

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 357 387**

21 Número de solicitud: 200930389

51 Int. Cl.:

C12N 5/071

(2010.01)

A61L 27/38

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.06.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2011**

Fecha de la concesión: **21.02.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **02.03.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (Titular al 40%)

**PLAZA DEL COLEGIO DE SANTA CRUZ, 8
47002 VALLADOLID, ES;**

UNIVERSIDAD DE LEÓN (Titular al 20%) y

**FUNDACIÓN CLÍNICA SAN FRANCISCO DE LEÓN
(Titular al 40%)**

72 Inventor/es:

VUELTA LÓPEZ, ELENA;

CALONGE CANO, MARGARITA;

IGLESIAS MUÑOZ, FRANCISCO JAVIER y

GONZALO ORDEN, JOSÉ MANUEL

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **GEL DE FIBRINA QUE CONTIENE FIBROBLASTOS Y CÉLULAS EPITELIALES DEL LIMBO
ESCLEROCORNEAL PARA BIOINGENIERÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR (CÓRNEA,
CONJUNTIVA Y LIMBO ESCLEROCORNEAL).**

57 Resumen:

Gel de fibrina que contiene fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal para bioingeniería de la superficie ocular (córnea, conjuntiva y limbo esclerocorneal).

Un gel de fibrina autóloga que comprende fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal (nicho de las células madres de la córnea) y un método de preparación del mismo que comprende: cultivar fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal, resuspender los fibroblastos cultivados en una solución de plasma sanguíneo, añadir un agente antifibrinolítico a la mezcla, polimerizar la mezcla, sembrar la mezcla en un recipiente de cultivo estéril y sembrar las células epiteliales cultivadas encima de la mezcla. Este gel puede ser usado en la elaboración de medicamentos para su uso en el tratamiento de enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular o, incluso, en aquellas mismas enfermedades para las que se utilizaría también esta técnica como ingeniería de tejidos.

ES 2 357 387 B1

DESCRIPCIÓN

Gel de fibrina que contiene fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal para bioingeniería de la superficie ocular (córnea, conjuntiva y limbo esclerocorneal).

La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina, la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos con células madre y se refiere a un gel de fibrina autóloga que comprende fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal (nicho de las células madres de la córnea). También se refiere a un método de preparación del mismo que comprende la elaboración del gel de fibrina conteniendo fibroblastos, el cual sirve de soporte para el crecimiento de las células epiteliales. Este gel, construido mediante técnicas de bioingeniería de tejidos, puede ser utilizado para la reconstrucción de la superficie ocular, tanto del limbo como de la córnea o conjuntiva, mediante su trasplante en el tejido dañado permitiendo la regeneración del mismo, o puede ser usado en la elaboración de medicamentos para su uso en el tratamiento de enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular o, incluso, en aquellas mismas enfermedades para las que se utilizaría también esta técnica como ingeniería de tejidos.

Estado de la técnica anterior

En los últimos años, las técnicas de ingeniería tisular han adquirido gran importancia en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas para la resolución de diversos tipos de patologías. Específicamente, en el campo de la oftalmología dichas técnicas se han centrado principalmente en el desarrollo de sustitutos biológicos que faciliten la reparación de defectos de la superficie ocular. Este es el caso de algunos de los tratamientos existentes en la actualidad frente a diversas enfermedades que afectan a la superficie corneal, como por ejemplo aquellas que se engloban en el grupo de patologías clasificadas como síndromes de insuficiencia límica (SIL). Uno de los tratamientos más en auge para la resolución de este grupo de patologías consiste en el trasplante de células epiteliales del limbo corneoescleral (el nicho de las células madre de la córnea) expandidas *ex vivo*.

Bajo condiciones fisiológicas normales, las células madre del epitelio corneal se encuentran alojadas en la región basal del epitelio limbar, en unas estructuras conocidas como empalizadas de Vogt. Dicha localización es sumamente importante para el mantenimiento no solo del fenotipo de este tipo celular sino también de sus capacidades y funciones como célula madre adulta. Es el microambiente en el que se encuentra dicha población celular el que determina su potencial como célula madre adulta. Dicho microambiente o nicho está compuesto por el resto de tipos celulares que se encuentran en la vecindad de la población de células madre del epitelio corneal, por la matriz extracelular que las rodea y, muy importante, por la lámina basal y el estroma subyacente en el que se encuentran dispersos los fibroblastos limbares. Se ha descrito que el contacto entre las regiones epitelial y estromal del limbo, así como las comunicaciones que se establecen entre los tipos celulares de ambos componentes, son esenciales para el mantenimiento de las características de las células madre del epitelio limbar.

Durante los mecanismos habituales de mantenimiento del epitelio corneal bajo condiciones normales, o bien en casos de alteraciones de la superficie corneal, la población de células madre del epitelio limbar, que normalmente se encuentra en estado quiescente, se ve inducida a sufrir procesos de división, migración y diferenciación. Es el momento en el que las células madre del epitelio limbar abandonan ese nicho cuando comienzan a diferenciarse y por tanto pierden sus características de célula madre adulta.

Por esta razón, es de vital importancia que durante la expansión *ex vivo* de este tipo celular se consigan reproducir, en la medida de lo posible, las condiciones microambientales en las que se encuentran en el tejido nativo. De este modo, durante los últimos años se han estudiado diferentes tipos de sustratos o soportes sobre los que expandir dicha población celular. Ejemplo de ellos son, la membrana amniótica, las capas sustentadoras de fibroblastos irradiados 3T3 (Pellegrini G., *et al.*, 1997, *The Lancet*; 345: 990-993), los geles de fibrina (Han B., *et al.*, 2002, *Cornea*; 21: 505-510) o la cápsula anterior del cristalino humano.

Se han construido equivalentes de la córnea humana sobre sustratos consistentes en colágeno y condroitin sulfato con glutaraldehído, basados en el desarrollo de líneas celulares a partir de células aisladas de las tres capas de la córnea, epitelio, estroma y endotelio, que son inmortalizadas por transfección vírica (May Griffith, *et al.*, 1999, *Science*; 286: 2169-2172).

Durante los mecanismos de regeneración natural tras una herida las células epiteliales migran a través de una matriz natural compuesta de fibrina y fibronectina. Además, se ha comprobado que los fibroblastos cultivados en geles de fibrina proliferan, migran y son capaces de sintetizar componentes de la matriz extracelular, como el colágeno (Tuan T., *et al.*, 1996, *Experimental Cell Research*; 223: 127-134).

Por ello, una de las aproximaciones ha sido el cultivo *in vitro* de las células epiteliales del limbo sobre una capa basal de fibroblastos murinos irradiados 3T3, de manera que esta construcción se puede embeber posteriormente en un gel de fibrina.

Otro sustituto biológico de la córnea se basa en geles de fibrina con agarosa, lo que requiere el cultivo de las tres capas celulares presentes en la córnea: células epiteliales, estromales y endoteliales. En este método, se siembran las células endoteliales en la base de un cultivo poroso, se desarrolla un gel de fibrina humana con agarosa conteniendo células del estroma o fibroblastos cultivados en su interior, que se sitúa sobre la capa de células endoteliales. Final-

mente, las células epiteliales crecen sobre la superficie de todo este soporte. Aunque en estos estudios se ha postulado que la fibrina pura no siempre es comparable con el estroma de la córnea en cuanto a su transparencia y consistencia, por lo que se propone el uso de los geles de fibrina y agarosa en su lugar (Miguel Alaminos, *et al.*, 2006, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 47:8, 3311-3317).

En otras ocasiones se han cultivado las células madre del estroma de la córnea humana en pellets, en ausencia de un soporte rígido. En este caso se ha comparado este crecimiento celular sobre pellets con el que ocurre sobre un gel de fibrina, de lo que se ha concluido que estos geles son maleables y frágiles y no permiten el depósito de una matriz densa (Yiqin Du, *et al.*, 2007, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 48:11, 5038-5045).

Actualmente, las técnicas de bioingeniería tisular desarrolladas a este respecto, persiguen la búsqueda de un soporte adecuado que permita no sólo la correcta expansión de las células del epitelio limbar bajo condiciones de cultivo *in vitro*, sino también la posterior utilización de dicha población celular en el tratamiento de alteraciones de la superficie ocular.

Como soporte para dicha expansión celular, se precisa de un biomaterial que sea biocompatible, biodegradable y que permita la adhesión y la proliferación celular.

Generalmente, el empleo de biomateriales que actúan como soporte para el crecimiento celular con fines clínicos está asociado a una posible inducción de la respuesta inflamatoria. Además de este inconveniente, es necesario que dicho soporte sea biocompatible, y por tanto, permita la proliferación de células epiteliales del limbo esclerocorneal manteniendo las características que las definen como células madre del epitelio corneal, y por tanto, puedan cumplir con la función de reparación del tejido, lo que supone una gran complejidad, y puede desencadenar respuestas inmunológicas en el paciente trasplantado.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un gel de fibrina que comprende fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal. También proporciona un método de preparación del mismo que comprende la elaboración del gel de fibrina autólogo conteniendo fibroblastos, el cual sirve de soporte para el crecimiento de las células epiteliales. Este gel, construido mediante técnicas de bioingeniería de tejidos, puede ser utilizado para la reconstrucción de la superficie ocular, mediante su trasplante en el tejido dañado permitiendo la regeneración del mismo, o puede ser usado en la elaboración de medicamentos para su uso en el tratamiento de lesiones o enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular, como por ejemplo, pero sin limitarnos, para la regeneración de la ceguera corneal.

La fibrina, en este sentido, supone un excelente biomaterial debido a que no presenta toxicidad, es capaz de promover la expansión no sólo del componente epitelial, sino también de células de naturaleza fibroblástica, permitiendo además la construcción de sustitutivos tisulares tridimensionales, y debido a que su obtención a partir de plasma aislado de una muestra de sangre es relativamente sencilla, permite la fabricación de un andamiaje de naturaleza totalmente autóloga, lo que evita los posibles problemas de aparición de reacciones inflamatorias tras su implante, asociados a la utilización de otros tipos de biomateriales.

