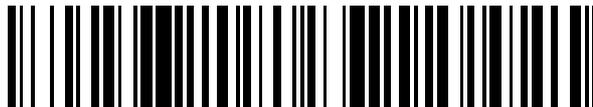


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 696**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/38** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 11/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2004 E 04708896 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 1602383**

54 Título: **Láminas de células para la formación de la ectocórnea, método para producir las mismas y método para usar las mismas**

30 Prioridad:

**06.02.2003 JP 2003068899**

**14.02.2003 JP 2003079100**

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

**23.06.2015**

73 Titular/es:

**CELLSEED INC. (50.0%)  
3-61, Haramachi, Shinjuku-ku  
Tokyo 162-0053, JP y  
NISHIDA, KOHJI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OKANO, TERUO;  
NISHIDA, KOHJI y  
YAMATO, MASAYUKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 538 696 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 de células para la formación de la ectocórnea, método para producir las mismas y método para usar las mismas

5

**Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere a las láminas de células que forman el epitelio corneal tal como se define en la reivindicación 1 en biología, medicina y otros campos, así como a los procesos para producir dichas láminas y métodos terapéuticos que las usan.

10

**Técnica anterior**

Junto con los marcados avances en la tecnología médica, la realización de trasplantes de órganos, es decir, el reemplazo de un órgano difícil de tratar por el órgano de otra persona, se ha vuelto popular recientemente. Los órganos que pueden trasplantarse son muy diversos e incluyen la piel, la córnea, el riñón, el hígado y el corazón, y además, el progreso postoperatorio de los trasplantes de órganos ha mejorado tan notablemente que ya se han establecido como un procedimiento médico. La queratoplastia es un ejemplo y ya hace 40 años, se organizó un banco ocular en Japón para comenzar las actividades de trasplante. Sin embargo, hasta ahora, el número de donantes en Japón es muy pequeño y, a pesar del hecho de que anualmente existen aproximadamente 20000 pacientes que necesitan una queratoplastia, solamente una décima parte de ellos (aproximadamente 2000 en número) pueden tratarse realmente mediante ese procedimiento. Aunque la queratoplastia es un procedimiento prácticamente establecido, soporta del problema de la falta de donantes, lo que da lugar a la necesidad del desarrollo de un procedimiento médico de última generación.

15

20

25

Con estos antecedentes, se ha prestado atención al procedimiento del trasplante directo de sustitutos artificiales o células que se cultivaron en un montaje. 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 pueden hacer que estos sean indeseables como injertos de piel. Por otro lado, la piel cultivada se prepara cultivando una parte de la piel normal del paciente hasta que esta crece a un tamaño deseado, de modo que pueda usarse sin el riesgo de causar rechazo y cualquier otro efecto secundario y pueda describirse bien como el agente enmascarante más natural.

30

De modo convencional, dicho cultivo celular se ha realizado ya sea sobre la superficie de vidrio o sobre la superficie de polímeros sintéticos que se sometieron a una serie de tratamientos. Por ejemplo, una serie de recipientes de poliestireno que se sometieron a tratamientos de superficie tales como la irradiación con rayos  $\gamma$  y el recubrimiento de silicona se han vuelto populares para su uso en el cultivo celular. Las células que se han cultivado para que crezcan en esos recipientes para cultivos se han despegado y han recubierto las superficies de los recipientes mediante un tratamiento con proteinasas tales como la tripsina o con reactivos químicos.

35

40

Sin embargo, se ha señalado que la recuperación de las células que han crecido mediante el tratamiento con reactivos químicos implica algunas desventajas tales como las etapas de procesamiento, complicándose hasta el aumento de las posibilidades de contaminación por impurezas y el crecimiento de células que se desnaturalizan o se dañan por el tratamiento químico teniendo sus funciones inherentes dañadas. Con el fin de superar estas desventajas, se han propuesto varias técnicas hasta la fecha.

45

El documento JP 2-23191 B describe un método para producir una membrana trasplantable de tejido queratinoso que comprende las etapas de cultivar células epidérmicas queratinizadas neonatales humanas en un recipiente de cultivo en condiciones que permitan que se forme una membrana de tejido queratinoso en la superficie del recipiente y que se despegue la membrana de tejido queratinoso usando una enzima. Específicamente, cuando se usan células 3T3 como capa nodriza, las células epidérmicas crecen y se estratifican como una lámina de células que se recupera usando la proteinasa dispasa. Sin embargo, el método descrito en el documento JP 2-23191 B tiene los siguientes defectos.

50

- (1) La dispasa es de origen microbiano y la lámina de células recuperada necesita un lavado exhaustivo.
- (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 que se ha injertado la lámina de células es propenso a la infección.

55

60

Además de estos defectos del método de la técnica anterior, se contempla en la presente invención que las células relacionadas con el segmento anterior, tales como las células epiteliales corneales, las células endoteliales corneales, y las células epiteliales conjuntivas, no tienen una unión intercelular tan fuerte como las células dérmicas y tienen el problema de que las células cultivadas no pueden despegarse y recuperarse como una sola lámina incluso si se emplea la dispasa.

65

Con el fin de resolver este problema, se ha ideado recientemente una técnica, de acuerdo con la cual se cultivan las células epiteliales corneales o células epiteliales conjuntivas montadas sobre un amnion desprovisto de la capa esponjosa y la capa epitelial y el montaje se usan como un injerto celular junto con el amnion (documento JP 2001-161353 A). Dado que el amnion tiene la fuerza adecuada como una membrana pero no tiene antigenicidad, es favorable como un soporte de injertos celulares; sin embargo, el amnion no está inherentemente en el ojo y con el fin de construir un tejido intraocular más preciso, se desea la preparación de una lámina fuerte satisfactoria solamente a partir de las células intraoculares y que la lámina tenga contacto directo con el tejido estromal corneal.

En la Solicitud de Patente Japonesa N°. 2001-226141, se cultivan células relacionadas con el segmento anterior en un soporte de cultivo celular que comprende un sustrato que tiene su superficie recubierta con un polímero que responde a la temperatura que tiene una temperatura crítica inferior o superior de 0-80 °C a la que se disuelve en agua y, en caso necesario, la capa de células cultivadas se estratifica por el método habitual y la lámina de células cultivadas se despegan simplemente cambiando la temperatura del soporte. La lámina de células despegada tiene la fuerza adecuada. También retiene una proteína similar a la membrana basal y, en comparación con la lámina de células recuperada por el tratamiento con dispasa que se describe anteriormente, obviamente se establece mejor en el tejido. Sin embargo, considerando la necesidad de reducir la verdadera carga sobre los pacientes, se desea una mejora adicional del establecimiento.

Recientemente, también se han propuesto varios métodos en la organización clínica. Por ejemplo, el documento WO 98/31316 ha propuesto una técnica que utiliza una lámina de células epiteliales corneales cultivadas en el tratamiento de la miopía mediante el método PRK o el método LASIK. Sin embargo, la lámina de células epiteliales corneales descrita en el documento WO 98/31316 se ha despegado mediante tratamiento con dispasa y tiene el problema de que se adhiere demasiado poco al tejido corneal extirpado con láser de modo que no se puede alcanzar una eficacia terapéutica significativa.

Lindeberg K. *et al.*, 1993 describe células epiteliales corneales cultivadas, que crecen en láminas de células que consisten en capas de células epiteliales. El documento no describe una lámina de células en contacto con un transportador anular.

