnea; el polímero sensible a temperatura es poli(N-isopropilacrilamida); y la membrana polimérica está hecha de difluoruro de polivinilideno convertido en hidrófilo.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde una cobertura del polímero sensible a temperatura está en el intervalo de 0,8 a 3,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .
- 25 3. Una lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior que se puede obtener por proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. La lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior de acuerdo con la reivindicación 3, donde la lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior está en estrecho contacto con la membrana polimérica hecha de difluoruro de polivinilideno convertido en hidrófilo.
- 30 5. La lámina celular relacionada con el segmento ocular anterior de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de un sitio enfermo en que parte o todo el tejido del segmento ocular anterior se ha dañado o ha llegado a ser deficiente.