

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 537**

21 Número de solicitud: 201132081

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 31/135 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.12.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.06.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (53.3%)
PLAZA DE SANTA CRUZ 5 BAJO
47002 VALLADOLID ES y
CIBER-BBN (46.7%)**

72 Inventor/es:

**CALONGE CANO, Margarita;
CORRALES HERRÁN, Rosa María;
LÓPEZ PANIAGUA, Marina;
DE LA MATA SAMPEDRO, Ana;
GALINDO DE LA ROSA, Sara y
NIETO MIGUEL, Teresa**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MEDIO DE CULTIVO CELULAR ÚTIL PARA LA PROLIFERACIÓN IN VITRO DE CÉLULAS DEL EPITELIO DEL LIMBO ESCLEROCORNEAL**

57 Resumen:

Medio de cultivo celular útil para la proliferación in vitro de células de epitelio del limbo esclerocorneal. La presente invención proporciona un medio de cultivo celular carente de componentes de origen animal no humano y de compuestos nocivos para el organismo humano, útil para la proliferación in vitro de células de epitelio del limbo esclerocorneal, tanto de las células epiteliales diferenciadas o en proceso de diferenciación como de las células madre presentes entre ellas. Por tanto, las células cultivadas en el medio de cultivo de la invención pueden ser aplicadas de forma segura en clínica, por ejemplo, en procedimientos de terapia celular para la regeneración epitelial de la superficie ocular, preferiblemente en los casos de Síndrome de Insuficiencia Límica (SIL).

ES 2 409 537 A1

DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo celular útil para la proliferación *in vitro* de células del epitelio del limbo esclerocorneal

La presente invención se encuadra en el campo de la terapia celular, específicamente dentro de los medios de cultivo celulares útiles para expandir y cultivar *in vitro* células del epitelio del limbo esclerocorneal que posteriormente puedan ser aplicadas de forma segura en clínica durante procedimientos de regeneración tisular de la superficie ocular.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La superficie ocular está definida como una unidad anatómica, histológica, fisiológica y patológica que está constituida por la película lagrimal y por el epitelio de la conjuntiva, del limbo esclerocorneal (en adelante, limbo) y de la córnea junto con los tejidos conectivos adyacentes. La córnea es uno de los tejidos avasculares y transparentes del globo ocular que permite que la luz llegue hasta la retina, por lo que mantener intacta su estructura es esencial para poder generar una visión normal. Sin embargo, su contacto directo con el exterior y con los rayos ultravioletas produce un continuo desgaste de su epitelio que hace fundamental la continua regeneración del mismo. La regeneración del epitelio corneal se produce gracias a la existencia de células madre que se localizan en el epitelio limbar y que son las llamadas células madre epiteliales limbares (CMEL).

El limbo es la zona de transición entre la córnea y la conjuntiva. El limbo tiene dos capas, una epitelial superficial y una estromal profunda. La capa epitelial del limbo está formada por 8 - 12 capas de células escamosas no queratinizadas, siendo las más superficiales similares, al menos en apariencia, al epitelio corneal, con la diferencia de que se acompañan de células melanocíticas y de Langerhans. Sus células basales son más cuboidales y se adentran en el interior de la matriz estromal subyacente. Debajo del epitelio limbar se sitúa la membrana basal, que permite el paso de factores de

crecimiento y citoquinas desde el estroma al epitelio. Debajo de la membrana basal se encuentra el estroma limbar, formado por fibras de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas, donde residen múltiples tipos celulares como melanocitos, macrófagos, mastocitos, linfocitos, células mesenquimales, fibroblastos y células plasmáticas. Además, la capa estromal contiene vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas, que desempeñan entre otras funciones aportar a las CMEL los nutrientes necesarios. Anatómicamente, en el limbo se pueden encontrar las empalizadas de Vogt, estructuras compuestas por crestas de tejido fibrovascular orientadas en sentido radial y alternadas entre capas de epitelio limbar. Hay múltiples evidencias clínicas y de laboratorio que sugieren que en las capas basales del epitelio limbar se encuentran las células madre del epitelio corneal. Se ha propuesto que las células madre se localizan en un microambiente altamente especializado en su conservación y mantenimiento, denominado nicho de células madre, localizado en las zonas más basales de las empalizadas de Vogt.

La constante renovación del epitelio corneal se produce por una migración de las CMEL desde el nicho limbar al epitelio corneal durante la cual se van produciendo diferentes estadios de diferenciación celular, encontrando las células más diferenciadas en las capas superficiales del epitelio corneal.

Las CMEL son células indiferenciadas, con capacidad de autorrenovación ilimitada y capacidad de diferenciarse a otros linajes celulares. Además, presentan un tamaño celular pequeño, un ratio núcleo citoplasma alto y ausencia de marcadores específicos de células epiteliales corneales diferenciadas, como las citoqueratinas (K) 3 y 12.

En ocasiones, las CMEL o su nicho pueden verse alteradas/o por diferentes causas, entre las que se incluyen causas primarias, más raras, en las que falla principalmente el nicho limbar (aniridia congénita y displasias ectodérmicas), y causas secundarias, mucho más frecuentes, como causticaciones químicas o térmicas, radiaciones ultravioleta o ionizantes, conjuntivitis cicatrizantes (como

el síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide de las membranas mucosas, rosácea, etc), múltiples cirugías, secuelas e infecciones extensas, abuso de lentes de contacto, pterigia, etc. Estas alteraciones en las CMEL o en su nicho producen una entidad clínica denominada deficiencia de células madre del limbo o síndrome de insuficiencia límbica (SIL). Esta patología, que puede ser unilateral o bilateral (afectando a un solo ojo o a ambos) y total o parcial (afectando a la totalidad del anillo limbar o solo a una región del mismo), se caracteriza por la conjuntivalización, vascularización, inflamación y opacificación de la córnea, lo que produce un síndrome de dolor crónico y en numerosas ocasiones pérdida parcial o completa de la visión.

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes técnicas para el tratamiento del SIL, entre las que encontramos la queratoplastia penetrante, los injertos de membrana amniótica, el trasplante de tejido limbar y, más recientemente, el trasplante de células limbares epiteliales (entre las que se encuentran las CMEL) expandidas y cultivadas *in vitro*. El objetivo de estas técnicas es eliminar las alteraciones de la superficie ocular y obtener una nueva fuente de células madre que sean capaces de regenerar el epitelio corneal de forma fisiológica. Sin embargo, las dos primeras técnicas mencionadas solo cumplen el primero de los objetivos y de forma temporal. Por otro lado, un trasplante de tejido limbar en casos de SIL unilateral, en el que normalmente el tejido donante procede del ojo contralateral del propio paciente (trasplante autólogo), implica pérdida de tejido limbar del ojo sano, lo que supone riesgo de desarrollar SIL bilateral. Si por el contrario el trasplante es realizado en pacientes con daño bilateral, en los cuales el tejido limbar procede de un donante compatible vivo o cadáver (trasplante alogénico), el mayor problema es el riesgo de rechazo inmune (ocasionando vascularización e inflamación), que hace necesaria una inmunosupresión sistémica mantenida durante al menos tres años y, en muchas ocasiones, incluso de por vida, lo que ocasiona gastos sanitarios importantes en morbilidad, visitas médicas, analíticas repetidas, etc.

Una forma de minimizar la posible lesión del ojo donante, en el caso de los trasplantes autólogos, y el riesgo de inflamación y rechazo, en el caso de los trasplantes alogénicos, es realizar un trasplante de células epiteliales limbares expandidas y cultivadas *in vitro*, ya que la cantidad de tejido limbar necesario para realizar el cultivo celular es mínima y los cultivos celulares obtenidos a partir de estos tejidos tienen muy pocas células presentadoras de antígenos, lo que disminuye su inmunogenicidad (Fernández A., *et al.*, 2008, *An Sist Sanit Navar.*, 31: 53-69; Shortt AJ., *et al.*, 2007, *Surv Ophthalmol.*, 52: 483-502; Burman S., Sangwan V., 2008, *Clin Ophthalmol.*, 2: 489-502).

El procedimiento realizado para llevar a cabo el trasplante de células epiteliales limbares cultivadas *in vitro* consiste en el aislamiento de células epiteliales limbares del nicho limbar donante, entre las que se encuentran las CMEL, su posterior expansión y cultivo *in vitro*, normalmente sobre membrana amniótica, y finalmente el trasplante del complejo membrana amniótica-células epiteliales limbares a la superficie ocular del receptor.

Aunque el trasplante de células epiteliales limbares cultivadas *in vitro* es la mejor estrategia terapéutica que existe actualmente para el tratamiento de SIL y se realiza de forma relativamente frecuente en estos casos, la metodología utilizada para ello está en continua controversia. Así, en la actualidad existen unos 20 ensayos clínicos en los que se han utilizado este tipo de trasplantes y entre todos ellos existen numerosas variantes.

Actualmente, se utilizan principalmente dos métodos para establecer un cultivo primario de células epiteliales limbares. Por un lado, la obtención de biopsias de la zona limbar que son directamente sembradas (explantes), y por otro lado, la obtención de células epiteliales limbares en suspensión por tratamientos enzimáticos, bien a partir de explantes o bien a partir de porciones mayores del anillo limbar, que posteriormente son sembradas.

Además del método de obtención de las células del nicho limbar, están en continua controversia las condiciones de cultivo en las que se tienen que mantener dichas células durante su cultivo *in vitro*. En la actualidad, el sustrato más utilizado para el cultivo y expansión *in vitro* de este tipo celular es la
5 membrana amniótica, por ser antiinflamatoria, antimicrobiana, tener capacidad para estimular la reepitelización y presentar baja inmunogenicidad (Riau AK., *et al.*, 2010, *Biomaterials*, 31: 216-225). Sin embargo, el medio de cultivo utilizado para el cultivo de células epiteliales del nicho limbar varía mucho entre los diferentes laboratorios y grupos clínicos, encontrándose en ocasiones
10 componentes en estos medios de cultivo que pueden comprometer el posterior uso clínico de los cultivos primarios obtenidos.