Schwab IR., 1999 divulga células madre epiteliales cultivadas en el estroma corneal o en la membrana amniótica. Las células cultivadas se usaron para el trasplante en ojos lesionados en modelos animales y en seres humanos. El documento no describe una lámina de células en contacto con un transportador anular.

El documento WO 99/37752 describe una matriz de córnea artificial que comprende un endotelio en contacto con la matriz estromal. El documento no describe una lámina de células en contacto con un transportador anular.

Kinoshita Shigeru, 2002 describe el cultivo de células madre epiteliales sobre la membrana amniótica, así como un epitelio de a mucosa oral cultivado. El documento no describe una lámina de células en contacto con un transportador anular.

En un nuevo artículo del 10 de mayo de 2001 expedido en el Mainichi, se propuso una técnica mediante la cual se pegó una mucosa oral cultivada en lugar de la córnea en un paciente que padecía una enfermedad corneal con vistas a promover la regeneración de la córnea del paciente. Sin embargo, la mucosa oral cultivada notificada en el artículo se despegó mediante tratamiento con dispasa y tenía el problema de que se adhirió demasiado poco al tejido corneal del paciente de modo que no se podría alcanzar una eficacia terapéutica significativa.

La presente invención se ha llevado a cabo con vistas a resolver los problemas anteriormente mencionados de la técnica anterior. Por lo tanto, la presente invención tiene como objeto proporcionar una lámina de células formadoras del epitelio corneal que se adhiera bien a un segmento anterior del tejido. Otros objetos de la presente invención son proporcionar un proceso para producir la lámina de células y un método para usarla.

### Sumario de la invención

Con el fin de lograr los objetivos establecidos, los presentes inventores se ocuparon de actividades de I+D abordando diversos ángulos de estudio. Como resultado, los inventores descubrieron que podría obtenerse una lámina de células formadoras del epitelio corneal que se pudiera adherir muy bien a un tejido mediante un proceso que comprende las etapas de cultivar las células formadoras del epitelio corneal en condiciones específicas en un soporte de cultivo celular que comprende un sustrato que tiene su superficie recubierta con un polímero especificado que responda a la temperatura, ajustar posteriormente la temperatura de la solución de cultivo bien por encima de una temperatura crítica de disolución superior o por debajo de una temperatura crítica de disolución inferior, llevar la lámina de células formadoras del epitelio corneal a un contacto íntimo con un transportador anular, y despegar la lámina junto con el transportador mientras que se tiene cuidado de inhibir la contracción de la lámina. La presente invención se ha llevado a cabo sobre la base de este hallazgo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona primero una lámina de células formadoras del epitelio corneal que se adherirá bien a un segmento anterior del tejido y que se ha llevado a un contacto íntimo con un transportador, tal

como se define en la reivindicación 1.

La presente invención también proporciona un proceso para producir una lámina de células formadoras del epitelio corneal que se adherirá muy bien a un tejido vivo, que comprende las etapas de cultivar las células formadoras del epitelio corneal en un soporte de cultivo celular que comprende un sustrato que tiene su superficie cubierta con un polímero que responde a la temperatura en el cual varía la fuerza de hidratación en un intervalo de temperatura de 0-80 °C, estratificando opcionalmente la capa de células cultivadas mediante el método habitual, y posteriormente,

- (1) ajustando la temperatura de la solución de cultivo bien por encima de una temperatura crítica de disolución superior o por debajo de una temperatura crítica de disolución inferior,
- (2) llevar las células formadoras del epitelio corneal a un contacto íntimo con un transportador anular, y
- (3) despegar la lámina junto con el transportador.

Además, la presente invención proporciona la lámina de células formadoras del epitelio corneal anteriormente descrita que se adherirá muy bien a un tejido vivo para el uso en un método de tratamiento de un tejido que se ha vuelto deficiente y/o está herido en un área más profunda.

Aún más, la presente solicitud describe una lámina de células formadoras del epitelio corneal que es útil no solamente en el campo de la medicina sino también como células para la evaluación de la seguridad de sustancias químicas, venenos o medicamentos.

#### **Modos de realización de la invención**

Tal como se describe anteriormente, la presente invención proporciona una lámina de células formadoras del epitelio corneal en contacto íntimo con un transportador anular tal como se define en la reivindicación 1. La expresión "lámina de células formadoras del epitelio corneal" tal como se usa en el presente documento cubre no solamente una lámina de células epiteliales corneales regenerada a partir de células epiteliales corneales sino también una lámina de células del epitelio corneal sustitutas formada a partir de células distintas a las epiteliales corneales.

Si se usa una lámina de células epiteliales corneales regenerada como la lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención, las células epiteliales corneales y las células madre de las mismas pueden mencionarse como células adecuadas para su uso, pero el tipo de células aplicables no se limita por ningún medio.

Si se usa una lámina de células epiteliales corneales sustitutas como la lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención, las células de la mucosa oral presentes en la membrana bucal o la gingival, las células de la raíz pilosa o las células epiteliales conjuntivas pueden mencionarse como células adecuadas para su uso; esas células pueden tomarse individualmente o en una mezcla de dos o más tipos o en una mezcla de las mismas con células epiteliales corneales, pero el tipo de células aplicables no se limitará por ningún medio. Cuando se preparan esas láminas de células, no existe la necesidad de añadir ningún aditivo especial durante el cultivo de las células del epitelio corneal sustitutas y si se usan células de la mucosa oral como células del epitelio corneal sustitutas, estas deben cultivarse por métodos convencionales de cultivo de células de la mucosa oral para preparar una lámina de células cultivadas y similares.

En el contexto de la presente invención, la lámina de células formadoras del epitelio corneal puede ser una monocapa o estar estratificada. Por lo tanto, en el caso en el que sea una lámina de células epiteliales corneales regeneradas, se incluyen tanto las láminas de monocapa como las de células epiteliales corneales regeneradas estratificadas; y en el caso de una lámina de células epiteliales corneales sustitutas, se incluyen tanto las láminas de monocapa como las de células epiteliales corneales sustitutas estratificadas. En otras palabras, la lámina de células formadoras del epitelio corneal puede ser cualquiera de las láminas de monocapa y estratificadas de células epiteliales corneales regeneradas o células de epitelio corneal sustitutas.

En la presente invención, la lámina de células corneales regeneradas quiere decir que una lámina se obtiene una lámina cultivando una monocapa de las diversas células anteriormente descritas en un soporte de cultivo celular y posteriormente despegando la capa del soporte; la capa estratificada quiere decir que se obtiene una lámina estratificando la lámina de células epiteliales corneales regenerada bien por sí misma o en combinación con una lámina o láminas de otras células.

Además, en la presente invención, la lámina de células corneales sustitutas quiere decir que se obtiene una lámina cultivando una monocapa de las diversas células anteriormente descritas en un soporte de cultivo celular y posteriormente despegando la capa del soporte; la capa estratificada quiere decir que se obtiene una capa estratificando la lámina de células epiteliales corneales sustitutas bien por sí misma o en combinación con una lámina o láminas de otras células.

La lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención es tal que no se ha dañado durante el cultivo por proteinasas tipificadas por la dispasa y la tripsina. Por lo tanto, la lámina de células formadoras del epitelio corneal que se ha despegado del sustrato retiene la estructura intercelular de desmosomas, tiene solamente unos

pocos defectos estructurales y características de fuerza altas. Además, la lámina de la presente invención se caracteriza por que la proteína similar a la membrana basal que se forma entre la célula y el sustrato durante el cultivo no se ha destruido por ninguna enzima. Por lo tanto, la lámina puede pegarse satisfactoriamente al tejido vivo del sitio enfermo en el que se ha injertado y esto permite que se realice un tratamiento eficaz. Esta propiedad de adherirse muy eficazmente a tejidos vivos se denomina "alta adherencia" en la presente invención.

