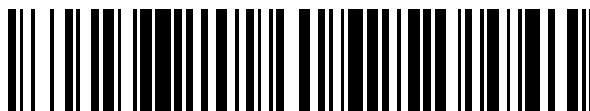


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 284**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2009** **PCT/GB2009/000917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009** **WO09127809**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009** **E 09732279 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 2265711**

54 Título: **Membrana**

30 Prioridad:

14.04.2008 GB 0806746

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

25.04.2018

73 Titular/es:

UCL BUSINESS PLC (100.0%)

The Network Building

97 Tottenham Court Road London W1T 4TP, GB

72 Inventor/es:

COFFEY, PETER;

DA CRUZ, LYNDON y

CHEETHAM, KAREN

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 665 284 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

Membrana

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere a una membrana para soportar el crecimiento de células. Además, la presente invención se refiere a procedimientos para hacer crecer las células. En particular, la membrana puede utilizarse en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad.

10

Antecedentes de la invención

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una afección que se encuentra en adultos de edad avanzada en los que el área macular de la retina sufre adelgazamiento, atrofia y hemorragias. Esto da como resultado la pérdida de la visión en el área central de visión, particularmente la incapacidad de ver detalles finos, leer o reconocer rostros.

La DMAE se clasifica como seca (no neovascular) o húmeda (neovascular). La DMAE húmeda implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en un área en la que no deberían estar. La forma seca es más común que la húmeda, con, aproximadamente, el 85-90 por ciento de los pacientes con DMAE diagnosticados con DMAE seca. La forma húmeda de la enfermedad causa generalmente una pérdida de visión más grave.

La DMAE seca es una fase temprana de la enfermedad y puede ser el resultado del envejecimiento y el adelgazamiento de los tejidos maculares, el depósito de pigmento en la mácula o una combinación de los dos procesos. La degeneración macular seca se diagnostica cuando las manchas amarillentas conocidas como drusas comienzan a acumularse a partir de depósitos o desechos del tejido deteriorado, principalmente en el área de la mácula. La pérdida gradual de la visión central puede ocurrir con la degeneración macular seca.

La DMAE seca puede evolucionar a la DMAE húmeda, en la que nuevos vasos sanguíneos crecen debajo de la retina y dejan escapar sangre y fluidos. Esta fuga causa daño permanente a las células retinianas sensibles a la luz, que mueren y crean puntos ciegos en la visión central.

Los tratamientos para la DMAE son actualmente limitados, pero algunos tratamientos pueden retrasar su progresión o mejorar la visión. Los tratamientos para la degeneración macular dependen de si la enfermedad está en su etapa inicial o en forma seca, o en una forma más avanzada y húmeda, que puede conducir a una pérdida grave de la visión. Un procedimiento de tratamiento es el trasplante de células de la periferia sana del ojo en pacientes con DMAE húmeda en el área afectada. Si bien esto es efectivo, existe un límite en el tamaño del área afectada que puede tratarse y la operación es larga e inapropiada para la mayoría de los pacientes de edad avanzada. Sería ventajoso proporcionar tratamientos mejorados para ambas formas de DMAE.

40

Los inventores de la presente invención han investigado formas en las que se pueden obtener y trasplantar células epiteliales retinianas de reemplazo, en particular utilizando células madre para producir las células requeridas. Los inventores de la presente invención han desarrollado una membrana sobre la que se pueden cultivar estas células y que puede trasplantarse en el ojo, junto con las células. La membrana es particularmente útil para el crecimiento de células epiteliales pigmentadas de la retina (RPE) y derivados de las mismas, pero también pueden crecer otros tipos de células.

45

Anteriormente, se han cultivado células en membranas. Williams y otros (Journal of Materials Science: Materials in Medicine 16 (2005) 1087-1092) han utilizado membranas de poliuretano para cultivar células RPE, pero han descubierto que la superficie de las membranas generalmente requiere tratamiento para permitir la unión celular. Otros grupos han utilizado membranas de poliéster. Stanzel y otros, (Investigative Ophthalmology and Visual Science 47 (2006) E-Abstract 1407) describen el cultivo de células RPE aisladas en una membrana de poliéster porosa con una densidad de poros de $4 \times 10^6 / \text{cm}^2$.

50

55 **Características de la invención**

Según la presente invención, se da a conocer una membrana para soportar el crecimiento de las células, siendo la membrana sustancialmente no biodegradable y porosa, teniendo los poros, aproximadamente, entre $0,2 \mu\text{m}$ y $0,5 \mu\text{m}$ de diámetro. Preferentemente, el diámetro de poro está entre $0,3 \mu\text{m}$ y $0,45 \mu\text{m}$.

60

La membrana no es biodegradable para garantizar que permanezca como soporte de las células una vez trasplantada al ojo. Por la expresión sustancialmente no biodegradable, se entiende que la membrana no se degrada durante, como mínimo, 5 años después de la inserción en el cuerpo, más preferentemente, como mínimo, 10 años, incluso más preferentemente, como mínimo, 15 años.

Los poros son de este diámetro para permitir la difusión de todos los nutrientes y proteínas, a la vez que previenen la migración de las células a través del polímero.