Además, las células comprendidas en el gel también pueden proceder del propio paciente y, al ser aisladas del nicho de células madre del limbo esclerocorneal, sus características de células madre permiten la regeneración del tejido limbar.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un gel de fibrina, de ahora en adelante “gel de la invención”, que comprende fibroblastos del limbo esclerocorneal. En una realización preferida, los fibroblastos del limbo esclerocorneal proceden de un humano. En una realización más preferida, los fibroblastos del limbo esclerocorneal son de origen autólogo.

En la presente descripción se entiende por “fibrina” la proteína fibrilar con capacidad para formar redes tridimensionales, que desempeña un importante papel en el proceso de coagulación, tiene forma de bastón con tres áreas globulares y la propiedad de formar agregados con otras moléculas de fibrina formando un coágulo blando. Normalmente se encuentra en la sangre en una forma inactiva, el fibrinógeno, el cual, por la acción de la trombina, se transforma en fibrina, que tiene capacidad de polimerizar, en presencia de un cofactor, por ejemplo, el calcio.

Se entiende por “limbo esclerocorneal” la zona circular, ligeramente sobreelevada que corresponde a la línea de transición entre la córnea y la conjuntiva-esclera. El limbo esclerocorneal es el nicho de células madre de la córnea. Los tipos celulares principales del limbo esclerocorneal son las células epiteliales y las células estromales o fibroblastos. El gel de la invención comprende células estromales o fibroblastos del limbo embebidos en su interior, expandiéndose en el entramado de fibrina. Estos fibroblastos poseen características de células madre, es decir, están indiferenciados. La caracterización de los tipos celulares del limbo esclerocorneal se puede realizar mediante, por ejemplo pero sin limitarnos, la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores. Los métodos que pueden ser utilizados para la caracterización incluyen, pero no se limitan: análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, análisis por *western blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, o análisis morfológicos por microscopía óptica o electrónica.

En la presente invención las células del limbo esclerocorneal comprendidas en el gel se caracterizan, pero sin limitarnos, mediante análisis inmunocitoquímico. Así, se entiende por “fibroblastos o células estromales del limbo esclerocorneal” aquellas células presentes en la capa estromal del limbo que se caracterizan, pero sin limitarnos, por ser positivas a la tinción con los anticuerpos contra los antígenos ALDH1A1, α -SMA (actina alfa del músculo liso),
5 colágeno tipo II, integrina β 1 y Cx43 (conexina 43), pero no a la tinción con el anticuerpo pancitoqueratina.

Una “célula madre o célula troncal” es una célula capaz de dividirse indefinidamente, de autorrenovarse y de diferenciarse en células especializadas, no sólo morfológicamente sino también desde el punto de vista funcional. Las células presentes en el limbo esclerocorneal, tanto fibroblastos como epiteliales, son células madre y por tanto son
10 capaces de dividirse y diferenciarse para reemplazar las células lesionadas o senescentes de la superficie ocular por células nuevas, manteniendo así una población celular constante. Los fibroblastos del limbo presentan características de célula madre mesenquimal y sus interacciones con el componente epitelial son muy importantes para el mantenimiento del nicho en el que se encuentran alojadas las células madre del epitelio corneal. Estas células pueden obtenerse mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica para tal fin, por ejemplo, pero sin limitarnos, cualquiera
15 de los protocolos de digestión y aislamiento celular descritos en los ejemplos de la presente invención.

El epitelio corneal tiene la capacidad de regenerarse rápidamente gracias a las células epiteliales limbares. Después de una lesión, el mantenimiento del epitelio corneal es logrado por esta población de células epiteliales, ya que poseen características de células madre multipotenciales. Las células madre epiteliales del limbo esclerocorneal están
20 localizadas en el epitelio basal del limbo.

El gel de la invención que comprende fibroblastos con características de células madre, embebidos en su interior expandiéndose y estableciendo contactos intercelulares, sirve como soporte para la siembra y posterior proliferación de células epiteliales del limbo esclerocorneal, como se muestra en los ejemplos de la presente invención. Por ello, en otra realización preferida, el gel de la invención comprende, además de fibroblastos del limbo esclerocorneal, células
25 epiteliales del limbo esclerocorneal. En una realización más preferida las células epiteliales del limbo esclerocorneal proceden de un humano. En una realización aún más preferida, las células epiteliales del limbo esclerocorneal son de origen autólogo.

Se entiende por “células epiteliales del limbo esclerocorneal” aquellas células aisladas a partir del tejido del limbo que se caracterizan, pero sin limitarnos, por ser positivas a la tinción con los anticuerpos contra los antígenos ALDH1A1, α -SMA (actina alfa del músculo liso), desmoplaquina, integrina β 1, pancitoqueratina y Cx43. Parte de las células epiteliales del limbo esclerocorneal comprendidas en el gel de la invención se encuentran en un estado indiferenciado, al proceder del nicho de células madre de la córnea, más concretamente de la región basal del epitelio
35 limbar. Estas células pueden obtenerse mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica para tal fin, por ejemplo, pero sin limitarnos, cualquiera de los protocolos de digestión y aislamiento celular descritos en los ejemplos de la presente invención.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los fibroblastos y las células epiteliales del limbo esclerocorneal del gel de la invención son células madre, porque proceden del nicho de células madre del limbo esclerocorneal.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la fibrina del gel de la invención procede del plasma sanguíneo de un humano. En una realización más preferida el plasma sanguíneo es de origen autólogo.

Aunque las células epiteliales y los fibroblastos, así como el plasma sanguíneo de donde se obtiene la fibrina, comprendidos en el gel de la invención podrían proceder, por ejemplo, pero sin limitarnos, de cualquier mamífero, preferiblemente de un humano, el hecho de que todos los componentes del gel procedan del propio paciente al que se le podría trasplantar el mismo, o al que le podría ser administrado un medicamento que lo comprenda, elimina la posibilidad de que éste sufra un rechazo inmunológico y/o una respuesta inflamatoria. Por ello, las células epiteliales y los
50 fibroblastos del limbo esclerocorneal comprendidos en el gel de la invención son, preferiblemente, autólogos, es decir, proceden del limbo esclerocorneal del propio paciente; y la fibrina del gel de la invención es también, preferiblemente, autóloga, es decir, procede del plasma sanguíneo del propio paciente.

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

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de preparación del gel de la invención que comprende fibroblastos del limbo esclerocorneal, de ahora en adelante “primer método de la invención”, que comprende:

- a. cultivar fibroblastos del limbo esclerocorneal,
- b. resuspender los fibroblastos cultivados en el paso (a) en una solución de plasma sanguíneo,
- 65 c. añadir un agente antifibrinolítico a la mezcla del paso (b),

- d. polimerizar la mezcla del paso (c), y
- e. sembrar la mezcla del paso (d) en un recipiente de cultivo estéril.

5 En una realización preferida, el plasma sanguíneo del paso (b) procede de un humano. En una realización más preferida, el plasma del paso (b) es de origen autólogo. En otra realización preferida, el agente antifibrinolítico del paso (c) es ácido tranexámico. En otra realización preferida, la polimerización del paso (d) se realiza mediante la adición de CaCl_2 a la mezcla del paso (c). En otra realización preferida, el recipiente de cultivo estéril del paso (e) es una placa de cultivo.

10 Las células epiteliales y los fibroblastos del limbo esclerocorneal se podrían obtener, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante protocolos de digestión del tejido limbar, como se describe en los ejemplos de la presente invención.

15 Las células obtenidas de la digestión se cultivan bajo condiciones *in vitro* para alcanzar una expansión de los tipos celulares suficiente como para poder elaborar los geles. Ejemplos de medios de cultivo podrían ser, pero sin limitarnos, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI 1640, Ham's F12, Ham's F10, MCDB 131, MEM (Minimum Essential Media) o DMEM/F12. Los medios de cultivo pueden estar suplementados con otros componentes adecuados para el crecimiento celular, como por ejemplo, pero sin limitarnos, suero, sustituto de suero, aminoácidos, antibióticos o factores de crecimiento, en las proporciones adecuadas. Los cultivos primarios son aquellos procedentes de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal. Los cultivos secundarios son aquellos que proceden de la resiembra o subcultivo de uno o varios tipos de células de un cultivo primario, donde la heterogeneidad celular es menor.

25 En la presente descripción se entiende por "plasma sanguíneo" la fracción líquida y acelular de la sangre, compuesta por agua y por múltiples sustancias disueltas en ella, de las cuales, las más abundantes son las proteínas. También contiene glúcidos y lípidos, así como los productos de desecho del metabolismo. La fibrina podría obtenerse del plasma mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, la acción de la trombina sobre el fibrinógeno presente en el plasma.

30 Para preparar el gel de fibrina conteniendo fibroblastos embebidos, primer método de la invención, los fibroblastos cultivados se resuspenden en una solución de plasma. Como se ha explicado anteriormente, la fibrina procede preferiblemente de un humano, y más preferiblemente es de origen autólogo, por lo que el plasma sanguíneo, que es de donde se obtiene la fibrina, también procede preferiblemente de un humano y más preferiblemente es de origen autólogo.

35 A continuación, se añade a la mezcla un agente antifibrinolítico, para evitar la fibrinólisis del gel. Se entiende por "agente antifibrinolítico" cualquier agente que disminuya o elimine la actividad fibrinolítica que degrada las redes de fibrina formadas durante el proceso de coagulación sanguínea. Ejemplos de agentes antifibrinolíticos son, sin limitarnos, ácido tranexámico, PEPH (éster propílico del ácido p-hidroxibenzoico) o aprotinina. El agente antifibrinolítico del paso (c) del método de la invención es, preferiblemente, ácido tranexámico, entendiéndose como tal, el compuesto sintético utilizado para neutralizar la fibrinólisis, cuyo mecanismo de efecto implica la inhibición de la disolución de los coágulos.

40 Para que la mezcla así obtenida comience a polimerizar es necesario añadir un agente capaz de inducir dicha polimerización, como por ejemplo, pero sin limitarnos, CaCl_2 . Se entiende por "polimerización" el proceso químico por el que los reactivos o monómeros (compuestos de bajo peso molecular) se agrupan químicamente entre sí, dando lugar a una molécula de mayor peso molecular, denominada polímero.

A continuación, la mezcla se siembra en un recipiente de cultivo estéril, preferiblemente, en una placa de cultivo, como se muestra en los ejemplos de la presente invención, para permitir su solidificación y la formación del gel.