Esto se describe más adelante de un modo más específico. Si se emplea una proteinasa común tal como la tripsina, la estructura intercelular de desmosomas y la proteína similar a la membrana basal entre las células y el sustrato quedan fuertemente retenidas y, por lo tanto, la lámina de células se despegar con las células separadas en masas discretas. Como para la proteinasa dispasa, la lámina de células puede despegarse con una retención del 10-60 % de la estructura de desmosomas intercelular; sin embargo, casi toda la proteína similar a la membrana basal entre las células y el sustrato se destruye y la lámina de células obtenida solamente tiene una fuerza baja. Por el contrario, la lámina de células de la presente invención mantiene al menos el 80 % de cada una de las estructuras de desmosomas y la proteína similar a la membrana basal intactas, proporcionando de ese modo las diversas ventajas anteriormente descritas. Por lo tanto, la propiedad anteriormente mencionada de "alta adherencia" se refiere estructuralmente a un estado donde al menos el 80 % de la estructura de desmosomas y/o la proteína similar a la membrana basal se mantiene intacta.

La lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención muestra un muy buen establecimiento o una "alta adherencia" al segmento anterior del tejido que es un tejido vivo. Los presentes inventores han descubierto que con el fin de mostrar esta propiedad, también es necesario evitar la contracción de la lámina de células epiteliales corneales regeneradas, bien en una monocapa o estratificada, en cuanto esta se despegar de la superficie del soporte. De modo deseable, la contracción de la lámina de células formadora del epitelio corneal no es superior al 20 % de la longitud en cualquiera de las direcciones de la lámina, preferentemente el 10 % o inferior, y más preferentemente el 5 % o inferior. Si la contracción es superior al 20 % de la longitud en cualquiera de las direcciones de la lámina, la lámina de células despegada quedará holgada; en dicho estado de holganza, la lámina no puede llevarse a un contacto íntimo con el tejido vivo y el "buen establecimiento" pretendido por la presente invención no será obtenible.

Como el método de inhibición de la contracción de la lámina de células formadoras del epitelio corneal se coloca un transportador anular con un corte en el centro en contacto íntimo con la lámina de células formadoras del epitelio corneal, que después de despegar del soporte junto con el transportador.

El transportador que se colocará en contacto íntimo con la lámina de células del epitelio corneal es una estructura que impide que la lámina de células de la presente invención se contraiga y se realiza por medio de una membrana polimérica o una estructura moldeada a partir de una membrana polimérica, o un accesorio de fijación metálico. Si se usa un polímero como el material transportador, este se selecciona a partir de difluoruro de polivinilideno (PVDF), polipropileno, polietileno, celulosas, derivados de celulosa, papeles, quitina, quitosano, colágeno o uretano.

La expresión "contacto íntimo" tal como se usa en el presente documento, se refiere a dicho estado en el que la lámina de células no se contrae mediante el deslizamiento o el movimiento sobre el transportador a lo largo de la interfase entre la lámina de células y el transportador; las dos membranas pueden colocarse en contacto íntimo uniéndose físicamente o con un líquido interviniente (por ejemplo, la solución de cultivo u otro fluido isotónico) entre las mismas.

La forma del transportador es tal que si la lámina de células formadoras del epitelio corneal se injerta junto con un transportador que tenga un corte en un área seleccionada que sea de aproximadamente el mismo tamaño o mayor que el sitio del injerto, se ofrece una gran conveniencia, ya que la lámina de células se fija solamente a la periferia del corte y solamente es necesario presionar a través de este en contacto con el sitio del injerto.

La lámina de células de la presente invención se obtiene inoculando las células formadoras del epitelio corneal sobre una superficie de sustrato y, posteriormente, cultivándolas durante un periodo no superior a 21 días, preferentemente no superior a 15 días, más preferentemente no superior a 10 días, después de que las células alcancen la confluencia sobre la superficie del sustrato. Si el periodo de cultivo es superior a 21 días después de que las células alcancen la confluencia, la actividad de las células de la capa más inferior de la lámina de células formadoras de epitelio corneal despegada se cae y, por consiguiente, disminuye la adherencia de la lámina con el resultado de que el "buen establecimiento" que caracteriza la presente invención no es obtenible.

La lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención puede usarse para tratar no solamente los sitios enfermos donde el segmento anterior se ha dañado parcial o totalmente o que son deficientes tal como en la erosión corneal y la úlcera corneal, sino también en las enfermedades binoculares conjuntivas refractarias sin células epiteliales corneales. El segmento anterior del tejido, tal como se menciona en la presente invención no se limita de cualquier modo particular, en tanto este se asocia con el segmento anterior sino que generalmente incluye el tejido epitelial corneal, la junta de Bowman y el tejido estromal corneal. Las enfermedades conjuntivas refractarias incluyen, tal como se menciona anteriormente, por ejemplo, el síndrome de Stevens-Johnson, el pérfino ocular, el ardor, la corrosión alcalina y la corrosión ácida.

Tal como se describe anteriormente, la lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención es una lámina de células que puede adherirse muy eficazmente al segmento anterior del tejido que es un tejido vivo y no ha sido en absoluto posible obtenerla mediante la técnica anterior.

5 La presente invención también proporciona un proceso para producir la lámina de células formadoras del epitelio corneal de la invención anteriormente descrita. Brevemente, esta proporciona un proceso para producir una lámina de células formadoras del epitelio corneal, que comprende las etapas de cultivar las células formadoras del epitelio corneal en un soporte de cultivo celular que comprende un sustrato que tiene su superficie cubierta con un polímero que responde a la temperatura en el cual varía la fuerza de hidratación en un intervalo de temperatura de 0 -80 °C, estratificando opcionalmente la capa de células cultivadas mediante el método habitual, y posteriormente,

- (1) ajustando la temperatura de la solución de cultivo bien por encima de una temperatura crítica de disolución superior o por debajo de una temperatura crítica de disolución inferior,
- 15 (2) llevar las células formadoras del epitelio corneal a un contacto íntimo con un transportador anular tal como se describe anteriormente y
- (3) despegar la lámina junto con el transportador.

La lámina de células formadoras del epitelio corneal obtenida por este método se caracteriza por tener una "alta adherencia" a los tejidos vivos.

20 El polímero que responde a la temperatura que se usa para cubrir el sustrato del soporte de cultivo celular se caracteriza por que su poder hidratante varía en un intervalo de temperatura de 0-80 °C, más preferentemente de 20 -50 °C. Una versión de este polímero que responde a la temperatura es tal que tiene una temperatura crítica de disolución superior o inferior de 0 °C - 80 °C, más preferentemente de 20 °C - 50 °C, en una solución acuosa. Más allá de los 80 °C, las células pueden morir, lo que no es preferente. Por debajo de los 0 °C, la velocidad de crecimiento generalmente caerá hasta un grado extremo o las células morirán, lo que tampoco es preferente.