En este sentido, durante mucho tiempo los medios de cultivo utilizados para la expansión y cultivo *in vitro* de CMEL han estado y siguen estando
15 suplementados con productos de origen animal no humano, lo que implica un alto riesgo de zoonosis, de transmisión de bacterias, virus y/u otros agentes infecciosos, como por ejemplo los priones responsables de la transmisión de la encefalopatía espongiforme. La adición de suero sanguíneo de origen animal no humano al medio de cultivo es uno de los grandes problemas. En diversos
20 ensayos clínicos de trasplante de células epiteliales limbares expandidas y cultivadas *in vitro* se suplementó el medio de cultivo con suero fetal bovino por sus propiedades proliferativas y no diferenciadoras (Kruse FE., Tseng SC., 1993, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 34: 2976-2989). Posteriormente, estudios *in vitro* y ensayos clínicos, han demostrado que la sustitución del suero fetal
25 bovino por suero humano no altera las características morfológicas, proliferativas y estadio de diferenciación de las células cultivadas (Kolli S., *et al.*, 2009, *Stem Cells*, 28: 597-610) ni tampoco el resultado clínico de los trasplantes.

30 Otro de los compuestos problemáticos usados normalmente en el cultivo celular *in vitro* de CMEL es la toxina colérica (Pellegrini G., *et al.*, 1997, *Lancet*, 349: 990-993), endotoxina secretada por la bacteria *Vibrio cholerae*

responsable del cólera. Su uso en cultivo *in vitro* está justificado por inducir la proliferación celular: induce la fosforilación de proteínas Gs, lo que produce una acumulación intracelular de AMP cíclico (AMPc), molécula que actúa como segundo mensajero regulando la proliferación celular. Actualmente, la acción
5 de esta molécula sobre queratinocitos cultivados *in vitro* está en controversia. Algunos autores han demostrado que el AMPc disminuye la proliferación celular, mientras que otros han encontrado que este compuesto aumenta la proliferación cuando se usa en un rango de entre 10^{-14} y 10^{-8} M. Además, se ha demostrado que el isoproterenol, utilizado en rangos de entre 10^{-6} y 10^{-5} M,
10 tiene efectos similares a los de la toxina colérica en cultivos de queratinocitos (Green H., 1978, *Cell*, 15: 801-811).

Por otro lado, el dimetil sulfóxido (DMSO) es una sustancia de naturaleza anfotérica que se caracteriza por su acción sobre la membrana plasmática de
15 las células y su interacción con moléculas de agua, por lo que es usado normalmente como criopreservante celular. Sin embargo, se ha demostrado que el DMSO es una sustancia tóxica para el organismo humano, ya que provoca vasoconstricción, vómitos, problemas cardiovasculares y en algunos casos problemas neurológicos. Por otro lado, el DMSO es frecuentemente
20 utilizado en el cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares por su capacidad generalizada para permeabilizar la membrana plasmática y como protector frente a los radicales libres que se pueden acumular en cultivo. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que este compuesto induce la disminución de la proliferación y el aumento de la diferenciación celular en células de epitelio
25 corneal humano (Cao XG., *et al.*, 2007, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 48: 3714-3718).

Por tanto, se considera necesario disponer de un medio de cultivo libre de compuestos animales no humanos y de componentes potencialmente nocivos
30 para el organismo humano, que permita establecer cultivos primarios de células del epitelio limbar humano, cultivando un elevado número de células madre

presentes en el epitelio limbar, que puedan utilizarse como terapia celular segura.

Algunos ejemplos de medios de cultivo desarrollados hasta la fecha para
5 cumplir estos objetivos son aquellos que incluyen en sus composiciones factores de crecimiento recombinantes humanos (Mariappan I., *et al.*, 2010, *Nature Protocols*, 5(8): 1470-1479), suero sanguíneo de cordón umbilical (Pek-Kiang Ang L., *et al.*, 2011, *IOVS Papers in Press* 10-6527), ausencia de toxina colérica (Ghoubay-Benallaoua D., *et al.*, 2011, *Molecular Vision*, 17: 341-354) o
10 fibroblastos embrionarios humanos que sirvan como sustrato para el crecimiento celular en condiciones libres de suero (Notara M., *et al.*, 2007, *Regenerative Medicine*, 2(6): 919-927).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 La presente invención proporciona un medio de cultivo celular, de ahora en adelante "medio de cultivo de la invención", que carece de componentes de origen animal no humano y de compuestos nocivos para el organismo humano, el cual es útil para llevar a cabo la proliferación *in vitro* de células del epitelio
20 del limbo esclerocorneal (o epitelio limbar). Además, este medio de cultivo permite mantener el fenotipo de las células madre (CMEL) presentes entre las células del epitelio limbar. Por tanto, las células expandidas y cultivadas en el medio de cultivo de la invención pueden ser aplicadas de forma segura en clínica, por ejemplo, en procedimientos de terapia celular para la regeneración
25 epitelial de la superficie ocular, preferiblemente en los casos de Síndrome de Insuficiencia Límica (SIL).

Esta aplicación presenta la ventaja de evitar la transmisión de enfermedades de origen animal no humano al paciente y de evitar, si el trasplante es autólogo,
30 o disminuir, si el trasplante es alogénico, el riesgo de rechazo inmunológico, riesgos inherentes al trasplante de células del epitelio limbar cultivadas en otros medios de cultivo que contienen componentes de origen animal no humano,

como por ejemplo suero fetal bovino (FBS). Además, presenta la ventaja de evitar posibles efectos secundarios, como vómitos, vasoconstricción o problemas cardiovasculares, producidos por la presencia habitual en otros medios de cultivo de componentes nocivos para el organismo humano, como por ejemplo DMSO o toxina colérica.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un medio de cultivo celular, "medio de cultivo de la invención", que comprende un medio base suplementado con:

10

a. entre 50 y 1.500 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente 50 $\mu\text{g/ml}$, de al menos un compuesto antibacteriano, más preferiblemente de gentamicina,

b. entre 0,25 y 1.250 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente 2,5 $\mu\text{g/ml}$, de al menos un compuesto antifúngico, más preferiblemente de anfotericina B,

15

c. entre 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 5 mg/ml, preferiblemente 5 $\mu\text{g/ml}$, de insulina recombinante humana o de IGFs, más preferiblemente de insulina recombinante humana,

d. entre 0,1 y 500 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente 0,4 $\mu\text{g/ml}$, de un compuesto esteroide, más preferiblemente de un compuesto glucocorticoide, aun más preferiblemente de hidrocortisona,

20

e. entre 2 y 100 ng/ml, preferiblemente 5 ng/ml, de al menos un factor de crecimiento o molécula que active los receptores de EGF, más preferiblemente de un factor de crecimiento seleccionado de la lista que comprende: EGF, TGF-alfa, HB-EGF, anfiregulina, epiregulina, betacelulina, o neuroregulina, aun más preferiblemente de EGF,

25

f. entre 10^{-9} y 10^{-5} M, preferiblemente 10^{-6} M, de isoproterenol,

g. entre 0 y 0,2 mM, preferiblemente 0,18 mM, de adenina,

h. entre 10^{-11} y 150×10^{-9} M, preferiblemente 2×10^{-9} M, de al menos una hormona tiroidea, más preferiblemente de triiodotironina o de tetraiodotironina, aun más preferiblemente de triiodotironina, y

30

i. entre un 0 y un 20%, preferiblemente un 10%, de suero humano.

El medio base que puede ser utilizado en el medio de cultivo de la invención podría ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica para el cultivo celular *in vitro*, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, medio basal "Eagle",
 5 CRCM-30, CMRL-1066, "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM),
 "Fischer's Medium", "Glasgow Minimum Essential Medium", Ham's F-10, Ham's
 F-12 (F12), "High Cell Density Medium", "Iscoe's Modified Dulbecco's
 Medium", Leibovitz's L-15, McCoy's 5A, medio 199, "Minimum Essential
 Medium Eagle", "Alpha Minimum Essential Medium", CnT20, NCTC 109, NCTC
 10 135, RPMI-1640, "William's Medium E", Waymouth's MB 75211, Waymouth's
 MB 70511, "Keratinocyte serum-free medium" (KSFM), o cualquiera de sus
 combinaciones. En una realización preferida, el medio de cultivo de la
 invención comprende un medio base DMEM/F12 en, por ejemplo, aunque sin
 limitarnos, cualquiera de las siguientes proporciones: (1:1), (2:1) o (3:1), más
 15 preferiblemente en proporción (1:1).

Se entiende por "compuesto antibacteriano" aquel compuesto, o mezcla de
 compuestos, que inhibe el crecimiento o mata a las bacterias. El agente
 antibacteriano, tal y como se entiende en la presente invención, puede ser
 20 bacteriostático, el cual inhibe el crecimiento de las bacterias sin llegar a
 provocar su muerte, o bactericida, que destruye las bacterias. Ejemplos de
 compuestos antibacterianos son, aunque sin limitarnos, los aminoglucósidos
 (estreptomicina, neomicina, kanamicina, netilmicina, gentamicina, etc.), los
 beta-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), los polipéptidos (vancomicina,
 25 bacitracina, polimixina B, etc.), las quinolonas (norfloxacino, ácido nalidixico,
 etc.), los macrólidos (eritromicina, azitromicina, etc.), las tetraciclinas
 (doxiciclina, tetraciclina, etc.) y otros como el cloranfenicol, la clindamicina o la
 lincomicina. En otra realización preferida, el compuesto antibacteriano del
 medio de cultivo de la invención es gentamicina.

30

Se entiende por "compuesto antifúngico" aquel compuesto, o mezcla de
 compuestos, que inhibe el crecimiento o mata a los hongos. El agente

antifúngico, tal y como se entiende en la presente invención, puede ser fungiestático, el cual inhibe el crecimiento de los hongos sin llegar a provocar su muerte, o fungicida, que destruye los hongos. Ejemplos de compuestos antifúngicos son, aunque sin limitarnos, la anfotericina B, los azoles (ketoconazol, fluconazol, itraconazol, etc.), la flucitosina, la terbinafina, la nistatina o la griseofulvina. En otra realización preferida, el compuesto antifúngico del medio de cultivo de la invención es anfotericina B.

La insulina es un péptido que en cultivo *in vitro* es capaz de producir un aumento en la proliferación celular, inhibir la apoptosis y cerrar fisuras epiteliales. Estos procesos se realizan a través de un mecanismo de acción que tiene su origen en la activación de los receptores de insulina (RI), localizados en la membrana plasmática, cuya presencia ya ha sido demostrada en células de la superficie ocular. Actualmente se conoce la existencia de dos péptidos análogos a la insulina, los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) I y II. Al igual que la insulina, estos péptidos pueden aumentar la proliferación celular y disminuir la apoptosis. Debido a la similitud en el mecanismo de acción de estos compuestos, los IGFs pueden ejercer una función similar a la ejercida por la insulina durante su uso para la expansión y cultivo *in vitro* de células del epitelio limbar, aumentando la proliferación celular sin modificar el fenotipo celular. Por ello, tanto la insulina como estos IGFs, preferiblemente IGF I y/o II, pueden ser empleados en el medio de cultivo de la invención.