65

- La densidad de poros está, aproximadamente, entre 1×10^7 y 3×10^8 poros por cm, más preferentemente, entre 5×10^7 y 1×10^8 por centímetro. Esta densidad permite los niveles de permeabilidad deseados y también permite la vascularización. En particular, el tamaño y la densidad de los poros es importante para permitir el movimiento de nutrientes desde un lado de la membrana al otro y también permite la vascularización a través de la membrana. Esto es especialmente importante después de la implantación. El cuerpo polimérico puede recibir vascularización desde el lecho coroideo rico. Esto se ha demostrado en lechos vasculares ricos fuera del ojo (Cassell y otros, 2002, Patrick y otros, 1999, Saxena y otros 1999, Peter y otros 1998) pero solo puede ocurrir si la porosidad es suficiente (Menger y otros, 1990).
- Preferentemente, la conductancia hidráulica de la membrana es más de $50 \times 10^{-10} \text{ m s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Específicamente, la conductancia hidráulica de la membrana de la membrana es, preferentemente, de 33 ml/min/cm^2 , aproximadamente. Esto es igual a $801,21 \times 10^{-10} \text{ m s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, que es ocho veces la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch cadavérica macular joven. Esta conductividad sobrante es útil, ya que la membrana artificial depende completamente de procesos pasivos. Además de ser capaz de satisfacer las demandas de las células superpuestas, en términos de difusión de nutrientes, tampoco debe ser un obstáculo para el transporte de fluidos desde el lado basal de la capa de las RPE, de lo contrario, las RPE se desprenderán de la superficie del polímero. Esto tiene sentido ya que se ha formulado la hipótesis de que la conductividad hidráulica reducida de la membrana de Bruch en ancianos provoca desprendimientos epiteliales pigmentarios en la DMAE (Bird y Marshall, 1986).
- Preferentemente, la membrana se puede esterilizar mediante irradiación gamma, óxido de etileno, esterilización en autoclave o UV, sin degradarse.
- Preferentemente, la membrana se puede sellar mediante sellado ultrasónico, sellado por radiofrecuencia o moldeo por inserción. Permite que otras capas se unan a la membrana, por ejemplo, uniendo capas farmacéuticas o de revestimiento a la membrana. Por ejemplo, se podría desear unir una capa biodegradable más rígida, tal como PLGA, para proporcionar rigidez a la membrana para facilitar la administración. Alternativamente, se pueden unir capas que contienen agentes farmacológicos o biológicos, o capas que soportan otras células.
- Preferentemente, la membrana tiene un espesor máximo de, aproximadamente, $11 \mu\text{m}$. Más preferentemente, el espesor de la membrana está entre $9 \mu\text{m}$ y $11 \mu\text{m}$. El espesor de la membrana se selecciona para permitir la difusión de nutrientes, permitir la vascularización y permitir también que la membrana se inserte fácilmente en el ojo.
- Por consiguiente, se da a conocer una membrana para soportar el crecimiento de las células, siendo la membrana sustancialmente no biodegradable y porosa y teniendo un grosor máximo de, aproximadamente, $11 \mu\text{m}$.
- Preferentemente, la membrana es sustancialmente plana y su dimensión más pequeña es, preferentemente, menor que $11 \mu\text{m}$, aproximadamente. Puede variar en grosor en esa dimensión pero, preferentemente, está entre $9 \mu\text{m}$ y $11 \mu\text{m}$ de espesor.
- Preferentemente, la membrana tiene un peso máximo de $1,5 \text{ mg/cm}^2$, aproximadamente. Más preferentemente, el peso de la membrana está entre $1,0 \text{ mg/cm}^2$ y $1,4 \text{ mg/cm}^2$. Preferentemente, la resistencia a la tracción mínima de la membrana es de 100 bar, para proporcionar la resistencia suficiente que permita la cirugía adecuadamente. Preferentemente, la resistencia máxima a la tracción es de 300 bar, nuevamente para permitir que la membrana se maneje fácilmente durante la cirugía. Preferentemente, la resistencia al estallido de la membrana es, como mínimo, 10 psi.
- Preferentemente, la membrana es hidrófila. Esto proporciona a la membrana una buena capacidad de humectación y permite la unión de células y otros revestimientos deseables con facilidad.
- Preferentemente, la membrana tiene un pH de 4 a 8, que es un pH fisiológicamente aceptable.
- Preferentemente, la membrana comprende un revestimiento en, como mínimo, un lado. El revestimiento es preferentemente una proteína o una glucoproteína, tal como laminina, matrigel, colágeno, fibronectina y PLGA ácido poli(láctico-co-glicólico). El revestimiento puede comprender también un agente farmacológico o biológico, unido al componente de revestimiento. Por ejemplo, el revestimiento puede incluir un agente neurotrófico, un agente antiinflamatorio o un agente antiangiogénico.
- En particular, el revestimiento contiene, preferentemente, laminina, especialmente laminina-1 o un fragmento de la misma, tal como IgVAV. En particular, el revestimiento contiene, preferentemente, más laminina-1 que otra proteína o glucoproteína. Preferentemente, el revestimiento comprende, como mínimo, el 30%, más preferentemente, como mínimo, el 40% de laminina, especialmente laminina-1. El revestimiento se aplica, preferentemente, para producir una concentración de laminina-1 en la membrana de $40\text{-}45 \mu\text{g/cm}^2$, aproximadamente.
- Por consiguiente, se da a conocer una membrana para soportar el crecimiento de células, comprendiendo la membrana una capa de soporte porosa y sustancialmente no biodegradable aplicada como revestimiento en, como mínimo, un lado con un revestimiento que comprende laminina-1.

Preferentemente, la membrana está elaborada a partir de un polímero hidrófilo. También se pueden utilizar polímeros hidrófobos que se han convertido en hidrófilos mediante la irradiación de luz UV sobre ese polímero. Entre los polímeros particularmente preferentes se incluyen poliésteres, tales como tereftalato de polietileno, tereftalato de polibutileno; poliuretanos y poliurea-uretanos, en particular los que contienen policarbonato y polisiloxano, y los que están basados en poliéster o basados en poliéter; poliamidas, tales como nylon; poliéter-ésteres, tales como Sympatex; policarbonatos, tales como Makrolon; poliacrilatos tales como Perspex; poli(tetrafluoroeteno) (PTFE); polisiloxanos; poliolefinas, tales como polietileno y polipropileno y polioximetileno (POM), conocido de forma habitual con la marca Delrin de DuPont. Es particularmente preferente que la membrana esté elaborada a partir de tereftalato de polietileno o tereftalato de polibutileno. En otra realización preferente, la membrana está elaborada a partir de poliéster.

La membrana es útil para hacer crecer una capa de células. Preferentemente, la membrana comprende una capa de células en la membrana. Las células pueden ser cualquier célula seleccionada, según la utilización prevista de la membrana y las células. Los tipos de células son células que se pueden cultivar como monocapa e incluyen células de la retina, células de la piel y células endoteliales y células madre pluripotentes inducidas. Las células pueden originarse a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, las células pueden ser células autólogas, tomadas de un individuo para trasplante de regreso a ese individuo o pueden ser células cultivadas específicamente para el propósito pretendido. Las células pueden haberse originado a partir de células madre, particularmente células madre embrionarias humanas. Cuando las células se han originado a partir de células madre embrionarias, es preferente que las células estén disponibles a partir de una fuente no embrionaria, tal como un banco de células. En una realización preferente, las células madre embrionarias humanas son células madre pluripotentes embrionarias. Las células madre embrionarias humanas de la presente invención se obtienen por medios distintos a la destrucción de embriones humanos. Las células pueden ser células inmortalizadas, tales como células ARP-19. En particular, la presente invención es útil para el tratamiento de enfermedades degenerativas, particularmente de la retina. Por consiguiente, las células pueden ser células epiteliales pigmentadas retinianas (células RPE), o células relacionadas, tales como células que se diferencian para formar células RPE o que se forman a partir de la diferenciación de células RPE (derivados retinianos) o precursores de las mismas. Estas células pueden incluir células fotorreceptoras, células horizontales, células amacrinas o células ganglionares de la retina. También se pueden utilizar otras células altamente diferenciadas.

Preferentemente, la membrana y la capa de células son de, como mínimo, 3 mm x 5 mm de largo y ancho. Preferentemente, la membrana y la capa de células son, como mínimo, de 4 mm x 6 mm.

Cuando se aplican las células a la membrana, es ventajoso sembrar las células densamente, a fin de reducir la probabilidad de que las células se desdiferencien. Idealmente, las células deberían sembrarse a una densidad de, como mínimo, 200.000 células por cm^2 , más preferentemente, a 250.000 células por cm^2 , aproximadamente, o a una densidad más elevada, tal como 300.000 o 350.000 células por cm^2 .

Por consiguiente, se da a conocer una membrana porosa, no biodegradable para soportar una colonia de células, teniendo la membrana una capa de células en, como mínimo, un lado, sembrándose las células a una densidad de, como mínimo, 200.000 células por cm^2 .

Se da a conocer también un procedimiento para sembrar células sobre una membrana que comprende la etapa de sembrar las células sobre la membrana a una densidad de 200.000 células por cm^2 o más.

La membrana es una membrana según la presente invención. Además, las células son, preferentemente, células altamente diferenciadas, tales como células RPE.

Se da a conocer también mediante la presente invención la utilización de una membrana, según la presente invención, para soportar una colonia de células.

Se da a conocer adicionalmente una membrana, según la presente invención, para utilización en terapia. En particular, se da a conocer la utilización de la membrana en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, desgarros retinianos, distrofia macular, coroidemia, amarosis congénita de Leber y enfermedad de Stargardt.