En la presente invención, la lámina de células formadoras del epitelio corneal se somete preferentemente a un tratamiento de baja temperatura de modo que se despegar del soporte de cultivo celular. Para el tratamiento de baja temperatura que se realizará en la presente invención, las condiciones de temperatura preferentes están en el intervalo de 0 °C - 30 °C y el tiempo de tratamiento preferente está en el intervalo de dos minutos a una hora; debería tenerse en cuenta, sin embargo, que estos no son los únicos ejemplos de la temperatura y el tiempo que pueden emplearse en la invención. Un ejemplo de condiciones preferentes para el tratamiento de baja temperatura es de 30 min de incubación a 20 °C.

35 El polímero que responde a la temperatura que se usará en la presente invención puede ser un homopolímero o un copolímero. Los ejemplos de dichos polímeros incluyen los polímeros que se describen en el documento JP 2-211865 A. Específicamente, estos se obtienen mediante la homo- o la copolimerización de los siguientes monómeros. Los monómeros que pueden usarse incluyen, por ejemplo, compuestos de (met)acrilamida, derivados de (met)acrilamida con N- (o N,N-di) alquilo sustituido y derivados de éter vinílico; en el caso de los copolímeros, pueden usarse cualquiera de dos o más de esos monómeros. Además, esos monómeros pueden copolimerizarse con otros monómeros, o los polímeros pueden injertarse conjuntamente o copolimerizarse, o como alternativa, pueden emplearse mezclas de polímeros y copolímeros. Si se desea, los polímeros pueden reticularse hasta el grado en el que no se alteren sus propiedades.

40 El sustrato que se cubrirá con el polímero que responde a la temperatura puede elegirse de entre el vidrio, vidrio modificado, compuestos tales como el poliestireno y el poli(metilmetacrilato) y el resto de las sustancias que pueden moldearse generalmente, tal como se ejemplifica por los compuestos poliméricos distintos a esos compuestos y cerámicas.

50 El método de recubrimiento del soporte con el polímero que responde a la temperatura no se limita de ningún modo particular pero pueden seguirse los métodos descritos en el documento JP 2-211865 A. Específicamente, la operación de recubrimiento puede alcanzarse bien sometiendo al sustrato y a los monómeros o a los polímeros anteriormente mencionados a la exposición a haces de electrones (HE), irradiación con rayos  $\gamma$ , irradiación ultravioleta, tratamiento con plasma, tratamiento corona y reacción de polimerización orgánica o por medio de la adsorción física tal como se efectúa mediante la aplicación de soluciones de recubrimiento o la etapa de amasado.

60 La cobertura del polímero que responde a la temperatura está adecuadamente en el intervalo de 0,4-4,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , preferentemente de 0,7-3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , más preferentemente de 0,9-3,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Si la cobertura del polímero que responde a la temperatura está adecuadamente en el intervalo de 0,2-4,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , las células del polímero no se despegarán fácilmente incluso si se les somete a un estímulo dado y disminuye considerablemente la eficacia de funcionamiento, lo que no es preferente. Si, por otro lado, la cobertura del polímero que responde a la temperatura es superior a 4,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , las células no se adherirán fácilmente al área cubierta y la adhesión adecuada de las células se vuelve difícil de lograr.

65 La morfología del soporte de la presente invención no se limita de ningún modo particular y puede ejemplificarse

mediante una placa, una placa múltiple, un matraz o un injerto celular. Entre estos, un injerto celular es particularmente ventajoso ya que usándolo, las células nodriza 3T3 que son necesarias para estratificar las células epiteliales corneales pueden cultivarse separadas de las células epiteliales corneales. En este caso, las células epiteliales corneales pueden estar presentes en el injerto celular o en el lado de una placa en el que se instalará el inserto celular, dado que al menos la superficie en la que se cultivarán las células epiteliales corneales está cubierta con el polímero que responde a la temperatura.

En la presente invención, el cultivo celular se efectúa en el soporte de cultivo celular que se ha preparado del modo anteriormente descrito. La temperatura del medio de cultivo no se limita de cualquier modo en particular, excepto por que depende de si el polímero anteriormente mencionado con el que se ha cubierto la superficie del sustrato tiene una temperatura crítica de disolución superior o una temperatura crítica de disolución inferior; en el primer caso, la temperatura del medio no debería ser mayor que la temperatura crítica de disolución superior y en este último caso, no debería ser menor que la temperatura crítica de disolución. No es necesario decir que es inapropiado realizar el cultivo en un intervalo de temperatura inferior en el que las células cultivadas no crecerán o en un intervalo de temperatura superior en el que las células cultivadas morirán. Las condiciones del cultivo distintas a la temperatura pueden ser tales como las que se adoptan en el método habitual y no están limitadas de ningún modo particular. Por ejemplo, el medio de cultivo a usar puede ser uno que esté complementado con suero tal como el suero fetal de ternera (FCS) conocido; como alternativa, este puede estar libre de suero.

En el proceso de la presente invención, las células cultivadas pueden despegarse y recuperarse a partir del material de soporte llevando primero las células formadoras del epitelio corneal a un contacto íntimo con el transportador, ajustando después la temperatura del material de soporte con células adherentes, bien por encima de la temperatura crítica de disolución superior del polímero superpuesto sobre el sustrato del soporte o por debajo de su temperatura crítica de disolución inferior, después de lo cual pueden despegarse las células junto con el transportador. El despegue de la lámina de células puede efectuarse dentro de la solución de cultivo en la que se han cultivado las células o en otros fluidos isotónicos, lo que sea adecuado dependiendo del objetivo.

En la presente invención, en cuanto la lámina de células se presiona contra el sitio enfermo puede despojarse del transportador. El método para despojarse del transportador no se limita de ningún modo particular y puede ejemplificarse por un método en el que el transportador se humedece de modo que su adhesión a la lámina de células se hace lo suficientemente débil para permitir que se despoje el transportador o mediante un método en el que se corte el transportador mediante un medio adecuado tal como un escalpelo, tijeras, luz láser u ondas de plasma. Tómese, por ejemplo, el caso del uso de la lámina de células colocada en un contacto íntimo con el transportador anteriormente mencionado con un corte en un área seleccionada; si la lámina de células se corta a lo largo de la frontera del sitio enfermo tal como mediante luz láser, la lámina de células no se adherirá a ningún área no deseada que esté fuera del sitio enfermo, lo que es ventajoso para los fines de la invención.

El método de fijación de la lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención a un tejido vivo no se limita de ningún modo en particular; la lámina de células puede suturarse al tejido vivo; como alternativa, dado que la lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención se establecerá rápidamente sobre el tejido vivo, la lámina de células, una vez que se adhiere al sitio enfermo, no requiere sutura al organismo vivo. En este último caso, es particularmente aconsejable usar una lente de contacto para el fin específico de proteger la lámina de células trasplantada.

El método para producir una lámina estratificada que es otra realización de la presente invención no se limita de ningún modo particular, pero puede ejemplificarse por un método generalmente conocido en el que las células 3T3 crecen como una capa nodriza para efectuar la estratificación, o un método en el que la lámina de células formadoras del epitelio corneal en contacto íntimo con el transportador anteriormente mencionado se utiliza para producir una lámina estratificada. Pueden mencionarse como ejemplos los siguientes métodos específicos.

(1) Se adhiere la lámina de células en contacto íntimo con el transportador al soporte de cultivo celular y, posteriormente, se añade el medio de cultivo, de modo que el transportador se despoja de la lámina de células, a la que está adherida otra lámina de células en contacto íntimo con el transportador, repitiéndose el proceso para formar una lámina de células estratificada.

