

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 029**

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)  
**C07K 1/22** (2006.01)  
**C07K 1/34** (2006.01)  
**C07K 1/30** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 10767898 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2421901**

54 Título: **Composiciones que contienen al complejo HC.HA y metodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**24.04.2009 US 172621 P**  
**08.12.2009 US 267776 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.02.2016**

73 Titular/es:

**TISSUE TECH, INC. (100.0%)**  
**7000 S.W. 9th Avenue, Suite 211**  
**Miami, FL 33173, US**

72 Inventor/es:

**TSENG, SCHEFFER y**  
**HE, HUA**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

ES 2 559 029 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que contienen al complejo HC•HA y métodos de uso de las mismas.

## 5 Antecedentes de la invención

La membrana amniótica (MA) es la membrana más interna que envuelve el feto en la cavidad amniótica. La MA consiste en un epitelio simple, una membrana basal gruesa, y un estroma no vascularizado.

## 10 Rugg y colaboradores (JBC, 2005) y Sanggaard y colaboradores (JBC, 2008) cada uno describe el mecanismo de cómo surgen los complejos HC•HA.

## Resumen de la invención

## 15 La presente invención proporciona un método para producir un complejo reconstituido HC•HA (HC•HArC) como se expone en las reivindicaciones. En el presente documento se divulga, en ciertas realizaciones, un complejo HC•HA que comprende hialuronano y una cadena pesada de IαI, en donde la transferencia de la cadena pesada de IαI es catalizada, al menos en parte, por proteína TSG-6, TSG-6 recombinante, proteína tipo TSG-6, proteína tipo TSG-6 recombinante, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el complejo HC•HA comprende HCl y HC2 de IαI. En algunas realizaciones, el complejo HC•HA tiene una pureza de al menos 75%.

## 20 Se divulga en el presente documento, en ciertas realizaciones, un complejo HC•HA que comprende hialuronano y una cadena pesada de IαI, en donde la transferencia de la cadena pesada de IαI es catalizada por la proteína tipo TSG-6 y/o una proteína tipo TSG-6 recombinante. En algunas realizaciones, el complejo HC•HA comprende HCl y HC2 de IαI. En algunas realizaciones, el complejo HC•HA tiene una pureza de al menos 75%.

## 25 Se divulga en el presente documento, un método para reducir o prevenir la inflamación, que comprende administrar un HC•HA de la invención a un individuo que requiera del mismo.

## 30 El método puede comprender además administrar un agente antibiótico adicional.

## 35 Se divulga en el presente documento, un método para reducir o prevenir la formación de cicatrices que comprende administrar un complejo HC•HA de la invención a un individuo que requiera del mismo. El método puede comprender además la administración de un agente antiinflamatorio adicional. El método puede comprender además la administración de un agente antibiótico adicional.

## 40 Se divulga en el presente documento, un método para reducir o prevenir la angiogénesis que comprende administrar un complejo HC•HA de la invención a un individuo que requiera del mismo. El método puede comprender además la administración conjunta de un agente quimioterapéutico adicional.

## 45 Se divulga en el presente documento, un método para prevenir el rechazo de trasplantes que comprende poner en contacto un tejido o una pluralidad de células con un complejo HC•HA de la invención. El método puede comprender además poner en contacto el tejido o una pluralidad de células con solución de reperfusión. El método puede comprender además la administración conjunta de un agente inmunosupresor adicional.

## 50 Se divulga en el presente documento, de acuerdo con la invención, un método de fabricación de un complejo HC•HA como se expone en la reivindicación 1. Al menos uno entre HA y TSG-6 es opcionalmente recombinante. En algunas realizaciones, el método comprende además un biorreactor. En algunas realizaciones, el método comprende además una pluralidad de células donde las células son modificadas por ingeniería genética para expresar constitutivamente proteína TSG-6 o tipo TSG-6.

## 55 Se divulga en el presente documento, un método de aislamiento de HC•HA a partir de material amniótico que comprende: (a) el procesamiento del material amniótico de tal manera que este sea adecuado para la extracción de un complejo HC•HA; y (b) la extracción del complejo HC•HA mediante un método seleccionado de: cromatografía, filtración por gel, centrifugación, o solubilidad diferencial, precipitación con etanol, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el procesamiento comprende la homogenización del material amniótico. En algunas realizaciones, el método comprende además la extracción del complejo HC•HA mediante centrifugación en gradiente. En algunas realizaciones, el procesamiento se produce por debajo de la temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el procesamiento se produce a 4°C. En algunas realizaciones, el material amniótico es de membrana amniótica. En algunas realizaciones, el material amniótico es de la membrana coriónica.

## 60 Descripción de los dibujos

## 65 Figura 1: Se trató el extracto A (por duplicado) con una serie de concentraciones de NaOH (0, 0,02, 0,05, 0,10, 0,2 N) antes de la transferencia tipo Western con un anticuerpo anti-IαI para determinar la concentración óptima NaOH para escindir el enlace entre HA y las HC (A, M: marcadores escalera de proteína y IαI: purificada a partir de plasma

humano). Se analizaron los extractos A, B, y C con o sin digestión con HAasa o tratamiento con NaOH 0,05 N (B). La bikunina no se asoció con extractos de HA en MA cuando se analizaron las mismas muestras como se describe en B mediante transferencias tipo Western con un anticuerpo anti-bikunina (C, bikunina purificada de orina, es decir, infección del tracto urinario, UTI, como control).

Figura 2. Se encontró que proteínas las TSG-6 y tipo TSG-6 están presentes en el extracto A usando tres diferentes anticuerpos que reconocieron el TSG-6Q de control (25 ng) como una proteína de ~ 32 kDa (A, se observaron bandas de ~35 kDa y ~50 kDa en el extracto A). TSG-6 no se acopló de forma covalente con HA en los extractos A, B, C que fueron tratados con o sin HAasa o NaOH y se analizó mediante transferencias tipo Western con anticuerpo MAB2104 anti-TSG-6 (B). Se encontró que la proteína tipo TSG-6 era diferente de TSG-6 en el peso molecular, y producida específicamente por la membrana amniótica.

Figura 3. Se observó una relación dependiente de la dosis en la supresión de la actividad del promotor del TGF- $\beta$ 1 por una serie de concentraciones de extracto P (A). Por el contrario, no hubo tal relación por una serie de concentraciones de HA de alto peso molecular, APM (B). El efecto supresor de la actividad promotora del TGF- $\beta$ 1 se perdió cuando se digirió el extracto P (125  $\mu$ g/ml de proteínas), pero no HA de APM (125  $\mu$ g/ml) con hialuronidasa (C) o se lo trató con calor (95°C durante 10 min) (D). En A, B, C, y D, un asterisco (\*) indica  $p < 0,05$  ( $n = 4$ ).

Figura 4. La fracción # 8-15 de la primera ultracentrifugación de CsCl/guanidina HCl 4 M (1era) comenzó a una densidad inicial de 1,35 g/ml (A) y la fracción # 3-15 de la segunda ultracentrifugación (2da) comenzó a una densidad inicial de 1,40 g/ml (B) se reunieron de acuerdo a la presencia de HA pero la ausencia de proteínas. La última fracción, después de la diálisis y la eliminación del agua, fue denominada como el complejo nHC•HA, se la trató con o sin NaOH 0,05 N a 25°C durante 1 h, y se analizó en gel de agarosa al 0,5% antes de ser teñido con tintes de todos los colores (C), se tiñeron con el colorante azul de Coomassie (D), o sobre la transferencia tipo Western utilizando un anticuerpo anti-lal (E). Los resultados confirmaron que el complejo HC•HAN fue formado por HA de APM y HC de lal a través de un enlace sensible a NaOH. Téngase en cuenta que las fracciones reunidas de la segunda ultracentrifugación (etiquetada como segunda) en D se concentraron ~ 20 veces por liofilización antes de la carga para mejorar la detección mediante el colorante azul de Coomassie.