50 El gel obtenido mediante este procedimiento puede ser empleado como soporte para la siembra y expansión de células epiteliales del limbo esclerocorneal. De esta manera, sobre este gel que contiene los fibroblastos en su interior, se pueden sembrar las células epiteliales.

55 Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método de preparación del gel de la invención que comprende fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal, de ahora en adelante "segundo método de la invención", que comprende los pasos del primer método de la invención, y además comprende:

- f. cultivar células epiteliales del limbo esclerocorneal, y
- 60 g. sembrar las células epiteliales cultivadas en el paso (f) encima de la mezcla del paso (e).

65 En el paso (e) del primer método de la invención, la siembra de la mezcla del paso (d) en un recipiente de cultivo estéril, preferiblemente una placa de cultivo, permite su solidificación y, por tanto, la formación del gel de fibrina conteniendo fibroblastos en su interior. Las células epiteliales del limbo, previamente cultivadas en cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente, aunque sin limitarnos, se pueden sembrar sobre la superficie de esta estructura de fibrina con fibroblastos embebidos para su expansión y proliferación.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso del gel de la invención que comprende fibroblastos del limbo esclerocorneal, como soporte para la proliferación de células epiteliales del limbo esclerocorneal.

Se entiende por “proliferación” los procesos de crecimiento, expansión, adhesión, división, multiplicación o diferenciación que sufren las células.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del gel de la invención, que comprende fibroblastos o que comprende, además de fibroblastos, células epiteliales del limbo esclerocorneal, para la elaboración de un medicamento. En una realización preferida, el medicamento es para su uso en el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular. En una realización más preferida, el medicamento es para su uso en el tratamiento de la ceguera corneal.

En la presente descripción se entiende por “superficie ocular” el limbo esclerocorneal, la córnea y la conjuntiva.

El aporte insuficiente, la ausencia o la disfunción de células epiteliales del limbo provoca alteraciones en la reparación epitelial corneal, trayendo como resultado defectos epiteliales persistentes, vascularización corneal, cicatrización, inflamación crónica, ulceración, crecimiento del epitelio conjuntival sobre la córnea (conjuntivalización) o una probable perforación corneal, conocida como síndrome de insuficiencia límbica. Por ello, preferiblemente, el medicamento se usa para el tratamiento de la ceguera corneal. Otras enfermedades o trastornos relacionados con la superficie ocular son, por ejemplo, pero sin limitarnos, la queratitis, ectasias, distrofias corneales o pterigium.

El reemplazo normal de las células epiteliales de la córnea y la curación de lesiones o enfermedades que afectan a la superficie ocular, como por ejemplo pero sin limitarnos, las úlceras corneales o queratitis superficiales, depende del buen funcionamiento del limbo esclerocorneal, ya que es aquí donde se alojan las células madre del epitelio corneal. El trasplante del gel de la invención conteniendo células madre del limbo, tanto fibroblastos como células epiteliales, supondría el reestablecimiento de las células epiteliales del limbo, lo cual contribuiría a la regeneración de lesiones o enfermedades de la superficie ocular. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del gel de la invención para el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular. En una realización más preferida, el gel de la invención se usa para el tratamiento de la ceguera corneal.

La fibrina es un material biocompatible que se reabsorbe una vez que es implantado *in vivo*, permitiendo la formación de matriz extracelular y la regeneración tisular. Por ello, el trasplante del gel de la invención conteniendo células madre del limbo, epiteliales y fibroblastos, supone la sustitución del nicho de células madre del limbo, la proliferación del epitelio corneal y, por tanto, la regeneración del tejido. Así, preferiblemente, el gel de la invención se usa para su trasplante sobre una superficie ocular disfuncional.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del gel de la invención, que comprende fibroblastos o que comprende, además de fibroblastos, células epiteliales del limbo esclerocorneal, para la evaluación *in vitro* del comportamiento de las células epiteliales y/o fibroblastos del estroma esclerocorneal.

El gel de la invención conteniendo células epiteliales y fibroblastos puede ser de utilidad para estudiar, por ejemplo pero sin limitarnos, el crecimiento, la proliferación, la interacción o la evolución fenotípica o genotípica de las células epiteliales y/o los fibroblastos del limbo, de manera que el análisis del comportamiento de las mismas *in vitro* puede proporcionar evidencias de cómo se comportan *in vivo* en el limbo esclerocorneal. Además, el gel de la invención podría ser usado, por ejemplo pero sin limitarnos, para la búsqueda de fármacos, estudios farmacológicos, estudios toxicológicos, estudios farmacogenómicos y/o estudios genéticos. Tales ensayos pueden ser utilizados para la identificación y/o caracterización de dianas biológicas, compuestos bioactivos y/o agentes farmacológicos.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante “composición farmacéutica de la invención”, que comprende el gel de la invención conteniendo fibroblastos o fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización más preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende, además del vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, intralesional, intraorbital, intracapsular o implante quirúrgico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión

“cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

- 5 Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

- 10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

- 20 Fig. 1. Muestra el crecimiento celular de los fibroblastos del limbo esclerocorneal en los cultivos primarios (P0) y en el primer pase o cultivo secundario (P1). Fibroblastos del limbo sembrados a una densidad inicial (IN) de 1×10^4 células/cm² en superficies de cultivo de plástico, muestran una buena proliferación en ambos cultivos, cultivo primario (P0) y cultivo secundario (P1), sin que haya diferencias entre las células obtenidas mediante el protocolo de digestión invertido (Pinv) y el estándar (PE) ($p > 0,05$).

- 25 Fig. 2. Muestra el crecimiento de los fibroblastos en los geles de fibrina que solo contienen fibroblastos (GFFs) durante 14 días. El número de células creciendo en estos geles se determina a los días 3, 5, 7, 10, 12 y 14 de cultivo, en 20 GFFs con una densidad celular inicial de 1×10^4 células/GFF.

- 30 Fig. 3. Muestra la expresión de los marcadores de diferenciación en la córnea central (A-G) y en el limbo esclerocorneal (H-N). Los marcadores estudiados son ALDH1A1 (A, H), α -SMA (B, I), colágeno tipo II (C, J), conexina 43 (D, K), desmoplaquina (E, L), integrina $\beta 1$ (F, M) y pancitoqueratina (G, N) (a 20 aumentos).

- 35 Fig. 4. Muestra la expresión de los marcadores de diferenciación en cultivos P0 (A-G) y P1 (H-N) de fibroblastos del limbo y en células epiteliales P0 (O-U). Los marcadores estudiados son ALDH1A1 (A, H, O), α -SMA (B, I, P), colágeno tipo II (C, J, Q), conexina 43 (D, K, R), desmoplaquina (E, L, S), integrina $\beta 1$ (F, M, T) y pancitoqueratina (G, N, U) (a 20 aumentos).

- 40 Fig. 5. Representa el crecimiento celular en los geles de fibrina que contienen fibroblastos (GFFs). Secciones teñidas con hematoxilina-eosina de estos geles de 14 días bajo condiciones de cultivo *in vitro*, 10 aumentos (A) y 20 aumentos (B). Imágenes de microscopía electrónica de un gel de fibrina después de la siembra celular (C), y de los fibroblastos adheridos y creciendo en el entramado de fibrina (D).

- 45 Fig. 6. Muestra la tinción hematoxilina-eosina, de una sección en parafina del gel de fibrina conteniendo células del limbo (GFCL), en concreto fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal (A), donde se observa una capa de células epiteliales creciendo en la superficie de la construcción. Imagen de microscopía electrónica del crecimiento celular epitelial en los geles de fibrina conteniendo fibroblastos (B) formando una capa con una morfología típica de adoquín.

Ejemplos

- 50 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del gel de fibrina que contiene células epiteliales y fibroblastos del limbo esclerocorneal, así como del método de preparación de dicho gel. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

- 60 Preparación del gel de fibrina conteniendo dos tipos celulares del limbo esclerocorneal

Procesamiento del nicho de células madre del limbo esclerocorneal

- 65 Las muestras biológicas empleadas en los ejemplos de la presente invención proceden de cerdos, machos y hembras, de 6 meses de edad, de aproximadamente 80 kg.

Una vez obtenidos ojos de cerdo frescos, por ejemplo de cualquier matadero, se transportan en contenedores estériles a 4°C al laboratorio, inmersos en una mezcla de DMEM suplementado con penicilina y estreptomycin. Una

vez en el laboratorio, y bajo una cabina de flujo laminar, se retira el limbo esclerocorneal de cada globo ocular cortando la esclera y la córnea a 1,5 mm del limbo. A continuación, se retira todo el tejido uveal con un bastoncillo de algodón y se esteriliza el limbo utilizando un protocolo estándar (Allamby D, *et al.*, 1997, *IOVS*, 38: 2064-2072): en primer lugar, las muestras se sumergen 2 minutos en DMEM suplementado con antibióticos (10 unidades de penicilina/10 μ g esptreptomina/mL), después se lavan en una mezcla de alcohol 96% en PBS (Phosphate Buffered Saline) (1:1 v/v) durante 2 minutos más, y finalmente las muestras se lavan 3 veces en DMEM fresco con una solución de antibióticos durante 2 minutos cada una. Los limbos esclerocorneales se recortan para obtener muestras limbares de 1x3 mm.