(2) La lámina de células en contacto íntimo con el transportador se invierte y se fija sobre el soporte de cultivo celular, con el lado transportador hacia abajo, y se adhiere otra lámina de células a la primera lámina de células y, posteriormente, se añade el medio de cultivo, de modo que el transportador se despoja de la lámina de células, a la que se añade otra lámina de células más, repitiéndose el proceso para formar una lámina de células estratificada.

(3) Dos láminas de células, cada una en contacto íntimo con el transportador, se mantienen unidas de tal modo que están una frente a la otra en contacto íntimo.

(4) Se presiona una lámina de células en contacto íntimo con el transportador contra el sitio enfermo de un organismo vivo de modo que se adhiera al tejido vivo y, posteriormente, se despoja el transportador y se sobrepone otra lámina de células sobre la primera lámina de células.

La lámina estratificada de la presente invención no necesariamente está hecha de células formadoras del epitelio

corneal. También es posible superponer una lámina de células endoteliales corneales y/o una lámina de células epiteliales conjuntivas que se haya preparado siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de la lámina de células formadoras del epitelio corneal que es una versión de la lámina de células formadoras del epitelio corneal. Este procedimiento es extremadamente eficaz para el fin de crear una estructura más próxima al segmento anterior de los tejidos del organismo vivo.

Con el fin de despegar y recuperar la lámina de células formadoras del epitelio corneal con un alto rendimiento, puede golpearse o agitarse ligeramente el soporte de cultivo celular o puede agitarse el medio de cultivo con la ayuda de una pipeta; pueden aplicarse estos y otros métodos bien independientemente o en combinación. Además, las células cultivadas pueden lavarse opcionalmente con un fluido isotónico o similar de modo que se despeguen para su recuperación.

El uso de la lámina de células formadoras del epitelio corneal descrita en la presente invención no se limita de ningún modo en particular y la como se ha mencionado anteriormente, puede usarse para tratar no solamente los sitios enfermos en los que el segmento anterior se ha dañado parcial o totalmente o son deficientes tal como en la erosión corneal y la úlcera corneal, sino también en las enfermedades binoculares conjuntivas refractarias sin células epiteliales corneales. Como alternativa, la lámina de células formadoras del epitelio corneal descrita en la presente invención es eficaz en los procedimientos correctores de la refracción tales como: el método PRK en el que se aplica un láser de escómeros al centro del ojo para extirpar la superficie de la córnea de modo que su poder refractivo disminuya para corregir la miopía; el método LASIK en el que la capa estromal corneal se corta a través de un espesor de 160  $\mu\text{m}$  con un microqueratomo para hacer una solapa, a la que se le da la vuelta después para extirpar la capa estromal corneal con un láser de escómeros y después de alisar su superficie, la solapa vuelve a la posición inicial; y el método LASEK en el que se vierte alcohol por goteo para suavizar la superficie de la córnea y sin usar un microqueratomo, se escinde el epitelio corneal en un espesor de 50  $\mu\text{m}$  para hacer una solapa, a la que se le da la vuelta después para extirpar la capa estromal corneal con un láser de escómeros y después de alisar su superficie, la solapa vuelve a la posición inicial.

La lámina de células formadoras del epitelio corneal obtenida por el proceso anteriormente descrito sobresale de las que se han obtenido mediante los métodos de la técnica anterior por que no es invasiva durante el despegue y tiene un gran potencial en aplicaciones clínicas, tal como se ejemplifica mediante los injertos corneales. En particular, al contrario que con las láminas de injerto convencionales, la lámina de células formadoras del epitelio corneal de la presente invención tiene un buen establecimiento en los tejidos vivos y por lo tanto se adapta muy rápidamente a los tejidos vivos. Esto no solamente contribuye a mejorar la eficacia del tratamiento de un sitio enfermo sino que también reduce la carga sobre el paciente, por lo tanto, se anticipa la materialización como una técnica muy eficaz. Téngase en cuenta que el soporte de cultivo celular usado en el proceso de la presente invención permite el uso repetido.

### **Ejemplos**

En las siguientes páginas, se describe la presente invención con más detalle mediante la referencia a los ejemplos que no están destinados a limitar el alcance de la invención por ningún medio.

#### **Ejemplo 1**

Se le aplicó a un inserto celular de 6 pocillos (FALCON 3090 fabricado por Beckton Dickinson Labware), una solución de recubrimiento que tenía un monómero de N-isopropilacrilamida disuelto en alcohol isopropílico para obtener una concentración del 30 % en un volumen de 0,08 ml. Mediante la aplicación de haces de electrones con una intensidad de 0,25 MGy, se inmovilizó un polímero de N-isopropilacrilamida (PIPAAm) en la superficie de una placa de cultivos. Después de la irradiación, la placa de cultivos se lavó con un agua de iones intercambiados para retirar el monómero residual y la PIPAAm que no se unió a la placa de cultivos; la placa de cultivos se secó después en una mesa limpia y se esterilizó con un gas de óxido de etileno para proporcionar un material de soporte de cultivo celular. Se midió la cantidad del polímero que responde a la temperatura sobre la superficie del sustrato; tal como se vio después, el sustrato se cubrió con 1,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  del polímero.

Sobre el material de soporte de cultivo celular obtenido, se cultivaron células epiteliales corneales de conejo normales mediante el método habitual (medio usado: CORNEPAK (producto de KURABO INDUSTRIES, LTD.); 37 °C con  $\text{CO}_2$  al 5 %). Como resultado, las células epiteliales corneales se adhirieron y crecieron normalmente sobre el material de soporte de cultivo celular.

En el día 7 del cultivo, las células se volvieron confluentes y después se cultivaron durante unos 7 días adicionales; se colocó un transportador moldeado a partir de una membrana de 2,1  $\text{cm}^2$  de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que tenía un corte circular de 1,5  $\text{cm}^2$  en el centro sobre las células; el medio de cultivo se aspiró con suavidad a través del corte y se sometió a un tratamiento de baja temperatura incubando y enfriando a 20 °C durante 30 minutos, junto con el material de soporte de cultivo celular, después de lo cual se despegaron las células del material de soporte de cultivo celular junto con el transportador superpuesto. La lámina de células obtenida tenía la fuerza adecuada como una sola lámina, con una contracción no superior al 5 %.

La lámina de células epiteliales corneales obtenida en el Ejemplo 1, se trasplantó a un conejo (un modelo patológico con erosión corneal) que tenía la parte del tejido epitelial corneal deficiente mediante el método habitual. La lámina de células epiteliales corneales se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con un escalpelo. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se descubrió que la lámina de células epiteliales corneales se había establecido bien en el globo ocular.

### **Ejemplo 2**

En este Ejemplo, se inmovilizó un polímero de N-isopropilacrilamida (PIPAAm) en la superficie de una placa de cultivos repitiendo el procedimiento del Ejemplo 1, excepto por que el monómero de N-isopropilacrilamida se disolvió en alcohol isopropílico para dar una concentración del 35 %. Se midió la cantidad del polímero que responde a la temperatura formado sobre la superficie del sustrato mediante el método anterior; tal como se vio después, el sustrato se cubrió con 1,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  del polímero.

