

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 700**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 31/573** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61P 27/10** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2016 PCT/NZ2016/050033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16140581**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2016 E 16759200 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3265096**

54 Título: **Composiciones oftálmicas y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**05.03.2015 NZ 70572715**

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

**03.11.2023**

73 Titular/es:

**THEIANOVA LIMITED (100.0%)  
Bridgewest Ventures, L12, 2 Commerce Street  
Auckland Central, Auckland, 1010, NZ**

72 Inventor/es:

**GREEN, COLIN;  
GREENE, CAROL ANN y  
SHERWIN, TREVOR**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 952 700 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

Composiciones oftálmicas y métodos de uso de las mismas

5 **Solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional neozelandesa número NZ-705727, presentada el 5 de marzo de 2015.

10 **Campo de la invención**

La presente descripción se refiere a composiciones y a métodos útiles para el tratamiento y/o la prevención de afecciones oculares. Concretamente, la descripción se refiere a composiciones y a métodos que pueden utilizarse para aumentar y regenerar la córnea, y para corregir errores refractivos del ojo.

15

**Antecedentes de la invención**

Antes se creía que las células diferenciadas renunciaban a su capacidad de regresión a un estado anterior. Sin embargo, este punto de vista ha sido cuestionado por la inducción de células madre pluripotentes (reprogramación celular) y las pruebas que demuestran que las células diferenciadas pueden cambiar a otro fenotipo (Takahashi y Yamanaka 2006; Wemig y col. 2007; Yamanaka y Blau 2010; Gurdon y Melton 2008; Peran y col. 2011). Además, ahora se cree que el microentorno de las células, que incluye las células circundantes, la matriz extracelular y los factores de crecimiento y diferenciación, desempeña un papel importante en la reorientación de la diferenciación celular (Häkelién y Collas 2002). Con esta información, los investigadores han empezado a desarrollar tratamientos que utilizan tecnologías de reprogramación celular y células madre.

20

La córnea del ojo representa más de dos tercios de la potencia refractiva total del ojo (potencia de enfoque). Incluso pequeños cambios en la forma de la córnea pueden tener un efecto dramático en la claridad con la que una imagen se enfoca en la retina. La capa estromal de la córnea (la superficie frontal transparente del ojo) comprende la mayor parte del tejido corneal y está compuesta por laminillas muy organizadas formadas por fibrillas de colágeno fuertemente empaquetadas, principalmente de colágeno de los tipos I y V (Marshall y col. 1993). La estructura única de la capa estromal como resultado de la alineación uniforme de las fibrillas de colágeno confiere a la córnea las propiedades de tenacidad y transparencia (Funderburgh 2000).

30

Cuando las células estromales (los queratocitos corneales) se extraen de la córnea y se cultivan en monocapa, presentan las características morfológicas de los fibroblastos y pasan de ser células estrelladas a células multinucleadas de forma fusiforme (Funderburgh y col. 2001). Otro fenotipo comúnmente observado de los queratocitos es la forma de miofibroblasto que se observa en la córnea tras una lesión (Jester y col. 1987). Se cree que los cambios en los factores de crecimiento y citocinas exógenos provocan estos cambios fenotípicos (Funderburgh y col. 2001).

35

Se sabe que los factores de crecimiento de la familia de TGF $\beta$  son los inductores más potentes de la diferenciación condrogénica (cartilago) (Heng, Cao y Lee 2004; Johnstone y col. 1998; Menetrey y col. 2000). El TGF $\beta$ 1 estimula la síntesis de colágenos y fibronectina por los fibroblastos de embrión de pollo (Ignatz y Massague 1986). En el caso de los queratocitos, se sabe que el TGF $\beta$ 1 y el TGF $\beta$ 2 provocan la deposición de MEC asociada a la cicatrización, posiblemente debido a la conversión de los queratocitos en el fenotipo de miofibroblasto (Funderburgh, Mann, Funderburgh, Corpuz, y Roth 2001). Por el contrario, se ha demostrado que el TGF $\beta$ 3 induce a los fibroblastos corneales a producir depósitos de MEC compuesta por colágeno de tipo I sin fibrosis ni cicatrices (Karamichos, Hutcheon y Zieske 2011). También se sabe que ciertos compuestos químicos no proteínicos como la dexametasona (Johnstone, Hering, Caplan, Goldberg y Yoo 1998), el ácido ascórbico (Farquharson, Berry, Barbara Mawer, Seawright y Whitehead 1998) y el etanol (Kulyk y Hoffman 1996) promueven la diferenciación condrogénica *in vitro*.

40

45

La córnea puede verse afectada por diversos trastornos, como defectos, lesiones, enfermedades y trastornos degenerativos. La miopía es el resultado de una curvatura excesiva de la córnea, de modo que la luz que entra en el ojo se enfoca por delante de la retina. Es la deficiencia visual más prevalente en todo el mundo y afecta a la visión del 70 al 90 % de las personas en algunos países asiáticos y del 30 al 40 % en Europa y Estados Unidos (Frederick 2002). En la mayoría de los casos, la miopía aparece por primera vez en niños en edad escolar y progresa hasta los 20 años aproximadamente. También se asocia a una mayor prevalencia de degeneración macular, desprendimiento de retina y glaucoma en la edad adulta (Ebenstein y Pruitt 2006).

55

La miopía suele corregirse con gafas graduadas o lentes de contacto. Sin embargo, estos dispositivos no proporcionan un tratamiento permanente para la afección, y no son adecuados para su uso durante determinadas actividades. Las lentes de contacto también se asocian a infecciones oftálmicas y a afecciones más graves, como abrasiones y úlceras corneales. En determinadas circunstancias, la cirugía refractiva o la ortoqueratología están indicadas para la miopía. Aun así, estos tratamientos solo proporcionan una corrección temporal de la miopía de leve a moderada; no son tratamientos permanentes y no son adecuados para casos graves.

60

65

El queratocono es una distrofia corneal extática asociada al adelgazamiento del estroma y a la alteración de la porción de la córnea conocida como capa de Bowman. El adelgazamiento progresivo del estroma corneal suele producirse a lo largo de décadas y da lugar a que la córnea desarrolle una forma cónica. Esto provoca un deterioro de la visión debido al astigmatismo irregular y a la miopía. La patogénesis del queratocono sigue siendo desconocida, pero se ha asociado a factores como el frotamiento constante de los ojos y el uso de lentes de contacto (Krachmer, Feder y Belin 1984; Sherwin y Brookes 2004). Puede aparecer ya en la pubertad y seguir progresando hasta la tercera o cuarta década de la vida.

La incidencia del queratocono se ha estimado en aproximadamente 1 de cada 2000 en la población general de todo el mundo (Rabinowitz 1998), sin predilección por ninguno de los sexos. Dado que el queratocono suele aparecer en los primeros años de la edad adulta y se prolonga hasta la edad en que se tienen mayores ingresos y se cría a los hijos, la pérdida de calidad de vida y la carga económica que supone el tratamiento del queratocono representan un importante problema de salud pública. El queratocono es una indicación importante para el trasplante de córnea en el mundo occidental, y los investigadores han determinado que constituye el 28,8 % de los trasplantes de córnea en Francia (Legeais y col. 2001) y del 11,4 % al 15,4 % en Estados Unidos (Cosar y col. 2002; Dobbins y col. 2000). En Nueva Zelanda existe una prevalencia inusualmente alta de queratocono, con una incidencia desproporcionadamente alta en las poblaciones polinesia y maorí (Patel y col. 2005; Patel y McGhee 2013). En Nueva Zelanda, aproximadamente el 50 % de todos los trasplantes de córnea realizados son por queratocono (Edwards y col. 2002).

A pesar de varios estudios sobre el queratocono, el proceso bioquímico subyacente sigue siendo poco conocido. La incidencia familiar del queratocono sugiere que uno de los factores etiológicos es genético (Ihalainen 1985). La enfermedad también se ha relacionado con determinados factores bioquímicos y biomecánicos. Por ejemplo, se ha determinado que el adelgazamiento corneal del queratocono es consecuencia de la pérdida de componentes de la matriz extracelular (MEC). Sin embargo, esto podría deberse a su destrucción, a su formación defectuosa o a una combinación de ambas (Klintworth y Damms 1995; Klintworth 1999; Jhanji y col. 2011). En el estroma corneal, los cambios asociados al queratocono incluyen una disminución del número de laminillas y queratocitos (Ku, Niederer, Patel, Sherwin y McGhee 2008; Sherwin & Brookes 2004), y cambios en la organización de las laminillas y la distribución de la masa fibrilar de colágeno (Meek y col. 2005).

Se cree que la degradación de la capa estromal podría deberse a una actividad enzimática proteolítica aberrante (Fukuchi, Yue, Sugar y Lam 1994). Se sabe que las córneas con queratocono tienen niveles reducidos de inhibidores enzimáticos y un nivel aumentado de enzimas degradativas (Kenney y Brown 2003). Los factores biomecánicos incluyen el adelgazamiento y la disminución de la rigidez de la córnea debido al daño oxidativo causado por la radiación ultravioleta y los traumatismos mecánicos (Kenney y Brown 2003). La investigación biomecánica de las córneas queratocónicas ha revelado una disminución de la elasticidad y rigidez; sin embargo, se desconocen las razones (Edmund 1988). Se ha sugerido que una reducción de los enlaces cruzados del colágeno podría ser la causa (Wollensak y Buddecke 1990). En la actualidad no existe ningún modelo animal satisfactorio para el queratocono y las investigaciones se han limitado en gran medida a un entorno *ex vivo*.

Dependiendo de la gravedad de la afección, los intentos de ralentizar la progresión del queratocono incluyen el uso de gafas especiales y lentes de contacto. En casos graves, son necesarios implantes corneales, anillos intraestromales o trasplantes de córnea (Jhanji, Sharma y Vajpayee 2011). La queratoplastia penetrante, un procedimiento mediante el que se extirpa todo el grosor de la córnea y se sustituye por tejido corneal de un donante, es el procedimiento quirúrgico más utilizado para tratar los casos avanzados de queratocono (Rabinowitz 1998). El queratocono es la principal indicación para la cirugía de trasplante de córnea en todo el mundo, y aproximadamente un 12–20 % de los afectados por queratocono requieren un trasplante de córnea (Pramanik, Musch, Sutphin y Farjo 2006).

Las primeras opciones de tratamiento del queratocono, como las lentes permeables al gas personalizadas conocidas como lentes Rose K, se han centrado en mejorar la agudeza visual. Los tratamientos más recientes pretenden ralentizar la progresión de la enfermedad. Un tratamiento conocido como reticulación de colágeno corneal (CXL) pretende aumentar la rigidez y la estabilidad biomecánica de la córnea. En este procedimiento, se desbrida el epitelio, se administran gotas tópicas de riboflavina y se exponen las córneas a luz ultravioleta A a 370 nm durante aproximadamente 30 minutos (Ashwin y McDonnell 2010; G. Wollensak, Spoerl y Seiler 2003). Se cree que la luz UV-A activa la riboflavina produciendo así especies reactivas de oxígeno que inducen la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de colágeno del estroma corneal (Spoerl, Huhle y Seiler 1998; G. Wollensak y col. 2003). Sin embargo, este procedimiento no se recomienda para el tratamiento de córneas con un espesor inferior a 400 µm debido a la posibilidad de que se produzcan daños en las células endoteliales. Aunque este tratamiento da lugar a una córnea más rígida, no aborda el problema del adelgazamiento corneal.

Por lo tanto, existe una necesidad constante de composiciones y métodos terapéuticos para tratar afecciones oculares, incluidas las que afectan a la córnea. Existe una necesidad particular de terapias que sean relativamente no invasivas y de fácil administración.

### Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción expone numerosas configuraciones, parámetros y similares ilustrativos. Debe reconocerse, sin embargo, que dicha descripción no pretende ser una limitación del alcance de la presente invención, sino que se proporciona como una descripción de realizaciones ilustrativas.

## Definiciones

- 5 En cada caso en la presente memoria, en las descripciones, aspectos, realizaciones y ejemplos de la presente invención, los términos “que comprende”, “que incluye”, etc., deben leerse en sentido amplio, sin limitaciones. Por lo tanto, a menos que el contexto requiera claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras “comprende”, “que comprende” y similares deben interpretarse en un sentido inclusivo en contraposición a un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de “incluyendo, pero sin limitación”.
- 10 Como se utiliza en la presente memoria, “aumentar” se refiere a métodos para aumentar uno o más del grosor, la dureza, el módulo elástico, la resistencia a la tracción y la regularidad de la córnea, incluido el tejido corneal (p. ej., la capa estromal). El aumento puede utilizarse para imponer una forma determinada a la córnea, es decir, la curvatura corneal. Los métodos de aumento pueden realizarse en presencia o ausencia de una afección particular del ojo o de la córnea. El aumento puede implicar el incremento de componentes en la matriz extracelular de la córnea (p. ej., colágeno de tipo II).
- 15 El aumento también puede implicar el incremento del número de células (p. ej., queratocitos) en la córnea. El número de células puede aumentarse, por ejemplo, alterando el estado proliferativo de dichas células de quiescente a activo.
- “Coadministración” o “coadministrar” se refiere al uso combinado de agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos para el ojo, e incluye la administración de coformulaciones (es decir, formulaciones combinadas), así como la administración simultánea o secuencial de formulaciones separadas. Del mismo modo, “conjuntamente” se refiere al uso combinado de una composición terapéutica y un dispositivo/procedimiento terapéutico. Esto puede incluir el uso de la composición antes del uso del dispositivo/procedimiento, simultáneamente con el dispositivo/procedimiento, y/o después del uso del dispositivo/procedimiento.
- 20 Por “afección” de la córnea se entiende una patología, defecto, daño, lesión, degeneración o disfunción de la córnea. La afección puede afectar al tejido corneal (p. ej., la capa estromal) o a las células corneales (p. ej., los queratocitos). La afección puede ser una afección aguda, por ejemplo, una abrasión o ulceración, o puede ser una afección crónica, por ejemplo, queratocono o miopía.
- 30 La “córnea”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la porción frontal transparente del ojo que cubre el iris, la pupila y la cámara anterior del ojo. Incluye el epitelio corneal, la capa de Bowman, el estroma corneal, la membrana de Descemet y el epitelio corneal. De particular interés es la capa estromal (también llamada *sustancia propia*) de la córnea, que comprende una matriz extracelular de fibras de colágeno dispuestas regularmente junto con queratocitos,
- 35 Un “derivado”, en relación con un derivado químico, se refiere a un compuesto que ha sido modificado químicamente. La presente descripción abarca cada uno de los compuestos químicos descritos en la presente memoria, así como cualquier derivado de los mismos, incluidas formas químicamente modificadas como sales, hidruros, ésteres y otras modificaciones del compuesto original.
- 40 “Aislado”, como se utiliza en la presente memoria, con especial referencia a los polipéptidos, se refiere a una molécula que está separada de su ambiente natural. Una molécula aislada puede obtenerse por cualquier método o combinación de métodos conocidos y utilizados en la técnica, incluidas las técnicas bioquímicas, recombinantes y sintéticas. Para obtener componentes aislados, los polipéptidos pueden prepararse mediante al menos una etapa de purificación o enriquecimiento. De particular interés son los polipéptidos y péptidos obtenidos por medios artificiales, es decir, no naturales. Esto incluye, entre otros, la química sintética, la tecnología recombinante, los protocolos de purificación, etc. Se incluyen polipéptidos aislados de fuentes naturales, recombinantes o sintéticas. También se incluyen los polipéptidos producidos por síntesis química, o por plásmidos, vectores u otras construcciones de expresión que pueden introducirse en una célula o en un sistema de traducción sin células. Dichos polipéptidos se distinguen claramente de los polipéptidos tal y como se producen de forma natural, sin intervención humana.
- 50 Los términos “proteína” o “polipéptido” (p. ej., con Id. de sec. n.º: T), y otros términos similares, para simplificar, se refieren a las moléculas descritas en la presente memoria. Estos términos no pretenden ofrecer una caracterización completa de estas moléculas. Por tanto, una proteína o polipéptido puede caracterizarse en la presente memoria por tener una secuencia de aminoácidos concreta, una representación bidimensional particular de la estructura, pero se entiende que la molécula real reivindicada tiene otras características, incluida la estructura tridimensional, la movilidad sobre determinados enlaces y otras propiedades de la molécula en su conjunto. La presente descripción barca las moléculas en sí y sus propiedades en su conjunto. Los términos “proteína” y “polipéptido” se utilizan indistintamente en la presente memoria.
- 55 Un “polipéptido” de TGFβ3 se refiere a polipéptidos obtenidos de cualquier fuente, por ejemplo, polipéptidos aislados de origen natural, polipéptidos recombinantes y polipéptidos sintéticos, e incluye polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de origen natural, así como polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos variantes, y fragmentos de dichas secuencias, como se describe en detalle en la presente memoria. El TGFβ3 también puede denominarse en la técnica factor de crecimiento transformante beta3, TGFB3, ARVD y FLJ16571.
- 60 La “identidad de secuencia” de aminoácidos se refiere a la comparación entre aminoácidos de dos o más polipéptidos. Una secuencia de prueba puede ser idéntica a una secuencia de referencia (es decir, comparte un 100 % de identidad),
- 65

o puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos. En aspectos preferidos, las sustituciones de aminoácidos pueden poseer propiedades químicas y/o físicas similares, como carga o hidrofobia, en comparación con el aminoácido de referencia. La identidad de secuencia puede determinarse normalmente mediante alineaciones de secuencias en las regiones de mayor homología. Los algoritmos de alineación de secuencias, por ejemplo los programas de alineación de secuencias BLAST®, son bien conocidos y ampliamente utilizados en la técnica. Basándose en la alineación de secuencias, puede determinarse el porcentaje de identidad entre las secuencias polipeptídicas comparadas.

Un “error de refracción”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere al error en el enfoque de la luz por el ojo. Los errores de refracción pueden incluir errores esféricos y errores cilíndricos. Se incluyen tanto las aberraciones de bajo orden como las de alto orden. Se incluyen específicamente como errores refractivos las afecciones del ojo denominadas miopía, hipermetropía, astigmatismo, anisometropía y presbicia.

“Regeneración”, en relación con la córnea, se refiere a la restauración de uno o más de la forma, el grosor, la regularidad, la dureza, el módulo elástico y la resistencia a la tracción de la córnea, incluida la del tejido corneal (p. ej., la capa estromal). Los métodos de regeneración pueden utilizarse para imponer una forma particular a la córnea, es decir, la curvatura corneal. Los métodos de regeneración pueden llevarse a cabo en el tratamiento de una afección particular del ojo, o de la córnea. La regeneración puede implicar el aumento de componentes en la matriz extracelular de la córnea (p. ej., colágeno de tipo II). La regeneración también puede implicar el aumento del número de células (p. ej., queratocitos) en la córnea. El número de células puede aumentarse, por ejemplo, alterando el estado proliferativo de dichas células de quiescente a activo.

“Reprogramación” de las células, por ejemplo, para las células de la córnea (p. ej., los queratocitos) se refiere a cambios en el estado de diferenciación. La reprogramación se asocia con uno o más cambios en la morfología celular, la expresión génica celular (p. ej., la expresión de colágeno, incluida la expresión de colágeno de tipo I y/o de tipo II), o el estado proliferativo de las células (p. ej., quiescente o activo).

El término “sujeto” se refiere a un animal humano o no humano.

“Prevenir” se refiere a detener o retrasar la aparición de una afección, por ejemplo una afección ocular, o en particular una afección corneal, como un trastorno u otro defecto de la córnea. Una medida preventiva tendrá como resultado la detención o el retraso de uno o más síntomas de la enfermedad, o la disminución de los síntomas en caso de que aparezcan. La prevención de una afección corneal puede implicar el aumento de la córnea, como se describe en detalle en la presente memoria.

“Tratar” se refiere a reducir, mejorar o resolver una afección, por ejemplo una afección ocular, o particularmente una afección corneal, como un trastorno u otro defecto de la córnea. Un tratamiento tendrá como resultado la reducción, mejora o eliminación de uno o más síntomas de la enfermedad. El tratamiento de una afección corneal puede implicar la regeneración de la córnea, como se detalla en la presente memoria. Las composiciones para su uso de la invención pueden ser para el tratamiento de diversas afecciones, para la prevención de diversas afecciones, o tanto para el tratamiento como para la prevención de diversas afecciones, como se describe en detalle en la presente memoria.

#### Regeneración de células y tejidos

Las tecnologías de regeneración celular y tisular son muy prometedoras para los tratamientos terapéuticos. Como se describe en la presente memoria, los inventores han desarrollado composiciones y métodos para modular células mediante reprogramación celular *in situ* con el fin de afectar a la expresión del colágeno de tipo II y a la deposición de matriz extracelular (MEC) en el tejido corneal. Esto, a su vez, se utiliza para reforzar y/o aumentar la córnea del ojo. Los inventores proporcionan de este modo un enfoque único para la regeneración y el aumento *in situ* / *in vivo* de la matriz estromal corneal.

Por consiguiente, las composiciones, combinaciones y kits descritos pueden utilizarse en la terapia de ingeniería tisular *in vivo* para tratar o prevenir el adelgazamiento o la irregularidad de la córnea asociada al queratocono o para tratar o prevenir un error refractivo del ojo asociado a la miopía. Como ya se ha señalado, la miopía se caracteriza por la curvatura excesiva de la córnea (Figura 1A), mientras que el queratocono es una distrofia corneal ectásica progresiva que da lugar a un patrón característico de adelgazamiento de la córnea (Figura 1B; imagen adaptada de Romero-Jimenez, Santodomingo-Rubido, & Wolffsohn 2010).

Los queratocitos corneales son relativamente quiescentes y normalmente solo producen grandes cantidades de matriz extracelular (MEC) cuando cambian a un fenotipo de fibroblasto o miofibroblasto. El depósito de MEC asociado a esos fenotipos suele provocar fibrosis corneal y pérdida de transparencia (Kadler, Baldock, Bella y Boot-Handford 2007). Los condrocitos, las células que forman el cartílago, secretan colágeno de tipo II, que es un colágeno fibrilar similar al de tipo I que se encuentra en la córnea. El colágeno de tipo II también se expresa por los queratocitos durante el desarrollo de la córnea de la cría de pollo y solo más tarde se sustituye por el de tipo I en el estroma maduro de la cría de pollo (Linsenmayer y col. 1990).

Los inventores han demostrado previamente que las células estromales de córneas humanas y de ratas adultas pueden reprogramarse para producir proteínas específicas de neuronas cuando se tratan con factores de crecimiento

especificadores del linaje neuronal (Greene y col. 2013). Estos datos demuestran que una población de células adultas puede reprogramarse simplemente mediante la modulación del entorno del factor de crecimiento, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ahora bien, como se demuestra en la presente memoria, los inventores demuestran que las células estromales corneales pueden inducirse *in vitro* y *ex vivo* para producir colágeno fibrilar específico de cartílago, colágeno de tipo II, tratando las células con factor de crecimiento transformante  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ) y dexametasona (Ejemplos 8 y 9). Concretamente, los inventores han demostrado que los queratocitos de biopsias de córnea humana queratocónica expresan colágeno de tipo II cuando se tratan con estos dos compuestos (Ejemplo 8). Además, con estudios en animales, los inventores han demostrado que los dos compuestos de TGF $\beta 3$  y dexametasona pueden administrarse *in vivo* mediante colirios para estimular la deposición de colágeno II (Ejemplo 9). De manera destacable, la deposición de colágeno de tipo II fue uniforme, mejorando la biomecánica de la córnea, sin fibrosis ni cicatrices, y sin efectos sobre la transparencia corneal (Ejemplos 11 y 13).

Sin desear ceñirnos a la teoría, la hipótesis es que el depósito de colágeno se produce por la reprogramación de las células del estroma hacia un fenotipo de condrocito. Se sabe que los condrocitos secretan colágeno de tipo II, que no solo es un colágeno fibrilar similar al de tipo I que se encuentra en la córnea, sino que también se expresa durante el desarrollo de la córnea del pollo (Linsenmayer y col. 1990). Solo más tarde se sustituye por colágeno de tipo I en el estroma maduro (Linsenmayer y col. 1990).

En los resultados descritos en la presente memoria, se observó un aumento inicial de la expresión de colágeno de tipo I tras el tratamiento de queratocitos corneales con TGF $\beta 3$  y dexametasona (Ejemplo 12). Sin embargo, los inventores consideran que el nivel observado de deposición de colágeno de tipo I sería insuficiente para dar rigidez/forma a una córnea. Además, la deposición de colágeno de tipo II se considera más factible como estrategia de tratamiento. Cabe señalar que el colágeno de tipo II es menos susceptible a la degradación enzimática, por ejemplo, por las enzimas presentes en una córnea queratocónica.

Según los resultados de los inventores, es posible utilizar la reprogramación de queratocitos para producir nuevas moléculas de la MEC como tratamiento eficaz para mejorar las características biomecánicas de la córnea. Esta estrategia se considera ventajosa, ya que reduce la susceptibilidad a la degradación por enzimas corneales, como se ha señalado anteriormente. El módulo de tratamiento descrito tiene como objetivo no solo estabilizar la córnea, sino también proporcionar ayuda correctiva para afecciones del ojo, incluidas diversas afecciones de la córnea y errores refractivos del ojo. Por tanto, las composiciones para su uso de la invención pueden ser, por ejemplo, para el tratamiento de queratocitos queratocónicos en la córnea ectásica. Además, las composiciones para su uso de la invención pueden ser para el tratamiento de la miopía y varias otras afecciones de la córnea, como se describe en detalle en la presente memoria.

#### Afecciones del ojo y la córnea

Las composiciones y combinaciones para su uso de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención del adelgazamiento o la irregularidad de una córnea de un sujeto, o el tratamiento o prevención de un error refractivo del ojo de un sujeto. Entre las afecciones ilustrativas se incluyen el queratocono, como se describe en detalle en la presente memoria, y afecciones relacionadas, incluidas las ectasias corneales como el queratoglobo, la degeneración marginal pelúcida y el queratocono posterior (véase, p. ej., Arffa 1997; Krachmer y col. 1984; Rabonitz 2004; Jinabhai y col. 2010). Se incluyen específicamente como defectos la miopía, la presbicia y también los astigmatismos, que abarcan los astigmatismos regulares e irregulares. También se incluyen los defectos congénitos de la córnea. Entre ellas se encuentran la córnea plana y la microcórnea, pudiendo esta última estar asociada al síndrome de alcoholismo fetal, el síndrome de Turner, el síndrome de Ehlers-Danlos, el síndrome de Weill-Marchesani, el síndrome de Waardenburg, el síndrome de Nance-Horan y el síndrome de Cornelia de Lange. También se incluye el queratoglobo (mencionado anteriormente) que puede estar asociado al síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV.