Figura 5. Se determinó que la capacidad de enlazamiento de HA (%) en pozos entrecruzados de HAPB era máxima a 25  $\mu$ g/ml de HA de APM mediante la adición tanto de lal humana como TSG-6 humana recombinante (A, ●) en comparación con solo HA de APM (A, ▲) o HA de APM con lal (A, ■). La transferencia tipo Western utilizando un anticuerpo anti-lal (B) reveló que el HA de APM enlazado en pozos entrecruzados con HAPB formó complejo HC•HA cuando se añadió tanto con lal como con TSG-6 (HA + lal + TSG-6, carriles 6, 10, y 14) en comparación con HA solo de APM (carriles 3, 7, y 11), con lal solo (HA + lal, carriles 4, 8, 12) o TSG-6 sola (HA + TSG-6, carriles 5, 9, 13), ya sea sin (carriles 3-6) o con digestión con HAasa (carriles 7-10) o tratamiento con NaOH (carriles 11-14).

Figura 6. En comparación con PBS como control (Ctrl), complejo HC•HA rc o nHC•HA suprimió significativamente la actividad promotora de TGF- $\beta$ 1, es decir, tal como se mide por el ensayo del promotor del TGF- $\beta$ 1 (A,  $p = 0,004$  y  $0,005$ , respectivamente), y promovió la muerte de macrófagos como se midió por el ensayo de MTT (B,  $p = 0,0003$  y  $0,0007$ , respectivamente). En contraste, HA solo e APM (HA) o con lal adicional (HA + lal) o TSG-6 (HA + TSG-6) no mostró ningún efecto (todos  $p > 0,05$ ).

Figura 7. El ensayo de MTT mostró que el complejo HC•HA purificado a partir de AME (etiquetado como HC•HA) disminuyó significativamente la viabilidad celular más que HA de APM o AME sola ( $P = 0,002$  y  $0,02$ , respectivamente).

Figura 8. La morfología de las células HUVEC es cambiada por un complejo HC•HA pero no por HA de APM. Cuando un complejo HC•HA fue sembrado simultáneamente con HUVEC, HUVEC mantuvo una forma poliédrica típica sin (Ctrl) o con 4  $\mu$ g/ml de HA de APM durante 2 días (HA). Por el contrario, HUVEC se tornaron pequeñas, redondeadas y se agregaron con 4  $\mu$ g/ml de complejo HC•HA durante 2 días. La Fig. 8B, un ensayo de MTT, muestra que no hay diferencia en la viabilidad celular entre el control (Ctrl) y HA de APM ( $P = 0,1$ ). En contraste, se suprimió significativamente la viabilidad de HUVEC por un complejo HC•HA cuando se compara con el control o HA de APM ( $P = 0,01$  o  $0,003$ , respectivamente). Las Figuras 8C y 8D muestran que se inhibe la proliferación. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de núcleos positivos para BrdU entre el control (32,5%,  $n = 133$ ) o 5  $\mu$ g/ml HA de APM añadidos durante 48 h (31,9%,  $n = 144$ ) y en el índice de marcación (es decir, el porcentaje de células en proliferación) de HA de APM ( $P = 0,9$ ). Por el contrario, se abolió completamente el etiquetado de BrdU cuando se les añadió a las células HUVEC 5  $\mu$ g/ml del complejo HC•HA, resultando en una reducción significativa del índice de marcación (1,9%,  $n = 69$ ), que fue significativamente diferente de Ctrl y HA de APM ( $P = 0,00005$  y  $P = 0,001$ , respectivamente). Finalmente, la Fig. 8E muestra que aumenta la muerte celular. El ensayo de Vida & Muerte mostró células HUVEC vivas en el control con o sin adición de 25  $\mu$ g/ml de HA de APM. Por el contrario, la reducción notable de células vivas y el aumento de células muertas fue provocado por 25  $\mu$ g/ml de complejo HC•HA.

Figura 9. Cuando se añadió el complejo HC•HA 24 h después de la siembra de HUVEC, no causó el mismo redondeo morfológico en comparación con el control de plástico (Ctrl) o HA de APM como se ha señalado, cuando se añadió el complejo HC•HA simultáneamente con la siembra de HUVEC (consultar la Fig. 9, micrografías de contraste de fase. Sin embargo, la adición del complejo HC•HA causó una reducción significativa de la viabilidad (con base en el ensayo de MTT) cuando se compara con Ctrl y HA de APM (Fig. 9A). Curiosamente, la preincubación de la CD44 que bloquea al anticuerpo no afectó la reducción de la viabilidad de HUVEC causada por el complejo HC•HA (Fig. 9A). La preincubación de CD44 que bloquea el anticuerpo no afectó la reducción de la viabilidad de HUVEC (por el MTT) (Fig. 9B).

Figura 10. Densidad y Concentración de la proteína después de la primera (A) y segunda (B) ronda de ultracentrifugación. Se centrifugaron mezclas de extracto de CH/CsCl/guanidina 4 M (1,35 g/ml) para 3 donantes a 125.000 g durante 48 h a 15°C. Se recolectaron fracciones desde la parte superior hasta la parte inferior de cada tubo

(15 fracciones, 0,8 ml/fracción). Se midieron el peso y las proteínas en cada fracción y se reunieron las fracciones 9-15, que contenían cantidades mínimas de proteína. La muestra combinada se ajustó con CsCl y guanidina-HCl (1,40 g/ml) y se centrifugó de nuevo como anteriormente. Se recolectaron las fracciones y se midieron las proteínas. Las fracciones 13-15, que contenían cantidades mínimas de proteína, se agruparon y se dializaron para destilar agua para eliminar el CsCl y la guanidina.

Figura 11. Concentración de HA en el extracto y después de la primera y segunda ronda de ultracentrifugación. Se midieron la concentración de HA del extracto antes de la centrifugación y después de la primera y segunda ronda de ultracentrifugación para 3 donantes por ELISA para HA. Se almacenó el complejo HA purificado a -80°C y se utilizó para su posterior caracterización bioquímica.

Figura 12. Resultados de ELISA con BrdU (A 450-670 nm) para HC•HA (AME) y HC•HA (CHE). El ELISA con BrdU muestra la diferencia adecuada entre el control etiquetado y control de fondo (1,9 vs. 0,65). HC•HA (AME) inhibe significativamente la proliferación (p <0,05) a razón de 5, 12,5 y 25 µg/ml. HC•HA (CHE) inhibe significativamente la proliferación (p <0,05) a razón de 0,25, 0,5 y 1 µg/ml. La dosis efectiva más baja para HC•HA (AME) y HC•HA (CHE) está entre 1-5 µg/ml y 0,05-0,25 µg/ml respectivamente. En Aim2b de P-184, la dosis efectiva más baja para HC•HA (ASE) está entre 0,2-1 µg/ml (en fibronectina + colágeno sin VEGF). No se encontró diferencia estadística entre los grupos de VEGF (antiguos o nuevos) y el control aunque se obtuvo un valor ligeramente inferior de absorbancia para el viejo VEGF en comparación con el control.

Figura 13. Gráfico logarítmico de ELISA con BrdU para HC•HA (AME) y HC•HA (CHE). Los valores de absorbancia graficados contra la concentración de HC•HA (AME) y HC•HA (CHE) de 0,5-25 µg/ml ajustan las ecuaciones de la curva logarítmica:  $y = -0,35 \ln(x) + 0,98$ ,  $R^2 = 1$  y  $y = -0,39 \ln(x) - 0,22$ ,  $R^2 = 0,99$ , respectivamente. Los derivados de las funciones para HC•HA (AME) y HC•HA (CHE) son  $0,35/[HA]$  y  $0,39/[HA]$  respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Se divulgan en el presente documento complejos HC•HA; particularmente un complejo HC•HA reconstituido (es decir, fabricado; en lo sucesivo, "HC•HARC"). En algunas de tales realizaciones, el HC•HARC comprende uno o más componentes recombinantes. También, se describen aquí complejos HC•HA que han sido aislados y purificados a partir de material amniótico, incluyendo la membrana amniótica, líquido amniótico o la membrana coriónica (en lo sucesivo "HC•HAN"). Dicho material amniótico es preferiblemente material de amniótico de mamífero, y más preferiblemente material amniótico humano. El material amniótico puede ser de membrana amniótica humana, por ejemplo de membrana coriónica humana. También se divulgan en el presente documento formulaciones de complejos HC•HA que incluyen tanto HC•HARC como HC•HAN.