Se da a conocer también un procedimiento para cultivar células que comprende las etapas de:

a) sembrar células madre embrionarias humanas con alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados con mitomicina C (MEF) con una densidad de siembra de, como mínimo, $1,2 \times 10^4/\text{cm}^2$ o alimentadores de fibroblastos humanos con una densidad de siembra de, como mínimo, $6 \times 10^4/\text{cm}^2$; y

b) mantener las células en un medio que comprende los siguientes componentes o equivalentes de los mismos: medio de Eagle modificado de Dulbecco Knockout (DMEM, Invitrogen) rico en glucosa (4,8 g/l) con reemplazo sérico Knockout del 20% (Invitrogen), solución al 1% de aminoácidos no esenciales, L-Glutamina (Invitrogen) 1 mM, bFGF humano (Invitrogen) a 4 ng/ml y β -mercaptoetanol (Sigma) 0,1 mM.

Preferentemente, las células en crecimiento se alimentan cada dos días. Diez días después del pase, el régimen de alimentación se cambia preferentemente a una rutina de alimentación diaria, utilizando un medio sin factor de crecimiento de fibroblastos básico humano.

Preferentemente, las células en crecimiento se cultivan durante, como mínimo, 30 días, más preferentemente, como mínimo, 35 días.

Preferentemente, el medio de cultivo comprende, como mínimo, el 15%, más preferentemente, como mínimo, el

18% o, como mínimo, el 20% de KSR. Además, el medio, preferentemente, no comprende plasmanato, LIF humano ni bFGF.

Las células forman focos pigmentados. Los focos preferentemente se retiran y se colocan en una matriz extracelular para permitir la unión y expansión de la monocapa.

La presente invención se describirá ahora en detalle, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos.

Descripción breve de los dibujos

La figura 1 muestra el parche Biopolymer con HESC-RPE in situ en el ojo de cerdo un mes después del trasplante (A). B: Micrografía óptica de A que muestra fotorreceptores con segmentos internos/externos adyacentes a HESC-RPE sobre el biopolímero. C: Polímero solo injertado en ojo de cerdo, los fotorreceptores se han degenerado. Tinción: violeta de cresilo. Barras de escala: A, 1 mm; B, 100 μ m. Esto demuestra la biocompatibilidad del polímero in vivo y que la monocapa de células RPE es esencial para mantener los fotorreceptores viables.

La figura 2 es una imagen confocal de HESC-RPE en biopolímero en ojo de cerdo, 1 mes de supervivencia. HESC-RPE forma una lámina pigmentada uniforme adyacente a los fotorreceptores de cerdo (rodopsina, FITC) y que reviste las RPE de cerdo. Algo de material fotorreceptor está presente dentro de las células HESC-RPE (A). B muestra que las células RPE del donante expresan RPE65 (TRITC). Esto demuestra que el HESC-RPE trasplantado funciona normalmente in vivo.

La figura 3 muestra HESC-RPE disociadas trasplantadas en ratas RCS distróficas de 3 semanas después de 5 semanas con ciclosporina. Las células humanas injertadas se etiquetan de rojo con el anticuerpo marcador de superficie antihumano (HSM) exclusivo de los inventores de la presente invención. Los procesos marcados de células derivadas de HESC-RPE evitan la membrana limitante externa y se integran en las capas sinápticas del huésped. La región enmarcada en A se amplía en B. Esta demuestra que las células trasplantadas fueron capaces de mantener un buen nivel de función visual en el ojo trasplantado (en comparación con el ojo no trasplantado del mismo animal). La agudeza visual con el equipo optocinético de los inventores de la presente invención se describe en ciclos por grado (c/d).

La figura 4 muestra el crecimiento celular en una variedad de membranas.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

EJEMPLO 1

Preparación de la membrana

La película delgada de poliéster se expone a partículas cargadas colimadas de un reactor nuclear. A medida que estas partículas pasan a través del material de poliéster, dejan pistas sensibilizadas. A continuación, las pistas de polímero se disuelven con una solución de ataque químico para formar poros cilíndricos. Variando la temperatura y la concentración de la solución de ataque químico, y el tiempo de exposición a la misma, produce tamaños de poro controlados con precisión.

La membrana resultante es una película delgada, translúcida, de poliéster microporosa con una superficie lisa y plana que contiene poros de diámetro y número controlados.

Producción de células epiteliales pigmentadas de la retina humana (hRPE) a partir de células madre embrionarias humanas (hESC)

Cultivo celular

Las hESC se mantienen en matraces recubiertos con gelatina al 0,1% y se siembran con alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados con mitomicina C (MEF) (con densidad de siembra de $1,2 \times 10^4/\text{cm}^2$) o alimentadores de fibroblastos humanos equivalentes. Las células se mantienen en medio HESC básico que comprende los siguientes componentes: medio de Eagle modificado de Dulbecco Knockout (DMEM, Invitrogen) rico en glucosa (4,8 g/l) con reemplazo sérico Knockout del 20% (Invitrogen), solución al 1% de aminoácidos no esenciales, L-Glutamina (Invitrogen) 1 mM, bFGF humano (Invitrogen) a 4 ng/ml y β -mercaptoetanol (Sigma) 0,1 mM. Una vez retiradas de la crioconservación, se mantienen las líneas de HESC durante hasta 74 pases con cambios de los medios cada 2 días. Las células se dividen regularmente (1:5) para mantener colonias de HESC indiferenciadas.

(Esto se evaluó mediante tinción para los marcadores SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-181. El examen de rutina en la Universidad de Sheffield confirmó que las HESC utilizadas eran cariotípicamente normales (Shefl (46XY) y Shefl (46XX)).

Diferenciación y expansión de HESC-RPE

Los inventores de la presente invención han descubierto que hESC-hRPE se forman de forma fiable cuando se permite que las colonias de hESC se vuelvan superconfluentes en un MEF. Cuando los límites de las colonias de hESC individuales se fusionan (10 días después del pase), se cambia el régimen de cambio de medios de una vez cada 2 días a una vez al día, utilizando los medios de hESC básicos detallados anteriormente (sin bFGF). Este factor se retiró de los medios debido a un vínculo documentado entre bFGF y la represión de la especificación de RPE. Los focos pigmentados aparecen en cultivos superconfluentes de hESC entre 1 y 2 semanas después de la implementación del régimen de alimentación diaria.

Después de su formación, los focos pigmentados se extirpan mecánicamente utilizando la punta de una pipeta de pasteur de vidrio y cuchillas microquirúrgicas. Este enfoque solo es práctico cuando los focos obtienen, como mínimo, con 1 mm de diámetro. Durante este procedimiento, se realizan todos los esfuerzos posibles para diseccionar el material circundante no pigmentado antes de la colocación de los focos pigmentados en placas de cultivo tisular de 35 mm recubiertas con factor de crecimiento reducido Matrigel® (BD Biosciences, diluido 1:30) o laminina. Se colocaron un total de 10 focos pigmentados en cada placa y las células RPE se dejaron expandir sobre Matrigel durante 35 días más (es decir, 5 semanas en medio HESC básico sin bFGF). Durante esta fase, los cambios de los medios se llevan a cabo cada 2-3 días. Este período de tiempo es suficiente para producir láminas monocapa de células pigmentadas que varían de 2-3 mm. Con este procedimiento, las láminas de RPE (que se aproximan a 1 cm) se han mantenido *in vitro* en el laboratorio de los inventores de la presente invención durante un máximo de 4 meses.