En ciertas situaciones, las composiciones para su uso de la invención pueden ser para prevenir el daño corneal. Los daños o la degeneración pueden estar asociados a una afección concreta de la córnea. Se incluye específicamente el derretimiento corneal, por ejemplo, el derretimiento corneal asociado a un trastorno inflamatorio, como la artritis reumatoide. Otras afecciones ilustrativas incluyen queratitis, como queratitis marginal, queratitis estromal, queratitis por exposición, queratitis neurotrófica, queratitis filamentosa, queratitis rosácea, queratitis vírica, incluida la queratitis herpética, queratitis fúngica, queratitis protozoaria y otras queratitis infecciosas, como la queratitis intersticial lútea, la queratitis microsporidial, la queratitis de Thygeson y la queratopatía cristalina infecciosa. También se incluye la queratitis ulcerosa, también llamada queratitis ulcerosa periférica (PUK), que incluye la queratitis ulcerosa asociada a una enfermedad sistémica, como la artritis reumatoide, la granulomatosis de Wegener, el lupus eritematoso sistémico, la policondritis recidivante y la poliarteritis nodosa. También se incluye la endoftalmítis. También se incluyen el edema corneal crónico, la úlcera de Mooren, el dellen, la flictenulosis, la degeneración de Terrien, la degeneración de Salzmann, la degeneración esferoide y la distrofia de Fuch. Dichas afecciones son bien conocidas y están bien caracterizadas en la técnica. Véase, por ejemplo, Jackson 2008; Denniston 2009; y Willshaw y col. 2000. Además, se incluyen las distrofias estromales, por ejemplo, la distrofia corneal reticular (p. ej., tipo 1 y tipo 2), la distrofia corneal granular (p. ej., tipo 1 y tipo 2), la distrofia corneal macular, la distrofia corneal de Schnyder, la distrofia corneal estromal congénita y la distrofia corneal moteada.

En otros aspectos adicionales, la invención abarca composiciones para su uso en el tratamiento o prevención de errores refractivos del ojo. Dichos errores de refracción pueden estar asociados a determinadas afecciones, como la miopía, la hipermetropía, la presbicia, la anisometropía, las aberraciones de alto orden y diversos astigmatismos. Las aberraciones de orden superior incluyen, entre otras, comas, tréboles, cuadriláteros, aberraciones esféricas y aberraciones identificadas mediante expresiones matemáticas (p. ej., polinomios de Zemike).

Las afecciones de la córnea pueden diagnosticarse mediante diversos métodos, como la tinción con fluoresceína, que puede incluir la prueba de Seidel, la microscopía especular, la topografía corneal, la tomografía isométrica, la paquimetría, la ecografía, las lámparas de hendidura, los raspados corneales y las biopsias. El diagnóstico también puede incluir evaluaciones de la agudeza visual y/o la opacificación. Las afecciones corneales pueden asociarse a uno o más síntomas de: dolor, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, disminución de la agudeza visual, edema, infiltrado de leucocitos, captación de fluoresceína, vascularización, enrojecimiento y síntomas sistémicos como cefaleas, náuseas y fatiga. Del mismo modo, los síntomas de los errores refractivos pueden incluir, entre otros: reducción de la agudeza visual, así como visión borrosa, visión doble, visión nublada, fatiga visual, sensación de cuerpo extraño, deslumbramientos o halos problemáticos, patrones de destellos de estrellas, imágenes fantasma, visión nocturna alterada, bizquera, mirada fija excesiva, parpadeo excesivo, dolores de cabeza, frotamiento ocular, tensión ocular, desecación de la superficie ocular, irritación ocular, enrojecimiento y espasmos oculares.

#### Composiciones terapéuticas

En varios aspectos, la composición para su uso puede formularse para incluir la combinación de componentes indicada (un polipéptido de TGFβ3 más dexametasona (o cualesquiera sales, ésteres o hidruros de la misma)), o puede formularse para incluir un primer componente (un polipéptido de TGFβ3 o como alternativa dexametasona (o cualesquiera sales, ésteres o hidruros de la misma)) con el segundo componente que se añadirá antes de la administración. Como alternativa, una combinación para su uso puede formularse para incluir un primer componente (un polipéptido de TGFβ3 o como alternativa dexametasona (o cualquier sal, éster o hidruro de la misma)), que se utiliza en administración simultánea o secuencial con una formulación que incluye el segundo componente.

En un aspecto, el polipéptido de TGFβ3 puede incluir al menos la siguiente secuencia de aminoácidos: ALDTNYCFRN LEENCCVRPL YIDFRQDLGW KVVHEPKGY ANFCSGPCPY LRSADTTHST VLGLYNTLNP EASASPCCVP QDLEPLTILY YVGRTPKVEQ LSNMVKKCSK CS (SEQ ID NO: 1) (referencia de GenBank CAR70088.1). El polipéptido de TGFβ3 puede incluir al menos 112 aminoácidos mostrados anteriormente, y puede tener una masa molecular de 25,5 kDa. Como alternativa, el polipéptido de TGFβ3 puede derivarse de los aminoácidos 644–850 (207 aminoácidos) de la secuencia del polipéptido precursor identificada en la referencia de GenBank CAA33024.1; Número de referencia GenBank: CAA33024; o Secuencia de Referencia del NCBI NP\_003230.1.

En otros aspectos, el polipéptido de TGFβ3 comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En aspectos adicionales, el polipéptido de TGFβ3 comprende al menos 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

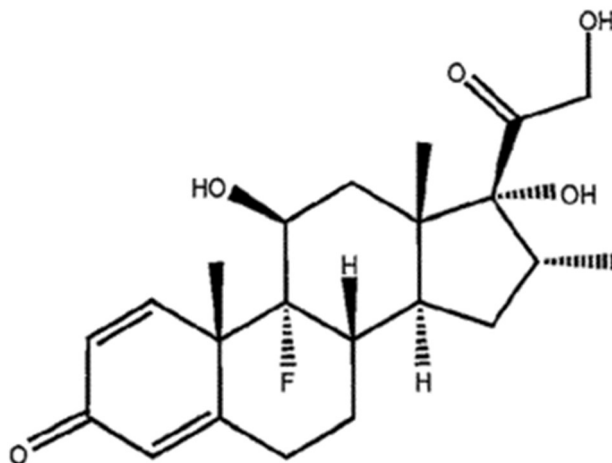
En un aspecto particular, el polipéptido de TGFβ3 o la variante o fragmento del mismo puede proporcionarse como un polipéptido recombinante. Por ejemplo, el polipéptido puede expresarse en sistemas de expresión en células o sin células, como es ampliamente conocido y utilizado en la técnica. Entre ellos se incluyen sistemas de expresión bacterianos, fúngicos, vegetales y de mamíferos. Se incluyen específicamente los sistemas de expresión que utilizan células de *E. coli*, células CHO, células HEK y células de *Nicotiana benthamiana*. El polipéptido de TGFβ3 o la variante o fragmento del mismo puede proporcionarse como polipéptido recombinante humano expresado en sistemas de expresión humanos o no humanos. El polipéptido de TGFβ3 o la variante o fragmento del mismo puede proporcionarse como una cadena polipeptídica homodimérica, no glicosilada, ligada a disulfuro, según métodos conocidos.

El polipéptido de TGFβ3 o la variante o fragmento del mismo puede aislarse a partir de sistemas de expresión recombinante mediante métodos estándar, incluidas técnicas cromatográficas bien conocidas. El polipéptido de TGFβ3 o la variante o fragmento del mismo puede incluir un marcador de secuencia para facilitar la escisión, el aislamiento y/o la localización del polipéptido. Según la presente invención, el polipéptido de TGFβ3 puede obtenerse de diversas fuentes comerciales. Por ejemplo, el TGFβ3 humano recombinante puede obtenerse de R&D Systems (números de catálogo 243-B3-002; 243-B3-010), BioVision, Inc. (números de catálogo 4344-500; 4344-50; 4344-5), o Prospec Protein Specialists (n.º de catálogo CYT-113; CYT-319).

La actividad biológica del polipéptido de TGFβ3 o de la variante o fragmento del mismo puede medirse según métodos ampliamente conocidos y utilizados. Por ejemplo, la actividad biológica puede medirse en cultivo por la capacidad de los polipéptidos para inhibir la proliferación de células epiteliales de pulmón de visón (MvLu) (véase, por ejemplo, Premaraj y col. 2006). Una actividad ilustrativa según esta medida se demuestra por una DE50 <50 ng/ml. Como alternativa, la actividad biológica puede medirse por la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación inducida por IL-4 de células HT-2 de ratón (bazo de BALB/c activado por eritrocitos de oveja en presencia de IL-2) (véase, por ejemplo, Tsang y col. 1995). La actividad ilustrativa por esta medición es típicamente

de 0,1 a 0,5 ng/ml. Como alternativa, se puede medir la actividad biológica de la composición que incluye la combinación de agentes descrita en la presente memoria mediante los métodos que se indican a continuación. Por ejemplo, la inducción de colágeno de tipo II (p. ej., colágeno de tipo II, alfa 1) en queratocitos puede evaluarse mediante una o más de las siguientes tecnologías: ensayos inmunohistoquímicos, ensayos de proteínas, análisis de transferencia de Western, análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR cuantitativa.

Como se describe en la presente memoria, la composición también puede incluir dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma. La dexametasona se caracteriza por tener la siguiente estructura química:



Los nombres comerciales para la dexametasona incluyen, por ejemplo, Decadron®, Dexametasona®, Diodes®, Hexadrol®, Maxidex®, y Minims®.

En diversos aspectos, pueden utilizarse derivados de la dexametasona, incluidos sus ésteres y sales. Algunos derivados ilustrativos son, entre otros: dexametasona-17-acetato (Reg. CAS: 1177-87-3), fosfato disódico de dexametasona (Reg. CAS: 2392-39-4), valerato de dexametasona (Reg. CAS: 14899-36-6), dexametasona-21-isonicotinato (Reg. CAS: 2265-64-7), palmitato de dexametasona (Reg. CAS: 33755-463), propionato de dexametasona (Reg. CAS: 55541-30-5), acefurato de dexametasona (Reg. CAS: 83880-70-0), dexametasona-21-galactósido (Reg. CAS: 92901-23-0), 21-tiopivalato de dexametasona, 21-tiopentanoato de dexametasona, 21-tiol-2-metil-butanoato de dexametasona, 21-tiol-3-metil-butanoato de dexametasona, 21-tiohexanoato de dexametasona, 21-tiol-4-metil-pentanoato de dexametasona, 21-tiol-3,3-dimetil-butanoato de dexametasona, 21-tiol-2-etil-butanoato de dexametasona, 21-tiooctanoato de dexametasona, 21-tiol-2-etil-hexanoato de dexametasona, 21-tiononanoato de dexametasona, 21-tiodecanoato de dexametasona, 21-p-fluorobenzoato de dexametasona o una combinación de los mismos. Se incluyen específicamente el alcohol de dexametasona y el fosfato sódico de dexametasona. También se incluyen derivados de la dexametasona, como se describe en el documento US-4177268.

La composición puede incluir agentes esteroideos relacionados además de la dexametasona. Por ejemplo, pueden utilizarse otros corticoesteroides, junto con la dexametasona. Para su uso como esteroides relacionados se prefieren los esteroides del Grupo C según la clasificación de Coopman, que incluye los esteroides del tipo betametasona, como la dexametasona, el fosfato sódico de dexametasona, la betametasona, el fosfato sódico de betametasona y la fluocortolona. Otros agentes esteroideos relacionados incluyen, pero sin limitarse a: fluorometalona, lotoprendol, medrisona, prednisolona, prednisona, rimexolona, hidrocortisona, lodoxamida o cualquier derivado o combinación del mismo. Se incluyen específicamente el acetato de fluorometalona, el alcohol de fluorometalona, el acetato de prednisolona, el fosfato sódico de prednisolona, el etabonato de lotoprendol, el acetato de hidrocortisona y la lodoxamida trometamina.

La composición puede incluir, por ejemplo, de 0,04 ng/ml a 4 ng/ml; o de 0,04 ng/ml a 0,4 ng/ml; o de 0,4 ng/ml a 4 ng/ml; o de 4 a 40 ng/ml; o de 40 ng/ml a 400 ng/ml, o de 40 ng/ml a 4000 ng/ml de dexametasona, o derivados de la misma o un agente esteroideo relacionado; o aproximadamente 0,04 ng/ml, aproximadamente 0,08 ng/ml, aproximadamente 0,12 ng/ml, aproximadamente 0,4 ng/ml, aproximadamente 0,8 ng/ml, aproximadamente 1,2 ng/ml, aproximadamente 4 ng/ml, aproximadamente 12 ng/ml, aproximadamente 24 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 120 ng/ml, aproximadamente 240 ng/ml, aproximadamente 400 ng/ml, aproximadamente 800 ng/ml, aproximadamente 1000 ng/ml, aproximadamente 1600 ng/ml, aproximadamente 2000 ng/ml, aproximadamente 2400 ng/ml, aproximadamente 3200 ng/ml o aproximadamente 4000 ng/ml de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma.

Como ejemplos adicionales, la composición puede incluir de 0,4 pg/ml a 40 pg/ml; o de 0,4 pg/ml a 4 pg/ml; o de 4 pg/ml a 40 pg/ml de dexametasona, o un derivado de la misma o un agente esteroideo relacionado; o aproximadamente 0,4 pg/ml, aproximadamente 0,8 pg/ml, aproximadamente 1 pg/ml, aproximadamente 1,2 pg/ml, aproximadamente

2 pg/ml, aproximadamente 4 pg/ml, aproximadamente 8 pg/ml, aproximadamente 12 pg/ml, aproximadamente 20 ug/ml o aproximadamente 40 pg/ml de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma.

5 Como ejemplos adicionales, la composición puede incluir de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml; o de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml; o de 1 mg/ml a 10 mg/ml; de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma; o aproximadamente 0,1 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml o aproximadamente 10 mg/ml de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma.

10 La composición puede incluir, por ejemplo, de 1 ng/ml a 1 pg/ml; o de 1 ng/ml a 10 ng/ml; o de 10 ng/ml a 100 ng/ml; o de 100 ng/ml a 1 pg/ml de polipéptido de TGFβ3 según se define en la presente memoria, o aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 800 ng/ml o aproximadamente 1 ug/ml de polipéptido de TGFβ3. En aspectos particulares, la composición puede incluir al menos 40 ng/ml de dexametasona, o un derivado de la misma o un agente esteroideo  
15 relacionado, junto con al menos 4 ng/ml de polipéptido de TGFβ3.

La composición también puede incluir uno o más agentes antiinflamatorios. Algunos agentes antiinflamatorios ilustrativos incluyen ketotifeno fumarato, diclofenaco sódico, flurbiprofeno sódico, ketorlac trometamina, suprofen, celecoxib, naproxeno, rofecoxib o cualquier derivado o combinación de los mismos. Se incluyen en particular los  
20 antiinflamatorios no esteroideos (AINE). La composición puede incluir además uno o más agentes anestésicos. Los anestésicos ilustrativos incluyen anestésicos tópicos como la proparacaína, la lidocaína y la tetracaína, y cualquier derivado o combinación de los mismos. Pueden seleccionarse para su inclusión en la composición otros agentes para el ojo; un experto en la técnica puede seleccionarlos según la enfermedad y las necesidades del sujeto en tratamiento.

25 Las composiciones descritas en la presente memoria pueden formularse para administración tópica, tal como se describe en la presente memoria y según métodos conocidos. En determinadas circunstancias, puede ser conveniente la administración intraocular. La composición puede suministrarse en cualquier forma adecuada para su administración al ojo. Las formulaciones ilustrativas incluyen, como mínimo, soluciones, suspensiones, emulsiones (dispersiones), geles, cremas o pomadas en un vehículo oftálmico adecuado. Por ejemplo, la composición puede suministrarse en  
30 forma de colirio, gel semisólido o aerosol. En ciertos aspectos, las lentes de contacto de moldeo u otros insertos/implantes pueden impregnarse con la composición para su uso de la invención. De este modo, la composición puede administrarse a la córnea de forma continua y prolongada mientras el sujeto lleva puestas las lentes de contacto.

Para la administración tópica al ojo, las composiciones pueden formularse con un intervalo de pH de 5,0 a 8,0. Este intervalo de pH puede conseguirse añadiendo tampones a la solución. Se prefiere que las formulaciones sean estables en soluciones tamponadas. Es decir, no hay ninguna interacción adversa entre el tampón y los agentes activos que provoque que la composición sea inestable, por ejemplo, por precipitación o agregación. La composición puede ser hipertónica (del 5 % al 40 %, preferiblemente aproximadamente un 10, 20, 30 o 40 %) o hipotónica (del 0 % al 5 %, preferiblemente aproximadamente un 1, 2, 3 o 4 %) según las necesidades del sujeto (p. ej.,  
35 necesidades de trabajo, horas de descanso, sueño, etc.). Puede usarse una composición hipertónica (p. ej., al 40 %) cuando se combina con lentes de contacto de moldeo, como se describe en detalle en la presente memoria.

Las composiciones pueden incluir uno o más conservantes adecuados como ingredientes opcionales. Pueden añadirse conservantes adecuados para evitar la contaminación, por ejemplo, bacteriana. Dichos agentes pueden incluir, pero sin limitación, cloruro de benzalconio, tiomersal, clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno, alcohol feniletílico, EDTA, ácido sórbico, Onamer® M y otros agentes conocidos por los expertos en la técnica, o cualquier combinación de los mismos. Dichos conservantes pueden emplearse típicamente a una concentración del 0,001 % al 1,0 % en peso de la composición.

Las composiciones pueden contener un codisolvente opcional. La solubilidad de los componentes de las presentes composiciones puede mejorarse mediante un tensioactivo u otro cosolvente adecuado en la composición. Dichos codisolventes/tensioactivos incluyen, por ejemplo, polisorbato 20, 60 y 80, tensioactivos polioxietileno/polioxipropileno (p. ej., Pluronic® F-68, F-84 y P-103), ciclodextrina, tiloxapol y otros agentes conocidos por los expertos en la técnica y cualquier combinación de los mismos. Dichos codisolventes pueden emplearse típicamente a una concentración del 0,01 % al 2 % en peso de la composición.

55 Pueden utilizarse agentes potenciadores de la penetración para aumentar la absorción de la composición en el ojo. Algunos agentes ilustrativos incluyen, como mínimo, cloruro de cetilpiridinio, ionóforos, tales como lasalocid, cloruro de benzalconio, parabenos, Tween 20, saponinas, Brij 35, Brij 78, Brij 98, ácido etilendiaminotetraacético, sales biliares y ácidos biliares (tales como colato de sodio, taurocolato de sodio, glicerodesoxicolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, ácido taurocólico, ácido quenodesoxicólico y ácido usrodesoxicólico), ácido cáprico, azona, ácido fusídico, lauramida de hexametileno, saponinas, octanamida de hexametileno y sulfóxido de decilmelilo.

60 Además, pueden utilizarse polímeros bioadhesivos que se adhieran a la capa de mucina que recubre el ojo, para prolongar el contacto de la composición con el ojo. Los polímeros bioadhesivos pueden ser hidrocoloides macromoleculares con numerosos grupos funcionales hidrófilos, como carboxilos, hidroxilos, amidas y sulfatos  
65

capaces de establecer interacciones electrostáticas. Algunos agentes ilustrativos incluyen, como mínimo, ácido poliárilico (p. ej., carbopol, carbófilo y policarbofilo) y carboximetilcelulosa.

5 También pueden utilizarse sistemas de liberación controlada; dichos sistemas pueden incluir geles in situ, partículas coloidales, nanopartículas y/o liposomas. Otros sistemas de administración de fármacos incluyen, entre otros: insertos oculares no erosionables, insertos oculares erosionables, hidrogeles, escudos de colágeno, liposomas, películas cargadas de fármacos (p. ej., NOD®) e iontoforesis.

10 Las composiciones pueden incluir, además, un agente opcional para aumentar la viscosidad. La viscosidad aumentada por encima de la de las soluciones acuosas simples puede ser deseable para aumentar la absorción ocular de los compuestos activos, para disminuir la variabilidad en la dispensación de la formulación, para disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de la formulación y/o para mejorar de otro modo la formulación oftálmica. Dichos agentes formadores de viscosidad incluyen, a modo de ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, otros agentes conocidos por los expertos en la técnica, o una combinación de los mismos. Dichos agentes pueden emplearse típicamente a una concentración del 0,01 % al 2 % en peso de la composición.

20 En aspectos particulares, las composiciones incluyen un agente gelificante, por ejemplo, polisacáridos solubles en agua de alta masa molecular, como la goma gellan. La goma gellan puede obtenerse de diversas fuentes comerciales, por ejemplo, bajo el nombre comercial Kelcogel®. Concretamente, Kelcogel® LT 100 puede utilizarse como un gellan de malla fina y alto contenido en acilo, que forma geles suaves, elásticos y no quebradizos. En aspectos específicos, la composición a base de goma gellan se formula como un colirio al 0,5 %.

25 Pueden utilizarse otros agentes para estabilizar o mejorar la composición. Por ejemplo, uno o más de EDTA, cloruro sódico, tiloxapol, sulfato sódico y/o hidroxietilcelulosa pueden tener efectos beneficiosos adicionales de estabilización adicional de la composición.

#### Métodos terapéuticos

30 Las composiciones para su uso se utilizan para tratar o prevenir el adelgazamiento o la irregularidad de una córnea de un sujeto; o tratar o prevenir un error refractivo del ojo de un sujeto. Por tanto, las composiciones descritas en la presente memoria pueden utilizarse para tratar diversas afecciones de la córnea y corregir errores refractivos del ojo, y pueden utilizarse como terapia coadyuvante con otros tratamientos oculares.

35 Como se ha indicado anteriormente, la composición para su uso puede formularse en cualquier medio adecuado para su administración al ojo. Como formulaciones se incluyen soluciones oftálmicas, cremas, emulsiones, pomadas y geles. Se señalan específicamente las formulaciones que se elaboran como colirios. En un aspecto particular, la composición para su uso puede administrarse en forma de colirio utilizando cualquiera de los muchos tipos de dispensadores de colirios existentes en el mercado. A modo de ejemplo, el envase para las composiciones para su uso de la invención puede ser transparente, translúcido y opaco, y puede tener otras propiedades o combinación de propiedades, como estar revestido de vidrio, ser a prueba de manipulaciones, estar envasado en alícuotas de una o pocas dosis, y cualquier combinación de los mismos.

45 La composición para su uso puede administrarse en cantidades terapéuticamente eficaces a un sujeto para lograr un resultado médico deseado. Concretamente, la composición para su uso puede administrarse en cantidades para tratar una afección oftálmica descrita en la presente memoria, o al menos mitigar uno o más síntomas de dicha afección. La dosificación precisa de la composición para su uso (es decir, la cantidad y la programación) puede determinarse por un médico, según el sujeto y la afección presentada. Las formulaciones ilustrativas (p. ej., colirios) pueden administrarse de 1 a 24 veces al día, o de 1 a 12 veces al día, o de 1 a 6 veces al día, o de 1 a 4 veces al día, o de 1 a 3 veces al día, o de 1 a 2 veces al día, o 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 o 24 veces al día. La composición para su uso puede aplicarse tópicamente como colirio, colocando una gota en cada ojo a tratar. Como alternativa, pueden aplicarse de 2 a 3 gotas en cada ojo.

55 Para la composición para su uso descrita, el intervalo de dosificación puede ser, por ejemplo, de 0,2 pg a 2,4 ng; o de 2 pg a 2,4 ng de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma; o aproximadamente 0,2 pg, aproximadamente 0,4 pg, aproximadamente 0,6 pg, aproximadamente 0,8 pg, aproximadamente 1,2 pg, aproximadamente 2,4 pg, aproximadamente 2 pg, aproximadamente 4 pg, aproximadamente 6 pg, aproximadamente 8 pg, aproximadamente 12 pg, aproximadamente 18 pg, aproximadamente 24 pg, aproximadamente 0,2 ng, aproximadamente 0,26 ng, aproximadamente 0,4 ng, aproximadamente 0,6 ng, aproximadamente 0,8 ng, aproximadamente 1,2 ng, aproximadamente 1,8 ng o aproximadamente 2,4 ng de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma, por ojo para una dosis.

60 Como otros ejemplos, el intervalo de dosificación puede ser de 12 ng a 1,3 pg; o de 6 ng a 600 ng de dexametasona, o derivado de la misma o un agente esteroideo relacionado; o aproximadamente 6 ng, aproximadamente 8 ng, aproximadamente 12 ng, aproximadamente 16 ng, aproximadamente 18 ng, aproximadamente 24 ng, aproximadamente 26 ng, aproximadamente 30 ng, aproximadamente 36 ng, aproximadamente 40 ng, aproximadamente 48 ng, aproximadamente 52 ng, aproximadamente 54 ng, aproximadamente 60 ng, aproximadamente 72 ng, aproximadamente 78 ng, aproximadamente 80 ng, aproximadamente 90 ng, aproximadamente 120 ng, aproximadamente 130 ng, aproximadamente 160 ng, aproximadamente 180 ng, aproximadamente 240 ng, aproximadamente 260 ng,

aproximadamente 300 ng, aproximadamente 360 ng, aproximadamente 400 ng, aproximadamente 480 ng, aproximadamente 520 ng, aproximadamente 540 ng, aproximadamente 600 ng, aproximadamente 720 ng, aproximadamente 780 ng, aproximadamente 900 ng, aproximadamente 1,2 µg, aproximadamente 1,3 µg de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma, por ojo para una dosis.