La hidrocortisona es un compuesto esteroide, concretamente un glucocorticoide, cuyo mecanismo de acción comienza con la entrada de la molécula al citoplasma celular a través de un transporte pasivo, donde se une de forma específica a sus receptores citoplasmáticos. Este conjunto receptor-hidrocortisona entra en el núcleo celular uniéndose a regiones específicas del ADN (elementos de respuesta a glucocorticoides), regulando la activación de otros factores de transcripción, como el AP-1, produciendo finalmente un aumento en la proliferación celular. Así mismo se ha comprobado que otros

compuestos del grupo de los esteroides, como por ejemplo, pero sin limitarnos, la dexametasona, producen este mismo efecto. Por ello, diferentes compuestos del grupo de los esteroides ejercen una función similar a la hidrocortisona durante su uso para la expansión y cultivo *in vitro* de células del epitelio limbar, aumentando la proliferación celular. Así, diferentes compuestos del grupo de los esteroides, preferiblemente de los glucocorticoides, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la dexametasona o la hidrocortisona, pueden ser empleados en el medio de cultivo de la invención.

El Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) es un compuesto implicado en la proliferación celular. Actualmente se conoce que el EGF comienza su mecanismo de acción en la célula diana cuando se une al receptor específico para EGF (EGFR). En ausencia de ligandos, los EGFR residen en la membrana de forma inactivada. Cuando el EGF se une a su receptor, se produce la dimerización de éste, que activa la ruta de señalización Ras/MAPK, activando la molécula MAPK, capaz de trasladarse al núcleo y activar genes que participan en la proliferación celular. Otra vía importante tras la activación de EGFR es la de PI3K, la cual genera señales para la supervivencia celular y previene la apoptosis. Además, la activación de los EGFR controla la proliferación celular por medio de la activación de canales de calcio y del intercambio Na-H. El EGF forma parte de una familia de factores de crecimiento, cuya principal función es estimular la proliferación de queratinocitos. En este contexto, se puede afirmar que los factores de crecimiento o moléculas que se unen y/o activan los receptores de EGF (EGFR), como por ejemplo, aunque sin limitarnos, el factor de crecimiento transformante (TGF-alfa), el factor de crecimiento parecido a EGF heparina (HB-EGF), la anfiregulina, la epiregulina, la betacelulina o las neuroregulinas, adicionados al medio de cultivo de la invención pueden estimular de la misma forma en que lo hace el EGF la proliferación celular de las células del epitelio limbar, ya que se unen al mismo receptor celular, y por tanto activan las mismas cascadas de transducción de señales intracelulares.

La triiodotironina (T3) es una hormona tiroidea y, por ello, está implicada en la regulación del metabolismo celular y en la correulación de la proliferación, apoptosis y diferenciación celular. La T3 es capaz de atravesar la membrana plasmática celular y unirse a sus receptores específicos, situados en la
5 membrana nuclear, donde actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. Por otro lado, se sabe que la hormona tiroidea tetraiodotironina o tiroxina (T4), al igual que la T3, atraviesa la membrana plasmática y que una vez en el interior de la célula es transformada en T3 a través del selenoenzima desyodasa tipo II, enzima que se ha demostrado que está presente en
10 queratinocitos de piel humana. Por tanto, la hormona T4 puede desencadenar los mismos efectos celulares que la T3. En este contexto, la adición de otras hormonas tiroideas además de la T3, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la T4 al medio de cultivo de la invención puede ejercer los mismos efectos en el cultivo *in vitro* de células del epitelio limbar que la adición de T3.

15 El suero sanguíneo humano está formado por numerosos componentes, los cuales ejercen efectos beneficiosos sobre el cultivo *in vitro* de células del epitelio limbar, como estimulación de la proliferación y de la adhesión celular. En este sentido, no solamente el suero sanguíneo humano comercial
20 (allogénico) puede ser utilizado, sino que en el medio de cultivo de la invención se puede utilizar también suero humano autólogo. Por ello, en otra realización preferida, el suero humano del medio de cultivo de la invención es de origen autólogo.

25 Como demuestran los ejemplos de la invención, el medio de cultivo descrito anteriormente es de utilidad en la expansión y cultivo *in vitro* de células del epitelio limbar, tanto de las células epiteliales diferenciadas o en proceso de diferenciación (transitorias) como de las células madre presentes entre ellas. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del medio de cultivo de la
30 invención para la proliferación *in vitro* de células del epitelio del limbo esclerocorneal.

El término "proliferación" se refiere a los procesos de crecimiento, expansión, adhesión, división o multiplicación que sufren las células.

El "limbo esclerocorneal" es la zona circular, ligeramente sobreelevada, que
5 corresponde a la línea de transición entre la córnea y la conjuntiva-esclera. Histológicamente el limbo esclerocorneal está formado por el epitelio, la membrana basal y el estroma. El término "células del epitelio del limbo esclerocorneal" se refiere tanto a las células epiteliales limbares diferenciadas o en proceso de diferenciación (transitorias), como a las células madre (células
10 indiferenciadas) presentes en el epitelio limbar, también llamadas CMEL, responsables de la regeneración epitelial de la superficie ocular, preferiblemente de la córnea. La caracterización de las células del epitelio del limbo esclerocorneal se puede realizar mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, el
15 análisis de expresión de genes, y/u otros marcadores. Los métodos que pueden ser utilizados para dicha caracterización incluyen, pero no se limitan: análisis inmunocitoquímico, análisis por inmunofluorescencia, análisis por *northern blot*, análisis por *western blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, o análisis morfológicos por microscopía óptica o electrónica.

20

Preferiblemente, en la presente invención las células del epitelio del limbo esclerocorneal se caracterizan por análisis mediante inmunofluorescencia o por RT-PCR a tiempo real, más preferiblemente por análisis mediante
25 inmunofluorescencia. Así, las células epiteliales limbares en proceso de diferenciación o diferenciadas son aquellas células localizadas en el epitelio del limbo esclerocorneal que se caracterizan por ser positivas a la tinción con anticuerpos anti- K3 y/o K12. Las "células madre del epitelio del limbo esclerocorneal" son aquellas células localizadas en el epitelio limbar, preferiblemente en la capa basal de dicho epitelio, que se caracterizan por ser
30 positivas a la tinción con anticuerpos anti-proteína ABCG2 y/o anti-K15.

En una realización preferida, las células del epitelio del limbo esclerocorneal son células madre.

5 Las células del epitelio del limbo esclerocorneal pueden proceder de cualquier animal, preferiblemente mamífero, más preferiblemente humano. En una realización más preferida, las células del epitelio del limbo esclerocorneal proceden de un humano.

10 La posibilidad de que las células del epitelio limbar cultivadas en presencia del medio de cultivo de la invención sean de origen autólogo, permite que el posterior trasplante de éstas para la regeneración tisular de la superficie ocular pueda realizarse sin que sea necesaria la inmunosupresión del sujeto trasplantado. Por ello, en una realización aun más preferida, las células del epitelio del limbo esclerocorneal son de origen autólogo.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la proliferación *in vitro* de células del epitelio del limbo esclerocorneal, de ahora en adelante "método de la invención", que comprende:

- 20 a. sembrar células del epitelio del limbo esclerocorneal en un sustrato, y
- b. cultivar las células del paso (a) en presencia del medio de cultivo de la invención.

25 En una realización preferida, las células del epitelio del limbo esclerocorneal en el método de la invención son células madre. Además, las células del epitelio del limbo esclerocorneal pueden proceder de un humano, pero también de mamíferos no humanos, como por ejemplo, pero sin limitarse, roedores, rumiantes, felinos o cánidos. En una realización más preferida, las células del epitelio del limbo esclerocorneal del método de la invención proceden de un

30 humano. En una realización aun más preferida, las células del epitelio del limbo esclerocorneal son de origen autólogo.

En la presente descripción se entiende por "origen autólogo" cualquier procedencia de la muestra, tomada de los tejidos o células de un individuo o paciente, que es la misma en un donante y en el receptor de los mismos cuando le son administrados tras su tratamiento o trasplantados tras su
5 modificación.

En el paso (a) del método de la invención se pueden sembrar células del epitelio limbar obtenidas, por ejemplo, aunque sin limitarnos, por digestión enzimática a partir de un tejido limbar, o bien se puede sembrar directamente
10 una porción de, preferiblemente, 1-2 mm² (explante) procedente de este tejido. El "sustrato" que se puede utilizar para sembrar las células en el paso (a) del método de la invención es cualquier recipiente o superficie de los conocidos en el estado de la técnica para el cultivo de células, preferiblemente para el cultivo de células del epitelio del limbo esclerocorneal. Ejemplos de este tipo de
15 sustratos y/o soportes son, aunque sin limitarnos, sustratos de plástico, preferiblemente en forma de placa o frasco de cultivo, más preferiblemente soportes de poliestireno, soportes de vidrio, membrana amniótica, preferiblemente humana, o biomateriales. En otra realización preferida, el sustrato del paso (a) del método de la invención es un biomaterial. En otra
20 realización preferida, el sustrato del paso (a) del método de la invención es plástico. Además, opcionalmente dicho sustrato puede estar recubierto de uno o varios componentes favorecedores de la adhesión celular, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, poli-L-lisina, laminina o fibroblastos, preferiblemente humanos.

25 Se entiende por "biomaterial" cualquier sustancia farmacológicamente inerte diseñada para ser implantada o incorporada al organismo vivo, que es biocompatible, no tóxica, químicamente estable y presenta una adecuada resistencia mecánica, entre otras propiedades deseables para el uso clínico. El
30 biomaterial de la invención puede ser, aunque sin limitarnos, metálico, cerámico, polimérico, incluyendo biopolímeros, o una combinación de los anteriores.

Los medios de cultivo celular confieren a las células expandidas y cultivadas *in vitro* ciertas características que son consecuencia de la respuesta celular a los estímulos externos específicos que ejerce el medio de cultivo sobre ellas. Por tanto, como muestran los ejemplos de la invención, las células del epitelio del limbo esclerocorneal, preferiblemente células madre, obtenidas mediante el método de la invención presentan unas características fenotípicas, aunque no funcionales, diferentes a las de otras células del epitelio limbar que no han estado sometidas a estas condiciones específicas de cultivo *in vitro*. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula obtenible mediante el método de la invención, de ahora en adelante "célula de la invención". En una realización preferida, la célula de la invención es una célula madre. En una realización más preferida, la célula de la invención se caracteriza por expresar al menos un marcador propio de células madre del epitelio limbar seleccionado de entre: K15 y ABCG2.