Protocolos de digestión para obtener las células del estroma y epiteliales del limbo

Para aislar los dos principales tipos celulares presentes en el tejido limbar (fibroblastos o células del estroma y células epiteliales), se digieren las muestras del limbo. En el presente ejemplo se llevan a cabo dos protocolos de digestión enzimáticos distintos, para comparar entre ellos y finalmente seleccionar el más efectivo:

a) *Protocolo estándar (PE)*: n=50 (donde n es el número de muestras). Las muestras se digieren utilizando un protocolo descrito previamente, consistente en depositar las piezas del limbo en discos Petri de 35 mm que contienen 2,5 mL de tripsina al 0,25%/EDTA al 0,02% e incubarlas a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 horas para conseguir la disociación de las células epiteliales. Cada 30 minutos se neutraliza la actividad enzimática añadiendo un volumen equivalente de DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS). Posteriormente, la solución se retira y se añade tripsina fresca. Finalmente, las cuatro soluciones obtenidas se mezclan y centrifugan a 1.400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se resuspende en un medio de cultivo de células epiteliales (MCE), las células obtenidas se cuentan y se determina su viabilidad utilizando el método de tinción con azul tripan (Phillips HJ., 1973, *New York: Academic Press*; 406-408). El tejido estromal restante, no digerido durante la tripsinización, se introduce en tubos de centrifuga de 50 mL y se digiere con colagenasa tipo I a una concentración de 2 mg/mL en DMEM, a 37°C y 5% de CO₂ durante 18-24 horas, hasta que se observa una completa disgregación del tejido. La suspensión celular obtenida se centrifuga a 1.400 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en un medio de crecimiento de fibroblastos (MCF), se cuentan las células y se llevan a cabo ensayos de viabilidad.

b) *Protocolo invertido (Pinv)*: n=50. Método alternativo al protocolo estándar. Consiste en la inversión del orden de actuación de las enzimas usadas en el protocolo anterior. En primer lugar, las muestras del limbo se incuban en una solución de colagenasa tipo I (2 mg/mL) durante aproximadamente 24 horas, para liberar los fibroblastos del estroma del tejido limbar. Después de esta incubación, se retira el tejido no digerido y se deposita en placas de cultivo para ser tripsinizado, como se ha descrito anteriormente, hasta alcanzar la digestión completa de la muestra. Ambas suspensiones celulares obtenidas en los dos pasos de la digestión se centrifugan a 1.400 rpm y los precipitados se resuspenden, se cuentan, y se determina la viabilidad celular.

Ambos protocolos de digestión difieren en el número de células totales obtenidas por muestra de tejido del limbo, de manera que se obtienen más células con el Pinv ($p < 0,05$), aunque no existen diferencias significativas en la viabilidad celular ($p = 0,3634$) (Tabla 1). Además, con el Pinv se obtienen más células de origen epitelial (después de emplear tripsina/EDTA) y menos fibroblastos (después de usar colagenasa) que con el PE.

TABLA 1

Media $\pm$ Desviación estándar (SD) (microscopía electrónica) de la densidad y la viabilidad celular después de someter a los tejidos del limbo de cerdo a dos protocolos de digestión diferentes: protocolo estándar (PE), 1°: tripsina/EDTA, 2°: colagenasa; protocolo invertido (Pinv), 1°: colagenasa, 2°: tripsina/EDTA

	Densidad celular (media $\pm$ SD) / Viabilidad celular (media $\pm$ SD) (%)		
Digestión	PE (n=50)	Pinv (n=50)	P valor (PE vs Pinv)
Tratamiento con Tripsina/EDTA	1,924 $\pm$ 1,477 / 87,76 $\pm$ 28,04	56,817 $\pm$ 33,479 / 95,97 $\pm$ 8,01	< 0,05 / 0,14
Digestión con colagenasa	38,476 $\pm$ 27,666 / 95,81 $\pm$ 10,21	11,007 $\pm$ 8,863 / 95,38 $\pm$ 13,79	< 0,05 / 0,94

Tripsina/EDTA + Colagenasa	39,005 ± 27,135 / 93,30 ± 11,12	62,825 ± 36,554 / 95,67 ± 8,40	< 0,05 / 0,36
-------------------------------	------------------------------------	-----------------------------------	---------------

Expansión celular *in vitro* y caracterización

Las células epiteliales y los fibroblastos obtenidos del nicho de las células madre del limbo mediante los dos protocolos de digestión descritos anteriormente, se expanden en cultivos primarios, y se calcula el porcentaje de éxito de los cultivos.

Para obtener los cultivos primarios (P0), las células de origen epitelial obtenidas después de la tripsinización en cualquiera de los dos protocolos de digestión, se siembran en placas de cultivo de plástico de 1×10^4 células/cm² y se añade MCE. Este medio de cultivo consiste en una mezcla de DMEM/Ham's F12 (1:1) con 5% de FBS, EGF 10 ng/mL, insulina 5 mg/mL, toxina colérica 100 ng/mL, penicilina/estreptomicina (100 unidades/100 µg/mL) y 2 mM L-Glutamina.

Para obtener el cultivo P0 de fibroblastos, las células estromales obtenidas de muestras de tejido limbar después de la digestión con colagenasa (segundo y primer paso del PE y del Pinv, respectivamente), se siembran en placas de cultivo de plástico en una densidad de 1×10^4 células/cm² y se cultivan en MCF que consiste en DMEM suplementado con 10% de FBS, penicilina/estreptomicina (100 unidades/100 µg/mL) y 2 mM L-Glutamina.

Tanto el P0 de células de origen epitelial como el P0 de células de origen estromal se mantienen a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio se cambia cada 2 ó 3 días y las células en cultivo se revisan diariamente mediante microscopía invertida, hasta que alcanzan el estado de confluencia. Posteriormente, las células se separan de la superficie del cultivo utilizando una solución de tripsina al 0,05%/EDTA al 0,02%, se cuentan y se usan para establecer los cultivos secundarios (P1) y/o para la construcción del gel de fibrina que contiene células del limbo (GFCL).

El ratio de expansión celular (RE) de las células en cultivo se determina en estado de confluencia de las células epiteliales y estromales en P0 y de los cultivos celulares en P1. Este ratio se calcula como: RE=densidad celular final/densidad celular inicial.

Para la caracterización, se cultivan las células estromales P0 y P1 y las células epiteliales P0 obtenidas en el Pinv en cámaras de cultivo celular a una densidad celular de 1×10^4 células/cm² hasta alcanzar el estado de preconfluencia. Las células se lavan dos veces en PBS y se fijan en una mezcla de acetona-metanol (1:1) a -20°C durante 20 minutos. Las muestras se almacenan a esta temperatura hasta su uso.

Como tejido control se emplean globos oculares porcinos congelados en nitrógeno líquido, embebidos en OCT (compuesto de temperatura de corte óptima) (Tissue-Tek). Se fijan de 5 a 8 secciones finas (µm) en acetona fría a 4°C durante 10 minutos, se montan en portaobjetos, se secan al aire y se almacenan a -20°C hasta su tinción.

La tinción inmunofluorescente de las secciones fijadas y los cultivos celulares se lleva a cabo como sigue: las muestras se lavan 3 veces con PBS, 5 minutos cada una, y se incuban en la solución Morpho Save al 1% (Ventana Medial Systems) en agua desionizada durante 15 minutos. Tras 3 lavados más con PBS, las muestras se permeabilizan con 0,3% de Tritón X-100 en PBS durante 10 minutos y se lavan de nuevo. Los sitios de unión no específicos se bloquean con suero de burro al 5% en PBS durante 1 hora. Las muestras se incuban con los anticuerpos primarios (Tabla 2) durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de tres lavados con PBS, se añade el anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor 488 (Inmunoglobulina G de burro preparada contra ratón o contra conejo a una dilución 1:300) y se incuba durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. El núcleo se tiñe con yoduro de propidio (1:100) durante 10 minutos, para su visualización bajo microscopía confocal (Radiance 2000, BIO-RAD). Para los controles negativos, se usa el suero de burro al 5% en PBS en lugar de los anticuerpos primarios. Para los estudios de inmunofluorescencia en los tejidos control solo se analizan la córnea central y las regiones limbares para la expresión de los antígenos mencionados. Para asegurar la fiabilidad de los resultados, todos los estudios de inmunofluorescencia se llevan a cabo en tres especímenes.

Los dos protocolos de digestión empleados difieren en el ratio de éxito en P0. De las 50 biopsias del limbo digeridas con el PE, solo 24 (48%) producen cultivos P0 exitosos de ambos tipos celulares, fibroblastos y células epiteliales. Este ratio se incrementa significativamente ($p < 0,005$) cuando se usa el Pinv, como muestran los resultados, en los que 48 biopsias de limbo de las 50 digeridas (96%) tienen éxito en los cultivos primarios (P0).

En cuanto a los resultados del ratio de expansión, las células obtenidas tras el tratamiento con colagenasa de las muestras de tejido sometidas a los dos protocolos y sembradas para P0 en pocillos de plástico, se adhieren a la superficie del cultivo después de 24 horas y resultan en cultivos de células viables en el 62% de los casos para el PE y

en el 96% de los casos para el Pinv ($p < 0,005$). Estos cultivos adoptan forma de huso y estrellada cuando se cultivan en MCF y forman una red de conexión que alcanza la confluencia a los 6 ó 10 días, mostrando un ratio de expansión de 6,76 ($\pm 1,92$, $n=31$) para el PE y de 6,09 ($\pm 1,74$, $n=48$) para el Pinv ($p=0,12$). La densidad celular final de las células aisladas es de aproximadamente 67,649 ($\pm 19,232$, $n=31$) y 60,973 ($\pm 17,476$, $n=48$) células/cm² para el PE y el Pinv, respectivamente (Figura 1). Las células del P1 obtenidas de la digestión con los dos protocolos, muestran la típica morfología de los fibroblastos y el ratio de expansión es significativamente mayor ($p < 0,05$) que en P0 con valores de 9,44 ($\pm 2,55$, $n=31$) y 10,31 ($\pm 2,93$, $n=48$) para el PE y el Pinv respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ambos protocolos de digestión. La proliferación celular se incrementa y las poblaciones colonizan totalmente la superficie del cultivo en 3 ó 5 días, más rápidamente que en P0, indicando que en este intervalo de tiempo las células subcultivadas proliferan más despacio en comparación con las células de los cultivos primarios. Entre los días 6 y 15 los cultivos celulares pueden alcanzar un número poblacional de más de 5×10^5 células por cm² de superficie de cultivo para las células del estroma aisladas por el PE o el Pinv (Figura 1).

El porcentaje de muestras de las que se obtiene éxito en los cultivos P0 de células epiteliales (después de tripsinizar los tejidos del limbo) es del 48% para el PE y del 96% para el Pinv ($p < 0,005$). En el P0, las células parecen adherirse a la superficie del cultivo a las 24 horas posteriores a su siembra y se observan pequeñas colonias de células epiteliales en estadio temprano del crecimiento (2 días) mostrando una morfología poligonal. El tiempo promedio para que las células de P0, que están a una densidad celular inicial de 1×10^4 células/cm², alcancen la confluencia en un pocillo de 1,9 cm² es de entre 10 a 16 días, mostrando valores de ratio de expansión de 6,03 ($\pm 1,41$, $n=24$) y 5,79 ($\pm 1,44$, $n=48$) para el PE y el Pinv, respectivamente ($p=0,5$), alcanzando una densidad poblacional celular de aproximadamente 5×10^4 células/cm² al final de P0, para ambos protocolos.