5 Como otros ejemplos más, el intervalo de dosificación puede ser de 1,5 pg a 150 pg; de 2,6 pg a 260 pg; o de 6,5 pg a 650 pg de dexametasona, o un derivado de la misma o un agente esteroideo relacionado; o aproximadamente 1,5 pg, aproximadamente 2 pg, aproximadamente 3 pg, aproximadamente 4,5 pg, aproximadamente 6 pg, aproximadamente 6,5 pg, aproximadamente 7,5 pg, aproximadamente 10 pg, aproximadamente 15 pg, aproximadamente 22,5 pg, aproximadamente 32,5 pg, aproximadamente 20 pg, aproximadamente 26 pg, aproximadamente 30 pg, aproximadamente 40 pg, aproximadamente 45 pg, aproximadamente 60 pg, aproximadamente 65 pg, aproximadamente 75 pg, aproximadamente 80 pg, aproximadamente 90 pg, aproximadamente 100 pg, aproximadamente 120 pg, aproximadamente 130 pg, aproximadamente 150 pg, aproximadamente 180 pg, aproximadamente 225 pg, aproximadamente 240 pg, aproximadamente 260 pg, aproximadamente 200 pg, aproximadamente 300 pg, aproximadamente 325 pg, aproximadamente 450 pg, aproximadamente 600 pg o aproximadamente 650 pg de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma, por ojo para una dosis. Se reconoce que existen formulaciones específicas de dexametasona disponibles en el mercado, que pueden utilizarse según las dosis y la pauta aceptadas.

20 Cualquiera de las dosis de dexametasona mencionadas anteriormente puede coadministrarse con un intervalo de dosis de, por ejemplo, 5 pg a 65 ng; o de 0,5 ng a 65 ng de polipéptido de TGFβ3, o variantes o fragmentos del mismo; o aproximadamente 5 pg, aproximadamente 10 pg, aproximadamente 15 pg, aproximadamente 20 pg, aproximadamente 30 pg, aproximadamente 45 pg, aproximadamente 60 pg, aproximadamente 0,05 ng, aproximadamente 0,1 ng, aproximadamente 0,15 ng, aproximadamente 0,2 ng, aproximadamente 0,3 ng, aproximadamente 0,45 ng, aproximadamente 0,5 ng, aproximadamente 0,6 ng, aproximadamente 0,65 ng, aproximadamente 1 ng, aproximadamente 1,5 ng, aproximadamente 2 ng, aproximadamente 3 ng, aproximadamente 4 ng, aproximadamente 4,5 ng, aproximadamente 6 ng, aproximadamente 6,5 ng, aproximadamente 7,5 ng, aproximadamente 9 ng, aproximadamente 10 ng, aproximadamente 12 ng, aproximadamente 13 ng, aproximadamente 15 ng, aproximadamente 16 ng, aproximadamente 20 ng, aproximadamente 22,5 ng, aproximadamente 24 ng, aproximadamente 30 ng, aproximadamente 32,5 ng, aproximadamente 36 ng, aproximadamente 40 ng, aproximadamente 45 ng, aproximadamente 48 ng, aproximadamente 50 ng, aproximadamente 52 ng, aproximadamente 60 ng o aproximadamente 65 ng de polipéptido de TGFβ3 como se define en la presente memoria, por ojo para una dosis.

35 La dosis para un ojo puede ser de aproximadamente una gota de la composición descrita para su uso. Una gota de composición puede ser de 10 pl a 200 pl, de 20 pl a 120 pl, o de 50 pl a 80 pl o cualquier valor intermedio. Por ejemplo, los dispensadores como los pipeteadores pueden dispensar gotas de 1 pl a 300 pl y cualquier valor intermedio. Preferiblemente, el dispensador dosifica aproximadamente 15 pl, aproximadamente 20 pl, aproximadamente 30 pl, aproximadamente 45 pl, aproximadamente 60 pl o aproximadamente 65 pl por gota de la composición descrita.

40 Cuando la composición para su uso se administra a través de una lente de contacto u otro dispositivo de inserto/implante, la lente de contacto o inserto/implante puede incluir, por ejemplo, de 0,01 mg a 10 mg de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma; o aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 5 mg o aproximadamente 10 mg de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma. Como alternativa, la lente de contacto o el inserto/implante puede incluir de 10 ng a 100 ng de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma; o aproximadamente 1 ng, aproximadamente 5 ng, aproximadamente 10 ng, aproximadamente 20 ng, aproximadamente 50 ng, aproximadamente 80 ng, o aproximadamente 100 ng de dexametasona, o cualquier sal, éster o hidruro de la misma. Como ejemplos adicionales, la lente de contacto o inserto/implante puede incluir aproximadamente de 10 ng a 1 pg de polipéptido de TGFβ3; o aproximadamente 10 ng, aproximadamente 50 ng, aproximadamente 100 ng, aproximadamente 200 ng, aproximadamente 500 ng, aproximadamente 800 ng o aproximadamente 1 pg de polipéptido de TGFβ3 como se define en la presente memoria.

55 Las composiciones para su uso descritas en la presente memoria pueden utilizarse junto con diversos procedimientos quirúrgicos u otros tratamientos. Por ejemplo, las composiciones para su uso pueden utilizarse junto con métodos quirúrgicos y no quirúrgicos para la corrección refractiva del ojo. Algunos métodos ilustrativos incluyen, entre otros: queratotomía radial (RK), incluida la miniqueratotomía radial asimétrica (MARK), queratotomía hexagonal (HK), queratectomía fotorrefractiva (PRK), queratomileusis, queratomileusis in situ con láser (LASIK), p. ej., intraLASIK®, queratomileusis epitelial con láser (LASEK), p. ej., Epi-LASEK, queratoplastia lamelar automatizada (ALK), queratoplastia térmica con láser (LTK), queratoplastia conductiva (CK), incisiones relajantes limbares (LRI), queratotomía astigmática (AK), epiqueratofaquia, esclerotomía ciliar anterior (ACS), cirugía de refuerzo escleral, reversión de la presbicia, reversión de la presbicia con láser (LRP), anillos intracorneales (ICR), segmentos de anillos corneales intraestromales (p. ej., INTACTS®), lentes de contacto implantables, bandas de expansión escleral (SEB) e incrustaciones Kamra™. También se incluyen la termoqueratoplastia, la ortoqueratología, la ortoqueratología enzimática y la ortoqueratología química.

65 Las composiciones para su uso pueden utilizarse junto con la corrección quirúrgica de afecciones no refractivas, por ejemplo, la corrección quirúrgica de un desgarro corneal. En aspectos particulares, las composiciones para su uso descritas en la presente memoria pueden utilizarse junto con métodos quirúrgicos específicos realizados en la

córnea. Algunos métodos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: cirugía de trasplante de córnea, queratoplastia penetrante (PK), queratectomía fototerapéutica (PTK), escisión de pterigión, tatuaje corneal, inserción de queratoprótesis (p. ej., KPro o Dohman-Doane) e inserción de osteo-odonto-queratoprótesis (OOKP).

5 Las composiciones para su uso pueden utilizarse junto con la reticulación del colágeno corneal. La reticulación corneal implica típicamente el uso de una solución de riboflavina activada por exposición a la luz UV-A. Entre los métodos de reticulación más conocidos se encuentran: la reticulación corneal sin epitelio (protocolo Dresden o epi-off), la reticulación transepitelial (epi-on) y la reticulación acelerada. Los procedimientos de reticulación suelen estar disponibles y se comercializan como reticulación corneal CXL, C3-R® CCL® y KXL®, entre otros. La administración de la composición puede ser anterior y/o posterior al procedimiento de reticulación. Se propone que las composiciones descritas puedan utilizarse para evitar o contrarrestar los efectos perjudiciales de los procedimientos de reticulación, como la opacidad estromal y la pérdida de células (como se describe con más detalle más adelante). Además, la regeneración corneal con las composiciones descritas puede permitir la reticulación en sujetos que anteriormente no eran aptos para dichos procedimientos, por ejemplo, aquellos con un grosor corneal inferior a 400 pm. Además, las composiciones descritas pueden usarse para ralentizar o detener el adelgazamiento progresivo de la córnea, que no se abordaría con el uso de la reticulación por sí sola.

Las composiciones para su uso descritas en la presente memoria pueden coadministrarse con uno o más agentes adicionales para el ojo. En varios aspectos, la coadministración puede realizarse mediante la administración simultánea o posterior con dichos agentes, o mediante la coformulación con dichos agentes. Dependiendo de la afección que se esté tratando o previniendo, las composiciones para su uso descritas en la presente memoria pueden coadministrarse con uno o más agentes, entre los que se incluyen: antihistamínicos, simpaticomiméticos, bloqueadores de los receptores beta, parasimpaticomiméticos, parasimpaticolíticos, prostaglandinas, nutrientes, vasoconstrictores, lubricantes, antimicrobianos y anestésicos. Se incluyen específicamente diversos agentes antiinflamatorios, entre ellos los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Las composiciones para su uso también pueden coadministrarse con soluciones lubricantes oculares y soluciones sustitutivas de lágrimas.

Algunos ejemplos no limitantes de anestésicos incluyen: benzocaína, bupivacaína, cocaína, etidocaína, lidocaína, mepivacaína, pramoxina, prilocaína, cloroprocaína, procaína, proparacaína, ropicaína y tetracaína. Algunos ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen: ácido acetil salicílico, paracetamol, indometacina, sulfasalazina, olsalazina, salicilato sódico, trisalicilato de colina y magnesio, salsalato, diflunisal, ácido salicilsalicílico, sulindaco, etodolaco, tolmetina, diclofenaco, ketorolaco, ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, suprofeno, oxaproxina, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, oxicam, piroxicam, tenoxicam, pirazolidindionas, fenilbutazona, oxifentatrazona, feniramina, antazolina, nabumetona, inhibidores de COX-2 (Celebrex®), apazona, nimesulida y zileutón. Los glucocorticoides como la hidrocortisona, la prednisolona, la fluorometolona y la dexametasona también pueden utilizarse como agentes antiinflamatorios.

Los agentes antimicrobianos ilustrativos incluyen, pero sin limitación: bacitracina zinc, cloranfenicol, clorotetraciclina, ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, norfloxacino, sulfacetamida, sulfisoxazol, polimixina B, tetraciclina, tobramicina, idoxuridina, trifluridina, vidarabina, aciclovir, foscamet, ganciclovir, natamicina, anfotericina B, clotrimazol, econazol, fluconazol, ketoconazol, miconazol, flucitosina, clindamicina, pirimetamina, ácido fólico, sulfadiazina y trimetoprim sulfametoxazol. Algunos vasoconstrictores ilustrativos incluyen, entre otros: dipivefrina (Propine®), epinefrina, fenilefrina, apraclonidina, cocaína, hidroxianfetamina, nafazolina, tetrahidrozolina, dapiprazol, betaxolol, carteolol, levobunolol, metipranolol y timolol. Los nutrientes incluyen vitaminas, minerales y otros agentes beneficiosos como vitamina A, vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E, vitamina K y zinc.

En aspectos específicos, la composición para su uso descrita en la presente memoria se formula como colirio, y dicho colirio se utiliza junto con otras formulaciones de colirio. Estos otros colirios pueden incluir, entre otros: colirios de enjuague/lubricantes, tratamientos para el ojo seco, colirios con corticoides y antibióticos, colirios para el glaucoma, colirios antialérgicos/antiinflamatorios y colirios para la conjuntivitis.

Las composiciones para su uso pueden utilizarse junto con lentes de contacto, insertos corneales, implantes corneales o anillos intraestromales, para ayudar a sostener o remodelar la córnea del sujeto. Entre las inserciones corneales se incluyen dispositivos de implante intracorneal o extracorneal. Por ejemplo, pueden utilizarse lentes de contacto, anillos intraestromales u otros insertos/implantes para moldear o mantener la forma de la córnea antes, durante y/o después del tratamiento con la composición. Cabe señalar que un “inserto” corneal suele referirse a un dispositivo temporal insertado en la córnea, mientras que un “implante” corneal suele referirse a un dispositivo más permanente. Sin embargo, muchos dispositivos bien conocidos se describen indistintamente en la técnica como implantes/insertos. Por lo tanto, los términos “inserto/implante” utilizados en la presente memoria no deben considerarse estrictamente limitativos según el tiempo de uso.

La lente de contacto, el inserto corneal, el implante corneal o el anillo intraestromal pueden utilizarse como un kit con la composición descrita para tratar o prevenir el adelgazamiento o la irregularidad de la córnea de un sujeto; o tratar o prevenir un error refractivo del ojo de un sujeto. En diversos aspectos, la lente de contacto, el inserto corneal, el implante corneal o el anillo intraestromal puede actuar como portador de la composición o como un dispositivo de elución de la composición. En otros aspectos, la lente de contacto, el anillo intraestromal u otro inserto/implante corneal pueden utilizarse con la composición adecuada para su administración al ojo, por ejemplo, gotas oftálmicas, como se describe en

detalle en la presente memoria. En ciertos aspectos, puede utilizarse un programa informático para determinar las lentes de contacto, los insertos corneales, los implantes corneales o los anillos intraestromales más adecuados para el sujeto y/o para determinar la formulación de la composición. En aspectos particulares, el tratamiento que utiliza lentes de contacto, insertos corneales, implantes corneales o anillos intraestromales junto con la composición descrita en la presente memoria se utiliza antes o después de la cirugía ocular, por ejemplo, cirugía refractiva o de trasplante.

El tratamiento puede implicar la evaluación del sujeto (p. ej., edad, necesidades laborales del sujeto, defecto o enfermedad ocular, etc.), la prescripción del uso de lentes de contacto de moldeo, insertos corneales, implantes corneales o anillos intraestromales para ayudar con los cambios necesarios en el radio de curvatura de la superficie anterior de la córnea, y la prescripción de la composición descrita en la presente memoria para su uso junto con las lentes de contacto o los implantes/insertos. Las lentes de contacto o los implantes/insertos prescritos y utilizados por el sujeto pueden utilizarse para ejercer una fuerza mecánica sobre la córnea, induciendo así un cambio en la forma, es decir, en la potencia refractiva, de la córnea.

En ciertos aspectos preferidos, la córnea puede soportarse o moldearse mediante el uso de un inserto corneal, un implante corneal o un anillo intraestromal junto con la composición descrita. Algunos ejemplos de dispositivos disponibles en el mercado son los anillos intraestromales INTACS® y KeraRing. En otro aspecto, puede utilizarse una lente de contacto de moldeo junto con la composición descrita. Las lentes de contacto pueden ser duras o rígidas, o pueden ser lentes blandas. Como alternativa, la lente de contacto puede comprender porciones duras y blandas. Si se utiliza una lente de contacto blanda, se puede inducir una curvatura más positiva o negativa en la córnea, y las molestias en los ojos del sujeto disminuirán a medida que se adapte a las lentes de contacto. Si se utiliza una lente de contacto dura, puede ejercerse más presión mecánica sobre la córnea. Las lentes de contacto pueden ser permeables al gas. Las lentes de contacto moldeables pueden obtenerse de fuentes comerciales. Entre los ejemplos de lentes disponibles en el mercado se incluyen, como mínimo, las lentes DreamLite, OK Lens, EyeDream, MiraLens, DreamLens, i-GO OVC, GOV, Wake and See, CRT, Fargo/iSee, Emerald y Wave Contact Lens System.

Una vez colocada la lente de contacto, el inserto corneal, el implante corneal o el anillo intraestromal en el ojo del sujeto, puede administrarse al ojo la composición descrita en la presente memoria (p. ej., gotas oftálmicas). En determinadas circunstancias, puede ser conveniente preadministrar la composición antes de la colocación de la lente de contacto, el inserto corneal, el implante corneal o el anillo intraestromal. Ventajosamente, las lentes de contacto, los anillos intraestromales u otros insertos/implantes y la composición pueden utilizarse conjuntamente para producir un cambio en la forma, y por tanto en la potencia refractiva, de la córnea. La composición puede administrarse con mayor frecuencia para permitir que la córnea adopte el cambio de forma deseado. En ciertos aspectos, la composición se administra al menos cada 24, 12 u 8 horas. En otros aspectos, la composición se administra cada 6 horas. En ciertos otros aspectos, la composición se administra aproximadamente cada 3 horas. En otros aspectos, la composición se administra aproximadamente cada 2 horas. En otros aspectos más, la composición se administra cada hora.

Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, el uso combinado de lentes de contacto, insertos corneales, implantes corneales o anillos intraestromales y la composición descrita en la presente memoria puede inducir cambios en la estructura molecular de la córnea y puede inducir cambios en las células y proteínas como el colágeno (p. ej., colágeno de tipo II) que se encuentran en el estroma corneal. De este modo, la superficie de la córnea se hace más uniforme. Al reducir las irregularidades de la superficie de la córnea, mejora la calidad y nitidez de todas las imágenes (es decir, la agudeza visual).

Para el cálculo de las lentes de contacto de moldeo se toma la queratometría más plana. Un experto en la técnica también podría utilizar la queratometría más pronunciada o una media de ambas y, basándose en esta curvatura corneal, realizar los cálculos necesarios para aplanar o aumentar el radio de curvatura de la superficie anterior de la córnea y corregir así el defecto refractivo del ojo. La curva base de la lente de contacto de moldeo puede calcularse a partir del cambio de potencia refractiva de cada ojo por separado. En aspectos particulares, la curva base de la lente de contacto de moldeo puede calcularse partiendo de una a cuatro dioptrías más planas o más inclinadas, más preferiblemente de una a tres dioptrías más planas o más inclinadas, aún más preferiblemente de una a dos dioptrías más planas o más inclinadas, dependiendo del error de refracción que se requiera. La curva periférica de la base depende de la adaptación de la lente de contacto de moldeo y se calcula que es 0,5 mm de radio mayor que la zona central, pero puede variar en función del diseño.

El diámetro de la lente de contacto de moldeo utilizada según la invención puede ser de 8,0 mm a 18,0 mm. Las lentes disponibles en el mercado se fabrican con dichos diámetros. En determinados aspectos, la lente de contacto de moldeo puede ser una lente de contacto dura con un diámetro comprendido entre 8,0 mm y 12,0 mm. En otros aspectos, la lente de contacto de moldeo puede ser una lente de contacto blanda con un diámetro comprendido entre 13,0 mm y 15,0 mm. Las lentes de contacto blandas pueden cubrir toda la córnea e ir de esclerótica a esclerótica. En otros aspectos, la lente de contacto de moldeo puede estar compuesta de materiales duros y blandos. La lente de contacto puede ser dura en el centro, hasta aproximadamente 12,0 mm, 13,0 mm, 14,0 mm o 15,0 mm, y blanda en la periferia hasta 16,0 mm, 17,0 mm y 18,0 mm. Una lente de contacto más grande, preferiblemente una lente de contacto blanda, puede utilizarse por la noche como lente de contacto de moldeo.

La potencia de las lentes de contacto de moldeo puede determinarse a la potencia refractiva más cercana posible que el sujeto necesite para ver cómodamente. Durante el proceso de adaptación con las lentes de contacto de moldeo, si la visión no es adecuada para las necesidades del sujeto, se le prescriben gafas mientras sigue el

tratamiento. A medida que se remodela o se ha remodelado la córnea, pueden repetirse varias mediciones optométricas para confirmar que el tratamiento progresa según lo previsto y es adecuado. Dichas mediciones pueden incluir la evaluación de la agudeza visual para visión cercana y lejana, ortotipos, mediciones de queratometría, retinoscopia objetiva y subjetiva, diagramas de la adaptación de la lente de contacto de moldeo, movimiento de la lente de contacto de moldeo y comodidad de la lente de contacto de moldeo.

Una vez realizadas las mediciones, pueden introducirse cambios en el programa de tratamiento en función de las mismas. Con cada evaluación, se puede decidir si continuar con la misma lente de contacto de moldeo o si se debe utilizar una nueva lente de contacto. Además, se puede tomar la misma decisión con respecto a la composición que se utiliza con las lentes de contacto de moldeo. Se pueden realizar cambios en las lentes de contacto de moldeo y/o en la composición para inducir la remodelación deseada de la córnea a lo largo de varias semanas. En ciertos aspectos, se realizan revisiones periódicas semanales durante las primeras 8 semanas tras el inicio del tratamiento.

La composición descrita en la presente memoria induce cambios en el contenido de colágeno de la córnea (p. ej., colágeno de tipo II). Otros aspectos de la anatomía, histología y fisiología de la córnea también pueden verse afectados por la composición. La composición puede ser hipertónica o hipotónica para inducir cambios en la hidratación de la córnea. La composición puede cambiar la estructura molecular de la córnea (p. ej., la matriz extracelular) y, de este modo, aumentar o reparar la córnea, o remodelar la córnea hasta la curvatura deseada.

Al remodelar la córnea, puede ser conveniente coadministrar una o más enzimas para ablandar la córnea. Las enzimas ilustrativas incluyen, entre otras, la hialuronidasa, la condroitinasa ABC, la condroitinasa AC, la queratanasa y la estromelisinasa, que se ha demostrado que actúan sobre diversos componentes proteoglicanos de la córnea. También se incluyen la enzima colagenasa, la metaloproteínasa de matriz 1 (colagenasa intersticial) y la metaloproteínasa de matriz 2 (gelatinasa). Cuando la composición para su uso se coadministra con alguna de dichas enzimas, puede ser conveniente incluir un vehículo como un polímero (p. ej., metilcelulosa, alcohol polivinílico, celulosa, etc.) en la composición para su uso para potenciar el funcionamiento de dichas enzimas. Pueden incluirse agentes adicionales para activar las enzimas metaloproteínasas, por ejemplo, interleucina-1a, factor de necrosis tumoral  $\alpha/\beta$  y cualquiera de sus subtipos, urato monosódico monohidratado, acetato 4-amino fenilmercúrico, amiloide sérico humano A, microglobina B2 humana y cloruro de cobre. También puede incluirse carbamida (urea). También puede utilizarse cualquier combinación de estos agentes.

La composición para su uso también puede coadministrarse con una o más enzimas que degradan otros azúcares o proteínas que se encuentran en la córnea. La composición para su uso puede coadministrarse con uno o más anestésicos utilizados para reducir la irritación por la lente de contacto de moldeo o por cualquier inserto/implante corneal en la córnea. La composición para su uso puede coadministrarse con uno o más lubricantes para mejorar la comodidad del sujeto durante el tratamiento. En otros aspectos, la composición para su uso puede coadministrarse con uno o más agentes antimicrobianos, como agentes antibacterianos, antivirales y/o antifúngicos. La composición para su uso también puede coadministrarse con uno o más vasoconstrictores. El experto en la técnica puede determinar los agentes apropiados para la coadministración al sujeto en función de la enfermedad tratada.

En ciertos aspectos, la composición puede suministrarse en un kit tal como se define en las reivindicaciones. El kit puede incluir uno o más de: lentes de contacto de moldeo, gotas lubricantes para los ojos, soluciones limpiadoras o de otro tipo para las lentes de contacto, un estuche para las lentes de contacto, un par adicional de lentes de contacto e instrucciones para llevar las lentes de contacto y utilizar la composición. La composición proporcionada con el kit puede formularse para incluir la combinación señalada de componentes (un polipéptido de TGF $\beta$ 3 como se define en la presente memoria más dexametasona (o cualquier sal, éster o hidruro de la misma)).

## Ejemplos

Los ejemplos descritos en la presente memoria se proporcionan con el fin de ilustrar realizaciones y aspectos específicos de la invención y no pretenden limitar la invención en modo alguno. Los expertos habituales en la técnica pueden utilizar las descripciones y enseñanzas de la presente memoria para producir otras realizaciones, aspectos y variaciones sin experimentación indebida.

### Ejemplo 1: Resumen de los experimentos

En experimentos anteriores, los inventores han demostrado que es posible dirigir los queratocitos para que se diferencien hacia un linaje neuronal. Los experimentos descritos en la presente memoria han tenido como objetivo investigar el potencial de los queratocitos para transformarse en células similares a los condrocitos que secretan colágeno de tipo II específico del cartílago. Se cree que este tipo de cartílago se expresa durante el desarrollo (Linsenmayer y col. 1990). Otro objetivo ha sido determinar si se podía inducir *in vivo* la deposición de colágeno de tipo II en las córneas de ratas vivas y si este tratamiento afectaba positivamente a las propiedades ópticas de las córneas. Otro objetivo ha sido determinar si los queratocitos de los tejidos queratocónicos podrían someterse a este método de reprogramación celular y a la consiguiente producción de MEC rica en colágeno de tipo II. Finalmente, los experimentos tienen como objetivo evaluar el efecto de la deposición de colágeno tipo II sobre las propiedades biomecánicas de las córneas tratadas *in vivo* y *ex vivo* córneas tratadas mediante ensayos de nanoindentación, una estrategia de bioingeniería que permite analizar la dureza y el módulo elástico.

Ejemplo 2: Muestras de tejido

Tejido humano

5 Se obtuvieron córneas humanas enteras de cadáver, córneas queratocónicas obtenidas en el momento de la cirugía de trasplante, bordes limbares humanos y tapones DSEK cortados por el cirujano (tejido estromal sobrante de la queratoplastia endotelial con extracción de Descemet's) de donantes procedentes del New Zealand National Eye Bank (banco oftalmológico nacional de Nueva Zelanda, Auckland, Nueva Zelanda). Los bordes limbares humanos se recogieron después de retirar el botón corneal central para la cirugía de trasplante de córnea, dejando un margen corneal de 2 mm desde la unión limbal.

10 Antes de utilizar los tejidos, se obtuvo la aprobación ética de la investigación y el consentimiento del Comité Regional de Ética Humana de Northern X. Todos los tejidos, hasta su utilización, se conservaron en medio del New Zealand National Eye Bank (FCS al 2 %, L-glutamina 2 mM, 1 x Anti-Anti en MEM de Eagle) y se transportaron en medio de transporte del New Zealand Eye Bank (medio del banco oftalmológico complementado con dextrano al 5 %).