En este Ejemplo, las células epiteliales corneales se adhirieron y crecieron sobre el material de soporte de cultivo celular normalmente tal como ocurre normalmente en el Ejemplo 1. En el día 7 del cultivo, las células se volvieron confluentes y después se cultivaron durante unos 7 días adicionales; se colocó un transportador moldeado a partir de una membrana de 2,1  $\text{cm}^2$  de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que tenía un corte circular de 1,5  $\text{cm}^2$  en el centro sobre las células; el medio de cultivo se aspiró con suavidad a través del corte y se sometió a un tratamiento de baja temperatura incubando y enfriando a 20 °C durante 30 minutos, junto con el material de soporte de cultivo celular, después de lo cual se despegaron las células del material de soporte de cultivo celular junto con el transportador superpuesto. La lámina de células obtenida tenía la fuerza adecuada como una sola lámina, con una contracción no superior al 5 %.

La lámina de células epiteliales corneales obtenida en el Ejemplo 2, se trasplantó a un conejo (un modelo patológico con erosión corneal) que tenía la parte del tejido epitelial corneal deficiente mediante el método habitual. La lámina de células epiteliales corneales se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con un escalpelo. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo pero se montó una lente de contacto sobre el sitio enfermo después de injertar la lámina de células. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se descubrió que la lámina de células epiteliales corneales se había establecido bien en el globo ocular.

### **Ejemplo 3**

Repitiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se cultivaron células epiteliales corneales de conejo sobre el mismo soporte de cultivo celular, excepto por que el medio se cambió por el medio común de Green *et al.*, que contenía mitomicina C (DMEM+AB (para hacer una capa nodriza); para las células epiteliales neonatales queratinizadas humanas). Como resultado, las células epiteliales corneales se adhirieron y crecieron normalmente sobre el material de soporte de cultivo celular.

En el día 6 del cultivo, las células se volvieron confluentes y después se cultivaron durante unos 6 días adicionales hasta que estas se estratificaron. Posteriormente, se colocó un transportador moldeado a partir de una membrana de 2,1  $\text{cm}^2$  de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que tenía un corte circular de 1,5  $\text{cm}^2$  en el centro sobre las células; el medio de cultivo se aspiró con suavidad a través del corte y se sometió a un tratamiento de baja temperatura incubando y enfriando a 20 °C durante 30 minutos, junto con el material de soporte de cultivo celular, después de lo cual la lámina de células epiteliales corneales estratificadas se despegó del material de soporte de cultivo celular, junto con el transportador superpuesto. La lámina despegada estratificada tenía la fuerza adecuada como una sola lámina, con una contracción no superior al 5 %.

La lámina de células epiteliales corneales estratificadas obtenida en el Ejemplo 3, se trasplantó a un conejo (un modelo patológico con erosión corneal) que tenía la parte del tejido epitelial corneal deficiente mediante el método habitual. La lámina de células epiteliales corneales se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con una luz láser. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se descubrió que la lámina de células epiteliales corneales estratificadas se había establecido bien en el globo ocular.

### **Ejemplo Comparativo 1**

Se preparó una lámina de células epiteliales corneales tal como en el Ejemplo 1, excepto por que la lámina de células se despegó sin usar el transportador, después de lo cual se contrajo un 42 %,.

Tal como en el Ejemplo 1, la lámina de células epiteliales corneales obtenida se trasplantó a un conejo que tenía una parte del tejido epitelial corneal deficiente mediante el método habitual. La lámina de células epiteliales corneales se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba

con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con un escalpelo. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo. En el día 1 del injerto, se observó el sitio enfermo; la lámina de células epiteliales corneales solamente se estableció en una pequeña parte del globo ocular y podría desprenderse del sitio enfermo en cualquier momento.

5

### **Ejemplo Comparativo 2**

Se preparó una lámina de células epiteliales corneales estratificada tal como en el Ejemplo 3, excepto por que la lámina de células se despegó del soporte de cultivo celular 28 días después de que se alcanzara la confluencia. La lámina obtenida no se contrajo más del 5 % y tenía una fuerza adecuada como una sola lámina.

10

Después, tal como en el Ejemplo 3: la lámina de células epiteliales corneales estratificadas obtenida se trasplantó a un conejo que tenía una parte del tejido epitelial corneal deficiente mediante el método habitual. La lámina de células epiteliales corneales se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con un escalpelo. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo. En el día 1 del injerto, se observó el sitio enfermo; la lámina de células epiteliales corneales solamente se estableció en una pequeña parte del globo ocular y podría desprenderse del sitio enfermo en cualquier momento.

15

### **Ejemplo 4**

Se le aplicó a una placa de cultivo celular de 3,5 cm<sup>φ</sup> (FALCON 3001 fabricada por Beckton Dickinson Labware), una solución de recubrimiento que tenía un monómero de N-isopropilacrilamida disuelto en alcohol isopropílico para obtener una concentración del 30 % en un volumen de 0,1 ml. Mediante la aplicación de haces de electrones con una intensidad de 0,25 MGy, se inmovilizó un polímero de N-isopropilacrilamida (PIPAAm) en la superficie de la placa de cultivos. Después de la irradiación, la placa de cultivos se lavó con un agua de iones intercambiados para retirar el monómero residual y la PIPAAm que no se unió a la placa de cultivos; la placa de cultivos se secó después en una plataforma limpia y se esterilizó con un gas de óxido de etileno para proporcionar un material de soporte de cultivo celular. Se midió la cantidad del polímero que responde a la temperatura sobre la superficie del sustrato; tal como se vio después, el sustrato se cubrió con 1,4 μg/cm<sup>2</sup> del polímero.

25

30

En una etapa separada, se preparó un conejo blanco como un modelo de epitelio patía queratoconjuntiva mediante el método habitual. Se recogió un tejido de la mucosa oral a partir del conejo profundamente anestesiado y se cultivaron sus células epiteliales sobre el material de soporte de cultivo celular obtenido mediante el método habitual junto con células 3T3 (medio usado: CORNEPAK (producto de KURABO INDUSTRIES, LTD.); 37 °C al 5 % CO<sub>2</sub>). Como resultado, todas las células epiteliales se adhirieron y crecieron normalmente sobre el material de soporte de cultivo celular.

35

En el día 6 del cultivo, las células se volvieron confluentes y después se cultivaron durante unos 7 días adicionales; se colocó un transportador moldeado a partir de una membrana de 2,3 cm<sup>φ</sup> de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que tenía un corte circular de 1,8 cm<sup>φ</sup> en el centro sobre las células; el medio de cultivo se aspiró con suavidad a través del corte y se sometió a un tratamiento de baja temperatura incubando y enfriando a 20 °C durante 30 minutos, junto con el material de soporte de cultivo celular, después de lo cual se despegaron las células del material de soporte de cultivo celular junto con el transportador superpuesto. La lámina de células obtenida tenía la fuerza adecuada como una sola lámina, con una contracción no superior al 5 %.

40

45

La lámina de células de la mucosa oral obtenida en el Ejemplo 4 se trasplantó a un conejo blanco (un modelo de epitelio patía queratoconjuntiva) que tenía una parte del tejido epitelial corneal defectuoso mediante el método habitual. La lámina de células de la mucosa oral se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con un escalpelo. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se descubrió que la lámina de células de la mucosa oral se había establecido bien en el globo ocular.

50

### **Ejemplo 5**

En este Ejemplo, se inmovilizó un polímero de N-isopropilacrilamida (PIPAAm) en la superficie de la placa de cultivos repitiendo el procedimiento del Ejemplo 4, excepto por que el monómero de N-isopropilacrilamida se disolvió en alcohol isopropílico para dar una concentración del 35 %. Se midió la cantidad del polímero que responde a la temperatura formado sobre la superficie del sustrato mediante el método anterior; tal como se vio después, el sustrato se cubrió con 1,5 μg/cm<sup>2</sup> del polímero.