Otro aspecto de la invención se refiere a una población celular que comprende la célula de la invención, de ahora en adelante "población celular de la invención".

Las células madre presentes en el epitelio del limbo esclerocorneal son capaces de dividirse y diferenciarse para reemplazar las células lesionadas o senescentes de la superficie ocular, preferiblemente del epitelio de la córnea, por células nuevas manteniendo así una población celular constante. La célula de la invención presenta también esta propiedad, preferiblemente cuando expresa los marcadores K15 y/o ABCG2 propios de células madre. Por tanto, dicha célula y la población celular de la invención son de utilidad en el tratamiento y/o prevención de lesiones o enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular, entendiéndose por "superficie ocular" la región del globo ocular que corresponde a la película lagrimal, la córnea, el limbo esclerocorneal y la conjuntiva. Preferiblemente, la célula de la invención y la población celular de la invención son útiles para incrementar,

restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un limbo esclerocorneal que presente destrucción, inexistencia o perturbación de la funcionalidad de las células madre, como es el caso de las patologías englobadas bajo la denominación de síndrome de insuficiencia límbica (SIL).

5

Así, la célula o la población celular de la invención pueden ser trasplantadas a la superficie ocular de un sujeto que padezca una lesión o enfermedad degenerativa, inflamatoria o genética de la superficie ocular con el objetivo de incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional del
10 limbo esclerocorneal, de la córnea o de la conjuntiva; preferiblemente para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un limbo esclerocorneal que presente destrucción, inexistencia o perturbación de la funcionalidad de las células madre, como es el caso de las patologías englobadas bajo la denominación de síndrome de insuficiencia límbica (SIL).

15

Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula o de la población celular de la invención para la elaboración de un medicamento o, alternativamente, a la célula o a la población celular de la invención para su uso como medicamento, de ahora en adelante "medicamento de la invención".

20

El "medicamento" al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario, aunque preferiblemente es de uso humano. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o
25 prevención de enfermedades o lesiones en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación
30 de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades o lesiones animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus

funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

En una realización preferida, el medicamento de la invención es para la prevención y/o tratamiento de lesiones o enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular. En una realización más preferida, la superficie ocular es la córnea. En una realización aun más preferida, la enfermedad es el Síndrome de Insuficiencia Límpica (SIL).

Las enfermedades de la superficie ocular cursan con signos y síntomas de inflamación ocular y/o con disminución de la agudeza visual. Ejemplos de este tipo de enfermedades son, aunque sin limitarnos, inflamación crónica del epitelio corneconjuntival, metaplasia escamosa, déficit de células madre límbicas (SIL), edema corneal (por ejemplo, por disfunción endotelial, hipoxia o trauma), distrofias/degeneraciones del epitelio corneal, defecto epitelial persistente o erosión epitelial corneal recidivante.

El "Síndrome de insuficiencia límbica o SIL" es el término empleado para englobar a todas las patologías que cursan con la perturbación de la funcionalidad, la destrucción o la inexistencia de las células madre del limbo esclerocorneal. Dentro de las patologías englobadas bajo este término se encuentran, por ejemplo, aunque sin limitarnos, aquellas provocadas por quemaduras químicas o térmicas, conjuntivitis cicatrizantes autoinmunes (como por ejemplo, aunque sin limitarnos, el síndrome de Stevens-Johnson o el penfigoide cicatrizal), aquellas provocadas por cirugías o crioterapias, queratopatía inducida por lentes de contacto, infecciones microbianas, ectasias, aquellas provocadas por radiación ionizante o ultravioleta, aquellas provocadas por el uso de medicación como los anti-metabolitos o el 5-fluorouracilo o la mitomicina c (iatrogénicos); aquellas patologías congénitas como, por ejemplo, aunque sin limitarnos, aniridia, coloboma, neoplasia, distrofia corneal, deficiencias hormonales, enfermedades ulcerativas periféricas de la córnea, queratopatía neurotrófica, queratopatía bullosa crónica, limbitis

crónica, pterigium o insuficiencia limbar idiopática, o en general, la ceguera corneal.

El medicamento de la invención puede utilizarse tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el tratamiento y/o
5 prevención de lesiones o enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular, preferiblemente de la córnea, más preferiblemente para el tratamiento y/o prevención del SIL.

Preferiblemente, el medicamento de la invención es un medicamento de terapia
10 celular somática. Se entiende por "terapia celular somática" la utilización de células somáticas vivas, tanto autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales), cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación, para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o
15 preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos. Entre los medicamentos de terapia celular somática se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse: células manipuladas para modificar sus propiedades inmunológicas, metabólicas o funcionales de otro tipo en aspectos cualitativos o cuantitativos; células clasificadas, seleccionadas y manipuladas, que se someten
20 posteriormente a un proceso de fabricación con el fin de obtener el producto terminado; células manipuladas y combinadas con componentes no celulares (por ejemplo, matrices o productos sanitarios biológicos o inertes) que ejercen la acción pretendida en principio en el producto acabado; derivados de células autólogas expresadas *ex vivo* (*in vitro*) en condiciones específicas de cultivo; o
25 células modificadas genéticamente o sometidas a otro tipo de manipulación para expresar propiedades funcionales homólogas o no homólogas anteriormente no expresadas.

El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se
30 refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de lesiones o enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular, preferiblemente de la córnea, más preferiblemente como consecuencia del SIL,

en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- 5 (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología; o
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención,
 10 consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

15

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante "composición de la invención", que comprende la célula o la población celular de la invención.

20 La composición de la invención puede comprender además excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Por ello, en una realización preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones,
 30 azúcares o celulosas, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función

desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes de la presente invención comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición.

Preferiblemente, la composición de la invención comprende la célula o la población celular de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" la cantidad de célula o de población celular de la invención que produzca el efecto deseado. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tipo de patología, estado de salud general del individuo o tolerancia del mismo.

La composición de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede ser formulada en forma de liposomas o nanosferas, de formulaciones de liberación sostenida o de cualquier otro sistema convencional de liberación.

Tal composición y/o sus formulaciones, así como la célula o la población celular de la invención, pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, parenteral (intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraestromal,

intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, subcutánea, intracapsular, etc.), tópica, intraocular, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

- 5 En una realización más preferida, la composición de la invención además comprende otro principio activo. Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto
- 10 diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una lesión o enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad
- 15 específica o el efecto.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas

20 y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra el porcentaje de cultivos primarios de células del epitelio del limbo esclerocorneal cultivados en plástico en presencia del medio de cultivo de la invención que alcanzan confluencia (A) y el tiempo que

30 **tardan dichos cultivos en alcanzar dicho estado (B).**

Fig. 2. Muestra la morfología de las células del epitelio del limbo esclerocorneal obtenidas a partir de explantes del tejido y cultivadas en presencia del medio de cultivo de la invención. Morfología de los cultivos primarios de células del epitelio del limbo esclerocorneal cultivadas sobre plástico y en presencia del medio de cultivo de la invención.

Fig. 3. Muestra la expresión génica relativa, analizada mediante RT-PCR a tiempo real, de los marcadores citoqueratina (K) 3, K12, K15 y la proteína transportadora de membrana ABCG2 en células del epitelio limbar cultivadas con el medio de cultivo de la invención sobre plástico. La expresión del marcador K12 fue tomada como calibrador interno, a la que se le asignó valor 1. Los resultados representados proceden de 5 experimentos independientes (n=5) utilizando cultivos primarios de tejidos procedentes de 5 donantes diferentes. El análisis estadístico se realizó, por un lado, mediante la comparación del grupo con valor 1 con el resto de grupos mediante el test T-Student para una muestra y, por otro lado, mediante la comparación de los otros grupos entre sí con un ANOVA de un factor (**p≤0,001).

Fig. 4. Muestra el porcentaje de células positivas durante la inmunofluorescencia para los marcadores específicos de células epiteliales corneales diferenciadas (citoqueratinas (K) 3 y K12) y para los marcadores de células madre de epitelio limbar (K15 y proteína transportadora ABCG2) en células de epitelio limbar cultivadas sobre plástico con el medio de cultivo de la invención. Los resultados mostrados proceden de 4 experimentos independientes (n=4) realizados a partir de cultivos primarios de tejidos procedentes de 4 donantes diferentes. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de un factor (*p≤0,05).

Fig. 5. Muestra la expresión génica relativa del marcador citoqueratina (K) 3 en cultivos primarios de limbo cultivados *in vitro* con dos medios de cultivo diferentes: el medio de cultivo de la invención (IOBA-SH) y un medio comercial sin suero pero con componentes de origen animal no

humano (CnT20). El calibrador utilizado fueron los niveles de expresión del ARNm de K15 en cada una de las condiciones analizadas. Se observa que el marcador K3 (propio de células epiteliales corneales diferenciadas) se expresa significativamente menos cuando se utiliza el medio de cultivo de la invención que cuando se utiliza el medio de cultivo CnT20, lo que indica que las células limbares cultivadas con el medio de cultivo de la invención presentan un fenotipo más propio de células indiferenciadas que cuando se utiliza otro medio de cultivo para este tipo celular. Los experimentos mostrados proceden de 5 cultivos primarios distintos (n=5) procedentes de al menos 3 donantes diferentes. Los datos fueron analizados estadísticamente con una T de Student (**p≤0,01).

Fig. 6. Muestra la expresión proteica de los marcadores propios de célula madre de epitelio limbar citoqueratina (K) 15 y proteína transportadora de membrana ABCG2 en cultivos primarios de limbo cultivados *in vitro* con dos medios de cultivo diferentes: el medio de cultivo de la invención (IOBA-SH) y un medio comercial sin suero pero con componentes de origen animal no humano (CnT20). Se observa que los marcadores K15 y ABCG2 se expresan significativamente más cuando se utiliza el medio de cultivo de la invención que cuando se utiliza el medio de cultivo CnT20, lo que indica que los cultivos de células cultivadas en presencia del medio de cultivo de la invención presentan un mayor porcentaje de células con fenotipo típico de células limbares indiferenciadas. Los datos mostrados proceden de cuatro experimentos independientes (n=4) a partir de cultivos primarios procedentes de al menos 3 donantes diferentes. Los datos fueron analizados estadísticamente con una T Student (*p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del medio de cultivo de la invención en la proliferación *in vitro* de células del epitelio del limbo

esclerocorneal, tanto de células epiteliales diferenciadas o en proceso de diferenciación, como de células madre (indiferenciadas). Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. CRECIMIENTO *IN VITRO* DE CÉLULAS EPITELIALES DEL LIMBO ESCLEROCORNEAL Y DE LAS CÉLULAS MADRE PRESENTES ENTRE ELLAS.