15 Tejido animal

La aprobación ética de los estudios con animales se obtuvo del Comité de Ética Animal de la Universidad de Auckland (número de solicitud R856). Se obtuvieron ojos y cartílagos de ratas Wistar macho adultas de 6–8 semanas de edad tras su eutanasia en una cámara de dióxido de carbono. Se extrajo todo el ojo del animal y se diseccionó cuidadosamente la córnea con unas tijeras quirúrgicas con la ayuda de un microscopio de disección. La apófisis xifoides, que es una parte del esternón que contiene una placa fina y ancha de cartílago en su extremo, se diseccionó utilizando una hoja de bisturí. El tejido animal se lavó con povidona yodada (PVP-I) y tiosulfato sódico. El exceso de grasa y tejido que cubre el cartílago se raspó con una cuchilla. Los ojos y cartílagos recién extraídos se conservaron durante un periodo de tiempo mínimo en solución salina tamponada con fosfato hasta su utilización.

25 Ejemplo 3: Análisis histológico

Preparación de tejidos y criosección

30 Los trozos de córnea y cartílago (2 mm x 2 mm) se incrustaron en un compuesto de temperatura de corte óptima (OCT, Tissue-Tek, Sakura, Países Bajos) antes de congelarlas en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de 10–15 µm de grosor utilizando un criostato Microm HM550 (Thermo-Scientific, EE. UU.) y se montaron en portaobjetos electrostáticos SuperFrost™ Plus (Menzel-Glenser, Alemania). Las criosecciones se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

35 Cultivo de células y tejidos

Digestión de tejidos y preparación de células a partir de córneas humanas y de rata

40 Se diseccionaron los bordes limbares para aislar el estroma de la esclerótica en una campana de flujo laminar de clase II. A continuación, el epitelio corneal y el endotelio se rasparon suavemente con un querátomo y se desecharon. Los tapones DSEK también se rasparon suavemente con un querátomo para eliminar el epitelio. A continuación, el tejido estromal restante se digirió en colagenasa de tipo II al 0,4 % (Sigma-Aldrich), en solución salina equilibrada de Hanks (GIBCO®, Life Technologies) a 37 °C con mezclado suave en un agitador orbital. Se utilizaron diversos tiempos de digestión, siendo 5 horas el tiempo necesario para una digestión óptima del tejido y la viabilidad celular.

45 Una vez finalizada la digestión del tejido, las células se separaron por centrifugación a 1200 rpm durante siete minutos. A continuación, las células se resuspendieron en una cantidad mínima de un medio de cultivo celular adecuado y se contaron utilizando un microscopio invertido de sobremesa Leica DM IL y un hemocitómetro Neubauer. Se utilizó una proporción 1:1 de suspensión celular añadida a la solución de azul tripano (solución madre de azul tripano al 0,04 % en PBS) con un mínimo de tres recuentos por muestra y se tomó el valor medio.

Cultivo celular de queratocitos corneales

55 Todas las manipulaciones celulares se realizaron en una campana de flujo laminar de clase II utilizando una técnica aséptica. Los queratocitos aislados se cultivaron en placas de racimo de 12 o 24 pocillos (Falcon) sobre cubreobjetos de plástico o vidrio en 2–3 ml de medio de cultivo celular. Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo se cambiaron a las 24 horas y, posteriormente, cada dos días o con mayor frecuencia en caso necesario. Los cultivos se observaron diariamente con un microscopio invertido de sobremesa Leica DM IL. Para el cultivo de sedimentos celulares, las células recién obtenidas tras el tejido se sedimentaron centrifugándolas a 300 g durante 7 minutos a 20 °C en un tubo cónico de plástico. Se añadieron a los tubos los medios de cultivo adecuados. Tras 24 horas de incubación a 37 °C, las células se habían contraído y formaban un precipitado que no se adhería a las paredes del tubo. Los sedimentos se cultivaron en 2 ml de medio en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante tres semanas. Los medios se cambiaron cada dos días.

65

Cultivo organotípico en secciones

El tejido corneal y cartilaginoso humano y de rata se cortó en secciones finas (1–2 mm) en un plano anteroposterior con una cuchilla y las secciones se colocaron en un sistema de cultivo organotípico de interfase aire-líquido (Figura 2). Brevemente, los explantes de tejido sano se cultivaron en insertos de cultivo celular de 0,4 cm de tamaño de poro (Millicell, Francia) en la interfaz entre el medio de cultivo y un entorno rico en CO<sub>2</sub>. Las secciones de córnea se colocaron con el epitelio hacia arriba en placas de cultivo celular con 3 ml de medio de cultivo. Los medios de cultivo se cambiaron cada dos días.

Ejemplo 3: Reprogramación *in vitro*

Medios de cultivo

Se utilizaron varios medios hechos a medida, como se describe en la tabla siguiente.

Tabla 1: Medios de cultivo celular utilizados

Nombre	Medio base	Otros componentes
<b>Medio de proliferación de fibroblastos</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies, GIBCO®)	FBS al 10 %, Anti-anti al 1 % (solución madre 100X), GlutaMAX™ al 1 % (solución madre 100X)
<b>Medio de reprogramación condrogénica</b>	DMEM avanzado (Life Technologies, GIBCO®)	10 ng/ml de TGFp3 (Abeam, ab52313), 10 <sup>-7</sup> M dexametasona (Abeam, ab120743), 1 % GlutaMAX™  (Life Technologies, Gibco®) (solución madre 100X), 1 % Anti-Anti-Anti (solución madre 100X) (Life Technologies, Gibco®)
<b>Medio de control</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	GlutaMAX™ al 1 % (solución madre 100X), Anti-Anti al 1 % (solución madre 100X)

Reprogramación condrogénica de queratocitos

Las secciones de tejido se cultivaron en el medio de diferenciación condrogénica durante intervalos de tiempo variables para determinar el tiempo óptimo necesario para el tratamiento con el factor de crecimiento. Se recogieron muestras para cada punto temporal (Tabla 2). Para obtener una monocapa de células, se sembraron queratocitos en cubreobjetos de vidrio a una densidad de 15 x 10<sup>4</sup> por cm<sup>2</sup>. Se dejó que las células se adhirieran a los cubreobjetos durante 24 horas y se cambiaron los medios de cultivo cada dos días. Los cultivos se mantuvieron hasta 3 semanas.

Tabla 2: Puntos temporales experimentales para el cultivo de secciones de tejido corneal

	Punto temporal 1 Semana 1	Punto temporal 1 Semana 2	Punto temporal 1 Semana 3
<b>Muestra 1</b>	Medio de diferenciación condrogénica	Medio de control	Medio de control
	Punto temporal 1 Semana 1	Punto temporal 1 Semana 2	Punto temporal 1 Semana 3
<b>Muestra 2</b>	Medio de diferenciación condrogénica	Medio de diferenciación condrogénica	Medio de control
<b>Muestra 3</b>	Medio de diferenciación condrogénica	Medio de diferenciación condrogénica	Medio de diferenciación condrogénica
<b>Muestra 4</b>	Medio de control	Medio de control	Medio de control

Ejemplo 4: Reprogramación *in vivo*

Colirio en gel para la administración de factores de crecimiento

Los colirios se formularon utilizando goma gellan, que es un polisacárido soluble en agua producido por la bacteria *Pseudomonas elodea*. El uso de una formulación a base de gel permite prolongar el tiempo de residencia en la córnea y aumentar la biodisponibilidad ocular del agente terapéutico. Dado que la goma gellan polimérica es un polímero aniónico, se gelifica *in situ* en presencia de cationes mono y divalentes como Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> (Bakliwal y Pawar 2010). Los electrolitos presentes en el líquido lagrimal provocan la gelificación del polímero cuando se instila en el ojo, lo que a su vez se traduce en un mayor tiempo de residencia y una mayor biodisponibilidad del fármaco (Ludwig 2005). Según estudios previos de formulación, la formulación polimérica no es irritante y es segura para su uso *in vivo* (Rupenthal, Green y Alany 2011).

Se preparó una solución al 0,5 % calentando primero agua destilada a 80 °C, seguida de la adición de goma gellan (Kelcogel™ EE. UU.) con agitación constante. Una vez que el polvo se disolvió completamente, la solución se enfrió y se conservó a 4 °C. Las cantidades apropiadas de factores de crecimiento se añadieron al gel líquido con agitación constante. Se utilizó una concentración de factores de crecimiento diez veces superior a la empleada en el medio de cultivo para compensar el fármaco perdido a través del drenaje nasolagrimal y el parpadeo. El colirio en gel incluyó una concentración final de 100 ng/ml de TGFβ3 y aproximadamente 4 µg/ml de dexametasona.

#### Tratamiento con factores neurogénicos y condrogénicos

Se sujetó manualmente a los animales y se instilaron aproximadamente 15 µl del colirio en el ojo derecho (Figura 3). El ojo contralateral se utilizó como ojo de control. Se administraron gotas oculares tres veces al día durante un máximo de 5 días para la especificación neuronal y durante un máximo de 8 semanas para la especificación condrogénica.

#### Ejemplo 5: Análisis inmunohistoquímico (IHC)

##### Recogida y tratamiento de tejidos

Al final del tratamiento, se sacrificó a los animales mediante una cámara de dióxido de carbono. Los ojos se extrajeron y se limpiaron en solución salina tamponada con fosfato. A continuación, las córneas se diseccionaron cuidadosamente y se fijaron en paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 1 hora y se trataron con solución de sacarosa para crioproteger el tejido antes de congelarlo y seccionarlo. La sacarosa como crioprotector es un deshidratante que evita la formación de artefactos de cristales de hielo en secciones de tejido congelado. En caso de congelación lenta del tejido, la crioprotección es especialmente importante.

Brevemente, las córneas se sumergieron en una solución de sacarosa al 20 % durante 5 horas a 4 °C y, a continuación, se pasaron a una solución de sacarosa al 30 % y se mantuvieron a 4 °C hasta que el tejido se hundió (normalmente toda la noche). A continuación, las córneas se embebieron en compuesto OCT y se sumergieron en nitrógeno líquido para provocar una congelación rápida. Los bloques de tejido congelados se conservaron a -80 °C hasta su uso posterior. Se montaron secciones de criostato de aproximadamente 10–15 µm de grosor en portaobjetos SuperFrost™ Plus y los portaobjetos se conservaron a -80 °C hasta que se necesitaron. En el caso de los cultivos celulares, las células cultivadas en cubreobjetos se enjuagaron con PBS y se fijaron con PFA al 4 % durante 15 minutos. Los cubreobjetos se sumergieron en PBS hasta su uso posterior.

##### Inmunohistoquímica

Para las criosecciones de tejido, antes de realizar la inmunohistoquímica, los portaobjetos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15–20 minutos. La OCT se lavó con PBS y la zona alrededor del tejido se demarcó con un lápiz de cera. Las secciones de tejido se incubaron primero con una solución de bloqueo de suero de cabra normal al 10 % durante 1 hora, seguido de una incubación de una noche con la dilución adecuada del anticuerpo primario a 4 °C. A continuación, los portaobjetos se enjuagaron tres veces en PBS antes de incubarlos con la dilución adecuada de anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario se dejó actuar durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones se tiñeron con el marcador nuclear de contraste 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se montaron en Citifluor, un agente antidecoloración (ProSciTech, Australia). Para la obtención de imágenes se utilizaron un microscopio confocal de barrido láser Olympus FluoView™ FV-1000 (láseres de longitud de onda de 405 nm, 473 nm y 559 nm) y un microscopio de fluorescencia Leica DMRA.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Proveedor/cat. núm.	Dilución utilizada
<b>Anticuerpos primarios</b>		
De ratón anticógeno de tipo I	Abcam/ab63080	1:2000
De ratón anticógeno de tipo II	Millipore/MAB8887	1:200
De ratón anticógeno de tipo III	Biogenesis/2150-0081	1:100
De ratón antivimentina	Sigma/V6630	1:1000
De ratón anti-α de músculo liso	Novocastra/NCL-SMA	1:100
<b>Anticuerpos secundarios</b>		
De cabra antirratón conjugado a Alexa 568	Sondas moleculares®/A-11031	1:500
De cabra anticonejo conjugado a Alexa 488	Sondas moleculares®/A-11034	1:500
De cabra antirratón conjugado a Alexa 488	Sondas moleculares®/A-11001	1:500

## Ejemplo 6: Análisis de la expresión génica

## Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

La extracción del ARNm de las muestras se llevó a cabo utilizando PureLink® RNA MicroKit (Invitrogen). En resumen, las muestras de tejido se mezclaron con 0,75 ml de TRIzol® y ARN portador y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador manual (PRO Scientific, Inc.). A continuación, las muestras se incubaron con 0,2 ml de cloroformo y se centrifugaron a 12000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. La fase superior se separó, se mezcló con etanol y se transfirió al tubo de la columna de recogida.

El ARN se recogió en la columna centrifugando a 12000 rpm durante 1 minuto. El flujo continuo se desechó y el ARN extraído se trató con desoxirribonucleasa (DNasa). La columna se lavó varias veces con los tampones proporcionados y el ARN se dispersó finalmente en agua sin ribonucleasas (RNasa). La concentración se determinó con un NanoDrop® (Thermo Scientific) y el ARNm se conservó a -80 °C.

Para preparar el ADNc se utilizó el kit de síntesis de ADNc SuperScript® VILO™ (Invitrogen™, Life Technologies). Brevemente, se incubaron 100 ng de ARN a 25 °C durante 10 minutos con VILO™ Reaction Mix, SuperScript® Enzyme Mix y agua sin RNasa. A continuación, las muestras se incubaron a 42 °C durante 120 minutos, seguida de una incubación a 85 °C durante 5 minutos. El ADNc se conservó a -20 °C.

## PCR cuantitativa mediante ensayos de expresión génica TaqMan®

Se obtuvieron ensayos de expresión génica TaqMan® para los genes de interés. En el paso de PCR, se combinaron 10 µl de TaqMan® Universal Master Mix II con 1 µl del ensayo, aproximadamente 25 ng de ADNc y 9 µl de agua para completar un volumen de 20 µl. Los tubos se agitaron en vórtex y se centrifugaron brevemente para centrifugar el contenido. Cada muestra de ADNc se preparó por triplicado y se pipeteó en una placa de 384 pocillos. Se cargaron 20 µl de cada mezcla de reacción en cada pocillo de una placa de reacción Micro Amp® Optical de 384 pocillos (Applied Biosystems). A continuación, se cubrió la placa con una película adhesiva óptica MicroAmp® (Applied Biosystems) y se centrifugó brevemente para eliminar las burbujas de aire. La placa se transfirió al 7900HT Fast Real-Time PCR System y se ejecutó utilizando los siguientes parámetros de termociclado, 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min seguidos de 40 ciclos de 95 °C a 15 s y 60 °C a 1 min. Los resultados se analizaron como se describe en la sección anterior.

Tabla 4: Ensayos génicos Taqman® utilizados para QPCR

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo
Col1a1 (rata)	Colágeno, tipo I, alfa 1	Rn01463848_m1
Col2a1 (rata)	Colágeno, tipo II, alfa 1	Rn01637085_m1

(continuación)

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo
Col2a1 (rata)	Colágeno, tipo II, alfa 1	Rn01637087_m1
Pop4 (rata)	Subunidad p29 de la proteína ribonucleasa P (gen constitutivo)	Rn02347225_m1
COL2A1 (humano)	Colágeno, tipo II, alfa 1	Hs00264051_m1
CDKN1A (humano)	Inhibidor 1 de cinasa dependiente de ciclina (gen constitutivo)	Hs00355782_m1

Ejemplo 7: Comprobación de las propiedades biomecánicas y ópticas de las córneas tras la deposición *in situ* de proteínas estromales de la MEC

## Examen del segmento anterior (estructuras frontales) del ojo del roedor

Se ha demostrado que la biomecánica corneal es relevante en el diagnóstico y el tratamiento de diversas enfermedades de la córnea y proporciona información sobre la estructura de la córnea y su relación con la función fisiológica corneal. Las córneas que se han sometido a tratamiento para provocar el depósito de proteínas de la MEC también deben someterse a pruebas de opacidad corneal, ya que una transparencia reducida sería indeseable.

Se utilizó el sistema de obtención de imágenes oculares Phoenix Micron IV Rodent (Phoenix Research Labs) para examinar las córneas de las ratas tratadas. Primero se sedó a las ratas mediante una inyección intraperitoneal de ketamina y Domitor® (3:2). Se utilizó la lámpara de hendidura del sistema de imagen Micron IV para examinar detalladamente las capas de la córnea y comprobar su integridad y transparencia. También se tomaron imágenes

retinianas para comprobar la transparencia de la córnea. Tras la obtención de imágenes, se administró a las ratas Antisedan® (atipamezol) para revertir la sedación.

Mediciones por nanoindentación de córneas tratadas *in vitro* e *in vivo*

La nanoindentación proporciona mediciones mecánicas de materiales de interés mediante la aplicación de fuerzas ultrapequeñas perpendiculares al plano de la muestra de interés y la medición de la indentación resultante de la muestra (Dias y Ziebarth 2013). La nanoindentación ha surgido recientemente como una potente herramienta para medir las propiedades mecánicas a nano y microescala en tejidos y otros biomateriales (Ebenstein y Pruitt 2006). El avance más reciente de la obtención de imágenes *in situ* mediante microscopía de sonda de barrido (SPM), en donde la punta del nanoindentador se utiliza simultáneamente como dispositivo de obtención de imágenes 3D combinado con la nanoindentación, ha permitido una nueva ola de investigación de materiales novedosos (Dickinson y Schirer 2009). La fuerza, el desplazamiento y el tiempo se registran simultáneamente mientras una punta de nanoindentación se introduce en el tejido corneal bajo una carga controlada. Las fuerzas aplicadas durante la nanoindentación pueden ser tan pequeñas como unos pocos nanoNewton o tan grandes como varios Newton, lo que permite estudiar una amplia gama de escalas de tamaño. Los ensayos de nanoindentación dan como resultado una curva de carga-desplazamiento que puede analizarse mediante ecuaciones bien definidas para calcular las propiedades mecánicas relativas a la rigidez, la integridad y la elasticidad de la córnea.

Las córneas queratocónicas humanas se pusieron en cultivo organotípico en medio de control o en medio que contenía la proteína específica de la MEC que inducía los factores de reprogramación. A continuación, se realizaron mediciones de nanoindentación al final del tiempo de tratamiento. Para el estudio *in vivo*, los animales se sujetaron manualmente y se instilaron aproximadamente 15 µl de la formulación de colirio en gel que contenía los factores de reprogramación en el ojo derecho de cada rata Wistar. El ojo contralateral se utilizó como ojo de control. Se administraron colirios tres veces al día durante un máximo de siete semanas. Las mediciones de nanoindentación se registraron tras la semana 1, la semana 3 o la semana 7 del periodo de tratamiento en ojos aislados.

Las pruebas de nanoindentación se llevaron a cabo en el laboratorio de Ingeniería Química y de Materiales de la Universidad de Auckland. Para probar la córnea en su posición natural se necesitó un molde para la nanoindentación. Estudios anteriores han utilizado poliestireno y masilla adhesiva para mantener las córneas en su sitio. El efecto de la deformación del molde bajo la carga era una fuente potencial de error, por lo que se decidió utilizar un molde duro para las pruebas. El primer material que se utilizó para crear un molde fue plastilina convencional. Se formó con la forma y curvatura exactas de las muestras de córnea humana (Figura 6(A)). La plastilina se dejó endurecer durante los dos días siguientes antes de utilizarla en las pruebas. La prueba de los ojos de rata fue ligeramente diferente, ya que se utilizaron los globos oculares completos. Para mantener en su sitio los globos oculares, se utilizó una placa de Petri rellena de resina y con una pequeña hendidura para sujetar el globo ocular (Figura 6(B)). Se utilizó PBS para evitar que las muestras se secaran.

Dado que las muestras son muestras biológicas muy blandas, se utilizó una punta de fluido conosférica para todas las pruebas de nanoindentación. La carga de indentación utilizada para las muestras humanas fue de 50 µN. Para los globos oculares de rata, se utilizó un intervalo de cargas entre 3 y 5 µN. Se encendió la luz de fibra óptica y se colocó la muestra directamente bajo el haz de luz del microscopio. La sección central de la córnea se colocó directamente en el haz de luz con la mayor precisión posible (Figura 6(C)). La muestra se enfocó ajustando el control deslizante Z hasta que se pudo observar la superficie de la córnea con buena resolución. Para asegurarse de que el foco estaba en el punto central más alto de la muestra de córnea, se movió la vista en las direcciones x e y para observar cómo cambiaba el foco.

Una vez enfocado el punto de recogida de datos en el centro de la córnea, se definió el límite de la muestra y se realizó una aproximación rápida. Antes de la indentación había que configurar correctamente la función de carga. El proceso de indentación propiamente dicho está automatizado por el Triboindenter® de Hysitron (Figura 6(D)). La carga predefinida se colocó en la punta del indentador, que penetra en la muestra hasta alcanzar un límite definido. A continuación, se mantuvo la punta durante 10 segundos antes de descargarla de la muestra. La dureza de la muestra se determina por el área de indentación residual (Ar) tras la descarga de la punta.

$$\text{Dureza} = \frac{\text{Carga máxima (P)}}{\text{Área de indentación residual (Ar)}}$$

Donde P<sub>máx.</sub> es la carga de indentación máxima y Área es el área de contacto de la punta conosférica con la muestra. El módulo elástico reducido es una representación del módulo elástico tanto en la muestra como en la punta del indentador, como muestra la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{1}{E_r}\right) = \left(\frac{1 - \nu_i^2}{E_i}\right) + \left(\frac{1 - \nu_m^2}{E_m}\right)$$

Donde  $i$  hace referencia al indentador y  $m$  hace referencia al material de la muestra. El módulo elástico reducido nos indica el grado de elasticidad de una muestra. Dado que se utiliza la misma punta de indentador para cada ensayo, el módulo elástico reducido puede utilizarse para comparar la elasticidad de cada muestra analizada.

5 Ejemplo 8: Los queratocitos de córnea humana adulta producen colágeno de tipo II específico de cartílago tras el tratamiento con TGF $\beta$ 3 exógeno y dexametasona

10 Se sabe que un factor de crecimiento puede actuar sobre varios tipos de células con efectos similares o variados, mientras que más de un factor de crecimiento puede compartir funciones biológicas similares. A la hora de elegir factores de crecimiento, citocinas y sustancias químicas que pudieran provocar el depósito de colágeno en el estroma corneal, era importante tener en cuenta los efectos conocidos de determinados factores exógenos. En los presentes experimentos, se utilizó un tratamiento combinado de TGF $\beta$ 3 y dexametasona.

15 La mayoría de las pruebas de los efectos del TGF $\beta$ 3 y la dexametasona se han obtenido mediante estudios realizados sobre sus efectos en las células madre/progenitoras (Schuldiner, Yanuka, Itskovitz-Eldor, Melton y Benvenisty 2000; Worster, Nixon, Brower-Toland y Williams 2000). Anteriormente se ha utilizado una combinación de TGF $\beta$  y dexametasona para inducir a las células progenitoras a diferenciarse en condrocitos *in vitro* (Diekman, Rowland, Lennon, Caplan, y Guilak 2009; Johnstone y col. 1998; Kolambkar, Peister, Soker, Atala y Guldberg 2007; Winter y col. 2003). Además, la dexametasona, un fármaco corticoide sintético, se ha utilizado para tratar afecciones oculares inflamatorias. Por lo tanto, se utilizó una combinación de TGF $\beta$ 3 y dexametasona en el medio de diferenciación condrogénica para impulsar la diferenciación de los queratocitos hacia un fenotipo condrocítico.

20 En los presentes experimentos, se observó específicamente la expresión de colágeno de tipo I y de tipo II. Se sabe que los tipos fibrilares de colágeno, como los tipos I y II, se autoensamblan y reticulan para formar fibras altamente cristalinas que presentan una rigidez muy elevada, una baja extensibilidad y una notable capacidad de almacenamiento de energía elástica (Wells 2003). La reticulación es el procedimiento que contribuye a la rigidez y resistencia a la tracción de las fibras.

25 La matriz extracelular (MEC) del estroma corneal está compuesta por fibrillas de colágeno heterotípicas fuertemente empaquetadas, compuestas principalmente por colágeno de los tipos I y V. Al igual que las fibrillas corneales, las fibrillas del cartílago son heterotípicas (compuestas por los tipos II y XI) y tienen un diámetro uniforme de 25 nm (ligeramente más pequeñas que las fibrillas corneales) (Mendler, Eich-Bender, Vaughan, Winterhalter y Bruckner 1989). El colágeno II es el principal componente fibrilar del cartílago y es similar al colágeno I en que la molécula consiste esencialmente en un único dominio helicoidal ininterrumpido de 300 nm de longitud. Debido a sus similitudes, los colágenos II y XI se consideran los análogos cartilaginosos de los colágenos I y V (colágenos del estroma corneal) en otros tejidos.

30 En los presentes experimentos, se sembraron queratocitos corneales de córneas adultas en el medio de diferenciación condrogénica que contenía TGF $\beta$ 3 y dexametasona o en un medio de proliferación de fibroblastos estándar. En 2–3 días, los queratocitos sembrados en el medio de diferenciación condrogénica formaron agregados/esferas celulares (Figura 7(A)) de aproximadamente 50–100  $\mu$ m de diámetro. Las esferas se marcaron para el colágeno de tipo II específico de los condrocitos en la parte central y para la nestina en la periferia (Figura 7(B)). Además, una vez colocadas las esferas en el medio de proliferación de fibroblastos, las células de las esferas empezaron a extenderse hacia el exterior (Figura 7(C)) para poblar la placa de cultivo, formando así una monocapa celular. Las regiones en donde las células habían estado agregadas marcaban el colágeno de tipo II, mientras que las células en monocapa no lo hacían (Figura 7(D)).

35 Los queratocitos sembrados en el medio de proliferación de fibroblastos formaron una monocapa uniforme de células similares a los fibroblastos (Figura 8(A)) que no marcaron ni para nestina ni para colágeno de tipo II (Figura 8(B)). Cuando se cambió el medio a un medio de diferenciación condrogénica no se produjeron cambios en el aspecto del cultivo y las células siguieron siendo negativas para colágeno de tipo II. Estos resultados sugieren que la agregación celular parece ser importante para la producción de MEC de tipo cartilaginoso. Los queratocitos sembrados en medio de proliferación de fibroblastos no consiguieron formar las agregaciones celulares necesarias. Por lo tanto, para formar grupos de fibroblastos, los fibroblastos confluentes se disociaron de la placa de cultivo, se sedimentaron y se cultivaron en forma de sedimentos en medio de diferenciación condrogénica durante tres semanas más. Los gránulos celulares dieron positivo para la proteína específica de la MEC del estroma corneal, el queratocano, pero no para la proteína específica de la MEC del cartílago, el colágeno de tipo II (Figura 8(F) y (G)).