Se divulgan en el presente documento métodos de fabricación de un complejo HC•HA. En algunas realizaciones, el agente que facilita la transferencia de, que cataliza la transferencia de, y/o transfiere una cadena pesada (en lo sucesivo HC) de Ial en HA puede ser seleccionado de TSG-6; TSG-6 recombinante; un material biológico obtenido de extractos solubles e insolubles en agua de membrana amniótica que contiene TSG-6 o un material de 50 kDa como se determina por una transferencia tipo Western utilizando anticuerpos anti-TSG-6 (en lo sucesivo, la "proteína tipo TSG-6"); una forma recombinante de la proteína tipo TSG-6; o sus combinaciones. En algunas realizaciones, la proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 se obtiene a partir de cultivos de células epiteliales amnióticas humanas o células mesenquimales estromales amnióticas. En algunas realizaciones, se fabrica HC•HARC utilizando (a) HA; (b) Ial del suero, donde el Ial es opcionalmente purificado a partir del suero; (c) proteína TSG-6 o de tipo TSG-6, en donde la proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 es opcionalmente recombinante. El complejo HC•HA fabricado es al menos 25% purificado a partir de otros componentes del proceso de fabricación; al menos 50% purificado a partir de otros componentes del proceso de fabricación; al menos 75% purificado de otros componentes del proceso de fabricación; o al menos 90% purificado a partir de otros componentes del proceso de fabricación.

De acuerdo con la invención es un método que produce la reconstitución de HC•HA, que comprende proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) proteína que se enlaza a HA (HABP) fijada a un soporte estacionario, (ii) HA; (iii) HCl y HC2 de Ial; aislado a partir de suero y (c) proteína TSG-6 o de tipo TSG-6. La proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 es opcionalmente recombinante. En algunos formas de realización, el método comprende además una pluralidad de células en donde las células son modificadas por ingeniería genética para expresar constitutivamente proteína TSG-6 o de tipo TSG-6. En algunas realizaciones, el método comprende además una pluralidad de células en donde las células son modificadas por ingeniería genética para expresar constitutivamente HCl, HC2, o ambos. En algunas realizaciones, la fuente de HA, HCl y HC2 de Ial, y de proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 es cualquier combinación de las fuentes divulgadas en la Tabla 1. Sin embargo, la lista no pretende ser exclusiva, únicamente sirve de ejemplo. La fuente del HA y de la proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 es cualquier fuente adecuada. El complejo HC•HA fabricado es al menos 25% purificado a partir de otros componentes del proceso de reconstitución; al menos 50% purificado a partir de otros componentes del proceso de reconstitución; al menos el 75% purificado a partir de otros componentes del proceso de reconstitución; o al menos 90% purificado a partir de otros componentes del proceso de reconstitución.

Tabla 1

Componente	Fuente
HA	Polvo comercialmente disponible Células que expresan HAS1, HAS2, o HAS3

(continuación)

Componente	Fuente
HC1	Suero no purificado Purificado a partir de suero
HC2	Suero no purificado Purificado a partir de suero
TSG-6	Extracto de material amniótico Células mesenquimales estromales amnióticas Células epiteliales amnióticas humanas Células recombinantes
Proteína de tipo TSG-6	Extracto de material amniótico Células mesenquimales estromales amnióticas Células epiteliales amnióticas humanas Células recombinantes

5 Adicionalmente, se describen aquí métodos de aislamiento de HC•HA a partir de material amniótico. En algunas realizaciones, el método comprende (a) el procesamiento del material amniótico de tal forma que sea adecuado para la extracción de un complejo HC•HA; y (b) la extracción del complejo HC•HA mediante un método seleccionado a partir de: cromatografía, filtración en gel, centrifugación, o solubilidad diferencial, precipitación con etanol, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el procesamiento comprende la homogenización del material amniótico. En algunas realizaciones, el procesamiento se produce por debajo de la temperatura ambiente. El complejo HC•HA es al menos 25% purificado a partir de otros componentes del proceso de aislamiento; al menos 50% purificado a partir de otros componentes del proceso de aislamiento; al menos 75% purificado a partir de otros componentes del proceso de aislamiento; o al menos 90% purificado a partir de otros componentes del proceso de aislamiento. En algunas realizaciones, el material amniótico es de membrana amniótica. En algunas realizaciones, el material amniótico es de la membrana coriónica.

15 También se divulga aquí un método para reducir o prevenir la inflamación, que comprende la administración de un complejo HC•HA divulgado aquí a un individuo que requiera del mismo. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HAN y/o HC•HArc. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HAN. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HA reconstituido (HC•HArc). En algunas realizaciones, al menos una cadena pesada de HC•HArc es recombinante (por ejemplo, HCl es de una fuente recombinante, HC2 es de una fuente recombinante, o ambos son de fuentes recombinantes).

25 Se divulga además en este documento, un método para reducir o prevenir la formación de cicatrices que comprende la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento a un individuo que requiera del mismo. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HAN y/o HC•HArc. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HAN. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HA reconstituido (HC•HArc). En algunas realizaciones, al menos una cadena pesada de HC•HArc es recombinante (por ejemplo, HCl es de una fuente recombinante, HC2 es de una fuente recombinante, o ambos son de fuentes recombinantes).

30 Se divulga en el presente documento, en ciertas realizaciones, un método para reducir o prevenir la angiogénesis que comprende administrar un complejo HC•HA divulgado en este documento a un individuo que requiera del mismo. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HAN y/o HC•HArc. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HAN. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HA reconstituido (HC•HArc). En algunas realizaciones, al menos una cadena pesada de HC•HArc es recombinante (por ejemplo, HCl es de una fuente recombinante, HC2 es de una fuente recombinante, o ambos son de fuentes recombinantes).

35 Adicionalmente, se divulga aquí, en ciertas realizaciones, un método para prevenir el rechazo de trasplantes que comprende poner en contacto una pluralidad de células (por ejemplo, las células madre, un órgano o un injerto de tejido) con un complejo HC•HA. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HAN y/o HC•HArc. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HAN. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de HC•HA reconstituido (HC•HArc). En algunas realizaciones, al menos una cadena pesada de HC•HArc es recombinante (por ejemplo, HCl es de una fuente recombinante, HC2 es de una fuente recombinante, o ambos son de fuentes recombinantes).

45 Cierta terminología

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona ordinariamente capacitada en la técnica a la que pertenece la materia reivindicada.

50 Se debe entender que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son solo ejemplos y únicamente aclaratorios y no son restrictivos de cualquier materia reivindicada. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en la especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un, uno, una", y "el, la" incluyen los

correspondientes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. También hay que señalar que el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas (por ejemplo, "incluyen", "incluye" e "incluido") no son limitantes.

5 El término "aislado", como se usa aquí, se refiere a la separación y la remoción de un componente de interés de los componentes que no son de interés. Las sustancias aisladas pueden estar, ya sea en estado seco o semiseco, o en solución, incluyendo pero sin limitarse a una solución acuosa. El componente aislado puede estar en un estado homogéneo o el componente aislado puede ser parte de una composición farmacéutica que comprende portadores y/o excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables. La pureza y la homogeneidad pueden determinarse utilizando técnicas de química analítica, incluyendo, pero sin limitarse a, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Además, cuando se aísla un componente de interés y es la especie predominante presente en una preparación, el componente se describe en el presente documento como sustancialmente purificado. A modo de ejemplo solamente, las proteínas están "aisladas" cuando tales proteínas están libres de al menos algunos de los componentes celulares con los que están asociadas en estado natural, o que la proteína se ha concentrado hasta un nivel mayor que la concentración de su producción in vivo o in vitro.