Por todo esto, y como el Pinv proporciona resultados superiores en cuanto a establecimiento de P0, los siguientes pasos de esta invención, los estudios de caracterización celular y la construcción de los geles GFFs y de los geles GFCLs, se llevan a cabo utilizando únicamente las suspensiones de células expandidas obtenidas del Pinv.

Construcción y caracterización de los sustitutos del nicho de células madre del limbo: geles de fibrina conteniendo células del limbo (GFCLs)

Las células epiteliales y los fibroblastos de los cultivos P0 y P1, respectivamente, aislados con el protocolo de digestión invertido se usan para la construcción de los geles de fibrina conteniendo células del limbo (GFCLs).

Para preparar los geles de fibrina de origen porcino, se obtienen 9 mL de sangre de cerdo y se introduce en tubos colectores de plasma que contienen 0,129 M de citrato sódico (BD Vacutainer Systems, UK). La sangre se centrifuga a 1.800 rpm durante 10 minutos, el plasma se separa, se introduce en tubos de centrifuga estériles y se almacena a -20°C hasta su uso. Para producir el gel de fibrina conteniendo fibroblastos (GFFs) se resuspende una suspensión de 1×10^4 fibroblastos del limbo de P1 en 400 μ L de plasma de cerdo fresco congelado por mL de volumen final del gel de fibrina. Para prevenir la fibrinólisis del gel, la mezcla se suplementa con 4 mg/mL de ácido tranexámico (Amchafibrin, Rottapharm S.L., España), y se ajusta el volumen final con MCF. A continuación, se añaden 40 μ g/mL de CaCl₂ (Braun Medical S.A.) para iniciar la polimerización de la fibrina. Finalmente, la mezcla se siembra en placas de cultivo de 24 pocillos, 1 mL por pocillo, para que tenga lugar la solidificación a 37°C durante 15-30 minutos. A medida que la matriz se va coagulando en los pocillos de plástico del cultivo, las células se van extendiendo por el entramado de fibrina. Estos geles de fibrina conteniendo fibroblastos tienen 1,9 cm² de tamaño y un grosor de aproximadamente 4 mm.

Después de 24 horas, tiempo en el que se produce la estabilización del gel de fibrina conteniendo fibroblastos, las células adquieren forma de huso y comienzan a proliferar, extenderse y migrar, proyectando sus procesos dendríticos en un patrón tridimensional y estableciendo contactos intercelulares que acaban formando una red celular densa.

A continuación, las células epiteliales del limbo de P0 se siembran encima de esta estructura o GFF, a una densidad celular de 5×10^4 células/cm², para construir el gel de fibrina conteniendo estos dos tipos celulares del limbo o GFCL, y se mantiene con MCE bajo condiciones *in vitro* hasta que las células hayan recubierto completamente la superficie de la construcción, durante aproximadamente 14 días, siendo supervisado diariamente con un microscopio invertido.

Para los estudios de caracterización se tiñen por inmunofluorescencia indirecta secciones congeladas de globos oculares porcinos, células epiteliales y fibroblastos del limbo de cerdo de los cultivos celulares, para estudiar la expresión de los siguientes marcadores: pancitoqueratina, ALDH1A1, α -SMA (α -smooth muscle actin), colágeno tipo II, conexina 43 (Cx43), desmoplaquina e integrina β 1 (Tabla 2). Los resultados de la expresión de estas proteínas se recogen en la Tabla 3.

TABLA 2

Anticuerpos primarios utilizados para la caracterización por inmunofluorescencia de los dos tipos celulares aislados de los dos protocolos de digestión

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Especificidad
Anticuerpo monoclonal de ratón-Pancitoqueratina (80)	Abcam	1:50	Todas las células epiteliales
Anticuerpo monoclonal de ratón- (A-5228) α-SMA	Sigma	1:50	Miofibroblastos
Anticuerpo policlonal de conejo-Conexina 43 (C-6219)	Sigma	1:500	Uniones Gap
Anticuerpo policlonal de conejo-Desmoplaquina-1,-2 (AHP320)	Serotec	1:200	Proteínas del desmosoma
Anticuerpo policlonal de conejo-Aldehído deshidrogenasa tipo I (ab23375) ALDH1A1	Abcam	1:50	Queratocitos de la córnea
Anticuerpo policlonal de conejo-Integrina-α1 (M-106)	Scbt	1:50	Receptor de la superficie celular Células mesenquimales
Anticuerpo policlonal de conejo-Colágeno tipo II	Monosan	1:15	Diferenciación celular

(PSX1060)			Síntesis de matriz extracelular
-----------	--	--	---------------------------------

TABLA 3

Resumen de los resultados de inmunofluorescencia de los cultivos celulares y las secciones de tejidos (++, detección muy elevada; +, detección; -, no detección). ¹ Expresión basal de actina citoplasmática en todos los cultivos de células del estroma. ² Detección en células epiteliales basales y superficiales en la región de la córnea central. No se detecta expresión en las células epiteliales basales del limbo.

³ Patrón de expresión típico de los queratocitos o fibroblastos de la córnea

	Secciones de tejido				Cultivo celular		
	Córnea central		Región del limbo		Células estromales	Células epiteliales	
	Epitelio	Estroma	Epitelio	Estroma	P0	P1	P0
Pancitoqueratina	++	-	++	-	-	-	++
α -SMA	++	++	++	++	++ ¹	++ ¹	
Cx 43	+ ²	++	+ ²	++	++ ³	++ ³	++
Desmoplauina	++	-	++	-	++	++	++
ALDH1A1	++	++	++	++	++	++	++
Integrina β 1	++	++	++	++	++	++	++
Colágeno tipo II	+	++	+	++	++	++	++

En las secciones de tejido ocular, se analiza la presencia de estos antígenos en el epitelio y el estroma de la córnea central y de las regiones limbares (Figura 3). Todos los queratocitos de la córnea porcina y los fibroblastos del estroma limbar son positivos a la tinción con anticuerpos contra ALDH1A1, α -SMA, colágeno tipo II, conexina 43 (Cx43) e integrina β 1, con niveles diferentes de expresión dependiendo del marcador. De manera que los anticuerpos contra

α -SMA, colágeno tipo II, conexina 43 (Cx43) e integrina $\beta 1$ muestran una tinción más fuerte que ALDH1A1. La presencia del antígeno desmoplaquina en el estroma de secciones de tejido solo se localiza a nivel conjuntivo. No se aprecia tinción en el estroma para pancitoqueratina, del cual solo se obtiene señal en las células epiteliales, las cuales exhiben un patrón de expresión distinto en las células superficiales y basales, mostrando una fluorescencia más marcada en la mayoría de las capas superficiales del epitelio. Las células epiteliales presentan tinción con todos los anticuerpos usados, mostrando una clara expresión de ALDH1A1, α -SMA, integrina $\beta 1$, desmoplaquina y Cx43, tanto en la córnea central como en el limbo. En las regiones epiteliales se aprecia una tinción más débil de colágeno tipo II, lo cual no parece ser representar una diferencia significativa si se compara la córnea central y la región limbar, excepto para Cx43. Las células basales de la córnea se tiñen para este marcador pero no así las células de la región basal del epitelio del limbo.

Para los estudios de inmunofluorescencia en las células en cultivo, se usan los fibroblastos del limbo de P0 y P1 y las células epiteliales de P0 (Figura 4). Las células cultivadas aisladas del estroma, es decir, los fibroblastos, muestran tinción para todos los anticuerpos usados excepto para pan-citoqueratina. La expresión de marcadores de la diferenciación tales como ALDH1A1, colágeno tipo II, integrina $\beta 1$ y α -SMA, revela que estas células mantienen su fenotipo de fibroblastos bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Las células en cultivo muestran una fuerte tinción para la desmoplaquina y la integrina $\beta 1$, lo que indica la existencia de estructuras de adhesión a la superficie del cultivo celular. Las células epiteliales en P0 muestran un patrón de expresión de antígenos similar al de las células del estroma, diferenciándose únicamente en que las primeras son positivas para el marcador pancitoqueratina.

Ejemplo 2

Evaluación de los geles de fibrina

Evaluación del crecimiento celular en los geles de fibrina

Los fibroblastos del limbo embebidos en los geles de fibrina se determinan contando el número de células de cada gel a los días, 3, 5, 7, 10, 12 y 14. Se digieren los geles de fibrina conteniendo fibroblastos para determinar la proliferación celular. Se elimina el medio de los cultivos, se recogen los geles de fibrina y se recortan antes de ser introducidos en tubos de centrifuga estériles. Entonces, los geles se digieren añadiendo 5 mL de una solución de 1 mg/mL de collagenasa tipo I durante 3 horas a 37°C. Las muestras se pipetea con cuidado y las células separadas se recuperan por centrifugación y se cuentan.

Las células epiteliales crecidas en los geles de fibrina conteniendo fibroblastos se analizan diariamente mediante microscopía invertida hasta que la población celular forma una monocapa confluyente.

Las células derivadas del estroma (fibroblastos) embebidas en la matriz de fibrina muestran una elevada capacidad de proliferación alcanzando una población celular de aproximadamente 1×10^6 células/GFF, después de 14 días bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Figura 5), mostrando un ratio de expansión de 119,43 ($\pm 34,67$, $n=20$).

Evaluación de la contracción de los geles de fibrina

Para determinar la posible contracción de los geles de fibrina conteniendo fibroblastos, se mide el grosor de los geles de fibrina cultivados durante 0 y 14 días en pocillos de 1,9 cm², antes y después de recuperar los geles de los pocillos ($n=20$). Se introducen 20 geles de fibrina de 15 días en cultivo conteniendo fibroblastos en etanol puro durante 30 minutos, después se lavan 3 veces durante 30 minutos con PBS. A continuación, los geles se embeben en MCF fresco durante 30 minutos. Se mide el diámetro y el grosor de los geles antes y después de ser embebidos en MCF para determinar su posible contracción.