40 Ejemplo 9: Los queratocitos de córneas humanas adultas y córneas de ratas adultas secretan MEC que contiene colágeno de tipo II cuando se tratan con TGF $\beta$ 3 y dexametasona

45 Se colocaron secciones de córnea humana adulta en cultivo organotípico de secciones en medio de control o en medio de diferenciación condrogénica durante dos semanas. A continuación, las secciones de tejido se marcaron con respecto a la proteína específica de los condrocitos de la MEC, el colágeno de tipo II y el colágeno corneal nativo de tipo I. Sólo se observó marcaje positivo en las córneas tratadas con TGF $\beta$ 3 y dexametasona (Figura 9(C) y 10(B)). Se observó que un período de tratamiento de dos semanas dio lugar a la deposición de colágeno de tipo II en la MEC estromal de las córneas tratadas (Figura 9(C)). El tratamiento durante 1 semana no produjo ningún depósito visible de colágeno de tipo II en la MEC estromal (Figura 9(B)).

La cantidad y el patrón del colágeno nativo de tipo I parecían estar ligeramente alterados en las córneas tratadas. En general, la intensidad del marcaje era similar, pero la distribución era más extensa y la cantidad de marcado era mayor en las córneas no tratadas (Figura 9(D)). Además, el colágeno de tipo II recién producido se depositó de forma uniforme y ordenada en la MEC, sin formar grandes masas ni agregados. El marcaje se observó claramente a lo largo de la estructura de colágeno preexistente del estroma corneal y se distribuyó por todo el grosor de la capa estromal.

El experimento *in vitro* con tejido corneal humano se amplió después a un estudio *in vivo* con roedores en donde las córneas derechas de ratas Wistar macho se trataron durante dos semanas con una administración tres veces al día de 15 µl de una formulación en colirio a base de goma gellan de TGFβ3 y dexametasona. Al cabo de dos semanas se practicó la eutanasia a las ratas y se procesaron las córneas para la inmunohistoquímica. Sólo las córneas tratadas dieron positivo para el colágeno de tipo II, observándose un mayor grado de deposición en la parte anterior de la córnea (Figura 10(D) y (E)). Por tanto, solo las secciones corneales cultivadas en el medio de diferenciación condrogénico fueron positivas para el colágeno de tipo II. Además, el colágeno de tipo II se depositó en capas uniformes a lo largo de la estructura de colágeno preexistente del estroma.

Ejemplo 10: Inducción del depósito de colágeno de tipo II en córneas queratocónicas

A continuación, los inventores trataron de confirmar que la reprogramación *in vivo* observada en sus estudios podía utilizarse en tratamientos contra el queratocono. Se llevaron a cabo experimentos para afirmar que los queratocitos de las córneas queratocónicas eran susceptibles de inducir la deposición de colágeno de tipo II. Los botones corneales queratocónicos obtenidos tras la cirugía de trasplante de córnea se colocaron en cultivo tan pronto como se obtuvieron. La mitad de cada botón se colocó en medio de control y la otra mitad en medio de diferenciación condrogénica y se mantuvo durante 2 semanas. Transcurridas 2 semanas, el tejido se procesó para inmunohistoquímica o extracción de ARNm. La MEC estromal de solo la mitad tratada de la córnea era positiva para el colágeno de tipo II (Figura 11(B)). Aunque la intensidad del marcaje era menor en el tejido queratocónico en comparación con el tejido corneal normal, el patrón de marcaje era similar y seguía una disposición ordenada a lo largo de la estructura de las laminillas de colágeno preexistentes.

El marcaje de la vimentina reveló marcadas diferencias entre los queratocitos de las córneas queratocónicas tratadas y no tratadas. En general, la densidad de queratocitos era menor en las córneas no tratadas, con escasez de células en la parte posterior de la córnea (Figura 11(C)). Además, los queratocitos de las córneas tratadas parecían más filamentosos y completos en su morfología en comparación con los queratocitos de las córneas no tratadas (Figura 11(E) y (F)). En comparación con los queratocitos de las córneas no tratadas, los queratocitos de las córneas tratadas eran más largos y presentaban un mayor número de procesos celulares que marcaban fuertemente la Vimentina.

Ejemplo 11: El tratamiento con TGFβ3 y dexametasona no induce el depósito de proteínas fibróticas ni causa opacidad corneal

Las córneas humanas cultivadas en el medio de diferenciación condrogénica durante un máximo de tres semanas se marcaron para el colágeno tipo III y αSMA, que están asociados a la fibrosis y la cicatrización (Gabbiani 2003; Karamichos y col. 2012). No se observaron indicios de deposición de matriz fibrótica, mientras que en el tejido de control se observó un mayor grado de marcaje de αSMA (Figura 12). Estos resultados confirman hallazgos anteriores de que, a diferencia de TGFβ1 y TGFβ2, TGFβ3 no induce la diferenciación de los queratocitos corneales en miofibroblastos.

El examen con lámpara de hendidura se realizó en ratas vivas durante todo el período de estudio. Al examinarlas, las córneas tratadas y no tratadas eran indistinguibles, sin signos de cicatrización u opacidad. Las imágenes de la parte posterior del ojo para revelar los vasos sanguíneos mostraron córneas claras que no obstruían el paso de la luz (Figura 13(A) y (B)) y las imágenes en sección transversal *in vivo* de la córnea de rata utilizando la lente Micron IV revelaron córneas transparentes a través de las cuales pasaba fácilmente la luz (Figura 13(C) y (D)). No había signos de opacidad o turbidez corneal que pudieran obstruir el paso de la luz a través de la córnea.

Ejemplo 12: Cambio en la expresión del ARNm del colágeno de tipo II y tipo I tras el tratamiento *in vivo*

Las córneas de rata tratadas *in vivo* durante 1 semana, 7 semanas y 3 semanas, seguido de un periodo sin tratamiento de 4 semanas, se sometieron a un análisis cuantitativo de expresión génica. El objetivo era determinar si la expresión de colágeno de tipo II disminuye de nuevo y/o cesa permanentemente tras la retirada del tratamiento con factor de crecimiento. También se investigó el efecto del tratamiento sobre el colágeno corneal nativo de tipo II.

En comparación con las córneas tratadas durante 7 semanas, las córneas tratadas durante 1 semana expresaban niveles muy elevados de colágeno de tipo II. Los niveles de expresión disminuyeron considerablemente al suspender el tratamiento, como indica el primer gráfico de la Figura 35. En cuanto a la expresión del colágeno de tipo I, las córneas tratadas durante 1 y 7 semanas se compararon con las córneas no tratadas. Se observó que había un pico inicial en la expresión de colágeno de tipo I después de 1 semana de tratamiento, pero en la semana 7 la expresión de colágeno de tipo I era significativamente menor y comparable a su expresión en la córnea no tratada (Figura 14(B)).

Ejemplo 13: Cambio en las propiedades biomecánicas de las córneas tratadas *in vitro* e *in vivo*

Se planteó la hipótesis de que el depósito de colágeno de tipo II afectaría a la rigidez y elasticidad de las córneas. Para evaluar estos cambios, las córneas de rata *in vivo* y las córneas humanas tratadas *ex vivo* y sus controles correspondientes se sometieron a pruebas de nanoindentación.

5 En comparación con los controles no tratados, las córneas de rata tratadas *in vivo* durante 1 semana no presentaron un aumento significativo ni de la dureza ni de la elasticidad (Figura 15). En las córneas tratadas *in vivo* durante 3 semanas, se observó una clara diferencia entre el ojo tratado y el de control. Cada una de las córneas se sometió a prueba hasta ocho veces y los gráficos de carga-deformación obtenidos mostraron una buena reproducibilidad (Figura 16). En el ojo derecho expuesto al tratamiento con factor de crecimiento, tanto la dureza como el módulo elástico reducido fueron notablemente superiores. También se sometieron a las mismas pruebas biomecánicas un par de córneas de queratoglobos emparejadas que se cultivaron *ex vivo* en el medio de control o en el medio de diferenciación condrogénica durante 6 semanas. Una vez más, las pruebas revelaron un aumento significativo de la dureza y el módulo elástico en la córnea tratada (Figura 17).

Ejemplo 14: Combinaciones comparativas de factores de crecimiento y esteroides

15 Se realizó un estudio *ex vivo* en córneas de oveja para investigar la eficacia de otras combinaciones de factores de crecimiento y esteroides en la diferenciación condrogénica de los queratocitos corneales.

20 Los ojos frescos de oveja se obtuvieron de Auckland Meat Processors. Las córneas se extirparon inmediatamente y se lavaron con povidona yodada (PVP-1) y solución de tiosulfato sódico. A continuación, se cortaron discos de 8 mm de tejido corneal ovino con un trépano. Se colocó un disco de córnea de oveja en cada una de las condiciones de cultivo (descritas en la Tabla 5) durante 3 semanas. A continuación, los discos corneales se colocaron en un sistema de cultivo organotípico de interfase aire-líquido.

25 Brevemente, los explantes de tejido sano se cultivaron en insertos de cultivo celular de 0,4 µm de tamaño de poro (Millicell, Francia) en la interfaz entre el medio de cultivo y un entorno rico en CO<sub>2</sub>. Las secciones de córnea se colocaron con el epitelio hacia arriba en placas de cultivo celular con 3 ml de medio de cultivo. Los medios de cultivo se cambiaron cada dos días. El medio basal utilizado fue medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con Anti-Anti al 1 % (solución antibiótica antimicótica) y GlutaMAX™ al 1 % (GIBCO®). Al cabo de 30 3 semanas, cada disco corneal se fijó en paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 1 hora y se trató con solución de sacarosa para crioproteger el tejido antes de congelarlo y seccionarlo.

35 En resumen, las córneas se sumergieron en una solución de sacarosa al 20 % durante 5 horas a 4 °C y, a continuación, se pasaron a una solución de sacarosa al 30 % y se mantuvieron a 4 °C hasta que el tejido se hundió (normalmente toda la noche). A continuación, las córneas se embebieron en compuesto OCT (temperatura óptima de corte) y se sumergieron en nitrógeno líquido para provocar una congelación rápida. Los bloques de tejido congelados se conservaron a -80 °C hasta su uso posterior. Se montaron aproximadamente 4–6 secciones criostáticas de 40 µm de grosor en portaobjetos SuperFrost™ Plus y los portaobjetos se conservaron a -80 °C hasta que se necesitaron. A continuación, se marcó el colágeno de tipo II en las secciones de córnea.

40 Para la inmunohistoquímica, los portaobjetos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15–20 minutos. La OCT se lavó con PBS y la zona alrededor del tejido se delimitó con un lápiz de cera. Las secciones de tejido se incubaron en primer lugar con una solución de bloqueo de suero de cabra normal al 10 % durante 1 h, seguido de incubación durante una noche con anticuerpo de ratón anticógeno II (Millipore/MAB8887) a 4 °C. A continuación, los portaobjetos se enjuagaron tres veces en PBS antes de incubarlos con la dilución adecuada de anticuerpo secundario de cabra antirratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®/A-11001). El anticuerpo secundario se dejó actuar durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones se tiñeron con el marcador nuclear de contraste 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se montaron en Citifluor, un agente antidecoloración (ProSciTech, Australia). Para visualizar el marcado, se utilizaron un microscopio confocal de barrido láser Olympus FluoView™ FV-1000 (láseres de longitud de onda de 405 nm 473 nm y 559 nm) y un microscopio de fluorescencia Leica DMRA.

La Tabla 5 presenta los resultados de este estudio. La Figura 20 muestra imágenes representativas del marcaje del colágeno de tipo II en secciones de córnea, en cada una de las condiciones.

55 Tabla 5: Combinaciones probadas de factores de crecimiento y esteroides

Combinación de factores de crecimiento y esteroides	Depósito de colágeno de tipo II (S/N)	Imagen representativa
BMP6	N	Figura 20A
BMP6 + hidrocortisona	N	Figura 20B
TGFβ <sub>3</sub> + hidrocortisona	N	Figura 20C
BMP6 + dexametasona	N	Figura 20D
TGFβ <sub>3</sub> + prednisona	N	Figura 20E
TGFβ <sub>3</sub> + Triesense®	N	Figura 20F

TGFβ <sub>3</sub> + dexametasona	S	Figura 20G-H
----------------------------------	---	--------------

Los resultados confirmaron que la combinación de TGFβ<sub>3</sub> y dexametasona es la única combinación ensayada que provocó la respuesta deseada de las células diana (Figura 20, paneles G-H). Las demás combinaciones de factores de crecimiento y esteroides no produjeron los cambios deseados en el colágeno de tipo II de los queratocitos (Figura 20, paneles A-F). Los resultados también confirmaron la reprogramación de queratocitos en córneas de oveja (Figura 20, paneles G-H).

Estudios anteriores han demostrado que otros factores de crecimiento y otros compuestos esteroideos no son adecuados para el tratamiento y la reparación de la córnea. Tanto el TGFβ<sub>1</sub> como el TGFβ<sub>2</sub> producen cicatrices fibróticas (Carrington, Albon y col. 2006; Desmouliere, Chaponnier y col. 2005; Jester, Huang y col. 2002; Cowin y col. 2001; Shah y col. 1995). El EGF regula negativamente la condrogénesis (Yoon 2000). Los estrógenos también regulan negativamente la condrogénesis (Kato y Gospodarowicz 1985). Se ha demostrado que la hidrocortisona promueve la diferenciación adipogénica en lugar de la condrogénica (Ghoniem y col. 2015; Lee, Kuo y col. 2004). Estos estudios anteriores muestran la importancia de los presentes hallazgos en TGFβ<sub>3</sub> y dexametasona, que actúan conjuntamente para promover la diferenciación condrogénica de los queratocitos corneales y la cicatrización corneal sin cicatrices.

#### Ejemplo 15: Dosis comparativas de TGFβ<sub>3</sub> y dexametasona

Antes de un estudio *in vivo*, se realizaron experimentos para identificar las distintas dosis eficaces para los tratamientos *ex vivo*. Se realizó un estudio de búsqueda de dosis para TGFβ<sub>3</sub> y dexametasona cultivando córneas de oveja en medios de cultivo que contenían estos dos factores en concentraciones variables.

Se obtuvieron ojos frescos de oveja, se extirparon las córneas y se trataron como se indica en el Ejemplo 14. Se colocó un disco de córnea de oveja en cada una de las 16 condiciones de cultivo (Tabla 21) durante 3 semanas. Los discos corneales se cultivaron y luego se sometieron a análisis inmunohistoquímicos y microscópicos como se indica en el Ejemplo 14. La Figura 21 muestra imágenes representativas del marcaje del colágeno de tipo II en secciones de córnea en cada una de las condiciones.

Este estudio reveló que las concentraciones más bajas de TGFβ<sub>3</sub> (2–4 ng/ml) y de dexametasona (1–10 nM) tenían una menor eficacia *ex vivo* (Figura 21, filas primera y segunda). Las dosis más altas, es decir, 8–10 ng/ml de TGFβ<sub>3</sub> y 100–1000 nM de dexametasona fueron eficaces para inducir la deposición de colágeno de tipo II (Figura 21, filas tercera y cuarta).

Estos resultados confirmaron el uso de dexametasona 100 nM y 10 ng/ml de TGFβ<sub>3</sub> como concentraciones eficaces (Figura 21, tercera fila). Las concentraciones más altas de dexametasona (1000 nM, es decir, 400 ng/ml) también demostraron ser eficaces (Figura 21, cuarta fila). Se observó que las concentraciones de dexametasona probadas en este estudio eran considerablemente inferiores a las concentraciones utilizadas en las gotas oftálmicas disponibles en el mercado (es decir, 1 mg/ml de dexametasona).

#### Ejemplo 16: Resumen de observaciones y resultados experimentales

Anteriormente se ha utilizado una combinación de TGFβ<sub>1</sub> y dexametasona para inducir a las células progenitoras a diferenciarse en condrocitos *in vitro* (Diekman y col. 2009; Johnstone y col. 1998; Kolambkar y col. 2007; Winter y col. 2003). En otros estudios, se ha demostrado que una población secundaria de células estromales corneales produce una matriz compuesta por colágeno II específico del cartílago en condiciones similares de diferenciación condrogénica (Du, Funderburgh, Mann, SundarRaj y Funderburgh 2005). También se ha informado de que las células escleróticas tras cuatro semanas en un medio de diferenciación condrogénica que contenía TGFβ<sub>1</sub> y BMP2 expresaban marcadores específicos del cartílago, incluidos el aggrecan y el colágeno de tipo II. Además, se ha demostrado que las células escleróticas humanas conservan su potencial condrogénico *in vivo* tras ser trasplantadas en un defecto de cartílago de rata (Seko y col. 2008). Se sabe que las células fibroblásticas de la esclerótica y el estroma corneal comparten un origen embriológico común.

Como se muestra en la presente memoria, los queratocitos sembrados en medio de cultivo que contenía TGFβ<sub>3</sub> y dexametasona y en ausencia de suero formaron espontáneamente esferoides celulares en 2–3 días por agregación celular y a las tres semanas estas agrupaciones celulares etiquetaron positivamente para el colágeno de tipo II específico del cartílago. Inicialmente, tras el tratamiento con TGFβ<sub>3</sub> y dexametasona, la expresión de colágeno de tipo I también aumentó. Cuando se cambió el medio a un medio de control que contenía suero fetal de ternero, los grupos celulares se dispersaron en una monocapa de células. Las células que crecían en la monocapa ya no expresaban colágeno de tipo II. Estos resultados sugieren que la agregación celular o el entorno podrían ser importantes en la inducción del colágeno de tipo II.

En particular, los queratocitos que primero proliferaron como fibroblastos en un medio que contenía suero no secretaron colágeno de tipo II cuando el medio se cambió al medio de diferenciación condrogénica que contenía TGFβ<sub>3</sub> y dexametasona. Esto sugiere que, una vez proliferadas como fibroblastos, las células pierden la capacidad de diferenciarse a lo largo de una vía condrogénica. Además, los fibroblastos cultivados en cultivo tridimensional en medio de diferenciación condrogénica como sedimento tampoco expresaron el colágeno de tipo II específico del cartílago. Estos resultados sugieren que el fenotipo quiescente de los queratocitos y la agregación celular son importantes para la diferenciación condrogénica.

En la presente memoria se demuestra que el cultivo *ex vivo* de córneas normales y queratocónicas en medios de diferenciación condrogénicos reveló la deposición uniforme de colágeno de tipo II a lo largo de las laminillas estromales. Todos los queratocitos del estroma corneal estaban asociados al marcaje de colágeno de tipo II, lo que sugiere una vez más que la reprogramación hacia un fenotipo condrogénico es estocástica y confirma que los resultados obtenidos en el cultivo celular *in vitro* no se debían a la proliferación de una población secundaria de células progenitoras. Además, el tratamiento *in vivo* de córneas en ratas también provocó la deposición de colágeno de tipo II de forma similar a la observada en el cultivo *ex vivo*. Sin embargo, en la parte anterior de la córnea, se observó un inmunomarcaje más fuerte del colágeno de tipo II cuando se trató *in vivo*, lo que muy probablemente refleja una difusión más fácil de los factores de crecimiento en las capas anteriores del estroma desde la superficie ocular.

Los estudios que analizan las diferencias en la densidad de queratocitos en córneas queratocónicas han informado de una disminución general de la densidad celular. Los resultados obtenidos aquí también lo confirman. Sin embargo, a diferencia de otros estudios que han informado de una marcada disminución de la densidad celular en la parte anterior del estroma (Hollingsworth, Efron, y Tullo 2005; Ku y col. 2008; Mencucci y col. 2010; Niederer y col. 2008), los resultados obtenidos en este ejemplo indican también una marcada disminución de la densidad de queratocitos en la parte posterior del estroma de la córnea queratocónica no tratada. En el queratocono se produce un adelgazamiento general de la córnea. Sin embargo, se desconoce si esto se debe a la apoptosis de los queratocitos y a la consiguiente disminución de la producción de MEC o si la apoptosis de los queratocitos es secundaria al proceso de adelgazamiento corneal.

Como se muestra en la presente memoria, la mitad tratada de la córnea queratocónica que se cultivó en el medio condrogénico que contenía TGF $\beta$ 3 y dexametasona presentaba una mayor densidad de queratocitos en comparación con el control. Además, la región posterior del estroma parecía estar repoblada por queratocitos. Los queratocitos de la mitad tratada también parecían más sanos, con núcleos grandes y prominentes y varios procesos celulares. Esto indica que el tratamiento con los dos factores posiblemente ha hecho que los queratocitos proliferen y repueblen el estroma, concretamente, la parte posterior que estaba desprovista de queratocitos.

La reticulación de colágeno, uno de los tratamientos actuales del queratocono, provoca un período inicial de apoptosis de los queratocitos en la parte anterior del estroma. A continuación, se produce un período de repoblación del estroma por los queratocitos. La muerte celular de los queratocitos suele producirse en respuesta a una lesión y, en el caso de la reticulación, se entiende que es consecuencia del daño celular inducido por los rayos UVA. Se cree que esta respuesta apoptótica ha evolucionado para proteger la córnea frente a una mayor inflamación (Wilson, Netto y Ambrosio 2003).

Tras el tratamiento de reticulación también se observa una opacidad estromal que puede durar varios meses. Se ha atribuido al aumento del diámetro del colágeno y del espaciado entre las fibrillas de colágeno, lo que da lugar a la modificación de la microestructura corneal. La mayoría de los estudios han informado de una disminución de la opacidad corneal entre 6–12 meses después del tratamiento (Greenstein, Fry, Bhatt, y Hersh 2010; Mazzotta y col. 2008). Aunque se han realizado varias observaciones clínicas de las córneas tras el tratamiento de reticulación, existe ambigüedad en cuanto a la causa de la opacidad corneal y otros posibles efectos secundarios del tratamiento. El hecho de que se necesiten varios meses para que las córneas se repueblen y se vuelvan transparentes sugiere que la reticulación podría estar desencadenando una respuesta de cicatrización dentro del estroma.

En este estudio, incluso tras un tratamiento *in vitro* e *in vivo* a largo plazo (hasta 8 semanas) no se observaron indicios de opacidad corneal. Esto se debe probablemente a la deposición del colágeno de tipo II a lo largo de las laminillas estromales. El depósito de colágeno de tipo III (asociado a la fibrosis) y de actina alfa de músculo liso (durante la formación de miofibroblastos) provoca opacidad y cicatrización. Ambos se observan durante la herida corneal. Ninguna de estas proteínas se expresó en las córneas tratadas, lo que sugiere que no se desencadenaron las cascadas de cicatrización de heridas que podrían provocar cicatrices.

Como se describe en la presente memoria, la medición cuantitativa de la expresión de ARNm de colágeno de tipo II mostró que su expresión se redujo significativamente tras la retirada de TGF $\beta$ 3 y dexametasona. Esto sugiere que la reprogramación de los queratocitos no es irreversible y que posiblemente puede controlarse la posterior deposición de colágeno de tipo II en la MEC. Esto es importante para el desarrollo de métodos terapéuticos, ya que no sería deseable inducir una deposición irreprimible de MEC.

La nanoindentación se ha empleado en la evaluación de métodos terapéuticos postoperatorios como la reticulación para el queratocono (una distrofia corneal) y la ectasia ocular posterior al LASIK. En un estudio realizado en córneas de cadáveres humanos se observó que la reticulación de colágeno provocaba un aumento del doble del módulo elástico en el estroma corneal anterior, mientras que el estroma posterior no se veía afectado por el tratamiento (Dias, Diakonis, Kankariya, Yoo y Ziebarth 2013). En este estudio se midió la elasticidad de la porción anterior de la córnea. Además, los resultados de este estudio indican que la densidad de los queratocitos del estroma posterior estaba alterada en las córneas tratadas con TGF $\beta$ 3 y dexametasona.

Aunque la nanoindentación no mide las propiedades de las fibrillas de colágeno individuales, puede medir los cambios en la propiedad elástica intrínseca de la córnea, que se verá alterada al depositarse colágeno II con el consiguiente aumento de la reticulación del colágeno. Las diferencias estructurales dentro del estroma se reflejan en las correspondientes diferencias en las propiedades biomecánicas. Los resultados obtenidos aquí muestran que el módulo elástico y la dureza de las córneas

de rata tratadas con factor de crecimiento casi se triplicaron. Estos resultados indican que el tratamiento da lugar a una córnea más rígida y con mayor elasticidad. El módulo elástico es una medida de la resistencia a la deformación elástica de una sustancia y, por tanto, un módulo elástico mayor indica que un material es más difícil de deformar. En este estudio, el aumento significativo de la dureza y el módulo elástico en córneas tratadas durante 3 semanas en comparación con córneas tratadas durante 1 semana es coherente con los resultados del marcaje inmunohistoquímico que muestran que se requieren al menos 2–3 semanas de tratamiento para el establecimiento de capas detectables de colágeno de tipo II.

Los resultados del marcaje inmunohistoquímico, junto con los estudios de expresión génica y las pruebas biomecánicas, demuestran que los queratocitos de una córnea intacta son susceptibles a la reprogramación a lo largo de una vía condrogénica mediante el tratamiento con TGFβ3 y dexametasona. La reprogramación por el tratamiento combinado de TGFβ3 y dexametasona es estocástica y puede controlarse mediante la modulación del periodo de tratamiento del factor de crecimiento para dar lugar a córneas más rígidas y elásticas. En particular, se requiere la administración de ambos agentes; cuando el TGFβ3 y la dexametasona se prueban por separado, no se observa producción de colágeno de tipo II en los queratocitos. Por lo tanto, se propone un tratamiento novedoso para el queratocono y otras afecciones oculares utilizando ingeniería tisular *in vivo*, mediante la administración de TGFβ3 y dexametasona, como se describe en la presente memoria.