1.1. Determinación de la composición de un medio de cultivo idóneo para el crecimiento *in vitro* de células epiteliales del limbo esclerocorneal y de las células madre presentes entre ellas.

Se intentó determinar la composición de un medio de cultivo en el que no se utilizasen compuestos de origen animal no humano ni componentes potencialmente nocivos como suplementos, con el objetivo de crecer células epiteliales del limbo esclerocorneal aisladas del nicho limbar y las células madre presentes entre ellas. En dicho medio de cultivo no se utilizó ni toxina colérica ni DMSO como suplementos, sino que éstos fueron sustituidos por otros componentes, como se verá más adelante. Además, los componentes de origen animal no humano fueron eliminados.

El DMSO no fue empleado en el medio de cultivo de la invención por la toxicidad que presenta para el organismo humano y por comportarse como un agente diferenciador y que aumenta la apoptosis en los cultivos *in vitro*.

La toxina colérica, normalmente empleada en este tipo de medios de cultivo, se sustituyó por isoproterenol, compuesto cuyo mecanismo de acción es similar al de la toxina colérica, pero que no presenta peligrosidad biológica. Está

demostrado que el isoproterenol presenta una menor activación de la proliferación que la toxina colérica, ya que la toxina colérica induce un cambio permanente en las proteínas Gs, induciendo un aumento constante en la concentración de AMPc, mientras que el isoproterenol cambia temporalmente
5 las proteínas Gs, por lo que el aumento de AMPc es temporal. Por ello, se adicionaron al medio de cultivo adenina y triiodotironina para potenciar la proliferación celular. La concentración de isoproterenol añadida a este medio de cultivo para inducir la proliferación fue de 10^{-6} M.

10 En el medio de cultivo de la invención se propuso además la sustitución de los componentes animales por otros de origen humano con el objetivo de disminuir los riesgos de zoonosis. Especialmente se propuso la sustitución del suero fetal bovino por suero humano, ya que este último no modifica las características morfológicas, ni el estadio de diferenciación de las células madre del epitelio
15 del limbo esclerocorneal cultivadas, ni el resultado clínico de los trasplantes de dichos cultivos celulares. Por ello, se suplementó el medio de cultivo de la invención con un 10% de suero sanguíneo de origen humano, ya que la presencia de suero sanguíneo favorece la proliferación de células progenitoras del limbo. Todos los demás componentes con un posible origen animal como la
20 insulina, el EGF, la hidrocortisona, la adenina y la triiodotironina fueron sustituidos por compuestos de origen humano, recombinante o de síntesis química.

Por tanto, el medio de cultivo diseñado consistió en un medio de cultivo base
25 DMEM/F12 en proporción 1:1 suplementado con:

- a. 50 μ g/ml de gentamicina,
- b. 2,5 μ g/ml de fungizona (anfotericina B),
- c. 5 μ g/ml de insulina recombinante humana,
- 30 d. 0,4 μ g/ml de hidrocortisona,
- e. 5 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF),
- f. 1 μ M de isoproterenol,

- g. 0,18 mM de adenina,
- h. 2 nM de triiodotironina, y
- i. 10% de suero humano.

5 Este medio de cultivo se empleó para llevar a cabo la expansión y cultivo *in vitro* de células epiteliales del limbo esclerocorneal, y de las células madre presentes entre ellas, sobre plástico.

10 **1.2. Establecimiento de cultivos primarios de células del epitelio del limbo esclerocorneal.**

Se establecieron cultivos primarios de células del epitelio del limbo esclerocorneal a partir de explantes del nicho limbar, utilizando como sustrato plástico (poliestireno) y como medio de cultivo el descrito en el apartado
15 anterior.

Las muestras de tejido corneo-limbo-escleral fueron enviadas por el Banco de Ojos de Barraquer de Barcelona, previo consentimiento informado, y procedían de donantes cadáver cuyos tejidos oculares no pudieron ser utilizados para el
20 trasplante de órganos. Así, los tejidos utilizados para el estudio pertenecieron a 6 donantes de una edad media de $82,87 \pm 2,83$ años y fueron utilizados en los $3,25 \pm 0,45$ días posteriores a la enucleación, tiempo durante el cual fueron mantenidos a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas en tampón salino suplementado con gentamicina y fungizona. Seguidamente, el exceso de
25 conjuntiva, esclera, iris y endotelio fueron retirados y el botón corneal fue separado con ayuda de un trépano, obteniendo de esta forma el anillo limbo-escleral. Se escogieron explantes procedentes de la zona superior e inferior del limbo, ya que ésta es el área descrita donde se localiza la mayor concentración de empalizadas de Vogt y, por tanto, de células madre del epitelio limbar. Se
30 cortaron porciones (explantes) de $1-2 \text{ mm}^2$ que fueron colocados sobre las placas de cultivo. Los cultivos primarios se realizaron en una superficie de 1 cm^2 . Los explantes fueron incubados con suero sanguíneo humano (50 μl)

durante toda la noche a 37°C. A las 24 horas, se añadió el medio de cultivo de la invención a cada explante y éste fue cambiado cada 2 – 3 días.

En la tabla 1 se muestra el número de donantes y el número de explantes sembrados en plástico.

Donantes	6
Explantes sembrados	32

Tabla 1. Número de donantes y número de explantes sembrados en sustrato de plástico.

1.3. Análisis del rendimiento celular que proporciona el medio de cultivo de la invención sobre plástico (poliestireno).

El rendimiento celular se analizó como el número de cultivos primarios del limbo humano (CPLH) que alcanzaban confluencia y el tiempo necesario para que estos cultivos alcanzasen dicho estado. Así, se realizó un seguimiento de los CPLH observando su evolución mediante un microscopio óptico invertido de contraste de fases. Se tuvo en cuenta el porcentaje de explantes que llegaron a alcanzar confluencia y el tiempo necesario para que las células cultivadas a partir de ese explante alcanzaran dicho estado.

El $58\% \pm 0,140$ de los explantes sembrados sobre plástico proliferó hasta alcanzar confluencia. Las células alcanzaron este estado de confluencia al cabo de $34,79 \pm 3,01$ días desde que se sembró el explante sobre el plástico (Fig. 1).

1.4. Caracterización de la población celular obtenida con el medio de cultivo de la invención sobre plástico.

Este paso se llevó a cabo con el fin de analizar la proporción de células madre del epitelio del limbo esclerocorneal presente en los cultivos primarios de limbo obtenidos con el medio de cultivo de la invención. La evaluación de la

morfología y del fenotipo adquirido por las células del epitelio limbar cultivadas *in vitro* se realizó mediante:

- Análisis morfológico: la morfología, el tamaño celular y la homogeneidad de los cultivos se controló mediante la toma de fotografías con un microscopio óptico invertido de contraste de fases.
 - Caracterización celular: el fenotipo celular se analizó mediante RT-PCR a tiempo real (ARNm) e inmunofluorescencia. Actualmente, están descritos marcadores que se expresan mayoritariamente en el epitelio diferenciado de la córnea y otros que, por el contrario, se expresan mayoritariamente en células indiferenciadas del epitelio de limbo. Por ello, se estudió la expresión de marcadores de epitelio corneal humano diferenciado y de células madre de epitelio limbar en células cultivadas con el medio de cultivo de la invención sobre plástico. Como marcadores de epitelio corneal diferenciado se estudió la expresión de las K3 y K12 . En el caso de las células madre de epitelio limbar, se estudió la expresión de la K15 y de la proteína transportadora de membrana ABCG2.
- En cuanto al análisis morfológico, las células del epitelio limbar cultivadas en presencia del medio de cultivo de la invención sobre plástico (Fig. 2) presentaron una morfología cuboidal y homogénea propia de células epiteliales.
- Mediante RT-PCR a tiempo real, se observó que la expresión génica relativa de la K3 era significativamente menor que la expresión de K12, ambas específicas de epitelio corneal diferenciado. Además, se observó mayor expresión génica relativa, aunque de forma no significativa, de la K15 con respecto a las K3, K12 y a la proteína transportadora de membrana ABCG2. Así mismo, no se observaron diferencias significativas en la expresión génica relativa de la proteína transportadora específica de célula madre ABCG2 con respecto a la del resto de marcadores analizados (Fig. 3).

A nivel proteico, se estudió mediante inmunofluorescencia la expresión de los mismos marcadores en células cultivadas sobre plástico en presencia del medio de cultivo de la invención. La preparación de las células para realizar
5 posteriormente la inmunofluorescencia fue la que se describe a continuación. Los CPLH fueron cultivados hasta alcanzar confluencia (70%-90%). Posteriormente, las células fueron levantadas incubándolas con Versene durante 30 min a 37°C y 5% CO₂. Se centrifugaron las células por citospin durante 10 minutos a 800 rpm y baja aceleración, depositándolas en cristales
10 tratados con poli-L-lisina. Finalmente fueron fijadas con metanol durante 10 minutos a -20°C. Se observó así un alto porcentaje de células positivas para las K3 y K12. Sin embargo, la K15 se observó en un 56%. Además, un 90% de las células expresaron la proteína ABCG2 (Fig. 4).

15 En base a estos resultados, se puede afirmar que el medio de cultivo de la invención es adecuado para el cultivo *in vitro* de células del epitelio limbar, ya que los cultivos celulares limbares incubados con dicho medio presentan tanto marcadores de células epiteliales diferenciadas corneales (K3 y K12) como de células madre limbares (K15 y ABCG2). La elevada expresión de los
20 marcadores K15 y ABCG2 demuestra la existencia de células madre entre la población celular obtenida, lo que indica que el medio de cultivo de la invención favorece el estado indiferenciado de las células madre de epitelio limbar y permite la expansión y cultivo *in vitro* de las mismas.

25 **EJEMPLO 2. ESTUDIOS ADICIONALES DE CARACTERIZACIÓN CELULAR SOBRE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO DEL LIMBO ESCLEROCORNEAL CULTIVADAS EN PRESENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO DE LA INVENCION.**

30 Se llevaron a cabo estudios de caracterización adicionales sobre las células cultivadas en presencia del medio de cultivo de la invención, con el objetivo de demostrar que efectivamente las células obtenibles mediante el método de

cultivo de la invención presentan unas características fenotípicas, aunque no funcionales, diferentes a las de otras células del epitelio limbar que no han estado sometidas a estas condiciones específicas de cultivo *in vitro*.