Se pueden utilizar otros procedimientos y técnicas de diferenciación conocidos en la técnica para producir las células de interés, entre los que se incluyen procedimientos para derivar células RPE de líneas celulares khES-1 y khES-3 (Osakada y otros, (2008) Nat Biotechnol, 26, 215 - 224) y procedimientos para derivar RPE de células H1, H7 y H9 (Klimanskaya y otros, (2004) Cloning and stem cells, 6, 217-245).

Siembra de células ES humanas sobre membranas y procedimiento de cultivo posterior

Cosecha de células:

Utilizando una cuchilla quirúrgica estéril, se hacen incisiones alrededor de los grupos de células pigmentadas para separarlas de la población de células no pigmentadas dentro de los matraces de cultivo tisular. Los conglomerados se eliminan utilizando una punta de pipeta o una pipeta de vidrio estéril. En algunos casos, esto se hace mientras se aspira simultáneamente para ayudar a retirarlos.

Los conglomerados pigmentados se recogen posteriormente junto con sus medios de crecimiento en un tubo Eppendorf. Después de la centrifugación a 12.000-13.500 rpm durante 3-5 minutos para asegurar que los conglomerados estén firmemente sedimentados, se realiza el intercambio de los medios con la solución de disociación. La solución de disociación se compone de lo siguiente: solución de disociación celular no enzimática al 90% en PBS sin calcio ni magnesio (Sigma-Aldrich) y tripsina al 0,25%. El resto es solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio ni magnesio. Los conglomerados celulares se incuban en esta solución de disociación a 37°C durante 5-15 minutos.

Se realiza la trituración rigurosa de los grupos de células con una pipeta hasta que los conglomerados de pigmentos se disuelven. La centrifugación se repite a 12.000-13.500 rpm durante 5 minutos. La solución de disociación se aspira sin perturbar el gránulo. A continuación, se añaden los medios de crecimiento y el gránulo celular se resuspende mediante trituración. La medición de la densidad celular se realiza con un hemocitómetro en esta etapa y, en consecuencia, se calcula la densidad de siembra.

Preparación de la membrana:

Las membranas se esterilizan utilizando una lámpara UV de campana de flujo laminar durante 30 minutos a cada lado. Posteriormente se colocan dentro de una placa de cultivo y se utiliza un inserto adecuado para pesarlos. Utilizando esta configuración, las membranas se recubren con matrigel 1:30 (BD Biosciences) a 37°C durante 30 minutos (procedimiento de gel grueso) o a 4°C durante una noche (procedimiento de gel delgado). La laminina se ha utilizado también con éxito en concentraciones superficiales de 1-10 µg/cm². La ventaja de la laminina es que la laminina humana está disponible en el mercado, lo que permite un procedimiento libre de xeno que es importante para alcanzar los estándares de grado clínico (Lei y otros, 2007).

Los parches de la membrana se han trasplantado en ojos de cerdo y en ojos de rata. Los resultados del trasplante se muestran en las figuras 1 a 3. La figura 1 muestra un parche de biopolímero con HESC-RPE *in situ* en el ojo de cerdo un mes después del trasplante. Esto demuestra la biocompatibilidad del polímero *in vivo* y que la monocapa de células RPE es esencial para mantener los fotorreceptores viables.

La figura 2 muestra una imagen de las HESC-RPE sobre un biopolímero en un ojo de cerdo, después de 1 mes de supervivencia. Esto demuestra que las HESC-RPE trasplantadas funcionan normalmente *in vivo*.

La figura 3 muestra las HESC-RPE disociadas trasplantadas en ratas RCS distróficas de 3 semanas después de 5 semanas con ciclosporina. Esto demuestra que las células trasplantadas pudieron mantener un buen nivel de función visual en el ojo trasplantado (en comparación con el ojo no trasplantado del mismo animal). La agudeza visual se midió utilizando el equipo optocinético de los inventores de la presente invención y se describe en ciclos por grado (c/d).

EJEMPLO 2

Siembra de membranas.

Las células RPE se sembraron en membranas a varias densidades para encontrar la densidad óptima de siembra para células altamente diferenciadas. Se observaron en las células las características de las células RPE, tales como la pigmentación y la morfología de empedrado. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Densidad de siembra (células/cm ²)	Pigmentación, tal como se ve a simple vista	Examen microscópico	
		No. de células pigmentadas por campo microscópico 40X	Morfología regular (hexágono perfecto es lo mejor = cero)*
70.000	No hay	16	Células demasiado escasas para calcular
212.000	Ligera	>400	0,023
270.000	Oscura (buena)	>400	0,024
391.000	La más oscura (la mejor)	>500	0,0175

EJEMPLO 3

Cultivo de células sobre diferentes membranas.

Se probó la capacidad de soportar el crecimiento celular de varias membranas diferentes. Los resultados se dan en la siguiente tabla:

	Poliestireno TC	PLGA	Teflón (PTFE)	Poliuretanos	Poliéster Dacron
Pros	Superficie de crecimiento excelentemente bien caracterizada	Superficie de crecimiento buena	Fuerte, flexible, poroso	Fuerte, flexible, poroso	Fuerte, flexible, suficientemente poroso, excelente superficie de crecimiento. Tamaño de poro pequeño suficiente para excluir la migración celular de células inmunes del donante y del huésped. Propiedades excelentes de manejo quirúrgico a pesar de ser muy delgado (ver espesor)
Espesor	Película delgada no disponible	700-900 µm†	90-150 µm	60-200 µm	5-12 µm
Tamaño de poro	N/A	17-50 µm	Aprox. 0,3-0,5 µm	20-200 µm	0,4 µm
Densidad de poro	N/A	Alta	Alta	Baja	1 x 10 ⁸ por cm ²
Hidrofobicidad	No	No	Fuerte	No	No
Afinidad celular	Alta	Alta	Muy Baja	Baja-Media	Alta

EJEMPLO 4

Crecimiento de células RPE

Morfología: se evaluaron los polímeros transparentes mediante la captura de imágenes en vivo en un microscopio invertido con contraste de fases. Para polímeros no transparentes, la morfología se evaluó mediante inmunotinción

para marcadores de unión (generalmente ZO-1)

Para evaluar el crecimiento celular:

- 5 Se utilizó una combinación de microscopía óptica, inmunoquímica con microscopía confocal, microscopía electrónica y ensayo de viabilidad celular para evaluar el crecimiento celular.