Ejemplo 17: Modelo animal de gran tamaño para investigar la remodelación de la córnea

Remodelación de la córnea mientras se administra el régimen óptimo en un modelo ovino

Se llevan a cabo experimentos adicionales para utilizar un modelo animal de gran tamaño para demostrar la remodelación de la córnea. Para estos experimentos, se utiliza un modelo animal de gran tamaño que permite la colocación de lentes de contacto graduadas. Las ovejas se utilizan como animal modelo, ya que sus ojos son comparables en tamaño y fisiología a los de los humanos. Además, la Universidad Lincoln de Christchurch dispone de instalaciones de alojamiento. También hay que señalar que las ovejas tienen un temperamento dócil y son fáciles de manejar.

Se seda a las ovejas según el procedimiento operativo estándar en la instalación de alojamiento. La formulación del colirio con las concentraciones óptimas de TGFβ3 y dexametasona (a escala de volumen) basada en los estudios de optimización de dosis en roedores se instila en el ojo derecho, seguido de la colocación de INTACS® corneales (o anillos esclerales similares) para mantener la curvatura deseada de la córnea durante la deposición de colágeno (Figura 18). Los colirios se siguen administrando una o dos veces al día (según se determine en los estudios de optimización con roedores) durante un periodo de tres semanas. A continuación, se retiran los INTACS® y se sigue alojando a los animales durante tres semanas o seis meses más.

Antes del tratamiento y al final del mismo (cuando se retiran los INTACS®), se toman medidas del grosor y la curvatura de la córnea. El paquímetro corneal portátil se utiliza para detectar cambios en el grosor corneal de córneas tratadas frente a córneas contralaterales de control *in vivo*. Se utiliza una cámara Pentacam® portátil para medir la curvatura corneal, así como el espesor corneal de los ojos de las ovejas antes y después del tratamiento (Figuras 19(E) y (F)). Las mediciones corneales se repiten de nuevo a las tres semanas de la retirada de las lentes con las mediciones Pentacam® finales (las más precisas). Éstas se toman después de sacrificar al animal pero antes de extraerle el ojo para realizar análisis inmunohistológicos y biomecánicos, como se ha descrito anteriormente para las córneas de roedores. En el caso improbable de que las ovejas no puedan tolerar una lente de contacto dura (signos de infección, inflamación o irritabilidad), el estudio continúa sin lentes, lo que permite completar parámetros clave como la deposición y distribución de colágeno de tipo II y las propiedades biomecánicas.

A la vista de los resultados, se propone utilizar ingeniería tisular *in vivo*, como se describe en detalle en la presente memoria, en combinación con lentes de contacto OrthoK rígidas permeables al gas (o similares) para remodelar y estabilizar permanentemente la córnea, proporcionando tratamiento para defectos corneales comunes, incluida la miopía.

## Referencias

Ashwin, P. T., y McDonnell, P. J. (2010). Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *British Journal of Ophthalmology*, 94(8), 965–970.

Cosar, C. B. y col. (2002). Indications for penetrating keratoplasty and associated procedures, 1996–2000. *Cornea*, 21(2), 148–151.

Cowin, A. J., Holmes, T. M., Brosnan, P., y Ferguson, M. W. (2001). Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *European Journal of Dermatology*, 11(5), 424–31.

Denniston A. K. O., Murray P. I. (2009) *Oxford Handbook of Ophthalmology (OUP)*. Segunda edición. Oxford: Nueva York. Oxford University Press.

Desmouliere, A., y col. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*, 13(1), 7–12.

- Dias, J., Diakonis, V. F., Kankariya, V. P., Yoo, S. H., y Ziebarth, N. M. (2013). Anterior and posterior corneal stroma elasticity after corneal collagen crosslinking treatment. *Experimental Eye Research*, 116, 58-62.
- 5 Dias, J. M., y Ziebarth, N. M. (2013). Anterior and posterior corneal stroma elasticity assessed using nanoindentation. *Experimental Eye Research*, 115, 41–46.
- Dickinson, M. E., y Schirer, J. P. (2009). Probing more than the surface. *Materials Today*, 12(7), 46–50.
- 10 Diekman, B. O., Rowland, C. R., Lennon, D. P., Caplan, A. I., y Guilak, F. (2009). Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix. *Tissue engineering Parte A*, 16(2), 523–533.
- Dobbins, K. R., F. W. Price Jr., W. E. Whitson. (2000). Trends in the indications for penetrating keratoplasty in the Midwestern United States. *Cornea*, 19(6), 813-816.
- 15 Ebenstein, D. M., y Pruitt, L. A. (2006). Nanoindentation of biological materials. *Nano Today*, 1(3), 26–33.
- Edmund, C. (1988). Corneal elasticity and ocular rigidity in normal and keratoconic eyes. *Acta Ophthalmologica*, 66(2), 134–140.
- 20 Edwards, M. y col. (2002). Indications for corneal transplantation in New Zealand: 1991-1999. *Cornea*, 21(2), 152-155.
- Farquharson, C., Berry, J. L., Barbara Mawer, E., Seawright, E., y Whitehead, C. C. (1998). Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1, 25-dihydroxyvitamin D. *European Journal of Cell Biology*, 76(2), 110–118.
- 25 Fredrick, D. R. (2002). Myopia. *BMJ: British Medical Journal*, 324(7347), 1195.
- Fukuchi, T., Yue, B., Sugar, J., y Lam, S. (1994). Lysosomal enzyme activities in conjunctival tissues of patients with keratoconus. *Archives of Ophthalmology*, 112(10), 1368.
- 30 Funderburgh, J. L. (2000). Corneal proteoglycans. In: *Proteoglycans: Structure, Biology and Molecular Interactions*, R. V. Lozzo, Editor. Marcel Dekker.
- 35 Funderburgh, J. L., Mann, M. M., Funderburgh, M. L., Corpuz, L., y Roth, M. R. (2001). Proteoglycan expression during transforming growth factor-induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44173.
- Funderburgh, J. L., M. M. Mann, y M. L. Funderburgh (2003) Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46): 45629.
- 40 Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology*, 200(4), 500–503.
- 45 Ghoniem, A. A., Açil, Y., Wiltfang, J., y Gierloff, M. (2015). Improved adipogenic in vitro differentiation: comparison of different adipogenic cell culture media on human fat and bone stroma cells for fat tissue engineering. *Anatomy & Cell Biology*, 48(2), 85–94.
- Greene, C. A. y col. (2013). Cells from the adult corneal stroma can be reprogrammed to a neuron-like cell using exogenous growth factors. *Experimental Cell Research*, 322(1), 122-132.
- 50 Greenstein, S. A., Fry, K. L., Bhatt, J., y Hersh, P. S. (2010). Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 36(12), 2105–2114.
- 55 Gurdon, J. B., D. A. Melton. (2008). Nuclear reprogramming in cells. *Science*, 322, 1811–1815.
- Gordon, M. K., R. A. Hahn (2010). Collagens. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 247–257.
- 60 Håkelién, A.M., P. Collas. (2002). Novel approaches to transdifferentiation. *Cloning & Stem Cells*, 4(4), 379–387.
- Heng, B. C., Cao, T., y Lee, E. H. (2004). Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells*, 22(7), 1152–1167.
- 65 Hollingsworth, J. G., Efron, N., y Tullo, A. B. (2005). In vivo corneal confocal microscopy in keratoconus. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 25(3), 254-260.

- Ignotz, R. A. y Massague, J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 4337–4345.
- 5 Ignotz, R. A., Endo, T., y Massague, J. (1987). Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *Journal of Biological Chemistry*, 262(14), 6443-6446.
- Jackson T. L. (2008) *Moorfields Manual of Ophthalmology*, Mosby, Elsevier.
- 10 Jester, J. V., Rodrigues, M. M., y Herman, I. M. (1987). Characterization of avascular corneal wound healing fibroblasts. New insights into the myofibroblast. *The American Journal of Pathology*, 127(1), 140.
- Jester, J. V., y col. (2002). TGFβ induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFβ, PDGF and integrin signaling. *Experimental Eye Research* 75(6), 645–657.
- 15 Jhanji, V., Sharma, N., y Vajpayee, R. B. (2011). Management of keratoconus: current scenario. *British Journal of Ophthalmology*, 95(8), 1044–1050.
- Jinabhai, A., H. Radhakrishnan, C. O'Donnell. (2010). Pellucid corneal marginal degeneration: a review. *Contact Lens & Anterior Eye*, 34(2), 56–63.
- 20 Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., & Yoo, J. U. (1998). In vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Experimental Cell Research*, 238(1), 265-272.
- 25 Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J., & Boot-Handford, R. P. (2007). Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(12), 1955-1958.
- Karamichos, D., Hutcheon, A., y Zieske, J. (2011). Transforming growth factor-β3 regulates assembly of a non-fibrotic matrix in a 3D corneal model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(8), e228-e238.
- 30 Karamichos, D., Zareian, R., Guo, X., Hutcheon, A. E. K., Ruberti, J. W., y Zieske, J. D. (2012). Novel in vitro model for keratoconus disease. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(4), 760–775.
- Kato, Y. y D. Gospodarowicz (1985). Stimulation by glucocorticoid of the synthesis of cartilage-matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 260(4), 2364–2373.
- 35 C. Kenney, M., Y Brown, D. J. (2003). The cascade hypothesis of keratoconus. *Contact Lens and Anterior Eye*, 26(3), 139-146.
- 40 Klintworth, G. K. (1999). Advances in the molecular genetics of corneal dystrophies. *American Journal of Ophthalmology*, 128(6), 747-754.
- Klintworth, G. K., y Damms, T. (1995). Corneal dystrophies and keratoconus. *Current Opinion in Ophthalmology*, 6(4), 44–56.
- 45 Kolambkar, Y. M., Peister, A., Soker, S., Atala, A., y Guldberg, R. E. (2007). Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *Journal of Molecular Histology*, 38(5), 405–413.
- Krachmer, J. H., Feder, R. S., y Belin, M. W. (1984). Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Survey of Ophthalmology*, 28(4), 293-322.
- 50 Ku, J. Y., Niederer, R. L., Patel, D. V., Sherwin, T., & McGhee, C. N. (2008). Laser scanning in vivo confocal analysis of keratocyte density in keratoconus. *Ophthalmology*, 115(5), 845-850.
- 55 Kulyk, W. M., y Hoffman, L. M. (1996). Ethanol exposure stimulates cartilage differentiation by embryonic limb mesenchyme cells. *Experimental Cell Research*, 223(2), 290–300.
- Lee, K. D., y col. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal cells. *Hepatology*, 40(6), 1275–1284.
- 60 Legeais, J.-M., y col. (2001). Nineteen years of penetrating keratoplasty in the Hotel-Dieu Hospital in Paris. *Cornea*, 20(6), 603-606.
- Linsenmayer, T. F., Fitch, J. M., y Birk, D. E. (1990). Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 580(1), 143–160.
- 65

- Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1595–1639.
- 5 Marshall, G. E., Konstas, A. G., y Lee, W. R. (1993). Collagens in ocular tissues. *The British Journal of Ophthalmology*, 77(8), 515.
- Mazzotta, C., Traversi, C., Baiocchi, S., Caporossi, O., Bovone, C., Sparano, M. C., Caporossi, A. (2008). Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy *in vivo*: early and late modifications. *American Journal of Ophthalmology*, 146(4), 527–533. e521.
- 10 Meek, K. M., Tuft, S. J., Huang, Y., Gill, P. S., Hayes, S., Newton, R. H., y Bron, A. J. (2005). Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(6), 1948–1956.
- 15 Mencucci, R., Marini, M., Paladini, I., Sarchielli, E., Sgambati, E., Menchini, D., & Vannelli, G. B. (2010). Effects of riboflavin/UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 38(1), 49–56.
- Mendler, M., Eich-Bender, S. G., Vaughan, L., Winterhalter, K. H., y Bruckner, P. (1989). El cartilago contiene fibrillas mezcladas de colágeno de tipo II, IX y XI. *The Journal of Cell Biology*, 108(1), 191–197.
- 20 Menetrey, J., y col. (2000). Growth factors improve muscle healing *in vivo*. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 82(1), 131–137.
- Niederer, R. L., Perumal, D., Sherwin, T., y McGhee, C. N. J. (2008). Laser scanning *in vivo* confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(7), 2964–2970.
- 25 Nirmal, H. B., S. R. Bakliwal, S. P. Pawar (2010). In-situ gel: New trends in controlled and sustained drug delivery system. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1398–1408.
- 30 Patel, H. Y. y col. (2005). The New Zealand National Eye Bank study 1991-2003: a review of the source and management of corneal tissue. *Cornea*, 24(5), 576–582.
- 35 Patel, D., C. McGhee (2013). Understanding keratoconus: what have we learned from the New Zealand perspective? *Clinical and Experimental Optometry*, 96(2), 183–187.
- Peran, M., y col. (2011). Transdifferentiation: why and how? *Cell Biology International*, 35(4), 373–379.
- 40 Pramanik, S., Musch, D. C., Sutphin, J. E., y Farjo, A. A. (2006). Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology*, 113(9), 1633–1638.
- Premaraj y col. (2006). Sustained delivery of bioactive cytokine using a dense collagen gel vehicle collagen gel delivery of bioactive cytokine. *Arch Oral Biol*. 51(4), 325–33.
- 45 Rabinowitz, Y. S. (1998). Keratoconus. *Survey of Ophthalmology*, 42(4), 297–319.
- Rabonitz, Y. S. (2004). Ectatic Disorders of the Cornea. In: *The Cornea*, 4.<sup>a</sup> edición. Lippincott Williams & Wilkins.
- 50 Romero-Jiménez, M., Santodomingo-Rubido, J., & Wolffsohn, J. S. (2010). Keratoconus: a review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 33(4), 157–166.
- Rupenthal, I. D., Green, C. R., y Alany, R. G. (2011). Comparison of ion-activated *in situ* gelling systems for ocular drug delivery. Part 2: Precorneal retention and *in vivo* pharmacodynamic study. *International Journal of Pharmaceutics*.
- 55 Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., y Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11307–11312.
- 60 Shah, M., Foreman, D. M., y Ferguson, M. W. (1995). Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of Cell Science*, 108(3), 985–1002.
- Sherwin, T., y Brookes, N. H. (2004). Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 32(2), 211–217.
- 65 Spoerl, E., Huhle, M., y Seiler, T. (1998). Induction of cross-links in corneal tissue. *Experimental Eye Research*, 66(1), 97–103.

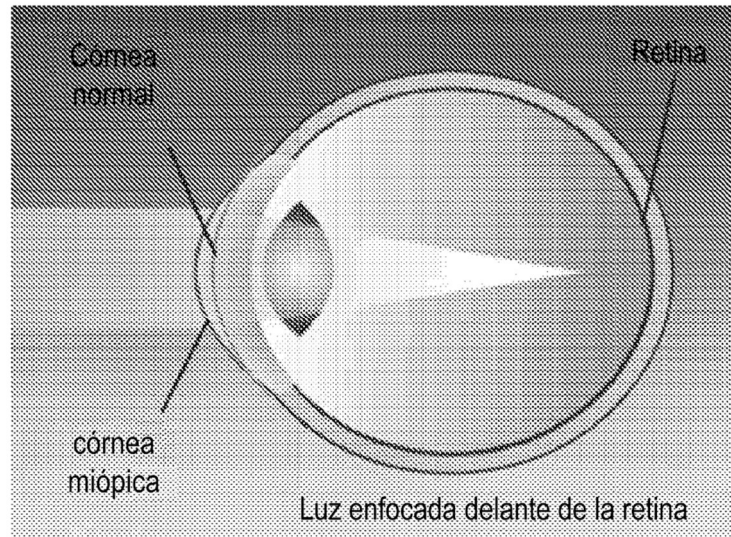
- Takahashi, K., S. Yamanaka. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676.
- 5 Tsang y col. (1995). Characterization of recombinant soluble human transforming growth factor-beta receptor type II (rhTGF-beta sRII). *Cytokine*, 7(5), 389–97.
- Wells, S. M. (2003). Mechanical design of elastic biopolymers. *Physics in Canada*, 59(2), 67–74.
- 10 Wernig, M. y col. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448(7151), 318–324.
- Willshaw H. y col. (2000). *A Handbook of Paediatric Ophthalmology*. Pensord Press: Reino Unido.
- 15 Wilson, S. E., Netto, M., y Ambrosio, R. (2003). Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. *American Journal of Ophthalmology*, 136(3), 530-536.
- Winter, A., Breit, S., Parsch, D., Benz, K., Steck, E., Hauner, H., Richter, W. (2003). Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: A comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis & Rheumatism*, 48(2), 418–429.
- 20 Wollensak, G., Spoerl, E., y Seiler, T. (2003). Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*, 135(5), 620–627.
- 25 Wollensak, J., y Buddecke, E. (1990). Biochemical studies on human corneal proteoglycans-a comparison of normal and keratoconic eyes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 228(6), 517–523.
- Worster, A. A., Nixon, A. J., Brower-Toland, B. D., y Williams, J. (2000). Effect of transforming growth factor  $\beta$ 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 30 61(9), 1003-1010.
- Yamanaka, S., H.M. Blau. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465(7299), 704–712.
- 35 Yoon Y. M., Oh C. D., Kim D. Y., Lee YS, Park J. W., Huh T. L., Kang S. S., Chun J. S. (2000). Epidermal growth factor negatively regulates chondrogenesis of mesenchymal cells by modulating the protein kinase C-alpha, Erk-1, and p38 MAPK signaling pathways. *Biol Chem*. 275(16):12353-9.

**REIVINDICACIONES**

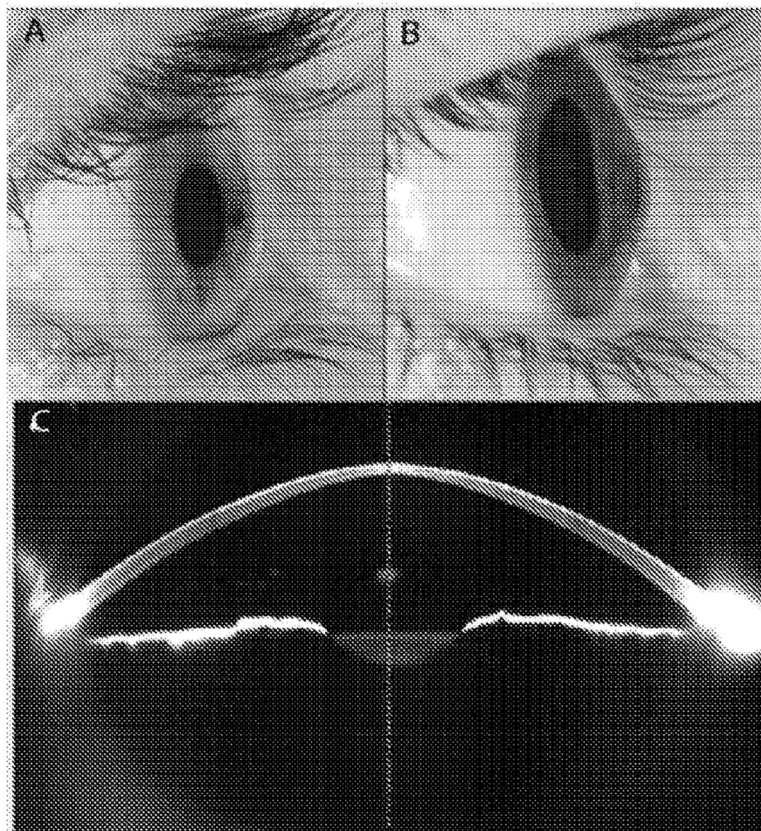
1. Una composición que comprende un polipéptido de TGFβ3 y dexametasona o cualquier, sal, éster o hidruro de la misma, para su uso en un método para: (i) tratar o prevenir el adelgazamiento o la irregularidad de la córnea de un sujeto; o (ii) tratar o prevenir un error refractivo del ojo de un sujeto, en donde:
- 5
- el polipéptido de TGFβ3 comprende la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1; o  
 el polipéptido de TGFβ3 comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1, o  
 el polipéptido de TGFβ3 comprende al menos 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1.
- 10
2. La composición para el uso según la reivindicación 1, en donde:
- 15
- (a) el polipéptido de TGFβ3 consiste en la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º: 1; y/o  
 (b) la dexametasona es fosfato de dexametasona.
3. La composición para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:
- 20
- (a) la composición comprende 10 a 100 ng/ml del polipéptido de TGFβ3; y/o  
 (b) la composición comprende 40 a 4000 ng/ml de dexametasona.
4. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde:
- 25
- (a) la composición se formula para su administración una vez al día o dos veces al día;  
 (b) la composición se formula para su coadministración con uno o más agentes adicionales para el ojo y el uno o más agentes adicionales para el ojo se seleccionan entre el grupo que consiste en: agentes anestésicos, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos y lubricantes; y/o  
 (c) la composición se formula para su administración junto con el uso de una lente de contacto, inserto corneal, implante corneal o anillo intraestromal, que se adapta para moldear o retener la forma de la córnea y/o después del tratamiento con la composición o que se adapta para actuar como portador de la composición o como dispositivo de elución de la composición.
- 30
5. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde:
- 35
- (a) para (i), la composición se formula para su administración antes de y/o después de la reticulación del colágeno corneal; o  
 (b) para (ii), la composición se formula para su administración antes o después de la cirugía refractiva.
- 40
6. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde:
- 45
- (a) el adelgazamiento o la irregularidad de la córnea están asociados al queratocono; o  
 (b) el error refractivo del ojo está asociado a uno o más de: miopía, hipermetropía, astigmatismo y presbicia.
7. Un kit que comprende: (i) una composición que comprende un polipéptido de TGFβ3 y dexametasona o cualquier sal, éster o hidruro de los mismos; y (ii) una lente de contacto, inserto corneal, implante corneal o anillo intraestromal, en donde:
- 50
- el polipéptido de TGFβ3 comprende la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1; o  
 el polipéptido de TGFβ3 comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1, o  
 el polipéptido de TGFβ3 comprende al menos 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1.
- 55
8. El kit de la reivindicación 7, en donde:
- 60
- (a) la lente de contacto, el inserto corneal, el implante corneal o el anillo intraestromal se adapta para moldear o retener la forma de la córnea durante y/o después del tratamiento con la composición; y/o  
 (b) la lente de contacto, el inserto corneal, el implante corneal o el anillo intraestromal actúan como un portador de la composición o como un dispositivo de elución de la composición.
- 65

9. El kit de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde:
- 5 (a) el polipéptido de TGFβ3 consiste en la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º: 1; y/o  
(b) la dexametasona es fosfato de dexametasona.
10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la composición comprende uno o más de:
- 10 (a) 10 a 100 ng/ml del polipéptido de TGFβ3;  
(b) 40 a 4000 ng/ml de dexametasona;  
(c) una formulación para su administración una vez al día o dos veces al día; o  
(d) una coformulación con uno o más agentes adicionales para el ojo.
11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde:
- 15 (a) el kit incluye uno o más agentes adicionales para el ojo y en donde los uno o más agentes  
adicionales para el ojo se seleccionan entre el grupo que consiste en: agentes anestésicos,  
agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos y lubricantes;  
(b) el kit incluye una solución para lentes de contacto; y/o  
(c) el kit incluye instrucciones de uso.
- 20 12. Una combinación de:
- 25 una composición que comprende un polipéptido de TGFβ3, y  
una composición que comprende dexametasona o cualquier sal, éster o hidruro de la misma,  
para su uso en un método para: (i) tratar o prevenir el adelgazamiento o la irregularidad de la córnea;  
o (ii) tratar o prevenir un error refractivo del ojo,  
en donde:
- 30 el polipéptido de TGFβ3 comprende la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1; o  
el polipéptido de TGFβ3 comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia con la  
secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1, o  
el polipéptido de TGFβ3 comprende al menos 100 aminoácidos de la secuencia de  
aminoácidos con Id. de sec. n.º 1.
- 35 13. La combinación para el uso según la reivindicación 12, en donde:
- (a) el polipéptido de TGFβ3 consiste en la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º: 1; y/o  
(b) la dexametasona es fosfato de dexametasona, y/o
- 40 el adelgazamiento o la irregularidad de la córnea está asociado al queratocono; o  
el error refractivo del ojo está asociado a uno o más de: miopía, hipermetropía,  
astigmatismo y presbicia.
- 45 14. La combinación para el uso según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde:
- (a) la composición comprende 10 a 100 ng/ml del polipéptido de TGFβ3;  
(b) la composición comprende 40 a 4000 ng/ml de dexametasona;  
(c) la composición comprende una formulación para su administración mediante una lente de  
contacto, un inserto corneal, un implante corneal o un anillo intraestromal;  
(d) la composición comprende una formulación para su administración en forma de solución, gel,  
crema o emulsión; y/o  
(e) la composición comprende una formulación para su administración in vivo o ex vivo.
- 50