55

60

En este Ejemplo, las células epiteliales de la mucosa oral se adhirieron y crecieron sobre el material de soporte de cultivo celular normalmente tal como en el Ejemplo 4. En el día 6 del cultivo, las células se volvieron confluentes y después se cultivaron durante unos 7 días adicionales; se colocó un transportador moldeado a partir de una membrana de 2,3 cm<sup>φ</sup> de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que tenía un corte circular de 1,8 cm<sup>φ</sup> en el centro sobre las células; el medio de cultivo se aspiró con suavidad a través del corte y se sometió a un tratamiento de baja

65

temperatura incubando y enfriando a 20 °C durante 30 minutos, junto con el material de soporte de cultivo celular, después de lo cual se despegaron las células del material de soporte de cultivo celular junto con el transportador superpuesto. La lámina de células obtenida tenía la fuerza adecuada como una sola lámina, con una contracción no superior al 5 %.

5 La lámina de células de la mucosa oral obtenida en el Ejemplo 5 se trasplantó a un conejo blanco (un modelo de epitelopatía queratoconjuntiva) que tenía una parte del tejido epitelial corneal defectuoso mediante el método habitual. La lámina de células de la mucosa oral se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con un escalpelo. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo pero se montó una lente de contacto sobre el sitio enfermo después de injertar la lámina de células. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se descubrió que la lámina de células de la mucosa oral se había establecido bien en el globo ocular.

### **Ejemplo 6**

15 El procedimiento del Ejemplo 4 se repitió para realizar el cultivo de las células sobre el mismo material de soporte de cultivo celular, excepto por que se recogieron células madre epiteliales del tejido de la raíz pilosa de la piel de un conejo blanco profundamente anestesiado y se cultivaron junto con las células 3T3. Como resultado, las células de la raíz pilosa se adherieron y crecieron normalmente sobre el material de soporte de cultivo celular. Después de dos semanas de cultivo, se colocó un transportador moldeado a partir de una membrana de 2,1 cm<sup>2</sup> de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que tenía un corte circular de 1,5 cm<sup>2</sup> en el centro sobre las células; el medio de cultivo se aspiró con suavidad a través del corte y se sometió a un tratamiento de baja temperatura incubando y enfriando a 20 °C durante 30 minutos, junto con el material de soporte de cultivo celular, después de lo cual la lámina de células corneales estratificadas se despegó del material de soporte de cultivo celular, junto con el transportador superpuesto. La lámina despegada estratificada tenía la fuerza adecuada como una sola lámina, con una contracción no superior al 5 %.

20 La lámina de células obtenida en el Ejemplo 6 se trasplantó a un conejo blanco (un modelo de epitelopatía queratoconjuntiva) que tenía una parte del tejido epitelial corneal defectuoso mediante el método habitual. La lámina de células de la raíz pilosa se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con una luz láser. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se vio que la lámina de células se había establecido bien en el globo ocular.

### **Ejemplo 7**

35 El procedimiento del Ejemplo 4 se repitió para realizar el cultivo de las células sobre el mismo material de soporte de cultivo celular, excepto por que se recogieron células epiteliales conjuntivas del tejido conjuntivo de la piel de un conejo blanco profundamente anestesiado y se cultivaron junto con las células 3T3. Como resultado, las células epiteliales conjuntivas se adherieron y crecieron normalmente sobre el material de soporte de cultivo celular. Después de dos semanas de cultivo, se colocó un transportador moldeado a partir de una membrana de 2,1 cm<sup>2</sup> de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que tenía un corte circular de 1,5 cm<sup>2</sup> en el centro sobre las células; el medio de cultivo se aspiró con suavidad a través del corte y se sometió a un tratamiento de baja temperatura incubando y enfriando a 20 °C durante 30 minutos, junto con el material de soporte de cultivo celular, después de lo cual la lámina de células corneales estratificadas se despegó del soporte de cultivo celular, junto con el transportador superpuesto. La lámina despegada estratificada tenía la fuerza adecuada como una sola lámina, con una contracción no superior al 3 %.

40 La lámina de células obtenida en el Ejemplo 7 se trasplantó a un conejo blanco (un modelo de epitelopatía queratoconjuntiva) que tenía una parte del tejido epitelial corneal defectuoso mediante el método habitual. La lámina de células de la raíz pilosa se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con una luz láser. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se vio que la lámina de células conjuntivas estratificadas se había establecido bien en el globo ocular; sin neovascularización visible de la conjuntiva.

### **Ejemplo Comparativo 3**

50 Se preparó una lámina de células de la mucosa oral tal como en el Ejemplo 4, excepto porqué la lámina de células se despegó sin usar el transportador, después de lo cual se contrajo un 38 %,.

60 Tal como en el Ejemplo 4, la lámina de células de la mucosa oral obtenida se trasplantó en un conejo que tenía una parte del tejido epitelial corneal deficiente mediante el método habitual. La lámina de células de la mucosa oral se adhirió al sitio de la herida durante 15 minutos y, posteriormente, la parte de la lámina de células que se solapaba con las áreas distintas al sitio enfermo se escindió con un escalpelo. Después de la escisión, la lámina de células no se suturó al tejido vivo. En el día 1 del injerto, se observó el sitio enfermo; la lámina de células de la mucosa oral solamente se estableció en una pequeña parte del globo ocular y podría desprenderse del sitio enfermo en cualquier

momento.

5 A partir de los resultados anteriores, estuvo claro que usando el procedimiento de la presente invención, pueden fabricarse láminas de células del epitelio corneal sustitutas que tienen una buena adherencia al segmento anterior del tejido. Esto contribuye a reducir la carga sobre los pacientes haciendo el protocolo de tratamiento más simple y más eficaz; además, dado que estas láminas de células aseguran un recubrimiento completo y una adherencia positiva al sitio enfermo, se cree que la presente invención proporciona una técnica muy eficaz que permite una notable reducción del dolor que sienten los pacientes.

#### 10 **Ejemplo 8**

15 Se preparó una lámina de células del epitelio corneal estratificada en contacto íntimo con un transportador mediante un método idéntico al del procedimiento que se muestra en el Ejemplo 3. Se realizó un ensayo para ver si la lámina sería un sustituto de la solapa del epitelio corneal en el método LASIK conocido como un procedimiento corrector para el tratamiento de la miopía.

20 Específicamente, se sometió la córnea de un conejo al ensayo; la capa estromal corneal se cortó a través de un espesor de 160  $\mu\text{m}$  con un microqueratomo para hacer una solapa, que se retiró después para extirpar la capa estromal corneal con un láser de escimeros y después de alisar su superficie, la lámina de células epiteliales corneales estratificadas en contacto íntimo con el transportador que se preparó de acuerdo con el Ejemplo 3 se adhirió a la posición a la que debería regresar la solapa. Para finalizar el procedimiento de injerto, la lámina de células epiteliales corneales estratificadas se cortó al mismo tamaño que el sitio enfermo por medio de una luz láser. No se hizo ninguna sutura. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se descubrió que la lámina de células epiteliales corneales estratificadas se había establecido bien en el globo ocular; por lo tanto se concluyó que la lámina de células epiteliales corneales estratificadas de la presente invención también fue eficaz en el método LASIK.