Ensayo de viabilidad celular (ensayo azul de Alamar):

- 10 Se unieron diversos polímeros de poliuretano a insertos comerciales de cultivo tisular, así como a PLGA. Brevemente, el filtro original se cortó y el material residual se eliminó con papel de lija. Tras un enjuague completo con PBS, el polímero experimental se montó en el inserto con adhesivo de cianoacrilato doméstico (Loctite, Henkel Corporation, Avon, Ohio). Para ensayar la idoneidad de polímeros basados en poliuretano se realizó un ensayo de viabilidad celular de azul de Alamar para medir la densidad de células vivas de la siguiente manera: el ensayo se realizó tal como sigue: las células se siembran en las diferentes superficies a baja densidad utilizando medios que contienen suero para permitir una unión óptima. Las células se incuban a 37°C durante 24 horas para permitir una unión suficiente. Posteriormente, se enjuagan dos veces en medios sin suero para lavar las células no unidas y posteriormente se incuban durante, como mínimo, 12-24 horas en medios sin suero para sincronizar las células. Los cultivos se cultivan, a continuación, durante el período de tiempo deseado. Para tomar una medida, los cultivos se enjuagan una vez en solución salina equilibrada de Hank sin fenol (PRF-HBSS) antes de aplicar un volumen específico de solución de Alamar Blue al 10% en PRF-HBSS. Los cultivos se incuban a 37°C durante 45 minutos. El sobrenadante azul se transformará en un color rojo fluorescente en proporción respecto a la cantidad de células vivas. Los sobrenadantes se recogen en una placa de 96 pocillos y se analizan en un lector de placas para fluorescencia (excitación 530-560 nm, emisión 590 nm).
- 25 Los resultados del ensayo de viabilidad de azul de Alamar para los diversos materiales se muestran en la tabla siguiente. Además, se comparó el crecimiento celular en los poliuretanos y poliéster y los resultados se muestran en la figura 4. Todos los polímeros basados en poliuretano mostraron un crecimiento celular reducido en comparación con el filtro de poliéster de los inventores de la presente invención.

	Poliestireno TC	PLGA	Teflon (PTFE)	Poliuretanos	Poliéster de calidad para cultivo comercial	Poliéster
Crecimiento celular	Excelente	Excelente	Insatisfactorio	Medio	Excelente	Excelente
Morfología	Insatisfactoria	Insatisfactoria	N/A	Buena	Buena	Buena
Microscopía electrónica	-	-	Escasas células aisladas	Láminas de células despegadas/curvadas, Esto es una evidencia adicional de una adhesión celular insatisfactoria	Células unidas confluentes	Células unidas confluentes
Tinción de unión (microscopía confocal)	Sí	Sí	N/A	Sí (solo polímero sólido)	Sí	Sí
Polaridad (microscopía confocal)	Sí	Sí	N/A	¿Parcial? (sólo polímero sólido)	Sí	Sí

30 Estos descubrimientos se confirmaron con inmunocitoquímica y microscopía confocal que mostraron una presencia celular muy escasa en la mayoría de los polímeros basados en poliuretano. En uno de los polímeros basados en poliuretano (polímero sólido) hubo un buen crecimiento celular y tinción de unión, pero las láminas celulares se desprendieron fácilmente de la superficie del polímero.

35 A partir de los resultados del ensayo, tal como se muestra en la tabla anterior, resulta evidente que el poliéster presenta ventajas significativas respecto a otros posibles materiales de membrana.

Procedimientos de PLGA:

40 Las membranas de PLGA fueron una donación desinteresada de E. B. Lavik y R. Langer (Departamento de Ingeniería Química, MIT, Cambridge, Massachusetts). El material de PLGA se compró originalmente como Resomer® 503H (Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Alemania), y las membranas de PLGA asimétricas se sintetizaron tal como había sido descrito por estos autores (Lu y col., 2000a y 2000b, Lavik y otros, 2001 y 2002).

Este perfil asimétrico permite la unión de las células a la superficie superior lisa, al tiempo que permite que las células se comuniquen con el entorno basal a través del lado poroso inferior del polímero.

La membrana asimétrica de PLGA se montó en insertos Corning Transwell® de 6,5 mm después de haber eliminado la membrana original. El montaje se consiguió utilizando adhesivo de cianoacrilato doméstico (Loctite, Henkel Corporation, Avon, Ohio). Estos insertos se esterilizaron por exposición de cada lado a una lámpara UV en una campana de flujo laminar durante 30-60 minutos. Las células ARPE-19 del pase 28 se sembraron sobre las membranas a una densidad de 90.000 células/cm².

En otra serie, se montó una membrana de PLGA asimétrica sobre insertos vacíos (tal como se indica más arriba). Los insertos, así como las placas de poliestireno de cultivo tisular (para control) se recubrieron con laminina a una concentración de trabajo estándar (Sigma-Aldrich, derivado del tumor murino Engelbreth-Holm-Swarm). Las placas e insertos fueron siembras con ARPE 19 p30 a una densidad más elevada, de 180.000 células/cm² para reducir el tiempo de confluencia. Los cultivos se mantuvieron con medios de RPE basados en DMEM Alta Glucosa dos veces por semana.

EJEMPLO 5

Revestimientos

Procedimientos de cultivo de HESC:

Se mantuvieron las líneas de HESC Shefl y Shef7 en matraces recubiertos con gelatina al 0,1% y se sembraron con alimentadores inactivados de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (Draper y otros, 2002). Las células se mantuvieron en medio básico HESC que se basa en el medio de Eagle modificado de Dulbecco Knockout (DMEM, Invitrogen) rico en glucosa con reemplazo sérico Knockout del 20% (Invitrogen), solución al 1% de aminoácidos no esenciales, L-Glutamina (Invitrogen) 1 mM, bFGF humano (Invitrogen) a 4 ng/ml y β-mercaptoetanol (Sigma) 0,1 mM. Una vez retiradas de la crioconservación, las líneas de HESC se mantuvieron durante hasta 74 pases con cambios de los medios cada 2 días. Las células se dividieron regularmente (1:4) para mantener colonias de HESC no diferenciadas.

Se aplicaron los siguientes revestimientos, según su protocolo estándar del fabricante, a menos que se indique lo contrario: matrigel (1:30), laminina, colágeno FV, colágeno humano I, Puramatrix®, plasmanato, poli-L-lisina, y sin revestimiento como control. Brevemente, cada revestimiento se descongeló a 4°C y se diluyó en PBS o medios exentos de suero. Las placas/insertos se revistieron ya sea a 4°C, a temperatura ambiente o a 37°C, según las directrices de cada fabricante. Posteriormente, se eliminó la solución matriz y las placas se lavaron o secaron al aire según el procedimiento estándar. Las colonias de HESC-RPE (colonias primarias) se escindieron de los matraces de cultivo y se colocaron en los medios después de lo cual se sembraron en las placas/insertos.

Se utilizó la observación directa de los cultivos para evaluar la adhesión de las colonias de HESC y su propagación. La observación de las HESC sembradas recientemente 24 horas hasta 72 horas después de la siembra reveló que solo Matrigel y laminina daban como resultado la adhesión de colonias de HESC-RPE, es decir, las colonias estaban bien inmovilizadas y no eran propensas a la separación incluso con un enjuague riguroso de los medios. Un lote de lamininas placentarias pepsinizadas humanas logró la inmovilización de las colonias HESC-RPE, mientras que otro lote no lo consiguió. Todos los otros revestimientos (colágeno IV, colágeno humano I, poli-L-lisina, Puramatrix®, Plasmanato) resultaron completamente insatisfactorios a este respecto.