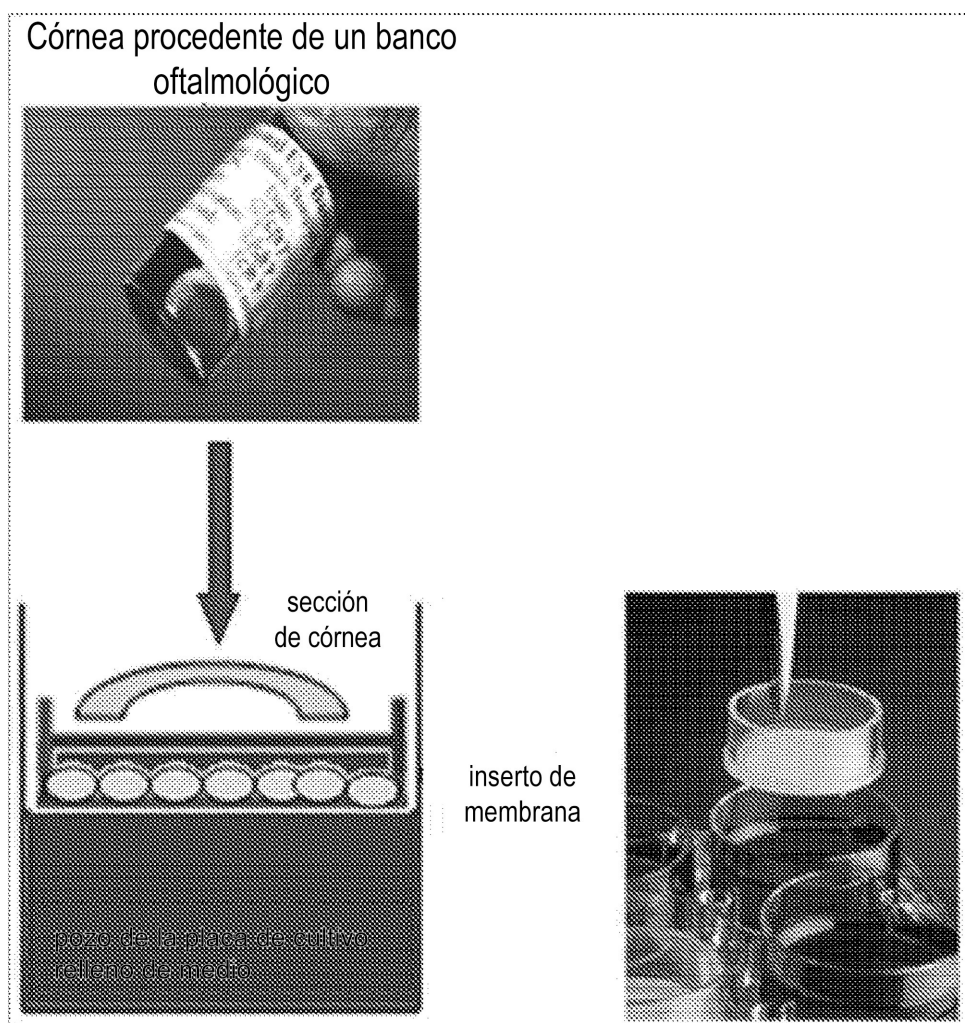
**Figura 1A**



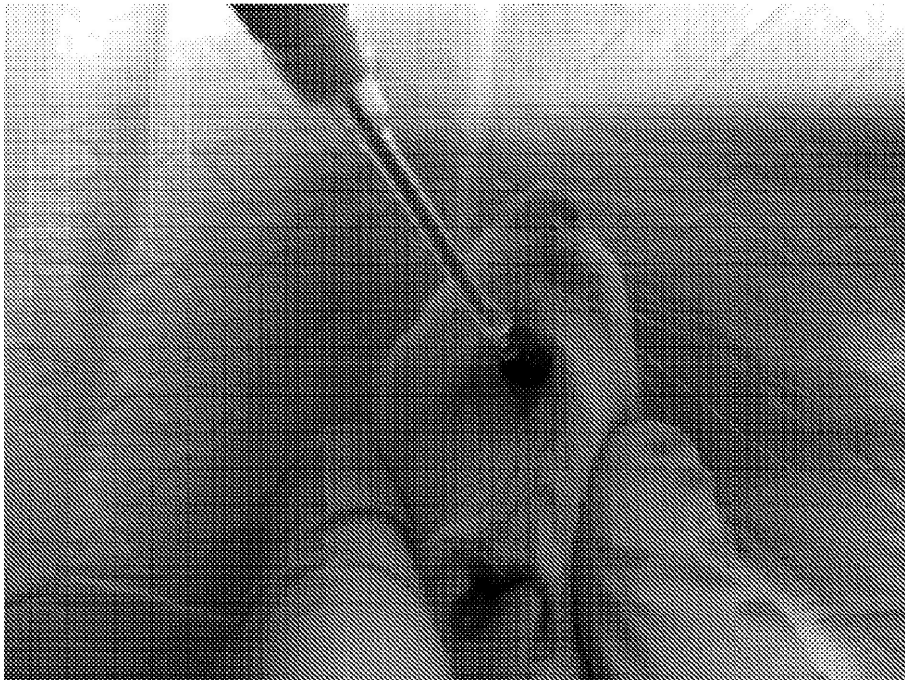
**Figura 1B**



**Figura 2**



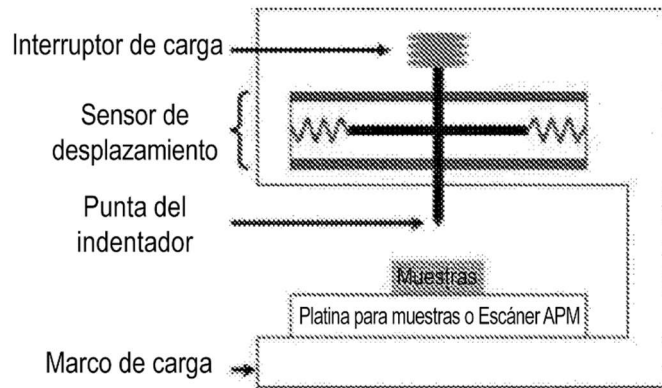
**Figura 3**



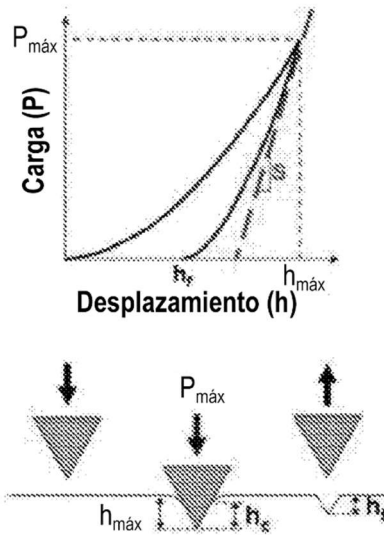
**Figura 4**



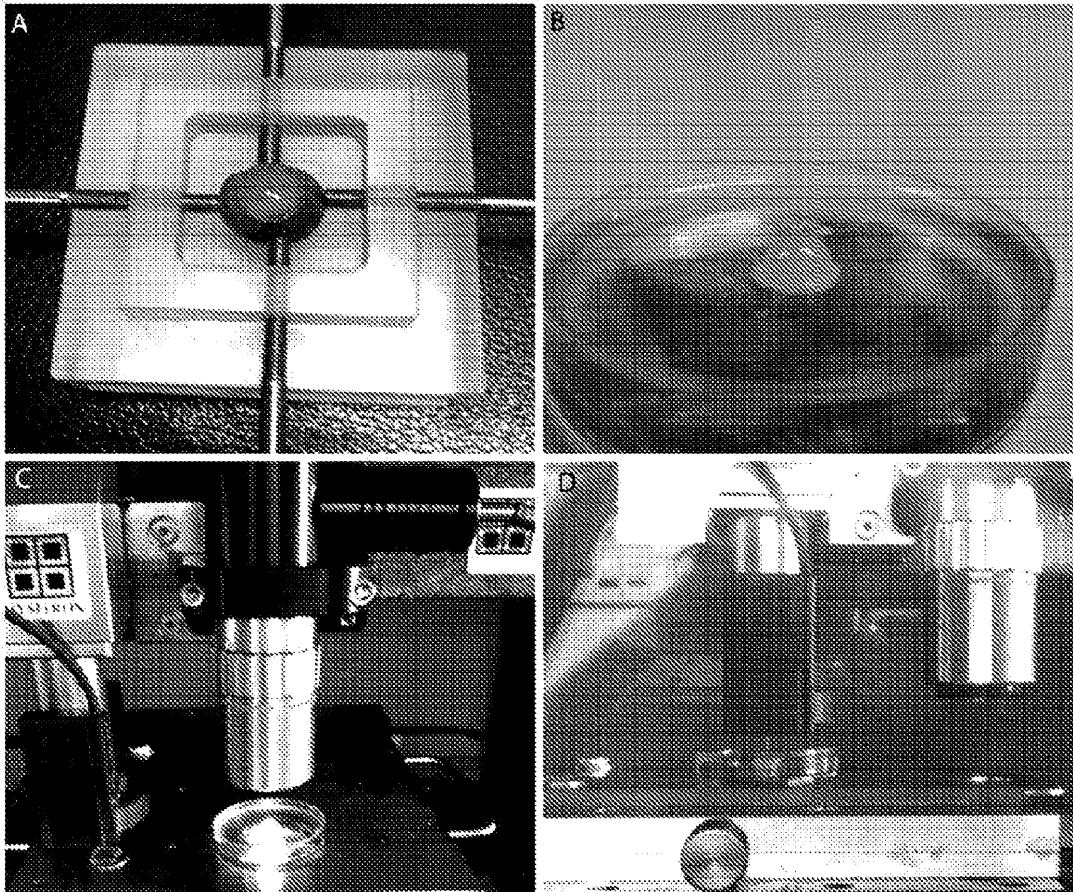
**Figura 5A**



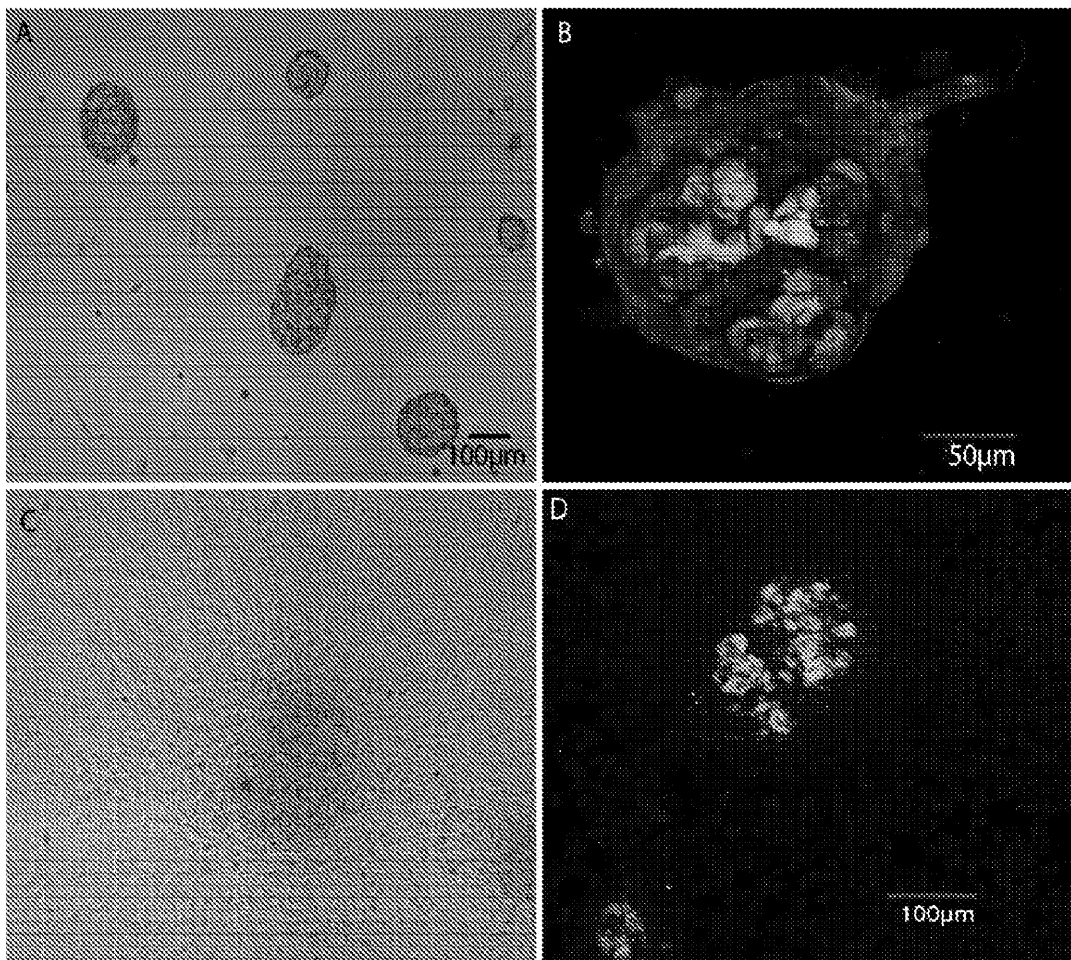
**Figura 5B**



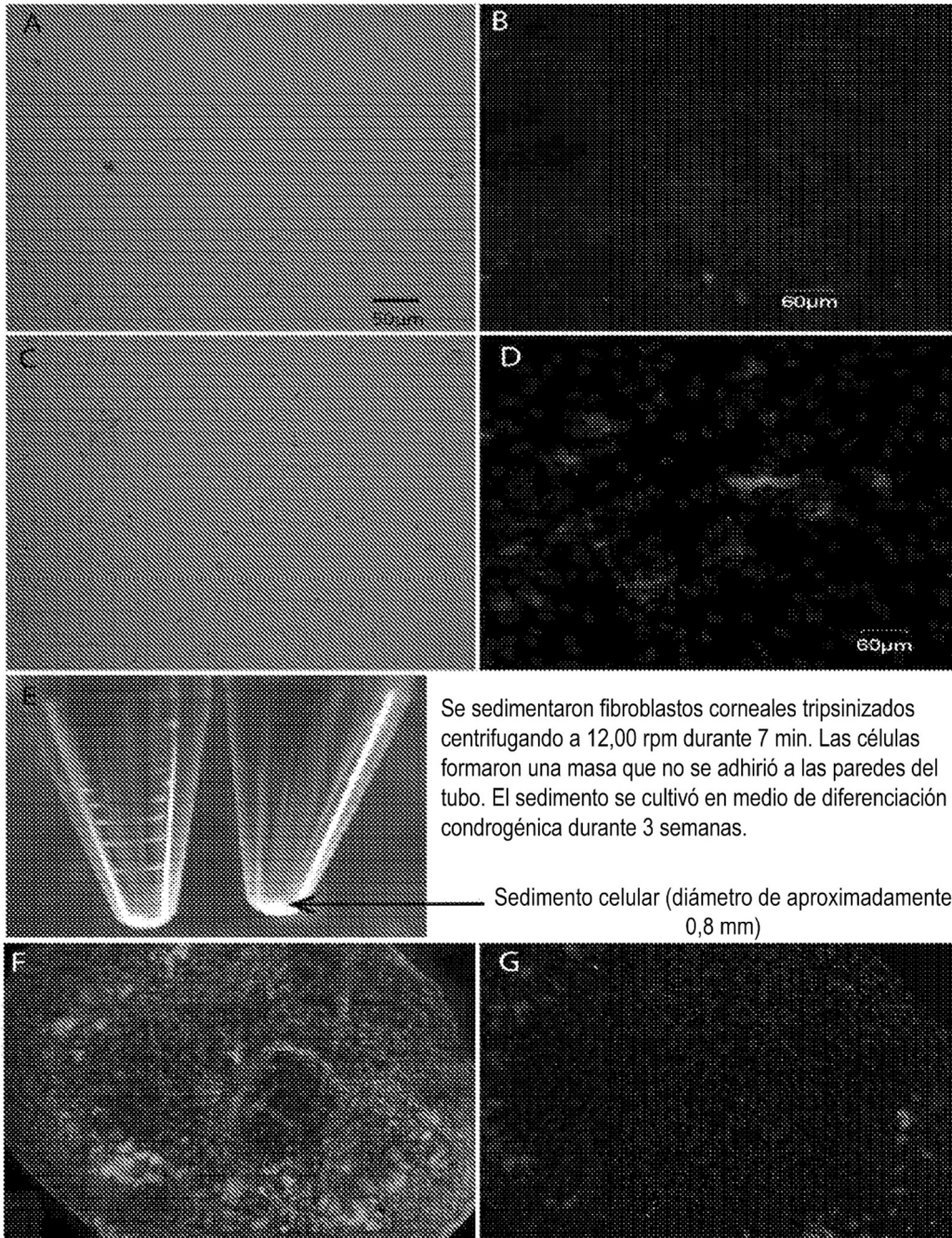
**Figura 6**



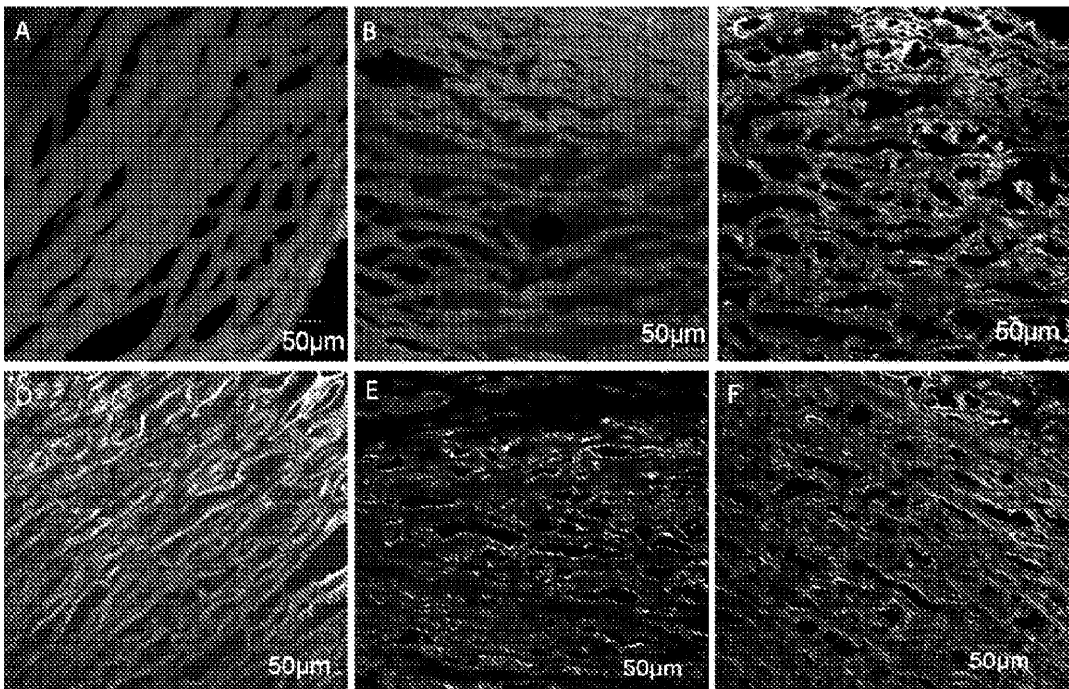
**Figura 7**



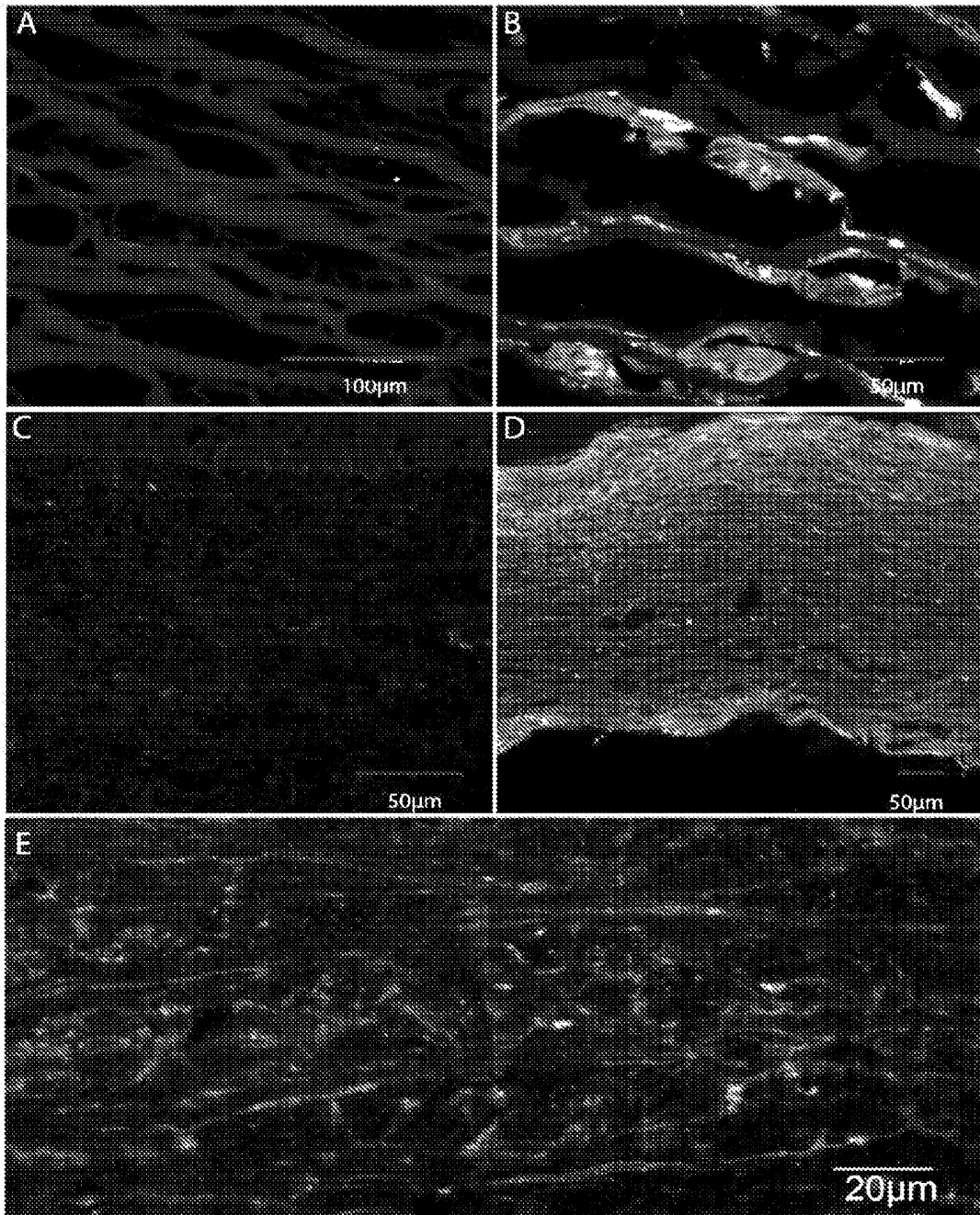
## Figura 8



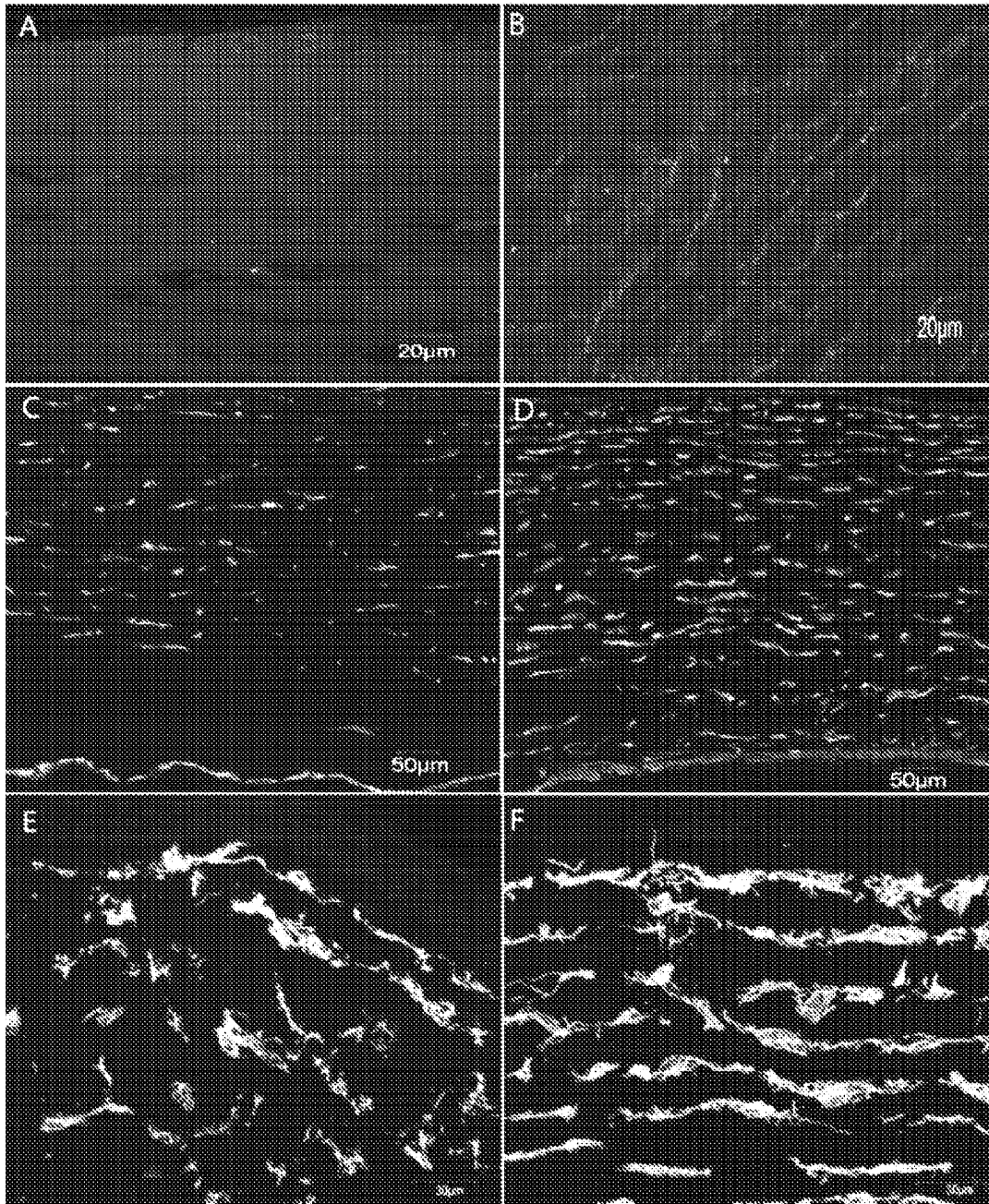