- 5 2.1. Se analizó la expresión proteica, mediante inmunofluorescencia, de marcadores propios de diferentes tipos celulares presentes en el nicho limbar, como melanocitos (MART-1), células dendríticas (CD11c) y células endoteliales (PECAM), en muestras de tejido de limbo humano sano y en muestras de cultivos primarios expandidos y cultivados *in vitro* con el medio de la invención,
10 para valorar las posibles diferencias existentes entre las células presentes en estos dos tipos de muestras.

Métodos: los tejidos limboesclerales humanos fueron fijados en formaldehído 4%, incluidos en "Tissue-Tek-OCT" y cortados mediante criostato en secciones
15 de 5 µm. Por otro lado, cuando las células de los cultivos primarios de epitelio limbar cultivados con el medio de cultivo de la invención alcanzaron confluencia fueron levantadas, incubándolas con tripsina 0,25%-1mM EDTA durante 5 min. Posteriormente, las células se centrifugaron por citospin durante 10 min a 800 rpm y baja aceleración, depositándolas en cristales tratados con poli-L-lisina, y
20 finalmente fueron fijadas con metanol frío durante 10 min a -20°C. Ambos tipos de muestras (células cultivadas en el medio de la invención y tejidos limbares) fueron permeabilizados con Triton X-100 al 0,3% durante 10 min e incubados 1 hora con suero de burro al 5%. Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios de ratón anti-MART1 humano, anti-CD11c
25 humano y anti-PECAM humano a dilución 1:50, 1:50 y 1:20, respectivamente. Posteriormente las muestras fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón AlexaFluor-488. Los núcleos fueron contrateñidos con ioduro de propidio y los resultados fueron observados con un microscopio de fluorescencia invertido.

30

Resultados: las células del nicho limbar humano sano expresan, a nivel proteico, marcadores específicos de melanocitos (MART-1), células dendríticas

(CD11c) y células endoteliales (PECAM), mientras que las células de los cultivos primarios de limbo obtenidos con el medio de la invención no expresan estos marcadores. Estos resultados demuestran, por tanto, que las células del nicho limboesclerocorneal obtenidas mediante el método de la invención
 5 (células de la invención) presentan unas características fenotípicas diferentes a las de otras células del nicho limbar que no han estado sometidas a estas condiciones específicas de cultivo *in vitro*.

2.2. Se analizó, mediante RT-PCR a tiempo real, la expresión de ARNm de los
 10 marcadores K3 y K15 en cultivos primarios de limbo obtenidos mediante dos metodologías diferentes, con el fin de valorar las diferencias existentes entre las células obtenidas por ambas metodologías. Una de las metodologías utilizadas es la metodología de la invención. La otra metodología analizada difiere del método de la invención tanto en el área de cultivo de los cultivos
 15 primarios (3,8 cm²) como en el medio de cultivo utilizado para la expansión y cultivo celular. En esta segunda metodología se utilizó el medio comercial CnT20, libre de suero pero con presencia de otros componentes de origen animal no humano.

20 Métodos: cuando los cultivos primarios alcanzaron confluencia, se realizó la extracción y cuantificación del ARNm celular con los reactivos de "RNeasy Mini Kit" y "Quany-iR RNA Assay", respectivamente. Todas las muestras fueron tratadas con la enzima DNasa, utilizando los reactivos "RNase-Free DNase I Set". Seguidamente, se sintetizó el ADN complementario (ADNc), a partir de 1
 25 µg de ARNm de cada una de las muestras, utilizando los reactivos "SuperScript VILO cDNA Syntetis kit". Finalmente se realizó la PCR a tiempo real propiamente dicha a partir de 20 ng de ADNc de cada muestra, con el reactivo "Taqman Universal PCR Master Mix" y con los cebadores y las sondas Taqman específicos para los genes de K3 y K15 ("Taqman Target Primer-Taqman
 30 probe"). Todos los reactivos fueron utilizados siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y un control negativo fue incluido en cada análisis. Se utilizó como control endógeno de

expresión génica el gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). El análisis de los datos se realizó siguiendo el método comparativo de valores Ct, donde se utilizó como calibrador la expresión del gen K15, a cuya expresión se le asignó el valor de 1. Se analizó el número de veces que se expresó el gen K3 con respecto al gen K15 en los cultivos primarios de limbo obtenidos con ambas metodologías. Los experimentos fueron realizados en 5 cultivos primarios distintos (n=5) procedentes de al menos 3 donantes diferentes. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el test de T de Student (*p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

Resultados: las células limbares expandidas y cultivadas *in vitro* con ambas metodologías expresaron menos ARNm del marcador propio de epitelio corneal diferenciado K3 que del marcador propio de célula madre K15. Sin embargo, los cultivos primarios obtenidos con la metodología de la invención expresaron 305,5 veces menos K3 que K15, mientras que los cultivos primarios obtenidos con la metodología alternativa utilizando el medio de cultivo CnT20 expresaron tan solo 3,9 veces menos K3 que K15 (Fig. 5). La expresión de K3 es significativamente menor cuando los cultivos primarios se obtuvieron con el método de la invención. De esta forma, queda demostrado que las células limbares cultivadas con el método de la invención presentan un fenotipo más propio de células indiferenciadas que cuando se utiliza otro método de cultivo para este tipo celular. Así mismo, también ha quedado evidenciado que las células del nicho limboesclerocorneal obtenidas mediante el método de la invención presentan unas características fenotípicas diferentes a las de las células del nicho limbar que no han estado sometidas a estas condiciones específicas de cultivo *in vitro*.

2.3. Se analizó la expresión proteica, mediante inmunofluorescencia, de marcadores que se expresan de forma mayoritaria en las células madre del epitelio limbar (K15 y ABCG2) en cultivos primarios de limbo obtenidos por dos metodologías diferentes, para valorar las diferencias existentes entre las

células obtenidas mediante ambas metodologías. Una de las metodologías utilizadas fue la metodología de la invención. La otra metodología analizada difiere del método de la invención tanto en el área de cultivo de los cultivos primarios (3,8 cm²), como en el medio de cultivo utilizado para el cultivo celular
 5 (medio CnT20).

Métodos: cuando los cultivos primarios de epitelio limbar cultivados con el método de la invención alcanzaron confluencia, las células fueron levantadas incubándolas con Versene. Posteriormente, las células se centrifugaron por
 10 citospin durante 10 min a 800 rpm y baja aceleración, depositándolas en cristales tratados con poli-L-lisina. Por otro lado, cuando los cultivos primarios cultivados con CnT20 sobre 3,8 cm² alcanzaron confluencia, las células fueron levantadas incubándolas con tripsina 0,25%-1mM EDTA durante 5 min. Posteriormente, las células fueron sembradas en una multicámara de 8 pocillos
 15 en una densidad de 25.000 células/cm² e incubadas con medio de cultivo CnT20 durante 18-20 horas. Las células fueron fijadas con metanol frío durante 10 min a -20°C y fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0,3% durante 10 min e incubadas 1 hora con suero de burro al 5%. Posteriormente, las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios de ratón anti-
 20 K15 humana y anti-ABCG2 humana a dilución 1:50 y 1:20, respectivamente. Seguidamente, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón AlexaFluor-488. Los núcleos fueron contrateñidos con yoduro de propidio y los resultados fueron observados con un microscopio de fluorescencia invertido. En cada muestra se tomaron imágenes a 20X
 25 aumentos de forma aleatoria de cinco campos diferentes y se cuantificó el porcentaje de células positivas para cada marcador. Los experimentos fueron realizados en 4 cultivos primarios distintos (n=4) procedentes de al menos 3 donantes diferentes y los datos fueron analizados estadísticamente con una T de Student (*p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

30

Resultados: en los cultivos primarios de epitelio limbar obtenidos a partir del método de la invención el 56% y 89,7% de las células expresaron los

marcadores K15 y ABCG2, respectivamente. Sin embargo, solamente el 8,10% y 16,5% de las células de los cultivos primarios obtenidos con el otro método (medio CnT20), expresaron los marcadores K15 y ABCG2, respectivamente. El porcentaje de células que expresaron los marcadores K15 y ABCG2 fue

5 significativamente mayor en los cultivos obtenidos con el método de la invención (Fig. 6). De esta forma, queda demostrado que las células limbares cultivadas con el método de la invención presentan un fenotipo más propio de células indiferenciadas que cuando se utiliza otro método de cultivo para este tipo celular y que, por tanto, las células del nicho limboesclerocorneal obtenidas

10 mediante el método de la invención presentan unas características fenotípicas diferentes a las de otras células del nicho limbar que no han estado sometidas a estas condiciones específicas de cultivo *in vitro*.

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo celular que comprende un medio base suplementado con:
 - a. entre 20 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de al menos un compuesto antibacteriano,
 - b. entre 0,25 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de al menos un compuesto antifúngico,
 - c. entre 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina recombinante humana o de IGFs,
 - d. entre 0,1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de un compuesto esteroide,
 - e. entre 2 y 20 ng/ml de al menos un factor de crecimiento que active los receptores de EGF,
 - f. entre 10^{-7} y 10^{-5} M de isoproterenol,
 - g. entre 0,15 y 0,2 mM de adenina,
 - h. entre 10^{-10} y 10×10^{-9} M de al menos una hormona tiroidea, y
 - i. entre 5 y 20% de suero humano.
2. Medio de cultivo celular según la reivindicación 1 donde el suero humano es de origen autólogo.
3. Uso del medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la proliferación *in vitro* de células del epitelio del limbo esclerocorneal.
4. Uso del medio de cultivo celular según la reivindicación 3 donde las células del epitelio del limbo esclerocorneal son células madre.
5. Uso del medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 donde las células del epitelio del limbo esclerocorneal proceden de un humano.
6. Uso del medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones

3 a 5 donde las células del epitelio del limbo esclerocorneal son de origen autólogo.

5 7. Método para la proliferación *in vitro* de células del epitelio del limbo esclerocorneal que comprende:

- a. sembrar células del epitelio del limbo esclerocorneal en un sustrato, y
- b. cultivar las células del paso (a) en presencia del medio de cultivo celular descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

10

8. Método según la reivindicación 7 donde el sustrato del paso (a) es un biomaterial.

15 9. Método según la reivindicación 7 donde el sustrato del paso (a) es plástico.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde las células del epitelio del limbo esclerocorneal son células madre.