No se observa retracción de los geles de fibrina conteniendo fibroblastos o GFFs en los pocillos del cultivo, sino que mantienen su diámetro inicial de 1,6 cm y la adhesión mediada por capilaridad a la pared del pocillo de cultivo. Aunque hay un ligero estrechamiento de los geles de aproximadamente 1,5 mm en la región central, alcanzando un grosor final de 1 mm. Cuando estos GFFs se separan de los pocillos y se tratan con etanol, muestran un diámetro de 1,117 ($\pm 0,09546$, $n=28$) cm, lo cual indica que han sufrido un porcentaje de contracción del 30,1339% ($\pm 5,96662\%$, $n=28$), si se compara con el diámetro inicial del gel.

Cuando los GFFs se rehidratan con MCF, no muestran variaciones en el diámetro del gel, manteniendo un diámetro de 1,11428 ($\pm 0,09546$, $n=28$) cm, de manera que no existen diferencias significativas entre el gel desecado y rehidratado ($p < 0,05$). En términos de grosor, los GFFs se separan de los pocillos y se tratan con etanol y con MCF, manteniéndose la profundidad de 1 mm que mostraban en los pocillos del cultivo después de 14 días.

Los geles se separan fácilmente de la superficie de los pocillos del cultivo, demostrando su capacidad elástica, de manera que son capaces de extenderse sin desgarrarse.

Evaluación microscópica

Microscopía óptica

5 Para la evaluación histológica, los geles de fibrina conteniendo fibroblastos o GFFs de 0, 3, 5, 7, 10, 12 y 14 días y los geles de fibrina que contienen los dos tipos celulares del limbo (células epiteliales y fibroblastos) o GFCLs de 14 días en cultivo, se fijan en paraformaldehído al 4%. Las muestras se deshidratan en concentraciones crecientes de alcohol y soluciones de Xileno previamente embebidas en parafina. Se tiñen secciones de 6 a 8 μm con hematoxilina-eosina y se visualizan en el microscopio óptico (Optiphot 2, Nikon) a 10, 20 y 40 aumentos.

10 El análisis hematoxilina-eosina de los geles de fibrina conteniendo fibroblastos muestra la expansión de los fibroblastos a través de los geles (Figura 5).

15 La tinción con hematoxilina-eosina de las secciones embebidas en parafina de los geles de fibrina conteniendo los dos tipos celulares del limbo o GFCLs cultivados durante 14 días muestran el crecimiento de las células epiteliales en los geles de fibrina conteniendo fibroblastos (Figura 6 A).

Microscopía electrónica

20 Los geles de fibrina que contienen fibroblastos ($n=5$) y los geles de fibrina que contienen los dos tipos celulares del limbo (células epiteliales y fibroblastos) ($n=5$) cultivados durante 14 días se fijan en glutaraldehído al 4%, después se fijan en tetraóxido de osmio al 2% durante 2 horas, y se pasan a través de un gradiente creciente de alcohol para su deshidratación. Las muestras se secan (Balzers CPD 030), se montan en una matriz de aluminio y se disparan con partículas recubiertas de oro (Balzers SCD 004) antes de ser examinadas en un microscopio electrónico (JEOL 6100).

25 La observación en el microscopio electrónico muestra que la morfología de la superficie de los geles de fibrina conteniendo fibroblastos y células epiteliales tiene una estructura ondulada con numerosas células poligonales que muestran rasgos similares a los de la superficie epitelial del tejido epitelial nativo (Figura 6 B).

Análisis estadístico

30 Para comparar estadísticamente la eficacia de recuperación de los dos tipos celulares de interés a partir de ambos protocolos de digestión (PE y Pinv) y el valor del ratio de expansión del cultivo, se usa un test bilateral ("two tailed test") y el test t-Student independiente de muestra después de revisar la distribución normal de las muestras. Un p valor igual o menor a 0,05 se considera estadísticamente significativo. Para medir las diferencias en la proporción de éxito de los cultivos primarios se utiliza un test Chi^2 .

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Gel de fibrina que comprende fibroblastos del limbo esclerocorneal.

2. Gel de fibrina según la reivindicación 1 donde los fibroblastos del limbo esclerocorneal proceden de un humano.

3. Gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde los fibroblastos del limbo esclerocorneal son de origen autólogo.

4. Gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que, además, comprende células epiteliales del limbo esclerocorneal.

5. Gel de fibrina según la reivindicación 4 donde las células epiteliales del limbo esclerocorneal proceden de un humano.

6. Gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5 donde las células epiteliales del limbo esclerocorneal son de origen autólogo.

7. Método de preparación del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende:

- a. cultivar fibroblastos del limbo esclerocorneal,
- b. resuspender los fibroblastos cultivados en el paso (a) en una solución de plasma sanguíneo,
- c. añadir un agente antifibrinolítico a la mezcla del paso (b),
- d. polimerizar la mezcla del paso (c), y
- e. sembrar la mezcla del paso (d) en un recipiente de cultivo estéril.

8. Método de preparación del gel de fibrina según la reivindicación 7 donde el plasma sanguíneo del paso (b) procede de un humano.

9. Método de preparación del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 donde el plasma sanguíneo del paso (b) es de origen autólogo.

10. Método de preparación del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde el agente antifibrinolítico del paso (c) es ácido tranexámico.

11. Método de preparación del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 donde la polimerización del paso (d) se realiza mediante la adición de CaCl_2 a la mezcla del paso (c).

12. Método de preparación del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 donde el recipiente de cultivo estéril del paso (e) es una placa de cultivo.

13. Método de preparación del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 que comprende los pasos según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, y además comprende:

- f. cultivar células epiteliales del limbo esclerocorneal, y
- g. sembrar las células epiteliales cultivadas en el paso (f) encima de la mezcla del paso (e).

14. Uso del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como soporte para la proliferación de células epiteliales del limbo esclerocorneal.

15. Uso del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento.

16. Uso del gel de fibrina según la reivindicación 15 para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas, inflamatorias o genéticas de la superficie ocular.

17. Uso del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de la ceguera corneal.

18. Uso del gel de fibrina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la evaluación *in vitro* del comportamiento de las células epiteliales y/o fibroblastos del estroma esclerocorneal.

19. Composición farmacéutica que comprende el gel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19 que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

21. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 que comprende, además, otro principio activo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

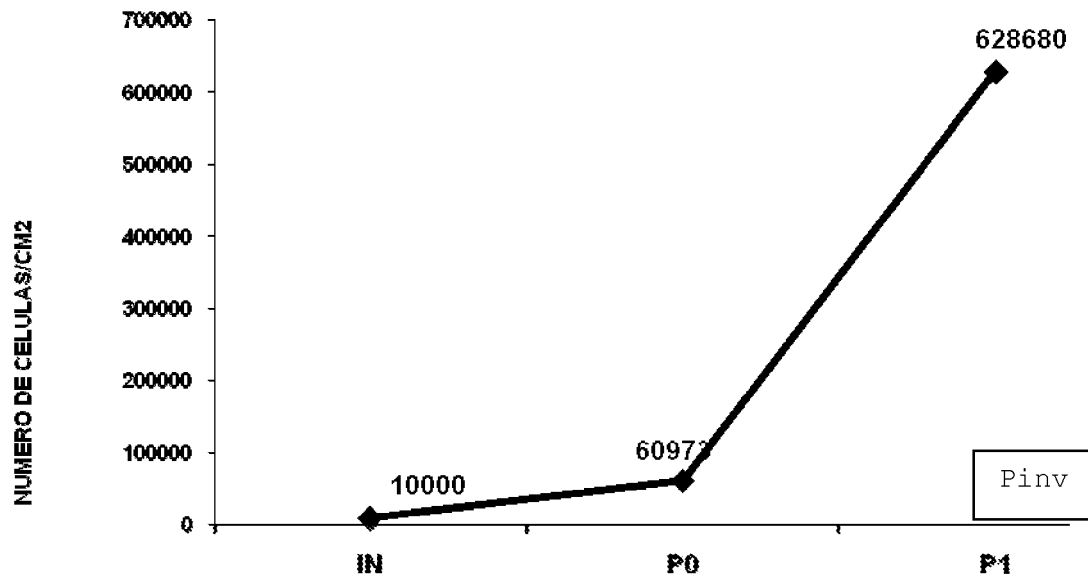
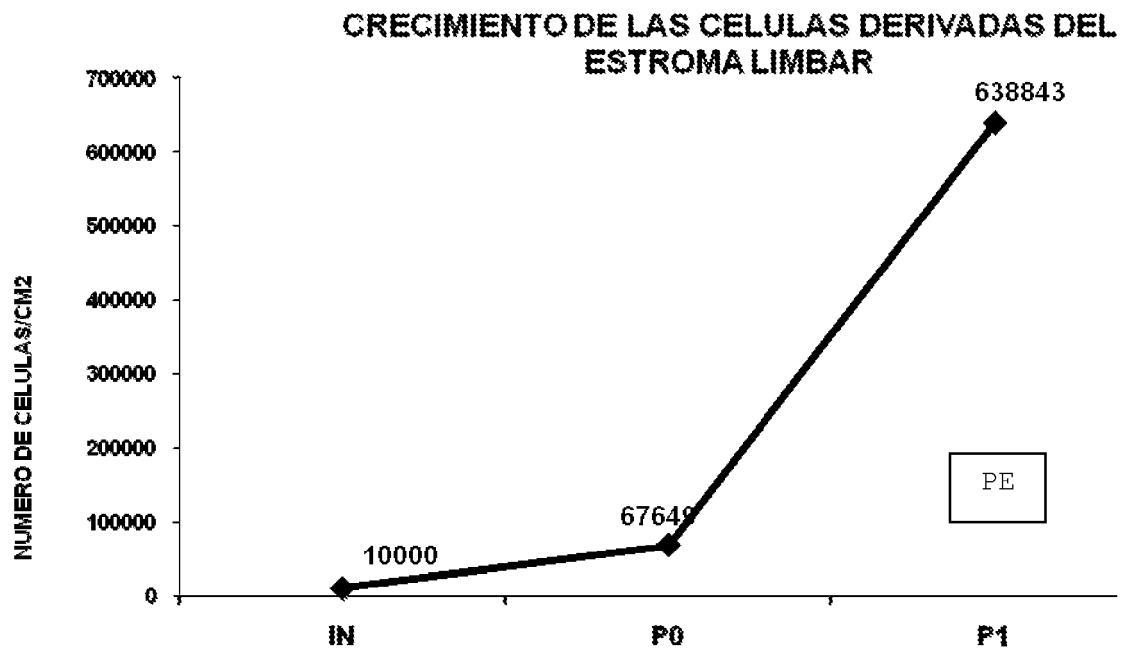