**Figura 9**



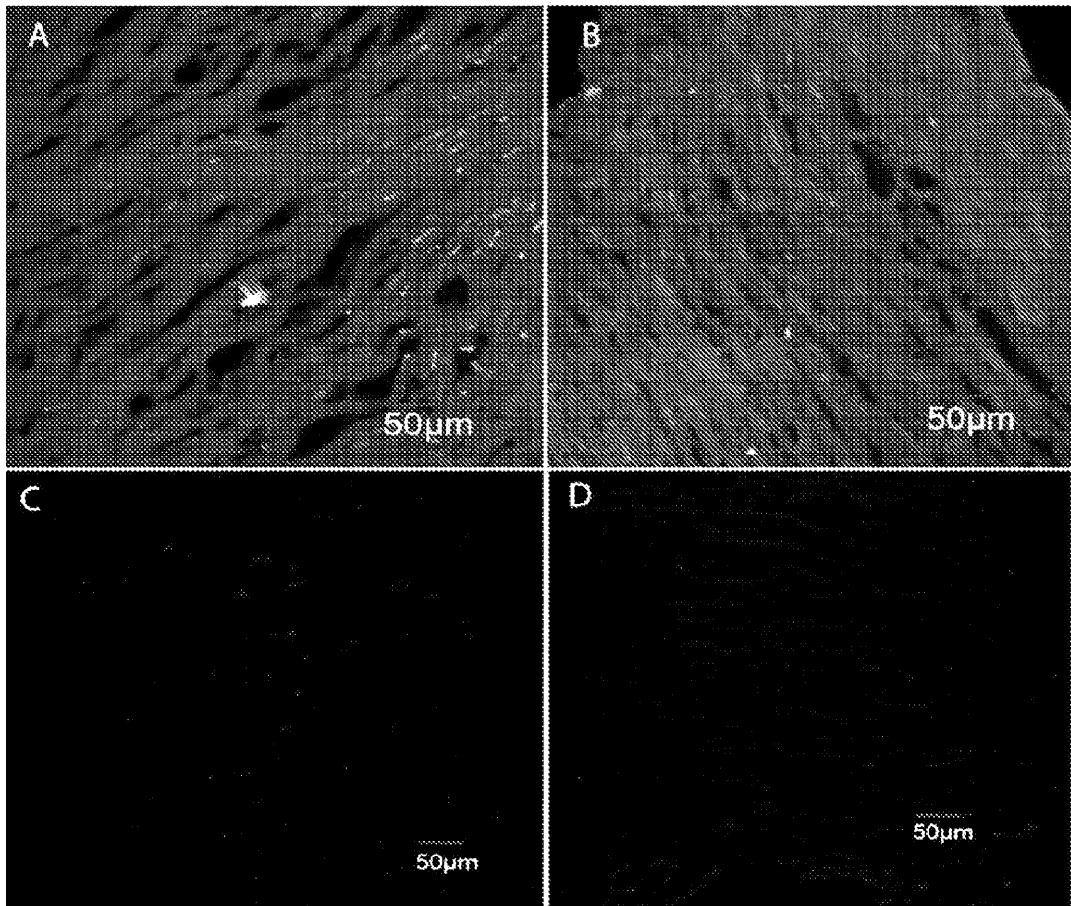
**Figura 10**



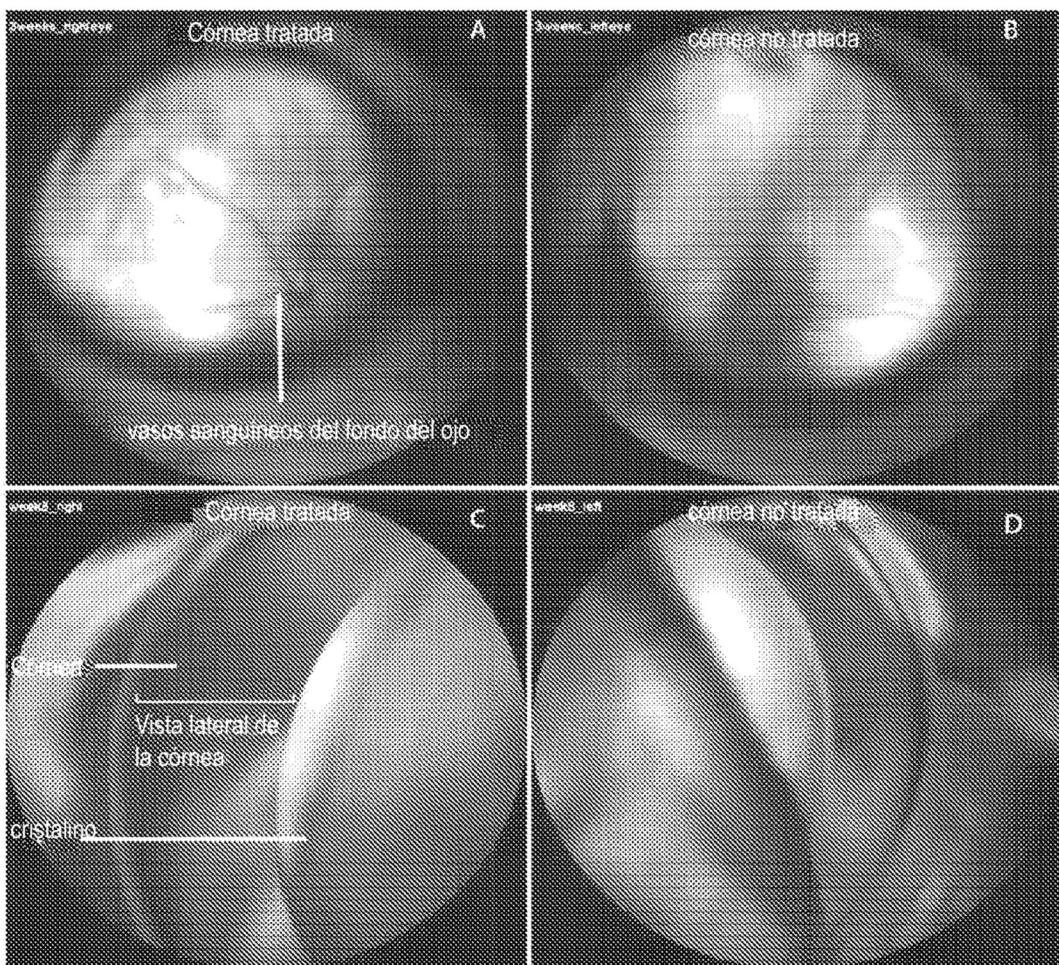
**Figura 11**



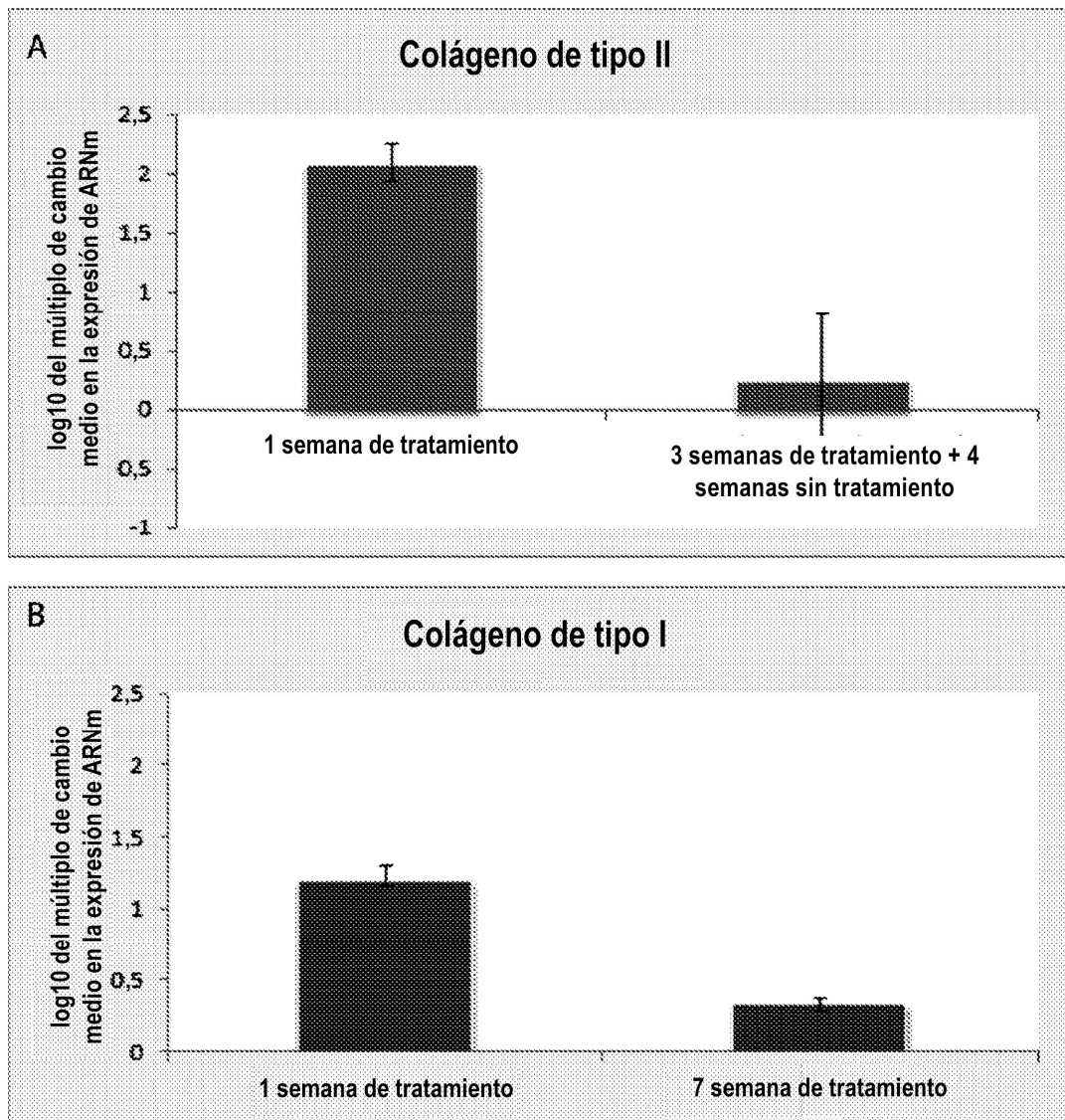
**Figura 12**



**Figura 13**



**Figura 14**



**Figura 15**

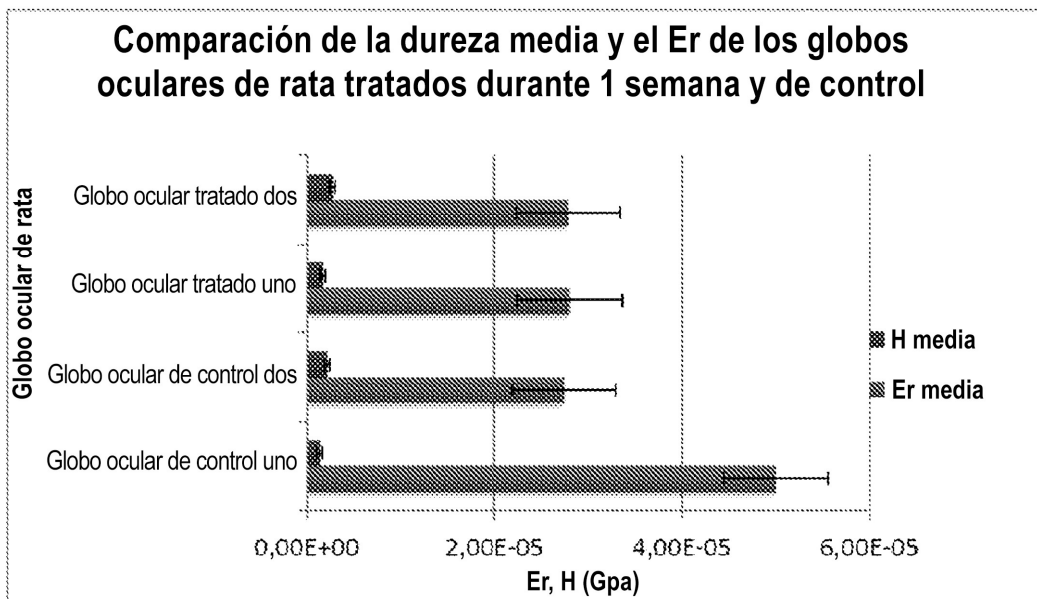
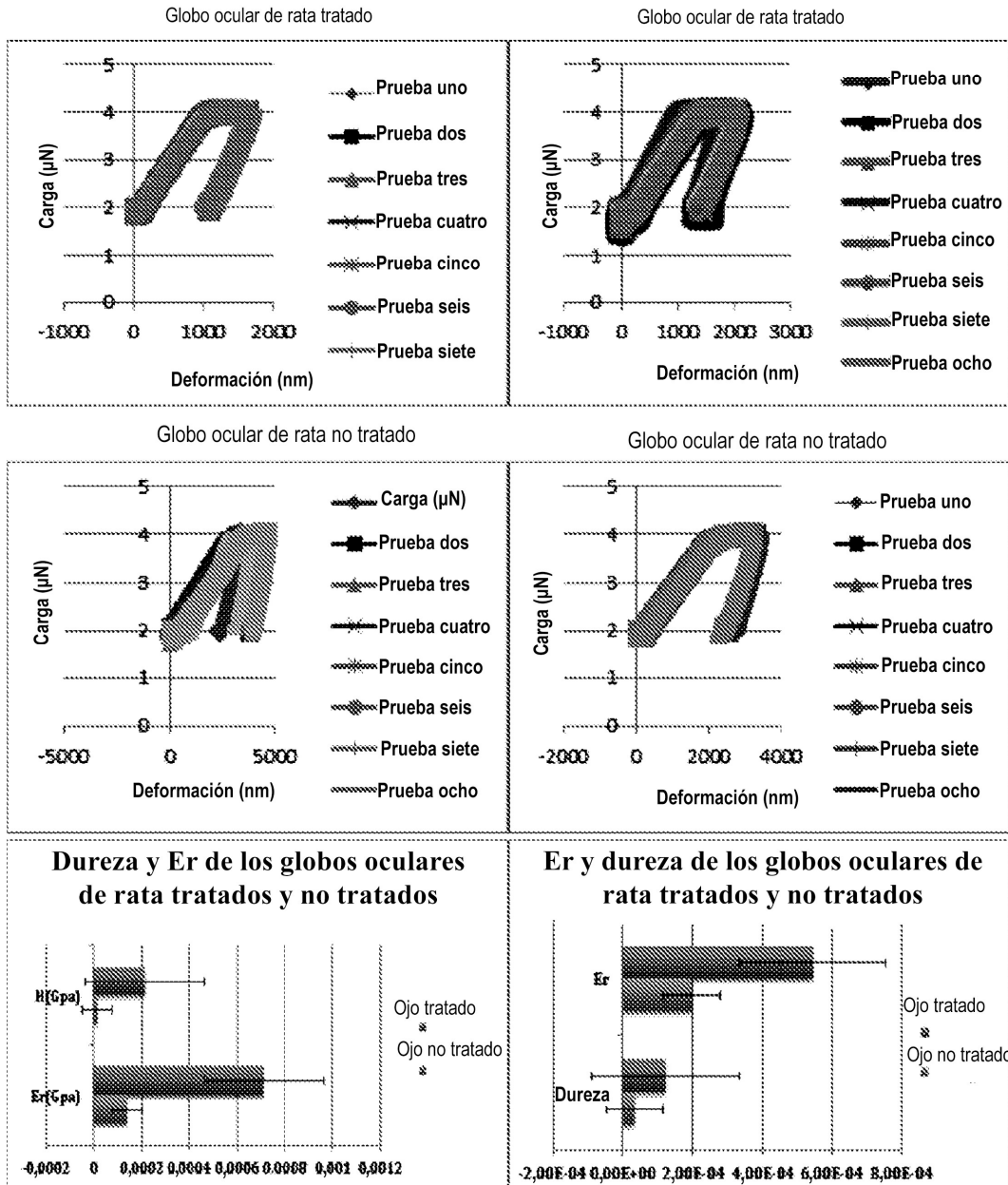
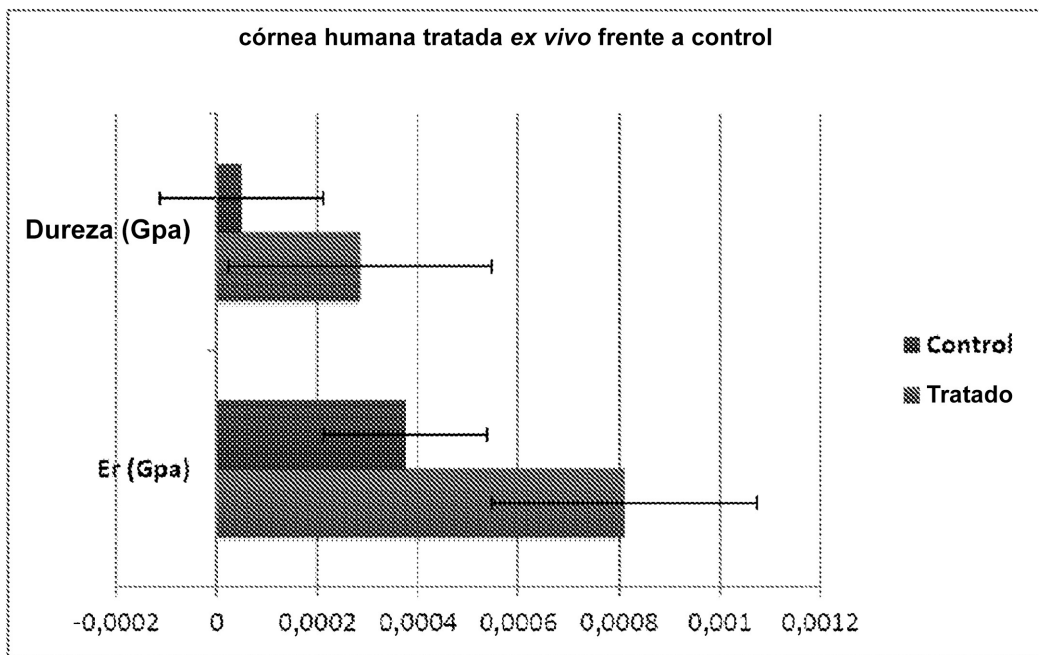


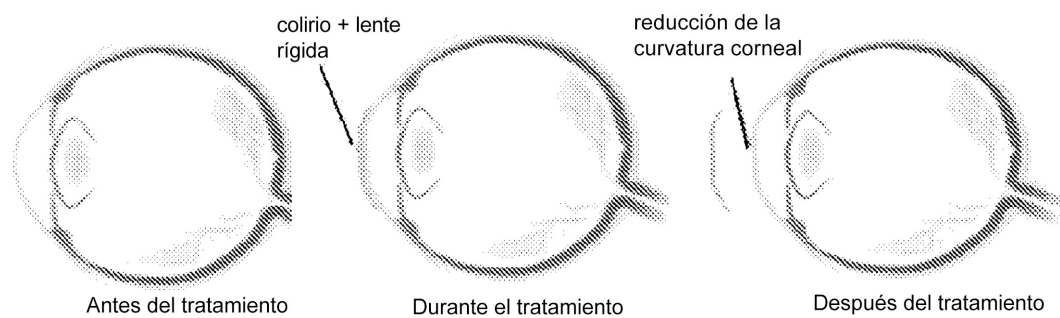
Figura 16



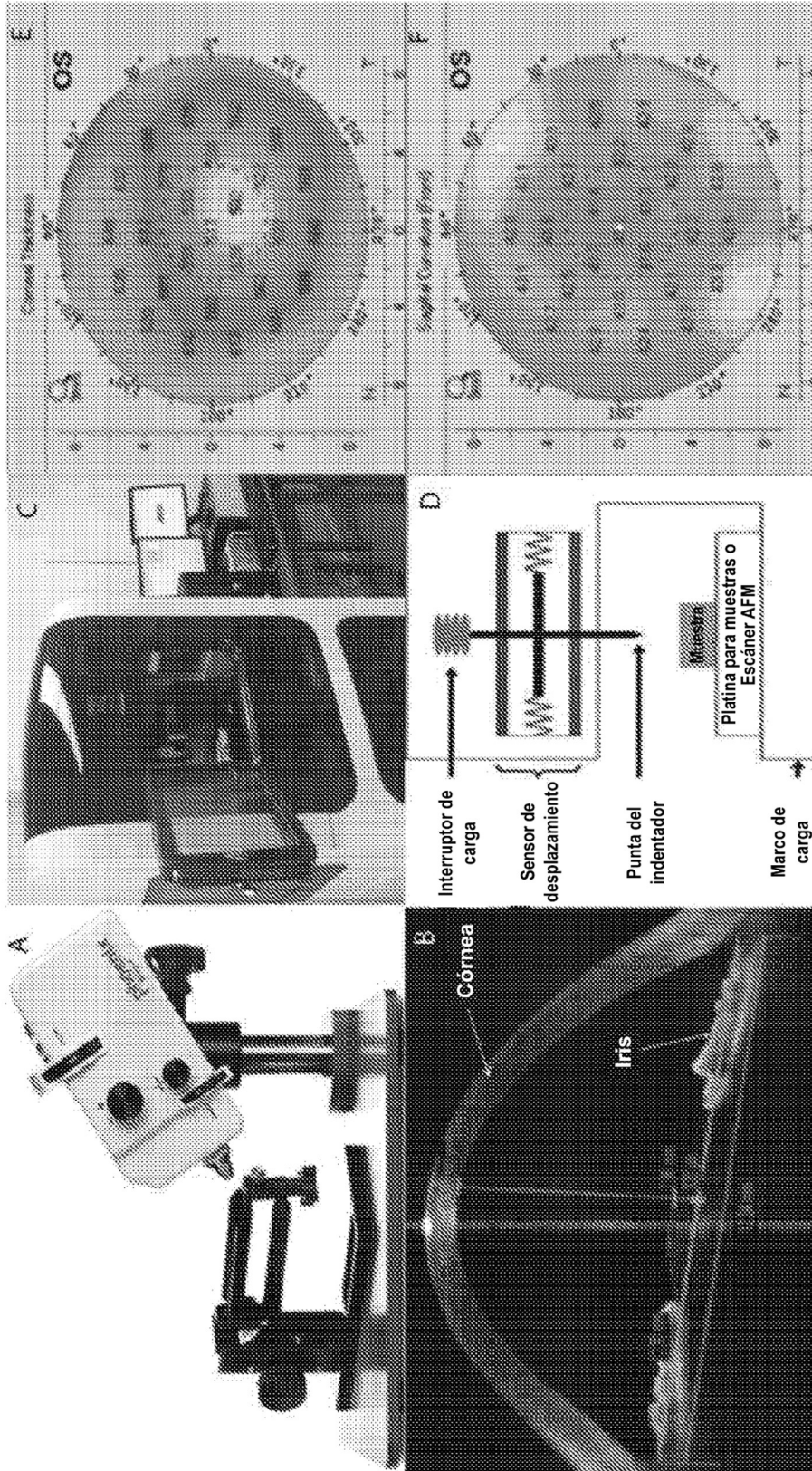
**Figura 17**



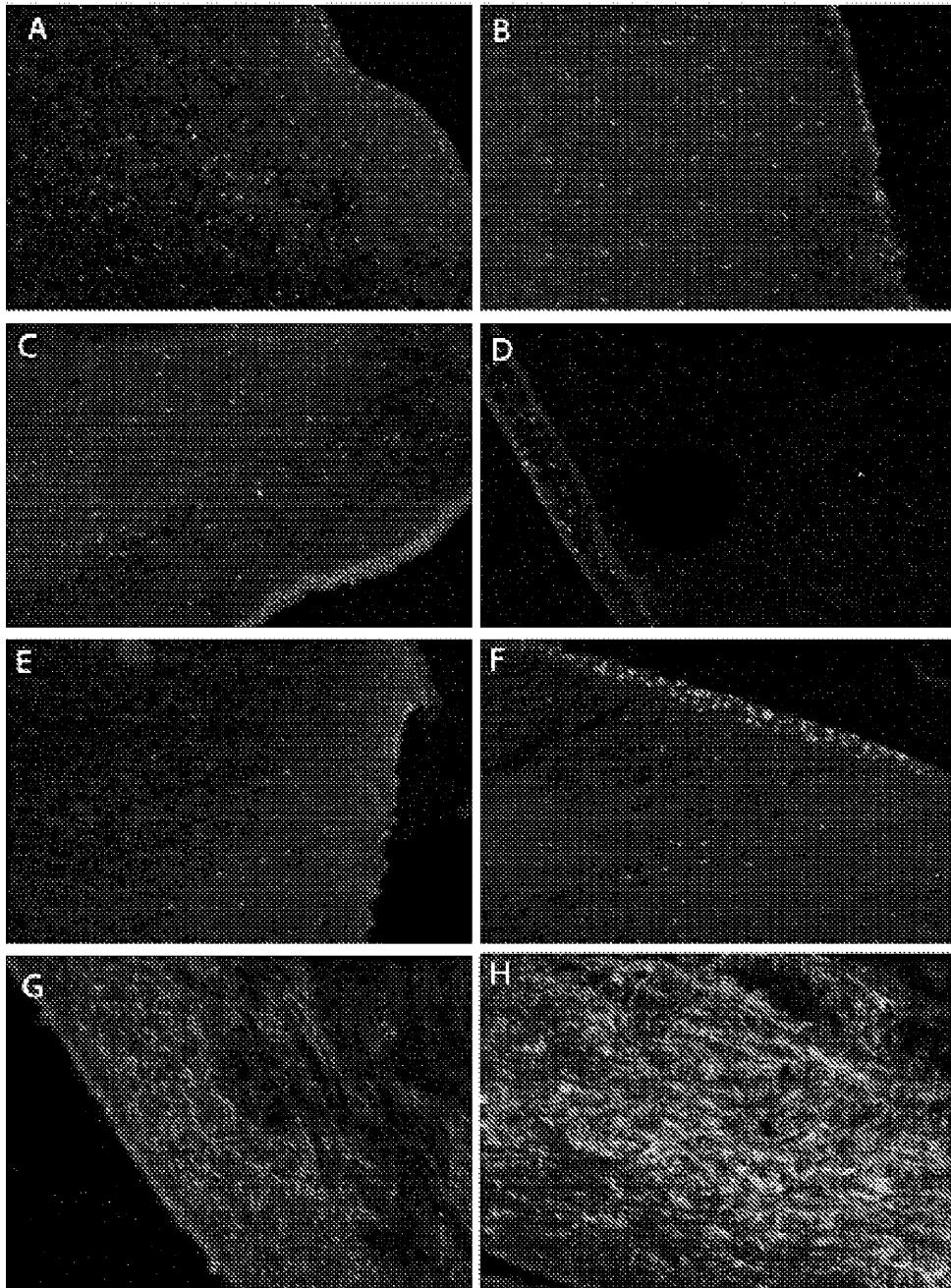
**Figura 18**



**Figura 19**



**Figura 20**



**Figura 21**