El término "purificado", como se usa aquí, se refiere a un componente de interés que es al menos 85% puro, al menos 90% puro, al menos 95% puro, al menos 99% puro o más.

20 El término "sujeto" o "individuo" como se usa en el presente documento abarca mamíferos y no mamíferos. Ninguno de los términos debe interpretarse como que se requiere la supervisión de un profesional de la medicina (por ejemplo, un médico, enfermera, asistente, asistente social para pacientes terminales). En una realización de los métodos y composiciones proporcionados en este documento, el mamífero es un humano.

25 Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento", y otros equivalentes gramaticales significan retardar o detener el desarrollo de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, mejorar un trastorno, los síntomas de un trastorno, la prevención del desarrollo o la presentación de síntomas adicionales, mejorar y/o prevenir la causa subyacente de un síntoma, o combinaciones de los mismos. El término incluye además la consecución de un beneficio profiláctico. Para el beneficio profiláctico, se administra un complejo HC•HA o composición de acuerdo con la invención a un individuo en riesgo de desarrollar un trastorno particular, predispuesto a desarrollar un trastorno particular, o a un individuo que reporta uno o más de los síntomas fisiológicos de un trastorno.

35 Los términos "cantidad efectiva", "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad de un complejo HC•HA que es suficiente para tratar un trastorno. En algunas realizaciones, el resultado es una reducción en y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de un trastorno, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad efectiva" para usos terapéuticos es la cantidad de la composición que comprende un complejo HC•HA como se divulga aquí, requerida para proporcionar una disminución clínicamente significativa en un trastorno. Una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual se determina utilizando cualquier técnica adecuada, (por ejemplo, un estudio de escalamiento de la dosis).

45 El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa aquí, se refiere a un material, (por ejemplo, un portador o diluyente), que no anula la actividad biológica o las propiedades de uno de los complejos HC•HA descritos en este documento, y es relativamente no tóxico (es decir, se administra el material a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o que interactúe de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en los que está contenido).

50 El término "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, o ribonucleótidos y polímeros de los mismos ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de enlazamiento similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a nucleótidos de origen natural. A menos que se limite específicamente de otra manera, el término también se refiere a análogos de oligonucleótidos incluyendo PNA (ácido peptidonucleico), análogos de ADN utilizados en la tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforamidatos, y similares). A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico abarca implícitamente también variantes modificadas de manera conservadora del mismo (incluyendo, pero sin limitarse a, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, se logran las sustituciones de codones degenerados mediante la generación de secuencias en las que se sustituye la tercera posición de uno o más codones degenerados (o todos) con residuos de desoxiinosina y/o de una base mixta (Batzner y colaboradores, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka y colaboradores, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); y Cassol y colaboradores (1992); Rossolini y colaboradores, Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)).

65 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos origen natural y de origen no natural, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Aminoácidos naturalmente codificados son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina,

5 treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a agentes que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono  $\alpha$  que está enlazado a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, tal como, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (tales como, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural.

10 Los aminoácidos se denominan en el presente documento ya sea por sus símbolos comúnmente conocidos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, igualmente, se mencionan por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

15 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos de origen no natural, por ejemplo, un análogo de aminoácido. Los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

20 Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se pueden alinear para fines de una comparación óptima (por ejemplo, se introducen huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Luego se pueden comparar los residuos de aminoácidos o de nucleótidos en las posiciones correspondientes de los aminoácidos o de los nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = # de posiciones idénticas / número total de posiciones (por ejemplo, posiciones que se superponen) x 100). En algunas realizaciones las dos secuencias tienen la misma longitud.

30 Para determinar el porcentaje de homología entre dos secuencias, se usa el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, y colaboradores (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. Las búsquedas de nucleótidos mediante BLAST se realizan con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico descritas o divulgadas en el presente documento. Las búsquedas de proteínas mediante BLAST se realizan con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se utiliza BLAST con huecos como se describe en Altschul y colaboradores (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y XBLAST con huecos, se usan los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica para obtener más detalles (en la red mundial de información en [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Las proteínas adecuadas para su uso en los métodos descritos en este documento también incluyen proteínas que tienen entre 1 a 15 cambios de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia de aminoácidos de cualquier proteína descrita en este documento. En otras realizaciones, la secuencia alterada de aminoácidos es al menos 75% idéntica, por ejemplo, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquier inhibidor de proteína descrito en este documento. Tales proteínas con variantes de secuencia son apropiadas para los métodos descritos en el presente documento, siempre y cuando la secuencia alterada de aminoácidos retenga la suficiente actividad biológica para ser funcional en las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Cuando se hacen sustituciones de aminoácidos, las sustituciones deben ser sustituciones conservadoras de aminoácidos. Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, se ilustra una "sustitución conservadora de aminoácidos" por una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina, y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina, y (6) lisina, arginina e histidina. La tabla BLOSUM62 es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineaciones múltiples locales de segmentos de secuencias de proteínas, que representan regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y colaboradores (1992), Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU., 89: 10915-10919). Por lo tanto, las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 se utilizan para definir sustituciones conservadoras de aminoácidos que, en algunas formas de realización, se introducen en las secuencias de aminoácidos descritas o divulgadas en este documento. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos con base únicamente en propiedades químicas (como se discutió anteriormente), la expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere preferiblemente a una sustitución representada por un valor de BLOSUM62 mayor que -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservadora si la sustitución se caracteriza por un valor de BLOSUM62 de 0, 1, 2, o 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones conservadoras de aminoácidos preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 o 3), mientras que las sustituciones conservadoras más preferidas de aminoácidos se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 o 3).

65 Tal como se usa en este documento, "proteína de tipo TSG-6" significa un material biológico obtenido de membrana

amniótica que presenta una banda de 50 kDa en una transferencia tipo Western de extractos de membrana amniótica solubles en agua e insolubles en agua utilizando anticuerpos anti-TSG-6. Véase la Fig. 2. En ciertos casos, proteína de tipo TSG-6 sólo se encuentra en la membrana amniótica y producida por células epiteliales amnióticas o células mesenquimales estromales amnióticas.

5 Tal como se usa en el presente documento, "TSG-6 recombinante" significa una proteína TSG-6 que se produce por métodos recombinantes (es decir, se clona el gen para TSG-6 a partir de una primera fuente (por ejemplo, un gen para TSG-6 humano) en una molécula de ADN a partir de una segunda fuente (por ejemplo, un plásmido bacteriano)).

10 Tal como se usa en el presente documento, "proteína de tipo TSG-6 recombinante" significa una proteína de tipo TSG-6 que es producida por métodos recombinantes (es decir, se clona el gen del tipo para TSG-6 de una primera fuente (por ejemplo, un gen del tipo para TSG-6 humano) en una molécula de ADN a partir de una segunda fuente (por ejemplo, un plásmido bacteriano)).

15 Tal como se usa en el presente documento, "HCl recombinante" significa una proteína de HCl que es producida por métodos recombinantes (es decir, se clona el gen para HCl a partir de una primera fuente (por ejemplo, un gen para HCl humano) en una molécula de ADN a partir de una segunda fuente (por ejemplo, un plásmido bacteriano)).

20 Como se usa en este documento, "HC2 recombinante" significa una proteína de HC2 que es producida por métodos recombinantes (es decir, se clona el gen para HC2 a partir de una primera fuente (por ejemplo, un gen para HC2 humano) en una molécula de ADN a partir de una segunda fuente (por ejemplo, un plásmido bacteriano)).

25 Tal como se utiliza aquí, el término "biorreactor" se refiere a cualquier recipiente artificial en el que crecen las células de mamífero. En algunas realizaciones, un biorreactor es de 1 litro, 10 litros, 100 litros, 250 litros, 500 litros, 1000 litros, 2500 litros, 5000 litros, 8000 litros, 10000 litros, o 12000 litros. Un biorreactor está compuesto de cualquier material que sea adecuado para contener cultivos de células de mamífero suspendidos en medios de cultivo (por ejemplo, vidrio, plástico o metal).