FIG. 1

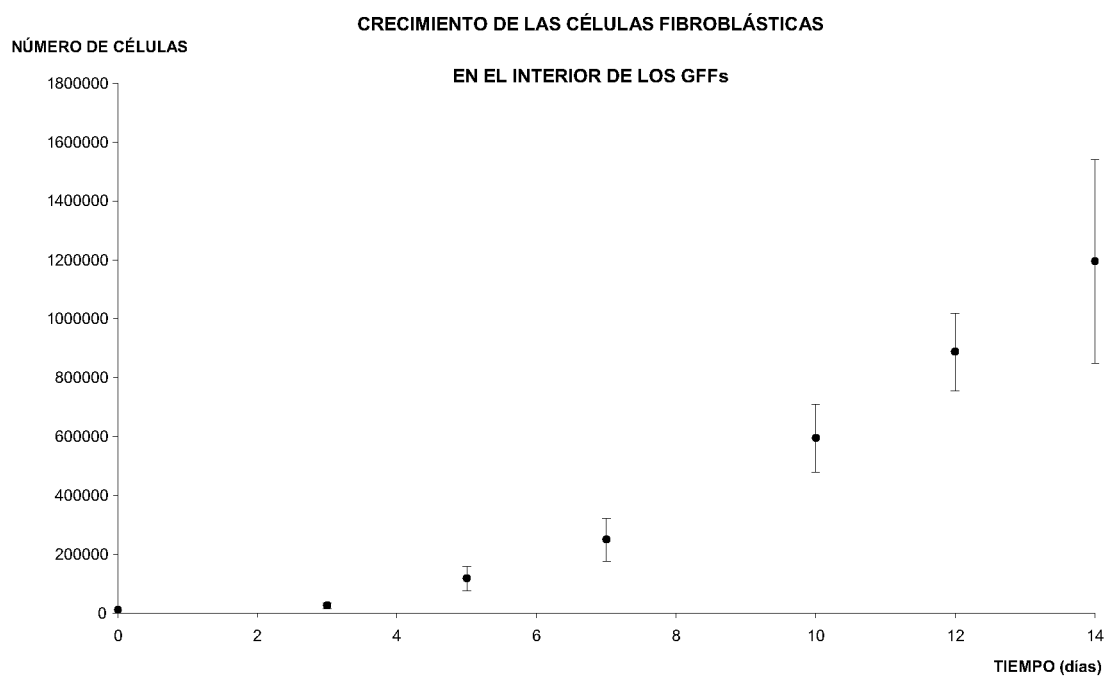


FIG. 2

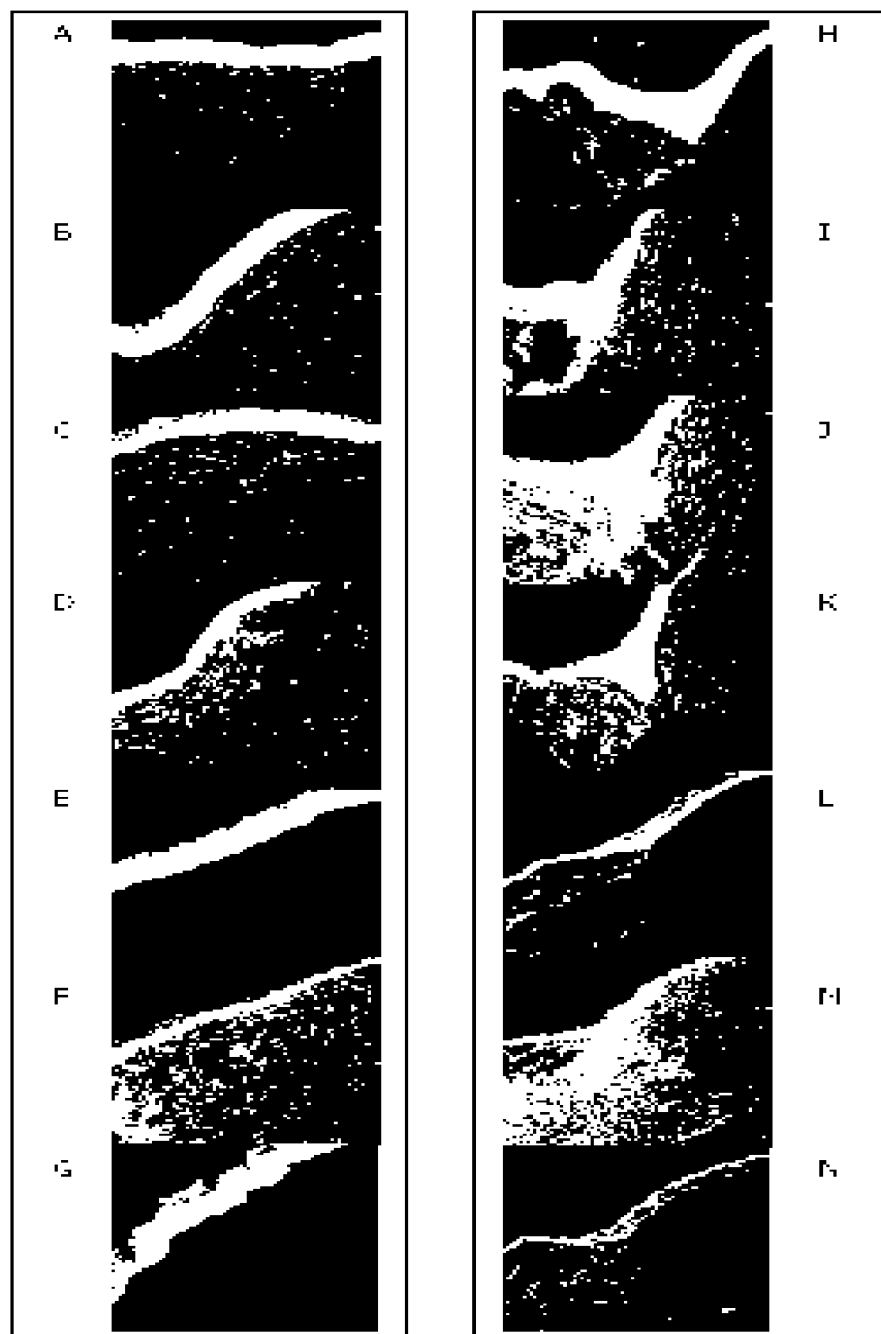


FIG. 3

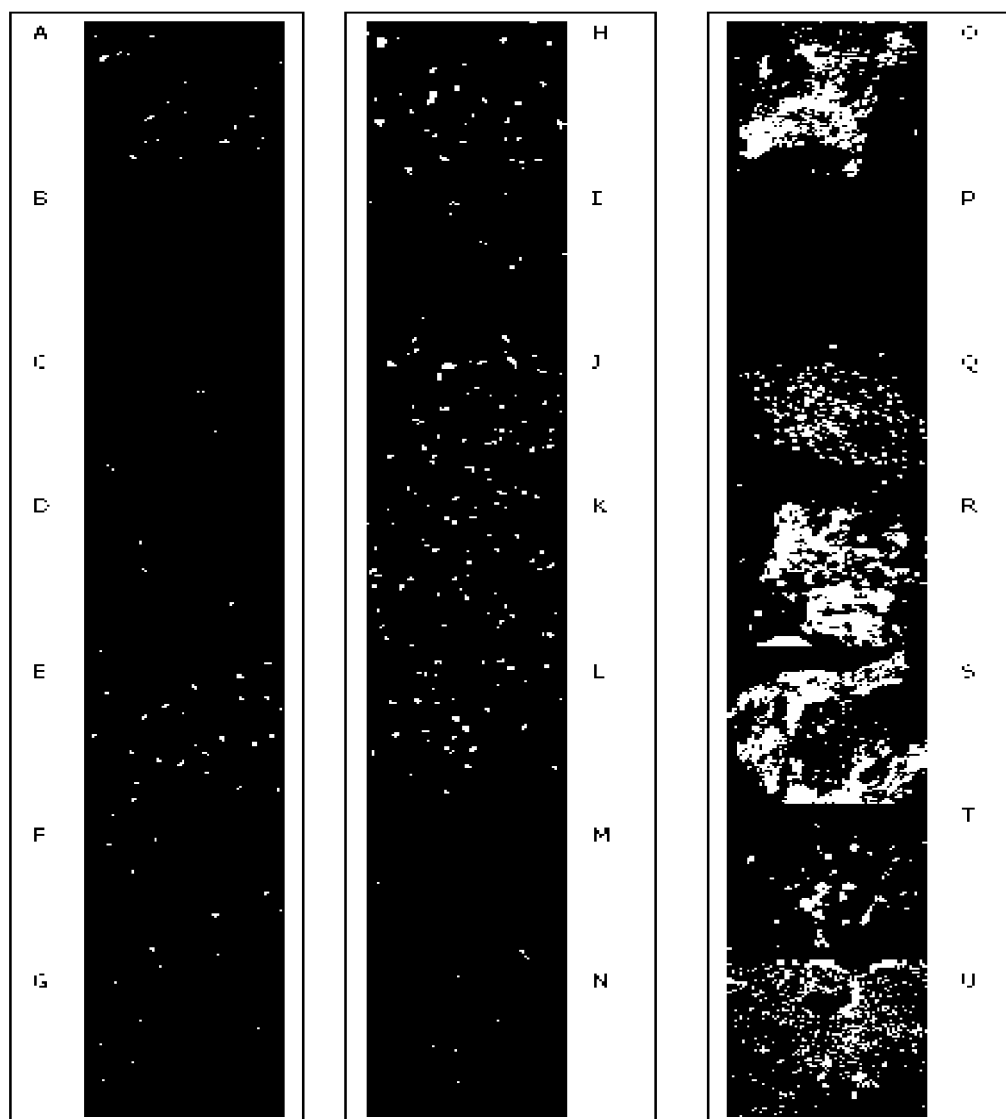


FIG. 4

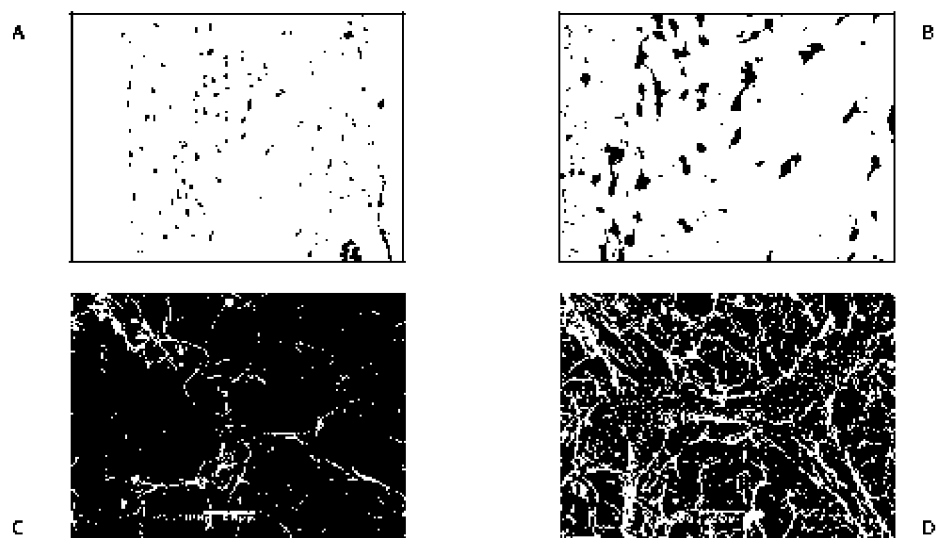


FIG. 5

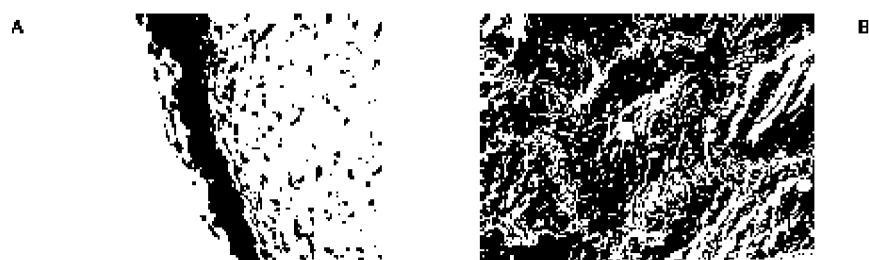


FIG. 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930389

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N5/071** (2010.01)
A61L27/38 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GONZÁLEZ-ANDRADES, M., <i>et al.</i> Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 05-05-2009 (en línea). Vol. 3, nº 6, páginas 442-449. ISSN 1932-7005 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente Resumen, Introducción, Apartado 2.1 de Resultados, y tercer párrafo de Discusión.	1-6,14-21
X	ALAMINOS, M., <i>et al.</i> Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. Investigative ophthalmology & visual science. Agosto 2006. Vol. 47, nº 8, páginas 311-3317. ISSN 0146-0404 (Impreso). Ver todo el documento, especialmente cuarto apartado de Materiales y Métodos.	1-6,14-21
Y	GERMAIN, L., <i>et al.</i> Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology. Mayo-Junio 1999. Vol. 67, nº 3, páginas 140-147. ISSN 1015-2008 (Impreso). Ver todo el documento.	1-21
Y	US 2008/0199513 A1 (CASCADE MEDICAL ENTERPRISES, LLC) 21-08-2008, Ver párrafos [0123] a [0127] y Ejemplo1.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.04.2011

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930389

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N5/071** (2010.01)
A61L27/38 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 2004/0137616 A1 (ISSEROFF, R.R. & SCHWAB, I.R.) 15-07-2004, Ver todo el documento, especialmente resumen, párrafos [0011], [0015], [0032], [0033], [0037], [0038], [0042], [0043] y [0050], ejemplos 1 y 5 y reivindicaciones 1, 5, 8, 12, 16, 17, 20 y 21.	1-21
Y	WO 2006/008748 A2 (PROCHON BIOTECH LTD) 26-01-2006, Ver todo el documento, especialmente las líneas 4 y 5 de la página 29.	1-21
A	MEANA, A., <i>et al.</i> Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. Burns: journal of the International Society for Burn Injuries. Noviembre 1998. Vol. 24, nº 7, páginas 621-630. ISSN 0305-4179 (Impreso). Ver todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.04.2011

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
2/6

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

C12N, A61L

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3, 6, 7-13	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 14-21	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-21	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GONZÁLEZ-ANDRADES, M., <i>et al.</i> Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 05-05-2009 (en línea). Vol. 3, nº 6, páginas 442-449. ISSN 1932-7005 (Electrónico).	05-05-2009
D02	ALAMINOS, M., <i>et al.</i> Investigative ophthalmology & visual science. Agosto 2006. Vol. 47, nº 8, páginas 311-3317. ISSN 0146-0404 (Impreso).	Agosto 2006
D03	GERMAIN, L., <i>et al.</i> Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology. Mayo-Junio 1999. Vol. 67, nº 3, páginas 140-147. ISSN 1015-2008 (Impreso).	Mayo-Junio 1999
D04	US 2008/0199513 A1 (CASCADE MEDICAL ENTERPRISES, LLC)	21-08-2008
D05	US 2004/0137616 A1 (ISSEROFF, R.R. & SCHWAB, I.R.)	15-07-2004
D06	WO 2006/008748 A2 (PROCHON BIOTECH LTD)	26-01-2006
D07	MEANA, A., <i>et al.</i> Burns: journal of the International Society for Burn Injuries. Noviembre 1998. Vol. 24, nº 7, páginas 621-630. ISSN 0305-4179 (Impreso).	Noviembre 1998

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica un gel de fibrina que contiene fibroblastos y células epiteliales del limbo esclerocorneal, así como el método de preparación del mismo y su uso para elaborar medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades de la superficie ocular. El método de preparación del gel de fibrina consiste en resuspender fibroblastos del limbo esclerocorneal (previamente cultivados) en una solución de plasma sanguíneo, añadir un agente antifibrinolítico, polimerizar la mezcla, y sembrar sobre ella un cultivo de células epiteliales del limbo.

Hay numerosos documentos en el estado de la técnica que divulgan la preparación de tejido artificial para su utilización en regeneración de tejidos, incluyendo tejido corneal.