20 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 donde las células del epitelio del limbo esclerocorneal proceden de un humano.

25 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 donde las células del epitelio del limbo esclerocorneal son de origen autólogo.

25

13. Célula obtenible mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.

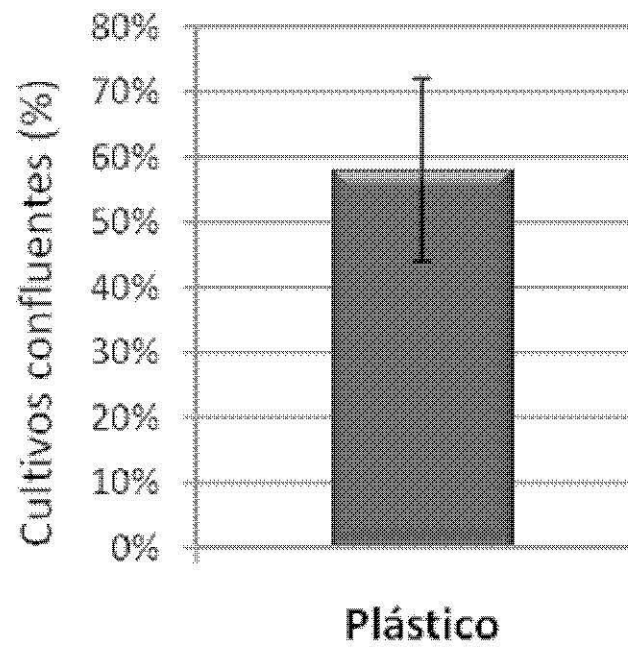
14. Población celular que comprende la célula según la reivindicación 13.

30

15. Uso de la célula según la reivindicación 13 o de la población celular según la reivindicación 14 para la elaboración de un medicamento.

- 5 16. Uso de la célula o de la población celular según la reivindicación 15
donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de lesiones
o enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie
ocular.
- 10 17. Uso de la célula o de la población celular según la reivindicación 16
donde la superficie ocular es la córnea.
- 10 18. Uso de la célula o de la población celular según la reivindicación 17
donde la enfermedad es el Síndrome de Insuficiencia Límica.
- 15 19. Composición farmacéutica que comprende la célula según la
reivindicación 13 o la población celular según la reivindicación 14.
- 15 20. Composición según la reivindicación 19 que además comprende un
vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 que
además comprende otro principio activo.