30 Tal como se usa en el presente documento, el "biorreactor de producción" es el biorreactor en el que se reconstituye el complejo HC•HA divulgado en este documento.

#### HC•HA

35 Tal como se usa en el presente documento, "hialuronano" (o "HA") significa un glicosaminoglicano sustancialmente no sulfatado o no sulfatado con unidades lineales repetidas de disacárido de glucuronosil-N-acetilglucosamina. En algunas realizaciones, HA se obtiene a través de un proveedor comercial (por ejemplo, Sigma Aldrich o Abbott Medical Optics, Irvine, CA). En algunas realizaciones, HA se obtiene a través de un proveedor comercial como un polvo. En algunas realizaciones, HA se obtiene a través de una célula que expresa hialuronano sintasas (por ejemplo, HAS1, HAS2 y HAS3). En ciertos casos, una HA sintasa prolonga un hialuronano mediante la adición repetida de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina al polisacárido naciente a medida que es extrudido a través de la membrana celular en el espacio extracelular.

45 En ciertos casos, HA de alto peso molecular (APM) promueve la quiescencia celular y la integridad estructural de dichos tejidos tales como el cartílago y el cuerpo vítreo (humor) en el ojo, y se asocia con la curación de heridas fetales sin cicatrices. En ciertos casos, HA de APM inhibe la expresión génica de mediadores proinflamatorios y proangiogénicos.

50 En ciertos casos, HA de APM se degrada en fragmentos más pequeños y oligosacáridos (por ejemplo, a través de una hialuronasa o condiciones de oxidación de radicales libres). En ciertos casos, HA de BPM estimula la proliferación celular vascular endotelial, la migración, la síntesis de colágeno, la formación de brotes, y la angiogénesis en la piel de ratas, el infarto de miocardio, y el modelo de injerto de piel criolesionada mediante la promoción de la expresión génica de mediadores proinflamatorios y proangiogénicos.

55 En ciertos casos, HA forma un complejo covalente con las cadenas pesadas (HC) del inhibidor inter  $\alpha$  (I $\alpha$ ) mediante el enlazamiento covalente a las cadenas pesadas (en lo sucesivo, "HC•HA"). (Véase la Fig. 1). En ciertos casos, I $\alpha$  consta de dos cadenas pesadas (HCl y HC2), ambos de los cuales están enlazados a través de enlaces éster a una cadena de sulfato de condroitina que se une a la cadena ligera (es decir, Bikunina).

60 En ciertos casos, la proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 facilita la transferencia de, cataliza la transferencia de, y/o transfiere las HCl y HC2 de I $\alpha$  a HA. En ciertos casos, la expresión de TSG-6 es inducida por mediadores inflamatorios tales como TNF- $\alpha$  y la interleuquina 1. En ciertos casos, la expresión de proteína de tipo TSG-6 es independiente de mediadores inflamatorios tales como TNF- $\alpha$ .

#### Métodos de tratamiento

65 A. Cicatrices  
Se describe aquí, en ciertas realizaciones, un método para prevenir, reducir o invertir la cicatrización en un sujeto que lo

requiera, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) divulgado en el presente documento.

5 Tal como se usa en el presente documento, "cicatrización" se refiere a la formación de una cicatriz. En un aspecto, la cicatriz es una cicatriz hipertrófica, o cicatriz queloide, o una cicatriz resultante de acné. Como se usa en este documento, un "cicatriz" es una zona de tejido fibroso que resulta de la sobreproducción de colágeno. En ciertos casos, la cicatrización de una herida comprende la migración de fibroblastos al sitio de la lesión. En ciertos casos, los fibroblastos depositan colágeno. En ciertos casos, los fibroblastos depositan exceso de colágeno en el sitio de la herida, dando lugar a una cicatriz.

10 En ciertos casos, un complejo HC•HA divulgado aquí (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) impide o inhibe la señalización de TGF- $\beta$ . En ciertos casos, el TGF- $\beta$  regula la matriz extracelular mediante la estimulación de fibroplasia y depósito de colágeno y la inhibición de la degradación de la matriz extracelular (por sobreexpresión de la síntesis de inhibidores de proteasa). En ciertos casos, la prevención o inhibición de la expresión de TGF- $\beta$  resulta en la prevención de o una reducción en la intensidad de una cicatriz. En algunas realizaciones, la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) evita o reduce la cicatrización.

20 En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) inhibe o previene la capacidad de los fibroblastos para diferenciarse en miofibroblastos. En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) revierte los miofibroblastos diferenciados en fibroblastos.

25 En algunas realizaciones, un método divulgado en el presente documento se usa para prevenir, reducir o revertir la formación de una cicatriz. En algunas realizaciones, un método divulgado en el presente documento comprende la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) a un individuo con un trastorno que resulta en una cicatrización (por ejemplo, dermatitis). En algunas realizaciones, un método divulgado en este documento comprende la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) a un individuo que requiera del mismo antes o después de un trauma. En algunas realizaciones, un método divulgado en el presente documento comprende administrar un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) a un individuo que requiera del mismo antes o después de una cirugía.

35 En algunas realizaciones, se usa un método divulgado en el presente documento para prevenir o reducir la formación de una cicatriz en un ojo o en el tejido circundante. En algunas realizaciones, un método divulgado en el presente documento comprende la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) a un individuo con un trastorno que da lugar a cicatrices en el ojo o el tejido circundante (por ejemplo, retinopatía del prematuro). En algunas realizaciones, un método divulgado en el presente documento comprende administrar un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) a un individuo que requiera del mismo antes o después de un traumatismo en un ojo o el tejido circundante. En algunas realizaciones, un método divulgado en el presente documento comprende la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) a un individuo que requiera del mismo antes o después de cirugía en un ojo o el tejido circundante.

#### 45 B. Inflamación

Se describe en el presente documento, en ciertas realizaciones, un método para prevenir o reducir la inflamación en un sujeto que requiera del mismo, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) divulgado en el presente documento. Como se usa aquí, "inflamación" significa respuestas fisiológicas que resultan de la migración de plasma y/o leucocitos (por ejemplo, linfocitos, macrófagos, granulocitos, y neutrófilos) al sitio de una infección o trauma (por ejemplo, traumatismo, traumatismo penetrante, o cirugía).

55 En ciertos casos, los leucocitos secretan citoquinas tras el contacto con un antígeno. Como se usa aquí, "citoquinas" son proteínas o glicoproteínas de señalización. En ciertos casos, una citoquina se une a un receptor de la superficie de la célula. En ciertos casos, las citoquinas inducen la quimiotaxis de los leucocitos en el sitio de una infección. En ciertos casos, los receptores de la superficie de la célula en un leucocito detectan gradientes químicos de una citoquina. En ciertos casos, un leucocito sigue el gradiente hasta el sitio de la infección. En ciertos casos, el enlazamiento de una citoquina con un receptor de la superficie de la célula da como resultado la sobreexpresión o la subregulación de ciertos genes y sus factores de transcripción. En ciertos casos, los cambios en la expresión génica dan como resultado la producción de citoquinas, un aumento en la producción de citoquinas, o un aumento en la presentación de receptores de la superficie celular.

65 A modo de ejemplo no limitativo, las citoquinas incluyen las interleuquinas IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 (también conocida como CCL2), y TNF- $\alpha$ . La interleuquina 1 está presente en el cuerpo en dos isoformas: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . En ciertos casos, la presencia de IL-1 aumenta la expresión de factores de adhesión en las células endoteliales. Esto, a su vez, permite la transmigración de leucocitos al sitio de la infección. En ciertos casos, IL-8 induce la quimiotaxis de los leucocitos. En

ciertos casos, TNF- $\alpha$  induce la quimiotaxis de los leucocitos. En ciertos casos, MCP-1 recluta leucocitos hacia los sitios de lesión e infección de los tejidos.