EJEMPLO 6

Cultivo de RPE a partir de Shefl HESC

Cultivo de células

Se mantienen Shefl HESC en matraces T25 recubiertos con gelatina al 0,1% y se siembran con alimentadores de fibroblastos humanos (densidad de siembra óptima de $2,25 \times 10^5$ células por T25 (9×10^3 /cm²)). Las células se mantienen en medio HESC básico que comprende los siguientes componentes: medio de Eagle modificado de Dulbecco Knockout (DMEM, Invitrogen) rico en glucosa (4,8 g/l) con reemplazo sérico Knockout del 20% (Invitrogen), solución al 1% de aminoácidos no esenciales, L-Glutamina (Invitrogen) 1 mM, bFGF humano (Invitrogen) a 4 ng/ml y β-mercaptoetanol (Sigma) 0,1 mM. Una vez retiradas de la crioconservación, las HESC Shef 1 sufren cambios de los medios cada 2 días y se dividen regularmente (1:4) para mantener las colonias de HESC indiferenciadas (evaluadas por tinción para los marcadores SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-181).

Diferenciación y expansión de HESC-RPE

Los inventores de la presente invención han descubierto que las HESC-RPE se forman de forma segura cuando se permite que las colonias de HESC Shefl se vuelvan superconfluentes sobre los alimentadores. Cuando los bordes de las colonias de HESC individuales se fusionan (aproximadamente 10 días después del pase), el régimen de

cambio de medios se modifica de una vez cada 2 días a una vez al día utilizando los medios básicos de HESC detallados anteriormente (menos bFGF). Este factor se retiró de los medios debido a un vínculo documentado entre bFGF y la represión de la especificación de RPE. Los focos pigmentados aparecen en cultivos de HESC superconfluentes entre 1 y 2 semanas después de la implementación del régimen de alimentación diaria.

Las células se cultivaron durante otras 5 semanas, después de las cuales los focos pigmentados se extirparon mecánicamente utilizando la punta de una pipeta pasteur de vidrio y cuchillas microquirúrgicas. Este enfoque solo es práctico cuando los focos obtienen, como mínimo, 1 mm de diámetro, por lo tanto, puede ser beneficioso para las células de cultivo durante más de 5 semanas. Durante este procedimiento, se realizan todos los esfuerzos posibles para diseccionar el material circundante no pigmentado antes de colocar los focos pigmentados en placas de cultivo de tejido de 35 mm recubiertas con laminina-1. Se puede colocar un total de 10-20 focos pigmentados en cada placa y se permite que las células del RPE se expandan en 2 ml de medio durante 35 días adicionales (es decir, 5 semanas en medio HESC básico menos bFGF). Durante esta fase, los cambios de los medios se llevan a cabo cada 2-3 días. Este período de tiempo es suficiente para producir láminas monocapa de células pigmentadas que varían de 2-3 mm.

Este procedimiento difiere de otros protocolos publicados de la siguiente manera: 1. Los inventores de la presente invención utilizan una mayor concentración estandarizada de KSR (20% en comparación con 8-15% de variable por el grupo Lanza) DECLARACIÓN. 2. Los inventores de la presente invención no utilizaron Plasmanate, LIF humano o bFGF durante la producción de células RPE de cultivos HESC superconfluentes.

Disociación y suspensión de HESC-RPE

Se recogieron HESC-RPE pigmentados de matraces T25 que contenían colonias de HESC-RPE en alimentadores (pase 0), o de láminas de HESC-RPE en expansión en los alimentadores (pase 1). La eliminación de las células se realizó cortando alrededor de ellas con una microcuchilla estéril y desalojándolas con una punta de pipeta estéril. A continuación, se aspiraron las colonias/láminas de HESC y se suspendieron en medio HES-bFGF (sin bFGF) hasta su utilización posterior.

La cantidad deseada de conglomerados se coloca junto con sus medios de crecimiento en un tubo y se centrifuga de 2.400 a 3.600 rpm durante 5 minutos para permitir la eliminación de los medios sobrenadantes. Se repitió la centrifugación según fue necesario para permitir el intercambio de soluciones de la siguiente manera: las células se lavan dos veces con PBS y, posteriormente, se incuban a 37°C durante 20 minutos en un tampón de disociación no enzimático al 90% en PBS (Sigma # C5914) y tripsina 10x al 10% en PBS (tripsina de páncreas porcino, sigma, concentración final de tripsina 0,25%). Después de este período de incubación, las células se trituran completamente hasta que se suspenden por completo, es decir, no se acumulan células visibles. Posteriormente se centrifugan nuevamente para permitir la eliminación del tampón de disociación después de lo cual las células se resuspenden en medio de HES-bFGF y se colocan en una incubadora a 37°C hasta su utilización posterior.

Montaje de láminas de polímero sobre insertos de cultivo

Se colocaron discos de filtro de poliéster de 13 mm con un tamaño de poro de 0,4 μm y densidad de poros de, aproximadamente, 1×10^8 poros/ cm^2 en insertos Transwell en lugar de los filtros originales utilizando un elastómero de silicona basado en vinilo de calidad biológica (Kwik-Sil, World Precision Instruments Inc. Sarasota, Florida). Los insertos tenían un espesor de entre 5 y 12 μm . El poliéster tenía un peso de 1,2 mg/cm^2 . Los insertos se enjuagaron una vez en PBS, se secaron al aire, y se irradiaron con una lámpara UV en una campana de flujo laminar durante 30 minutos cada lado para la esterilización. Insertos esterilizados se almacenaron en una campana de flujo laminar estéril.

Revestimiento y siembra de los insertos de cultivo preparados

Se recubrieron los insertos esterilizados con 1:30 laminina-1 diluida durante 30 minutos a 37°C. Laminina (a una concentración de 43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e incubada a 37°C durante 30 minutos). La laminina se aspiró inmediatamente antes de la siembra celular. La densidad celular de la suspensión de HESC-RPE se midió utilizando un hemocitómetro Neubauer® con una dilución de azul de tripano 1:1. La tinción con azul de tripano se utilizó para confirmar la viabilidad celular, que fue superior al 93% en todos los casos. Las células se sembraron a una densidad óptima de 200.000 – 400.000 células/ cm^2 . Las células sembradas se dejaron unir durante, como mínimo, 24 horas y típicamente 48 horas antes de que cambiara el primer medio. Los medios se cambiaron 3 veces por semana a partir de entonces.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Membrana para soportar el crecimiento de células epiteliales pigmentadas de la retina, comprendiendo la membrana una capa de soporte sustancialmente no biodegradable y porosa recubierta en, como mínimo, un lado, con un revestimiento que comprende una glucoproteína, en la que la densidad de poros de los poros en la capa de soporte está entre 1×10^7 y 3×10^8 poros por cm^2 .
- 10 2. Membrana para soportar el crecimiento de células, comprendiendo la membrana una capa de soporte sustancialmente no biodegradable y porosa, teniendo los poros entre $0,2 \mu\text{m}$ y $0,5 \mu\text{m}$ de diámetro, en la que la densidad de poros de los poros en la capa de soporte está entre 1×10^7 y 3×10^8 poros por cm^2 , comprendiendo además sobre la membrana una capa de células epiteliales pigmentadas de la retina o células que se diferencian para formar células epiteliales pigmentadas de la retina.
- 15 3. Membrana, según la reivindicación 1, en la que los poros tienen entre $0,2 \mu\text{m}$ y $0,5 \mu\text{m}$ de diámetro.
4. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la conductancia hidráulica de membrana de la membrana es más de $50 \times 10^{-10} \text{ m s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$.
- 20 5. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la membrana se esteriliza mediante irradiación gamma, óxido de etileno, esterilización en autoclave o con UV sin degradarse.
6. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la membrana está sellada mediante sellado ultrasónico, sellado por radiofrecuencia o moldeo por inserción.
- 25 7. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene un espesor máximo de $11 \mu\text{m}$.
8. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene un peso máximo de $1,5 \text{ mg/cm}^2$.
- 30 9. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la membrana es hidrófila.
10. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la membrana tiene un pH de 4 a 8.
- 35 11. Membrana, según las reivindicaciones 1, 3 o cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, cuando dependen de la reivindicación 1 o 3, en la que el revestimiento comprende fibronectina o laminina.
12. Membrana, según las reivindicaciones 1, 3 o cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, cuando dependen de la reivindicación 1 o 3, que comprende un agente farmacológico o biológico, unido al componente de revestimiento.
- 40 13. Membrana, según las reivindicaciones 1, 3, 11, 12 o cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, cuando dependen de la reivindicación 1 o 3, que comprende además una capa de células en la membrana, en la que las células se obtienen por medios distintos a la destrucción de embriones humanos.
14. Membrana, según la reivindicación 13, en la que las células son células derivadas de retina.
- 45 15. Membrana, según la reivindicación 13, en la que las células son células epiteliales pigmentadas de retina humanas.
16. Membrana, según la reivindicación 2 o la reivindicación 13, en la que las células son células inmortalizadas.
- 50 17. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la membrana está hecha de un polímero hidrófilo seleccionado de poliéster, poliuretano, poliurea-uretano, poliamida, poliéter-éster, policarbonato, poliacrilato, poli(tetrafluoroeteno), polisiloxano, poliolefina y polioximetileno.
- 55 18. Utilización de una membrana, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para soportar una colonia de células.
19. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para su utilización en terapia.
- 60 20. Membrana, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para su utilización en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad.
21. Procedimiento para sembrar células en una membrana que comprende la etapa de sembrar las células sobre la membrana, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 12, a una densidad de 200.000 células por cm^2 o superior.