A



B

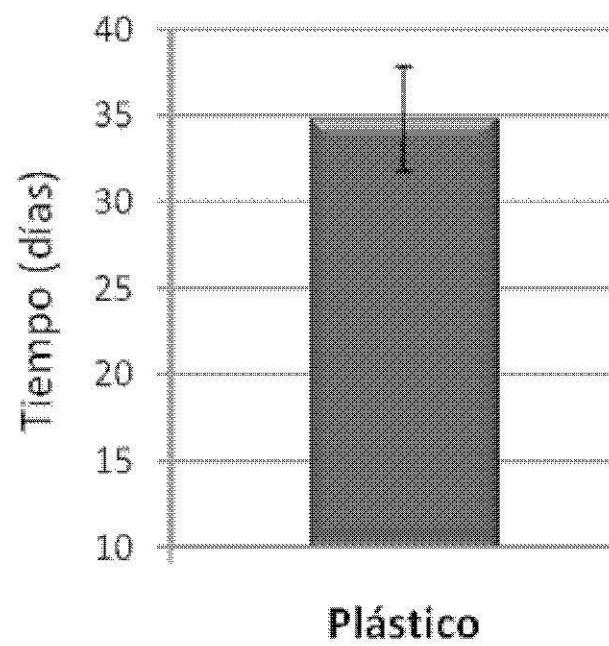


FIG. 1

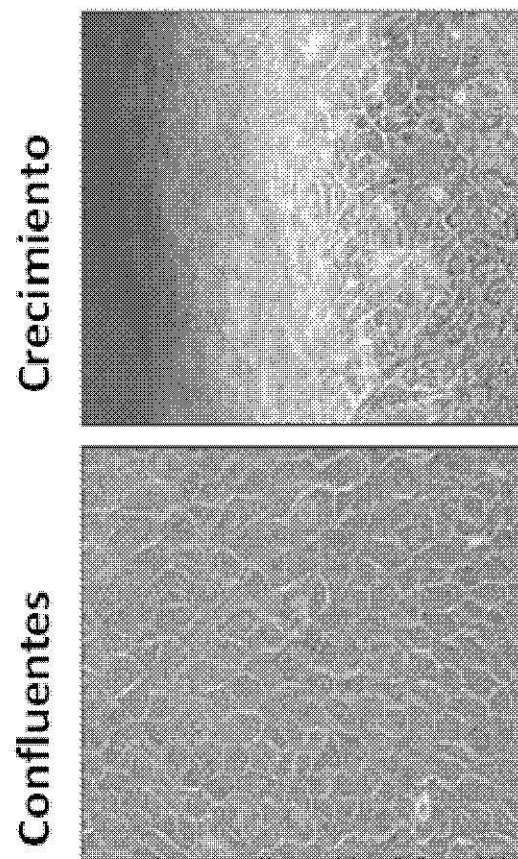


FIG. 2

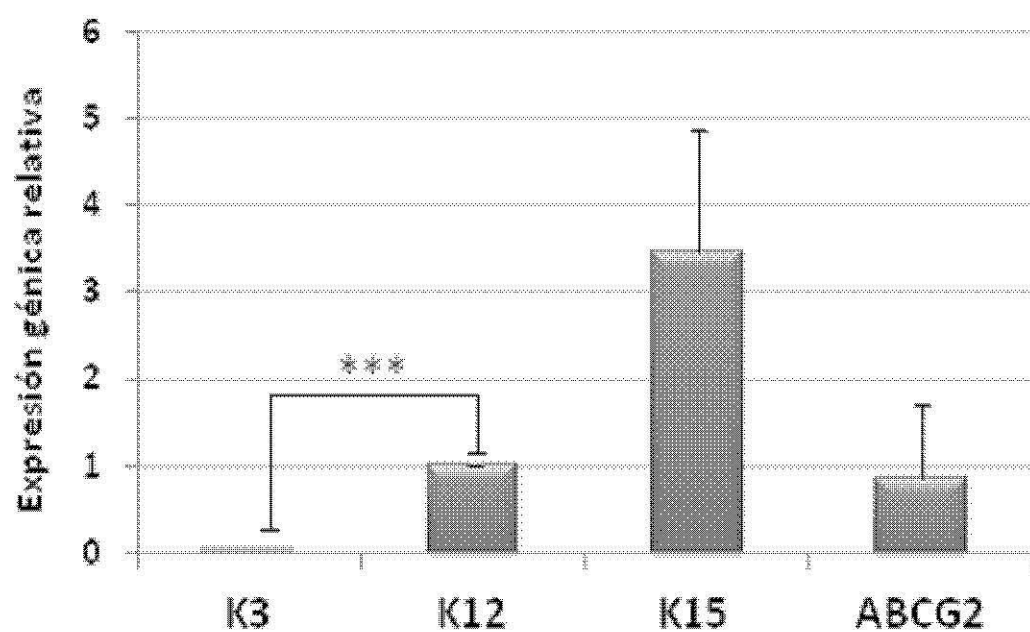


FIG. 3

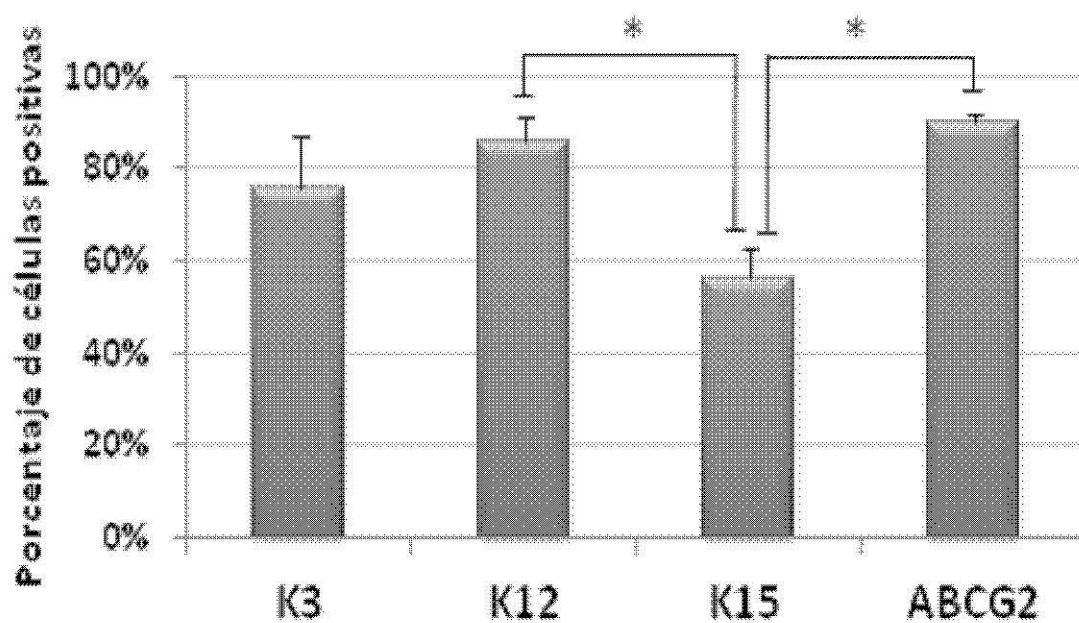


FIG. 4

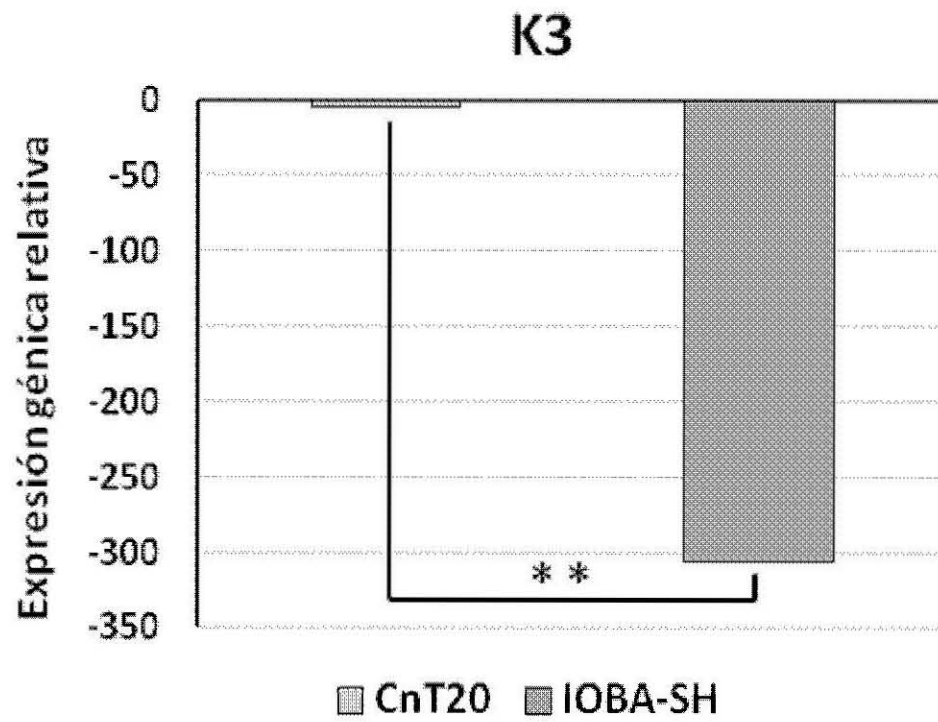


FIG. 5

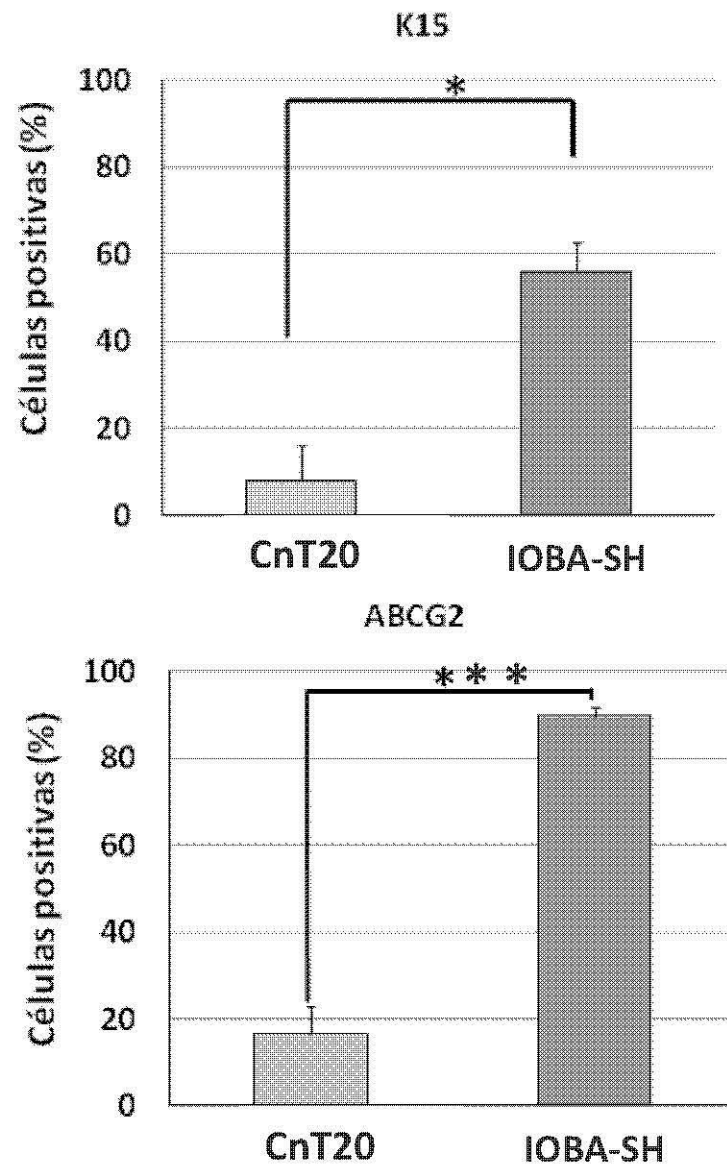


FIG. 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201132081

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N5/074** (2010.01)
A61K31/135 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	PECHA FLORENCE <i>et al.</i> Cholera Toxin And Isoproterenol Effects On Limbal Epithelial Cells Culture. ARVO Annual Meeting Abstract Search and Program Planner. 04.05.2011. VOL: 2011, pág: 5129. Ver todo el documento.	1-21
Y	CN 101347640 A (UNIV XI AN JIAOTONG) 21.01.2009, (resumen) WPI / Thomson [en línea] Londres (Reino Unido): Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 24.04.2013]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, DW200926, nº de acceso 2009- E71854. Ver todo el documento.	1-21
Y	GHOUBAY-BENALLAOUA D <i>et al.</i> Human epithelial cell cultures from superficial limbal explants. Molecular vision 01.02.2011. VOL: 17, págs: 341-354. ISSN 1090-0535 (Electrónico). Ver página 342, columna derecha, párrafo 2.	1-21
Y	GREEN <i>et al.</i> Cyclic AMP in relation to proliferation of the Epidermal cell: a new view. Cell. 01.11.1978. VOL: 15 No: 3, págs: 801-811. ISSN 0092-8674 Doi: doi:10.1016/0092-8674(78)90265-9. Ver página 805, columna izquierda, párrafo 2.	1-21
A	CN 101486994 A (CHINESE ACAD INSP & QUARANTINE) 22.07.2009, (resumen) WPI / Thomson [en línea] Londres (Reino Unido): Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 24.04.2013]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, DW200956, nº de acceso 2009- M15994. Ver todo el documento.	1-21
A	US 6692961 B1 (JUDD DAVID A <i>et al.</i>) 17.02.2004, ejemplo 1.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.04.2013

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, Google Academics.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-21	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PECHA FLORENCE <i>et al.</i> ARVO Annual Meeting Abstract Search and Program Planner. 04.05.2011. VOL: 2011, pág: 5129.	04.05.2011
D02	CN 101347640 A (UNIV XI AN JIAOTONG)	21.01.2009
D03	GHOUBAY-BENALLAOUA D <i>et al.</i> Molecular vision 01.02.2011. VOL: 17, págs: 341-354. ISSN 1090-0535 (Electrónico).	01.02.2011
D04	GREEN <i>et al.</i> Cell. 01.11.1978. VOL: 15 No: 3, págs: 801-811. ISSN 0092-8674 Doi: doi:10.1016/0092-8674(78)90265-9.	Nov 1978
D05	CN 101486994 A (CHINESE ACAD INSP & QUARANTINE)	22.07.2009
D06	US 6692961 B1 (JUDD DAVID A <i>et al.</i>)	17.02.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un medio de cultivo que comprende un medio base suplementado con un compuesto antibacteriano, un compuesto antifúngico, insulina recombinante humana, un compuesto esteroide (hidrocortisona), factor de crecimiento epidérmico (EGF), isoproterenol, adenina, una hormona tiroidea y suero humano. Reivindica también el uso del medio de cultivo para la proliferación in vitro de células madre del epitelio de limbo esclerocorneal humano, un método para la proliferación in vitro de estas células, y el uso de las mismas para el tratamiento de lesiones o enfermedades degenerativas de la superficie ocular.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el medio de cultivo tal y como está exactamente reivindicado, por lo que las reivindicaciones 1 a 21 de la solicitud son nuevas según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

A continuación se comentan algunos documentos del estado de la técnica cuya evidente combinación llevaría al experto en la materia al medio de cultivo de la invención, así como a los usos reivindicados en la solicitud. Por tanto, las reivindicaciones 1 a 21 de la solicitud no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se estudia el efecto de la toxina colérica frente al isoproterenol en cultivos de explantes de epitelio limbal, y se concluye que el isoproterenol produce mayor cantidad de células en cultivo que la toxina colérica. La diferencia fundamental entre el documento D01 y la solicitud radica en el resto de los componentes del medio de cultivo, que no se especifican en D01.

En el documento D02 se describe un medio de cultivo para fibroblastos de piel, que contiene todos los componentes del medio de la solicitud, a las concentraciones reivindicadas. Aunque en el medio de cultivo de D02 se emplean conjuntamente toxina colérica e isoprenalina (isoproterenol), y no se utiliza para el crecimiento de células epiteliales del limbo esclerocorneal, se considera evidente para el experto en la materia la combinación de los documentos D01 y D02 para llegar al medio reivindicado en la solicitud, y al uso del mismo para crecer células del epitelio de limbo esclerocorneal.

La única diferencia de D01 y D02 con la solicitud consiste en que en esta última se emplea suero humano en lugar de suero fetal bovino utilizado en los dos documentos del estado de la técnica. No se considera que tal diferencia aporte actividad inventiva a las reivindicaciones de la solicitud, ya que es obvia la utilización de suero humano si se quieren evitar los componentes de origen animal en el medio de cultivo, dado que el suero se obtiene mediante técnicas sobradamente conocidas en el campo técnico de la invención, e incluso se puede disponer de él de forma comercial.

Por todo lo expuesto anteriormente, la solicitud no cumple el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la ley de patentes, a la luz de la información divulgada en los documentos D01 y D02, y de los conocimientos generales del estado de la técnica.

En el documento D03 se describe un medio para cultivar explantes de limbo esclerocorneal humano, que contiene los ingredientes del medio reivindicado en la solicitud, y carece de toxina colérica, aunque no tiene isoproterenol. En el documento D04 se demuestra que el isoproterenol favorece el crecimiento de queratinocitos humanos. Al tratarse de células epiteliales en ambos casos, se considera evidente que el experto en la materia combine la información de los documentos D03 y D04 y llegue al medio de cultivo de la invención, y a los usos reivindicados. Por tanto, las reivindicaciones 1 a 21 de la solicitud no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

El documento D05 divulga también un medio de cultivo para crecer queratinocitos y utilizar en ingeniería tisular de piel, que contiene los componentes del medio de la solicitud (excepto la insulina). Ya que el medio de D05 comprende además toxina colérica, que es lo que se quiere evitar con el medio de la solicitud, no se considera que este documento afecte la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 21 de la presente solicitud.

Por último, en el documento D06 encontramos un medio de cultivo muy similar al medio reivindicado en la solicitud, que, como éste, contiene isoproterenol. En el caso de D06 se cultivan queratinocitos humanos, y se menciona su posible uso para cultivar otras células, entre las que no se incluyen las células epiteliales de limbo esclerocorneal. Por tanto, no se considera que el documento D06 anticipe el objeto de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 21 de la solicitud tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes, a la luz de lo divulgado en D06.