En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) suprime la producción de y/o la actividad de las citoquinas. En ciertos casos, una disminución en la concentración de citoquinas reduce o previene la inflamación mediante la disminución del número de leucocitos y/o la velocidad a la que los leucocitos migran al sitio de una lesión.

En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) induce la apoptosis de un leucocito (por ejemplo, un macrófago, neutrófilo o linfocito). En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) disminuye el número de leucocitos activados o la velocidad a la que se activan los leucocitos. En ciertos casos, una disminución en la concentración de leucocitos reduce o previene la inflamación disminuyendo el número (por ejemplo, facilita la muerte de dichas células a través de apoptosis) de las células que migran al sitio de una lesión.

En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es un trastorno autoinmune, una alergia, un defecto de los leucocitos, la enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de tejido, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es una infección bacteriana, una infección protozoaria, una infección viral, una infección fúngica, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio mediado por células T. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio mediado por macrófagos. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es un trastorno inmune mediado por Th-17. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es encefalomiелitis aguda diseminada; la enfermedad de Addison; espondilitis anquilosante; síndrome de anticuerpos antifosfolípidos; anemia hemolítica autoinmune; hepatitis autoinmune; enfermedad autoinmune del oído interno; penfigoide bulloso; la enfermedad de Chagas; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; enfermedad celíaca; dermatomiositis; diabetes mellitus tipo 1; diabetes mellitus tipo 2; endometriosis; síndrome de Goodpasture; enfermedad de Graves; síndrome de Guillain-Barré; enfermedad de Hashimoto; púrpura trombocitopénica idiopática; cistitis intersticial; lupus eritematoso sistémico (LES); síndrome metabólico; esclerosis múltiple; miastenia grave; miocarditis, narcolepsia; obesidad; pénfigo vulgar; anemia perniciosa; polimiositis; cirrosis biliar primaria; artritis reumatoide; esquizofrenia; esclerodermia; síndrome de Sjogren; vasculitis; vitiligo; granulomatosis de Wegener; rinitis alérgica; cáncer de próstata; carcinoma pulmonar de células no pequeñas; cáncer de ovario; cáncer de mama; melanoma; cáncer gástrico; cáncer colorrectal; cáncer de cerebro; trastorno óseo metastásico; cáncer pancreático; un linfoma; pólipos nasales; cáncer gastrointestinal; colitis ulcerativa; trastorno de Crohn; colitis colagenosa; colitis linfocítica; colitis isquémica; colitis por desviación; síndrome de Behcet; colitis infecciosa; colitis indeterminada; trastorno inflamatorio del hígado, choque por endotoxinas, choque séptico; espondilitis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis gotosa, polimialgia reumática, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia, demencia por SIDA, asma, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, bronquitis, fibrosis quística, lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos, proctitis distal, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, bronquitis, fibrosis quística, uveítis, conjuntivitis, psoriasis, eczema, dermatitis, trastornos de proliferación del músculo liso, meningitis, herpes, encefalitis, nefritis, tuberculosis, retinitis, dermatitis atópica, pancreatitis, gingivitis periodontal, necrosis coagulativa, necrosis licuefactiva, necrosis fibrinoide, hiperplasia neointimal, o combinaciones de las mismas.

En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio de un ojo o el tejido circundante. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es conjuntivitis. En ciertos casos, la conjuntivitis resulta de la exposición a un alérgeno. En ciertos casos, la conjuntivitis resulta de una infección bacteriana. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es queratitis. Como se usa en este documento, "queratitis" es un trastorno caracterizado por la inflamación de la córnea. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es queratoconjuntivitis (es decir, una combinación de conjuntivitis y queratitis (es decir, inflamación de la córnea)). En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es blefaritis. Como se usa aquí, "blefaritis" es un trastorno oftalmológico caracterizado por la inflamación de los bordes de los párpados. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es blefaroconjuntivitis (es decir, una combinación de conjuntivitis y blefaritis (es decir, la inflamación de un párpado)). En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es escleritis. Como se usa en este documento, "escleritis" es un trastorno caracterizado por la inflamación de la esclerótica. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es epiescleritis. Como se usa aquí, "epiescleritis" es un trastorno inflamatorio de la epiesclerótica caracterizado por hiperemia y quemosis. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es uveítis. Como se utiliza aquí, "uveítis" es un trastorno inflamatorio de la úvea. En algunas realizaciones, el trastorno es retinitis. Como se usa en este documento, "retinitis" es un trastorno inflamatorio de la retina. En algunas realizaciones, el trastorno es coroiditis. Como se usa en este documento, "coroiditis" es un trastorno inflamatorio de la úvea, el cuerpo ciliar y la coroides.

### C. Angiogénesis

Se divulga en el presente documento, en ciertas realizaciones, un método para prevención o reducción de la angiogénesis en un sujeto que lo requiera, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) divulgado en este documento. Como se usa aquí, "angiogénesis" significa la formación de nuevos vasos sanguíneos. En ciertos casos, la angiogénesis facilita el crecimiento y la metástasis de un tumor. Además, en ciertos casos, la angiogénesis anormal es la base de la degeneración macular húmeda relacionada con la edad (DMHRE) y la retinopatía diabética proliferativa. En ciertos casos, un complejo HC•HA

(por ejemplo, HC•HAn y/o HC•HArC) divulgado en este documento previene o reduce la angiogénesis.

En ciertos casos, el enlazamiento de un ligando al receptor 2 de VEGF (VEGFR-2) inicia una cascada de señalización tirosina quinasa que estimula la producción de factores que estimulan de diversas formas la permeabilidad de los vasos (eNOS, que produce NO), la proliferación/supervivencia (bFGF), migración (los ICAM/VCAM/MMP) y finalmente la diferenciación en los vasos sanguíneos maduros. En ciertos casos, después de la unión de VEGFR-2 a su ligando, las células endoteliales forman estructuras tubulares que se asemejan a los capilares.

Como se utiliza en la presente invención, "degeneración macular húmeda relacionada con la edad", "DMHRE", o "DMRE húmeda" significa un trastorno de los ojos que se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos de la coroides. En ciertos casos, la DMRE húmeda causa la pérdida de la visión debido a filtración de sangre y proteína por debajo de la mácula. En ciertos casos, el sangrado, la filtración, y la cicatrización de estos vasos sanguíneos causa daños irreversibles a los fotorreceptores y la pérdida rápida de visión si no se trata.

Tal como se usa en el presente documento, "retinopatía diabética proliferativa" significa un trastorno de los ojos que se caracteriza por la incompetencia de las paredes vasculares. En ciertos casos, la falta de oxígeno en la retina resulta en angiogénesis a lo largo de la retina y en el humor vítreo. En ciertos casos, los nuevos vasos sanguíneos sangran, nublan la visión, y destruyen la retina.

En ciertos casos, la proliferación de capilares le suministra nutrientes al tumor, permitiendo que el tumor se expanda. En ciertos casos, la proliferación de capilares permite la rápida eliminación de los desechos celulares permitiendo el crecimiento del tumor. En ciertos casos, la angiogénesis facilita la metástasis. En ciertos casos, la proliferación de capilares aumenta las posibilidades de que una célula cancerosa sea capaz de entrar en un vaso sanguíneo y por lo tanto establecer un nuevo tumor en un nuevo lugar.

Los ejemplos de tipos de cáncer que pueden ser tratados utilizando un complejo HC•HA descrito en este documento (por ejemplo, HC•HAn y/o HC•HArC) incluyen pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma de la corteza suprarrenal, cánceres relacionados con SIDA, linfoma relacionado con SIDA, cáncer anal, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, carcinoma, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer de esófago, tumor de células germinales extragonadales, cáncer ocular, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (TEGI), tumor de células germinales (extracraneal), tumor de células germinales (extragonadales), tumor de células germinales (ovario), tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma de las vías hipotalámica y visual, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (células renales), cáncer de laringe, Leucemia (linfoblástica aguda), leucemia (mieloide aguda), leucemia (linfocítica crónica), leucemia (mielógena crónica), cáncer de la cavidad oral y el labio, cáncer hepático, cáncer de pulmón (células no pequeñas), cáncer de pulmón (células pequeñas), linfoma, (células T cutáneas), linfoma (no Hodgkin), histiocitoma fibroso maligno óseo/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células de plasma, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno óseo, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer pancreático, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la pituitaria, neoplasma de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándula salival, sarcoma (de Kaposi), sarcoma (uterino), síndrome de Sezary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel (células de Merkel), cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), linfoma de células T, cáncer testicular, timoma, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico, cáncer gestacional, uretral, cáncer uterino, endometrial, sarcoma uterino, cáncer vaginal, glioma de las vías ópticas y del hipotálamo, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms, y similares.