#### **Ejemplo 9**

30 Se preparó una lámina de células epiteliales corneales estratificadas en contacto íntimo con un transportador mediante un método idéntico al del procedimiento que se muestra en el Ejemplo 3. Se realizó un ensayo para ver si la lámina sería un sustituto de la solapa del epitelio corneal en el método LASEK también conocido como un procedimiento corrector para el tratamiento de la miopía.

35 Específicamente, se sometió la córnea de un conejo al ensayo; se vertió alcohol en gotas para suavizar la superficie de la córnea y sin usar un microqueratomo, se escindió el epitelio corneal con un espesor de 50  $\mu\text{m}$  para hacer una solapa, que se retiró después para extirpar la capa estromal corneal con un láser de escimeros y después de alisar su superficie, la lámina de células epiteliales corneales estratificadas en contacto íntimo con el transportador que se preparó de acuerdo con el Ejemplo 3 se adhirió a la posición a la que debería regresar la solapa. Para finalizar el procedimiento de injerto, la lámina de células epiteliales corneales estratificadas se cortó al mismo tamaño que el sitio enfermo por medio de una luz láser. No se hizo ninguna sutura. Tres semanas después, se observó el sitio enfermo y se descubrió que la lámina de células epiteliales corneales estratificadas se había establecido en bien el globo ocular; por lo tanto se concluyó que la lámina de células epiteliales corneales estratificadas de la presente invención también fue eficaz en el método LASEK.

45 A partir de los resultados anteriores, estuvo claro que usando el procedimiento de la presente invención, pueden fabricarse láminas de células epiteliales corneales regeneradas, tanto en una monocapa como estratificadas, que tienen una buena adherencia al segmento anterior del tejido. Se cree que esto proporciona una técnica muy eficaz que contribuye a reducir la carga sobre los pacientes haciendo el protocolo de tratamiento más simple y más eficaz.

#### 50 **Aplicabilidad industrial**

55 Las láminas de células formadoras del epitelio corneal obtenidas por la presente invención se caracterizan por un muy buen establecimiento, o "alta adherencia", a los tejidos vivos y tiene un gran potencial para su uso en aplicaciones clínicas incluyendo el injerto de córnea, el tratamiento de las enfermedades corneales y el tratamiento de la miopía. Por lo tanto, la presente invención probará ser muy útil en los campos de la medicina y de la biología tales como la ingeniería celular y la ingeniería médica.

## REIVINDICACIONES

1. Una lámina de células formadoras del epitelio corneal que está **caracterizada por que** está en contacto con un transportador anular que evita la contracción de la lámina de células, cuyo transportador anular se selecciona de una membrana polimérica, una estructura moldeada a partir de una membrana polimérica o un accesorio de fijación metálico, donde, cuando se usa un polímero, se selecciona del grupo que consiste en difluoruro de polivinilideno, polipropileno, polietileno, celulosas, derivados de celulosa, papeles, quitina, quitosano, colágeno o uretano; cuya lámina de células en contacto con un transportador anular es obtenible despegándola de una superficie de un soporte de cultivo después de poner en contacto la lámina de células sobre la superficie de soporte de cultivo con dicho transportador anular.
2. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con la reivindicación 1 obtenible despegándola de un soporte sin someterla a ningún tratamiento con una proteinasa, teniendo la lámina de células despegada una contracción no superior al 20 %.
3. La lámina de células de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que tiene al menos el 80 % de una proteína de la membrana basal que se mantiene intacta.
4. La lámina de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que tiene al menos el 80 % de una estructura de desmosomas que se mantiene intacta.
5. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, obtenible despegándola dentro de un periodo de 21 días después de que las células se volvieron confluentes sobre una superficie de soporte.
6. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es una lámina de células epiteliales corneales regeneradas que es de una monocapa o está estratificada.
7. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con la reivindicación 6, que es una lámina estratificada obtenida mediante el cultivo de células corneales epiteliales en capas.
8. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es una lámina de células epiteliales corneales sustitutas que es de una monocapa o está estratificada.
9. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con la reivindicación 8, donde la lámina de células epiteliales corneales sustitutas comprende células de la mucosa oral, células de la raíz pilosa o células epiteliales conjuntivas, tal como se toman individualmente o en una mezcla de dos o más tipos, o en una mezcla de las mismas con células epiteliales corneales.
10. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que es una lámina estratificada obtenible mediante cultivo de células de la mucosa oral, células de la raíz pilosa o células epiteliales conjuntivas en capas, tal como se toman individualmente o en una mezcla de dos o más tipos, o en una mezcla de las mismas con células epiteliales corneales.
11. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, donde las células de la mucosa oral se originan a partir de la membrana bucal.
12. La lámina de células del epitelio corneal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un método para tratar un sitio enfermo donde un segmento anterior del tejido está dañado parcial o completamente o es deficiente.
13. La lámina de células formadoras del epitelio corneal para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 12, donde el segmento anterior del tejido es un tejido epitelial corneal, membrana de Bowman o un tejido estromal corneal.
14. La lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso en un método para tratar un sitio enfermo aplicándola de modo que recubra el sitio enfermo sin suturar.
15. La lámina de células formadoras del epitelio corneal para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, que es obtenible cortando al tamaño y la forma del sitio enfermo antes de aplicarla para cubrir el sitio enfermo.
16. Un proceso para producir una lámina de células formadoras del epitelio corneal, que comprende las etapas de cultivar las células formadoras del epitelio corneal en un soporte de cultivo celular que comprende un sustrato que tiene su superficie cubierta con un polímero que responde a la temperatura en el cual varía la fuerza de hidratación en un intervalo de temperatura de 0-80 °C con respecto al agua, y posteriormente,

- (1) ajustar la temperatura de la solución de cultivo bien por encima de una temperatura crítica de disolución superior o bien por debajo de una temperatura crítica de disolución inferior,  
5 (2) llevar las células formadoras del epitelio corneal cultivadas a un contacto con un transportador anular de modo que se inhiba la contracción de la lámina de células, y  
(3) despegar la lámina junto con el transportador anular.
- 10 17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16, donde la lámina de células formadoras del epitelio corneal es una lámina de células epiteliales corneales regeneradas o una lámina de células del epitelio corneal sustitutas, cada una de las cuales es de una monocapa o está estratificada.
- 15 18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, donde el soporte de cultivo celular es un inserto celular basado en una membrana.
- 20 19. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, donde el polímero que responde a la temperatura es poli(N-isopropilacrilamida).
- 20 20. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-19, donde la estructura es de forma anular con un corte en el centro.
- 25 21. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-20, donde la lámina se despega sin tratamiento con una proteinasa.
- 30 22. Uso de una lámina de células formadoras del epitelio corneal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para la fabricación de una composición de injerto para el tratamiento de un sitio enfermo donde un segmento anterior del tejido está parcial o completamente dañado o es deficiente, injertando dicha lámina de células formadoras del epitelio corneal.
- 30 23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, donde la lámina injertada cubre el sitio enfermo sin suturar.
- 35 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, donde la lámina de células formadoras del epitelio corneal se corta al tamaño y la forma del sitio enfermo antes de aplicarla para recubrir el sitio enfermo.
- 35 25. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22-24, donde la enfermedad a tratar es la erosión corneal, la úlcera corneal o una enfermedad binocular conjuntiva refractaria.
26. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, donde el tratamiento implica la corrección refractaria por el método RK, el método PRK, el método LASIK, o el método LASEK.