FIG. 1A

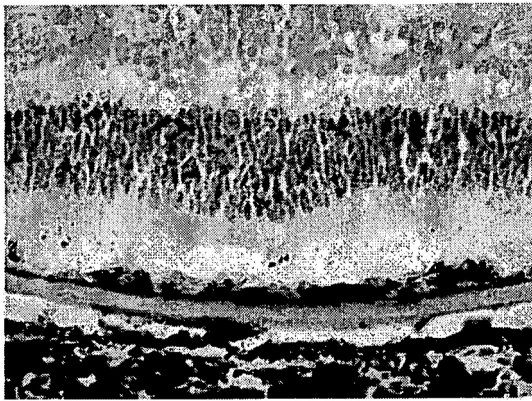


FIG. 1B

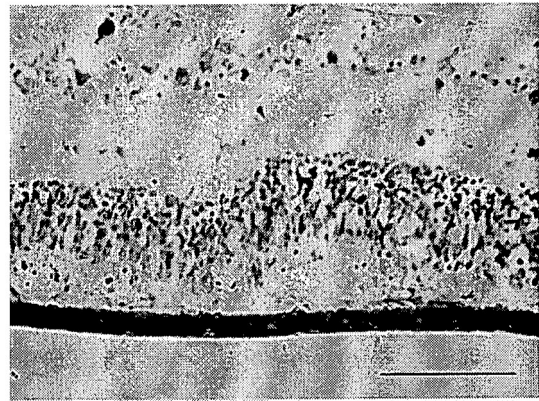


FIG. 1C

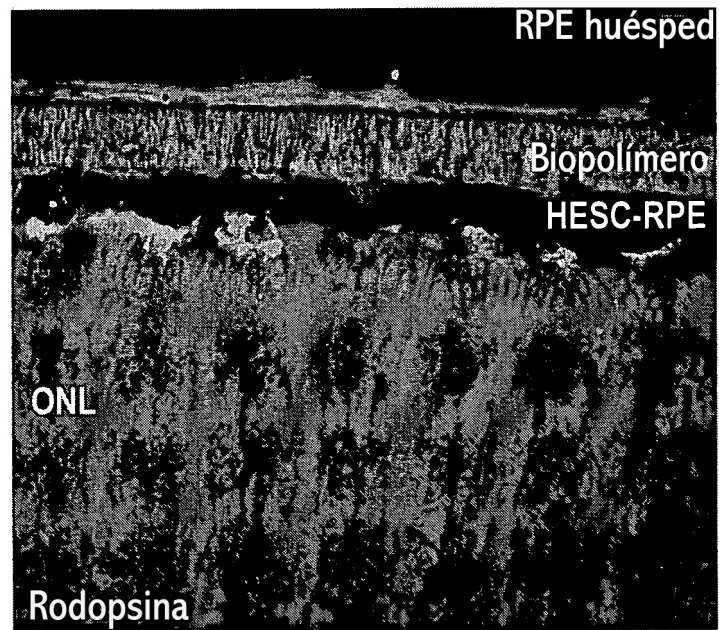


FIG. 2A

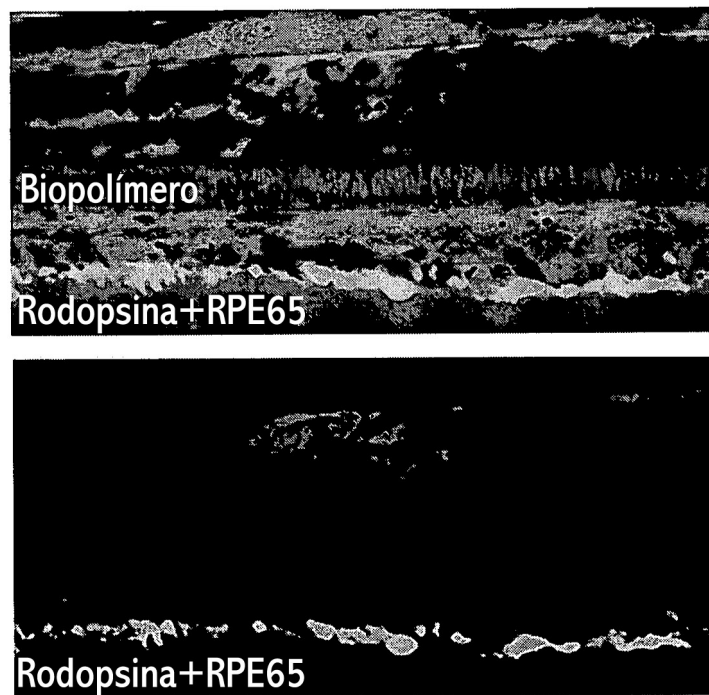