Los documentos D01 y D02 divulgan sustitutos artificiales de córnea (humana y de conejo, respectivamente), preparados a partir de geles de fibrina que contienen fibroblastos del limbo, sobre los cuales se siembra un cultivo de células epiteliales corneales. Es decir, se trata de geles de fibrina como los reivindicados en la solicitud, salvo que las células empleadas en la preparación del tejido artificial en D01 y D02 son de origen heterólogo. Por tanto, el documento D01 afecta la novedad de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5 y 14-21 de la solicitud, y la actividad inventiva de las reivindicaciones 3 y 6 (el mero hecho de emplear células de origen autólogo o heterólogo no confiere actividad inventiva a estas dos reivindicaciones). En el caso del documento D02, al tratarse de experimentos realizados en conejo y no en humano, no afecta la novedad, pero sí la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-6 y 14-21 de la presente solicitud.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1, 2, 4, 5 y 14-21 de la solicitud no cumplen el requisito de novedad del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, y las reivindicaciones 1-6 y 14-21 no cumplen el requisito de actividad inventiva del artículo 8.1 de la mencionada Ley de Patentes.

El documento D03 consiste en un estudio para reconstruir córnea humana in vitro por ingeniería de tejidos. Para ello, cultivan fibroblastos del limbo corneal en geles de colágeno, y, tras 4 días, siembran en ese gel células epiteliales de la córnea (ver, por ejemplo, primer apartado de Resultados). Por tanto, los experimentos descritos en el documento D03 son los mismos que los de la solicitud de patente, excepto por la matriz utilizada para la construcción del tejido, que es fibrina en un caso y colágeno en el otro. Es conocido en el campo técnico de cultivo de tejidos que hay una gran variedad de matrices empleadas para regeneración tisular. Así, por ejemplo, en el documento D04 se describen métodos de preparación de geles de fibrina para su uso en regeneración tisular. En los párrafos [0123] a [0127] y en el ejemplo 1 de este documento, se describe la preparación de geles de fibrina a partir de plasma sanguíneo al que se añade ácido tranexámico y cloruro cálcico, que es el método de las reivindicaciones 7 a 12 de la solicitud de patente.

Por lo tanto, resultaría obvio para el experto en la materia la combinación de la información divulgada en los documentos D03 y D04 para preparar el gel reivindicado en la solicitud, por lo que ésta no cumple el requisito de actividad inventiva según el artículo 8.1 de la Ley de Patentes.

También el documento D05 describe un implante para el tratamiento de la superficie epitelial de córneas dañadas o enfermas. La preparación del implante comprende el cultivo de fibroblastos del estroma corneal sobre una matriz extracelular sobre la que se siembran posteriormente células epiteliales corneales. Una de las matrices empleadas en D05 es un gel de fibrina. En el ejemplo 5 de este documento se detalla el procedimiento de formación del gel, que coincide con el de la solicitud de patente, salvo en el hecho de que en D05 emplean aprotinina en lugar de ácido tranexámico, que es el agente utilizado en la solicitud. El empleo de ambos agentes fibrinolíticos es ampliamente conocido en el estado de la técnica, como se puede ver, por ejemplo, en el documento D06, en el que se enumeran varios agentes antifibrinolíticos, incluyendo aprotinina y ácido tranexámico (ver página 29, líneas 4 y 5). El experto en la materia no necesitaría realizar ningún esfuerzo inventivo para preparar el gel de fibrina de la solicitud a la luz de lo divulgado en los documentos D05 y D06. Por lo tanto, estos dos documentos afectan la actividad inventiva de la presente solicitud, que no cumpliría el requisito del artículo 8.1 de la Ley de Patentes.

El documento D07 divulga un método de generación de tejido artificial muy semejante al de la solicitud de patente, pues consiste en el cultivo de fibroblastos sobre un gel de fibrina y la posterior siembra de células epiteliales sobre el gel. Dado que en el documento D07 se utilizan células de la epidermis y se genera piel humana, no se considera que este documento afecte la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.