#### Métodos de Producción

Se describen aquí métodos que implican técnicas biológicas. Tales técnicas se describen en tratados tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y colaboradores, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001; y Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel y colaboradores, Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 2003 (con actualizaciones periódicas). Se describen diversas técnicas convencionales para el cultivo de células animales en Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4a ed., R. Ian Freshney, Wiley-Liss, Hoboken, Nueva Jersey, 2000, y Animal Cell Culture Techniques (Springer Lab Manual), M. Clynos, Springer-Verlag, Nueva York, NY, 1998. Los métodos que implican análisis y

purificación de proteínas también se conocen en la técnica y se describen en *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*, 2da ed., Ian M. Rosenberg, Birkhauser, Nueva York, NY, 2004.

5 Se divulga en el presente documento, en ciertas realizaciones, un método de aislamiento de HC•HA a partir de material amniótico (por ejemplo, la membrana amniótica o la membrana coriónica) (HC•HAN). Preferiblemente, el material amniótico es material amniótico humano. En algunas realizaciones, el material amniótico es de membrana amniótica humana. En algunas realizaciones, el material amniótico de la membrana coriónica.

10 De acuerdo con la invención, un método de reconstituir un complejo HC•HA (HC•HAn que comprende proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) proteína de enlazamiento a HA (PEHA) fijada a un soporte estacionario; (ii) hialuronano (HA); (iii) cadenas pesadas de Iol (por ejemplo, HC1 y HC2) aisladas de suero; y (iv) proteína TSG-6, opcionalmente TSG-6 recombinante, tipo TSG-6, proteína tipo TSG-6 recombinante, o combinaciones de los mismos.

15 Preferiblemente se generan uno o más componentes por una pluralidad de células vivas.

#### A. Aislamiento y purificación de HC•HAN

20 Se describe también en el presente documento, un método de aislamiento de HC•HA a partir de material amniótico (por ejemplo, la membrana amniótica o la membrana coriónica) (HC•HAN). Preferiblemente, el material amniótico es material amniótico humano. En algunas realizaciones, el material amniótico es de membrana amniótica humana. En algunas realizaciones, el material amniótico es de la membrana coriónica humana.

25 En algunas realizaciones, HC•HAN es aislado de la membrana coriónica. En algunas realizaciones, el complejo HC•HAN purificado a partir de la membrana coriónica contiene una mayor relación de proteína:HA que HC•HAN aislado de MA (véase la Tabla 3 en el Ejemplo 12). En algunas realizaciones, HC•HAN aislado de la membrana coriónica ejerce actividad antiinflamatoria y antiangiogénica más fuerte que HC•HAN aislado de membrana amniótica. En algunas realizaciones, HC•HAN aislado de la membrana coriónica es 10 veces más efectivo que una actividad antiinflamatoria y antiangiogénica de HC•HAN aislado de membrana amniótica. En algunas realizaciones, HC•HAN aislado de la membrana coriónica es 15 veces más efectivo que una actividad antiinflamatoria y antiangiogénica de HC•HAN aislado de membrana amniótica. En algunas realizaciones, HC•HAN aislado de la membrana coriónica es 20 veces más efectivo que una actividad antiinflamatoria y antiangiogénica de HC•HAN aislado de membrana amniótica. En algunas realizaciones, HC•HAN aislado de la membrana coriónica es 25 veces más efectivo que una actividad antiinflamatoria y antiangiogénica de HC•HAN aislado de membrana amniótica. Para los datos experimentales que muestran una mayor eficacia véanse las Figuras 12 y 13 y el Ejemplo 13.

35 En algunas realizaciones, se procesa el material amniótico (por ejemplo, la membrana amniótica en polvo o la membrana coriónica en polvo) de tal manera que sea adecuado para la extracción del complejo HC•HAN. En algunas realizaciones, se purifica HC•HAN a partir del material amniótico procesado por cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, el complejo HC•HAN se purifica por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño, y de hidroxapatita), filtración por gel, centrifugación (por ejemplo, centrifugación en gradiente), o solubilidad diferencial, precipitación con etanol o por cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, segunda edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1987; Higgins, S.J. y Hames, B.D. (eds.), *Protein Expression: A Practical Approach*, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology* (Methods in Enzymology Series, vol 182), Academic Press, 1997.

40 En algunas realizaciones, el complejo HC•HAN se purifica mediante cualquier método adecuado o combinación de métodos. Las realizaciones descritas a continuación no pretenden ser exclusivos, solamente a modo de ejemplo.

50 En algunas realizaciones, el complejo HC•HAN se purifica por cromatografía de inmovinoafinidad. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-HC1, los anticuerpos anti-HC2, o ambos se generan y se fija a un soporte estacionario. En algunas formas de realización, el complejo HC•HAN sin purificar (es decir, la fase móvil) se pasa sobre el soporte. En ciertos casos, el complejo HC•HAN se enlaza a los anticuerpos (por ejemplo, a través de la interacción de (a) un anticuerpo HC1 y HC1, (b) un anticuerpo HC2 y HC2, o (c) ambos). En algunas realizaciones se lava el soporte (por ejemplo, con PBS) para eliminar cualquiera de las moléculas no enlazadas o enlazadas débilmente. En algunas realizaciones, se lava luego el soporte con una solución que permite la elución del complejo HC•HAN del soporte (por ejemplo, SDS al 1%, guanidina-HCl 6 M, o urea 8 M).

60 En algunas realizaciones, el complejo HC•HAN se purifica por cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, se genera HABP y se fija a un soporte estacionario. En algunas formas de realización, el complejo HC•HAN sin purificar (es decir, la fase móvil) se pasa sobre el soporte. En ciertos casos, el complejo HC•HAN se enlaza a HABP. En algunas realizaciones se lava el soporte (por ejemplo, con PBS) para eliminar cualquiera de las moléculas no enlazadas o débilmente enlazadas. En algunas realizaciones, se lava luego el soporte con una solución que permite la elución del complejo HC•HAN del soporte.

65 En algunas realizaciones, el complejo HC•HAN se purifica mediante una combinación de cromatografía de afinidad

HABP, y cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos anti-HCl, anticuerpos anti-HC2, o ambos.

A modo de ejemplo no limitante: se mezcla polvo de membrana amniótica (MA) con el regulador PBS frío sin inhibidores de proteasa en proporción 1:1 (g/ml). La mezcla se centrifuga a 48.000 x g a 4°C durante 30 min. El sobrenadante (extracto P) se disuelve en una mezcla de CsCl/guanidina HCl 4 M a la densidad inicial de 1,35 g/ml, y se centrifuga a 125.000 x g durante 48 h a 15°C. Se extrae el sobrenadante y se dializa contra agua destilada para eliminar el CsCl y la guanidina HCl. Se mezcla el dializado con 3 volúmenes de etanol al 95% (v/v) que contiene acetato de potasio al 1,3% (p/v) a 0°C durante 1 h. Después de centrifugación a 15.000 x g, se lava el sedimento con etanol al 70% (v/v) y se centrifuga. El sedimento se secó brevemente al aire, y se almacena a -80°C.