FIG. 2B

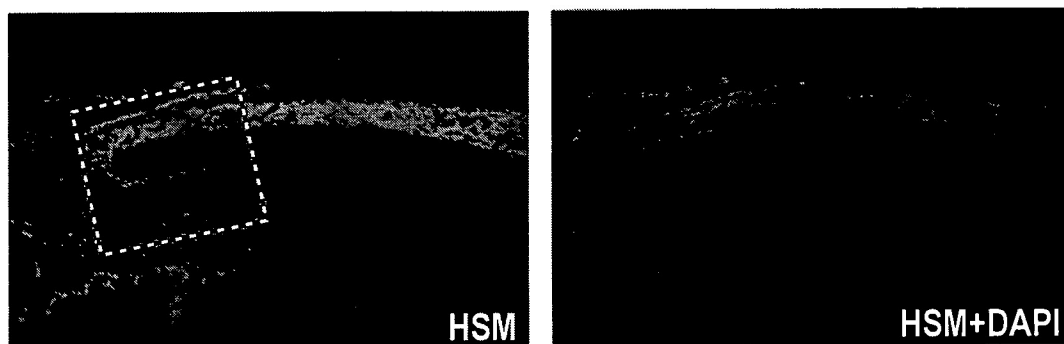


FIG. 3A

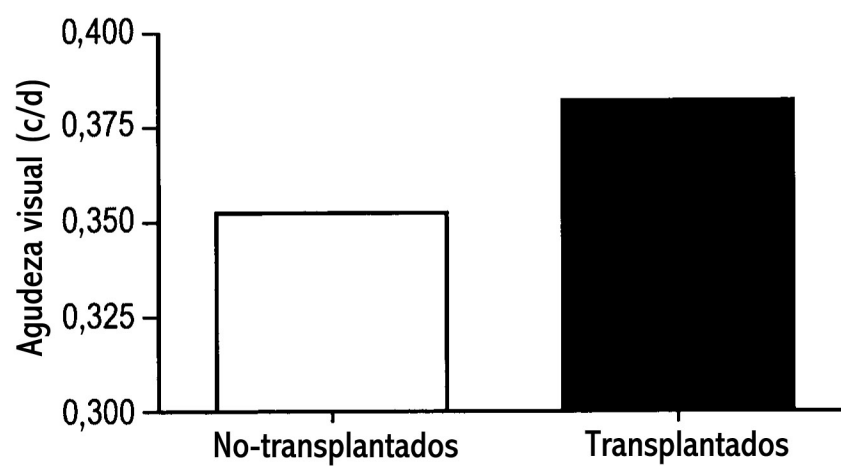
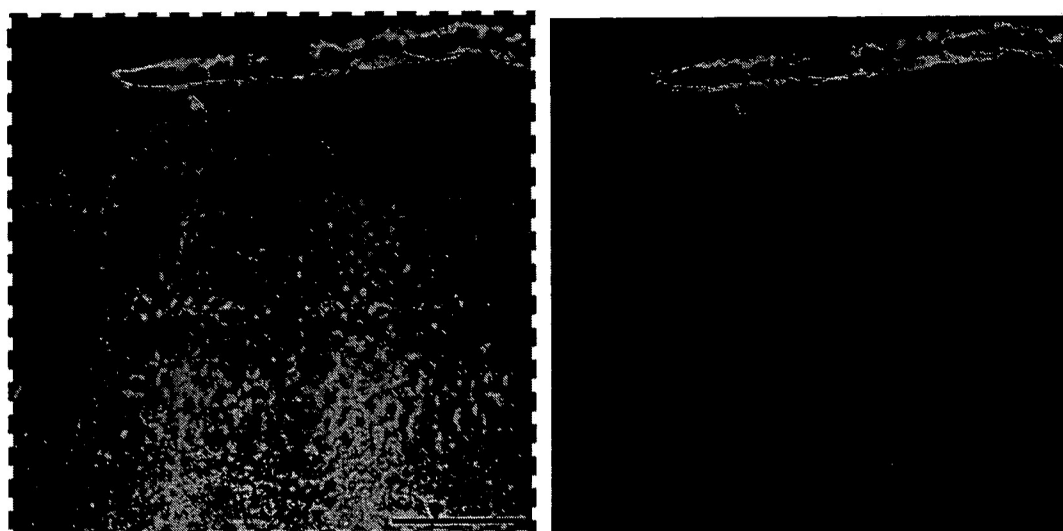


FIG. 3B

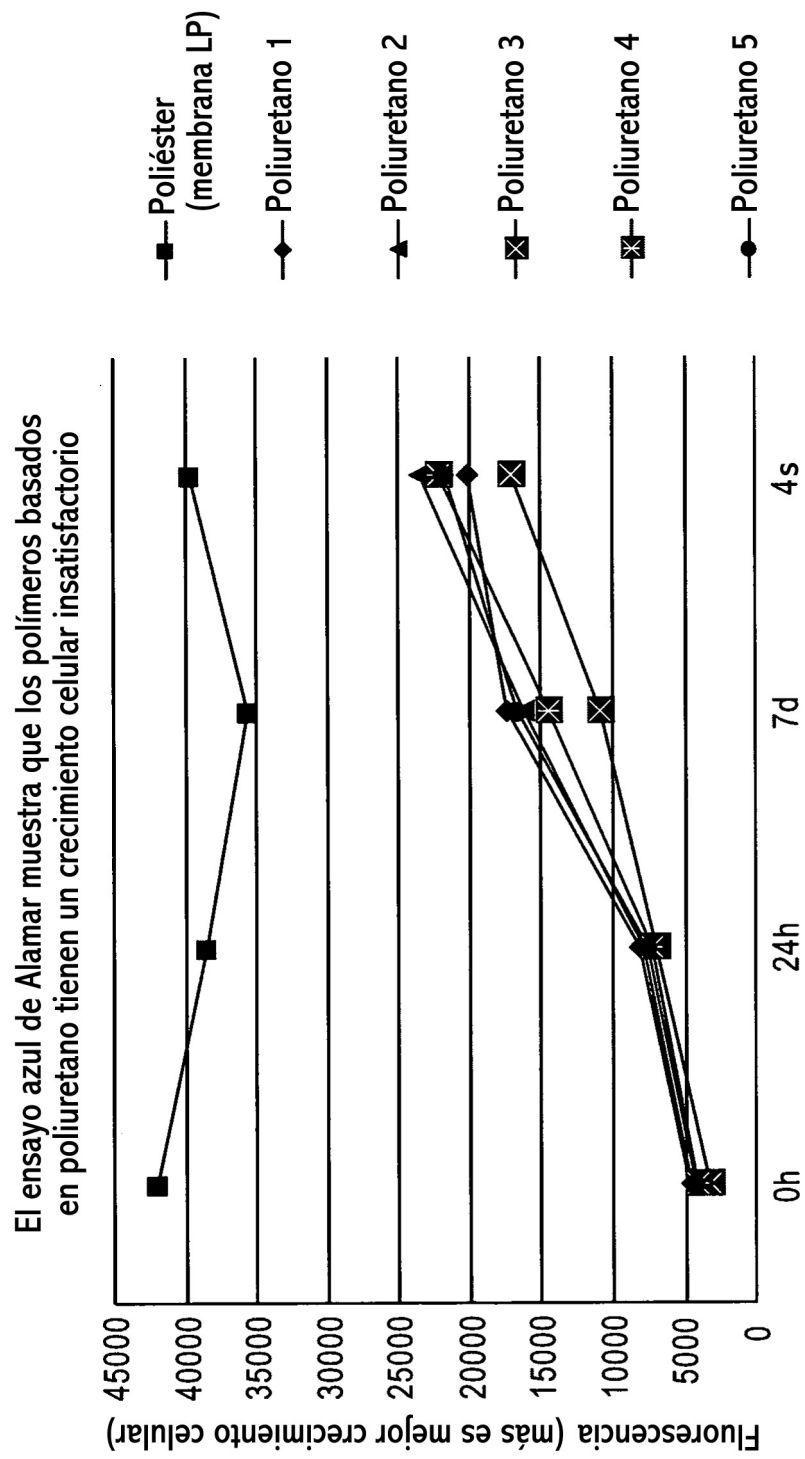


FIG. 4