A modo de ejemplo no limitante: se mezcla polvo de membrana amniótica (MA) con el regulador PBS frío sin inhibidores de proteasa en proporción 1:1 (g/ml). La mezcla se centrifuga a 48.000 x g a 4°C durante 30 min. El sobrenadante (extracto P) se disuelve en una mezcla de CsCl/guanidina HCl 4 M a la densidad inicial de 1,35 g/ml, y se centrifuga a 125.000 x g durante 48 h a 15°C. Se recolectan un total de 15 fracciones (0,8 ml/fracción) desde la parte superior a la parte inferior de cada tubo. Además de la densidad, se mide la concentración de proteínas y HA en cada fracción mediante el ensayo de proteínas BCA y el kit de ensayo cuantitativo de HA, respectivamente. Se reúnen las fracciones # 8-15, que contienen HA pero no proteínas detectables, se ajusta con CsCl/ guanidina HCl 4 M a la densidad inicial de 1,40 g/ml, se centrifuga, y se fracciona en la misma forma que la descrita anteriormente. Las fracciones # 3-15 que contenían HA pero no proteínas detectables, se reúnen y se dializan frente a agua destilada para eliminar CsCl y guanidina HCl. Se mezcla el dializado con 3 volúmenes de etanol al 95% (v/v) que contiene acetato de potasio al 1,3% (p/v) en 0°C durante 1 h. Después de centrifugación a 15.000 x g, se lava el sedimento con etanol al 70% (v/v) y se centrifuga. El sedimento se seca brevemente al aire y se almacena a -80°C.

A modo de ejemplo no limitante: se mezcla polvo de membrana coriónica (MC) con el regulador PBS frío sin inhibidores de proteasa en proporción 1:1 (g/ml). La mezcla se centrifuga a 48.000 x g a 4°C durante 30 min. El sobrenadante (extracto P) se disuelve en una mezcla de CsCl/guanidina HCl 4 M a la densidad inicial de 1,35 g/ml, y se centrifuga a 125.000 x g durante 48 h a 15°C. Se extrae el sobrenadante y se dializa contra agua destilada para eliminar el CsCl y la guanidina HCl. Se mezcla el dializado con 3 volúmenes de etanol al 95% (v/v) que contiene acetato de potasio al 1,3% (p/v) a 0°C durante 1 h. Después de centrifugación a 15.000 x g, se lava el sedimento con etanol al 70% (v/v) y se centrifuga. El sedimento se secó brevemente al aire, y se almacena a -80°C.

B. Producción del biorreactor de un complejo HC•HArc sin el uso de células vivas

Los métodos para producir complejo HC-HA reconstituido (HC•HArc) se exponen en la reivindicación 1.

Las cadenas pesadas de Ial se aíslan a partir de suero. En algunas realizaciones, las cadenas pesadas de Ial no se aíslan a partir de suero.

En algunas realizaciones, se aísla proteína TSG6 o de tipo TSG-6 a partir de una célula o de una pluralidad de células (por ejemplo, un extracto de tejido). En algunas realizaciones, no se aísla proteína TSG6 o de tipo TSG-6 a partir de una célula o de una pluralidad de células (por ejemplo, un extracto de tejido). En algunas realizaciones, se prepara proteína TSG6 o de tipo TSG-6 mediante tecnología recombinante.

En algunas realizaciones, se pone en contacto HA (por ejemplo, HA de APM) con HCl y HC2 de Ial (por ejemplo, a partir de suero no purificado o purificado a partir de suero; y TSG-6. En algunas realizaciones, se pone en contacto HA (por ejemplo, HA de APM) con HCl y HC2 de Ial (por ejemplo, a partir de suero no purificado o purificado a partir de suero); y TSG-6 recombinante (por ejemplo, TSG-6Q). En algunas realizaciones, se pone en contacto HA (por ejemplo, HA de APM) con HCl y HC2 de Ial (por ejemplo, a partir de suero no purificado o purificado a partir de suero); y proteína de tipo TSG-6. En algunas realizaciones, se pone en contacto HA (por ejemplo, HA de APM) con (a) cadenas pesadas de Ial (por ejemplo, HCl y HC2; a partir de suero no purificado o purificado a partir de suero); y (b) proteína TSG-6, TSG-6 recombinante, de tipo TSG-6, de tipo TSG-6 recombinante o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el contacto se produce durante al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 60 horas, o al menos 72 horas.

El método comprende proteína de enlace a HA (HABP) fijada a un soporte estacionario (por ejemplo, mediante entrecruzamiento). En algunas formas de realización, se pone en contacto el soporte estacionario que comprende HABP con HA (por ejemplo, HA de APM), una cadena pesada de Ial y una proteína catalítica HC•HArc seleccionada de TSG-6, TSG-6 recombinante, de tipo TSG-6, de tipo TSG-6 recombinante, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el contacto se produce durante al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 60 horas, o al menos 72 horas. En algunas realizaciones, se lava el soporte estacionario para eliminar cualquier componente no enlazado.

En algunas realizaciones, el complejo HC•HArc se purifica mediante cualquier método adecuado o combinación de métodos. Las realizaciones descritas a continuación no pretenden ser exclusivas, solamente a modo de ejemplo.

En algunas realizaciones, el complejo HC•HArc se purifica por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio

iónico, afinidad, exclusión por tamaño, y de hidroxapatita), filtración en gel, centrifugación (por ejemplo, centrifugación en gradiente), o solubilidad diferencial, precipitación con etanol o mediante cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, segunda edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1987; Higgins, S.J. y Hames, B.D. (eds.), *Protein Expression: A Practical Approach*, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, vol 182)*, Academic Press, 1997.

En algunas realizaciones, el complejo HC•HArC se purifica por cromatografía de inmovinoafinidad. En algunas realizaciones, se generan anticuerpos anti-HCl, anticuerpos anti-HC2, o ambos y se fijan a un soporte estacionario. En algunos formas de realización, el complejo HC•HArC sin purificar (es decir, la fase móvil) se pasa sobre el soporte. En ciertos casos, el complejo HC•HArC se enlaza a los anticuerpos (por ejemplo, a través de la interacción de (a) un anticuerpo HCl y HCl, (b) un anticuerpo HC2 y HC2, o (c) ambos). En algunas realizaciones se lava el soporte (por ejemplo, con PBS) para eliminar cualquier molécula no enlazada o débilmente enlazada. En algunas realizaciones, se lava luego el soporte con una solución que permite la elución del complejo HC•HArC del soporte (por ejemplo, SDS al 1%, guanidina-HCl 6 M, o urea 8 M).

En algunas realizaciones, el complejo HC•HArC se purifica mediante cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, se genera HArC y se fija a un soporte estacionario. En algunas realizaciones, el complejo HC•HArC sin purificar (es decir, la fase móvil) se pasa sobre el soporte. En ciertos casos, el complejo HC•HArC se enlaza a HArC. En algunas realizaciones se lava el soporte (por ejemplo, con PBS) para eliminar cualquier molécula no enlazada o débilmente enlazada. En algunas formas de realización, se lava luego el soporte con una solución que permite la elución del complejo HC•HArC del soporte.

En algunas realizaciones, el complejo HC•HArC se purifica mediante una combinación de cromatografía de afinidad de HArC, y cromatografía de inmovinoafinidad usando anticuerpos anti-HCl, anticuerpos anti-HC2, o ambos.

#### C. Producción del biorreactor de un complejo de HC•HArC mediante el uso de células vivas

Se divulga en el presente documento, en ciertas realizaciones, un método de reconstituir un complejo HC•HArC como se expone en la reivindicación 1 mediante el uso de células vivas. Se generan o expresan uno o más componentes mediante una pluralidad de células en un biorreactor.

En algunas realizaciones, el método comprende HA que se obtiene a través de un proveedor comercial. En algunas realizaciones, el método comprende HA que se genera por una pluralidad de células en un biorreactor. En algunas realizaciones, la pluralidad de células genera constitutivamente HA. En algunas realizaciones, la pluralidad de células expresa constitutivamente HAS1, HAS2, HAS3, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de células se pone en contacto con al menos un factor que se sabe que sobrerregula HAS1, HAS2, HAS3, o una combinación de los mismos.

De acuerdo con la invención, el método comprende una cadena pesada de I<sub>H</sub> aislada de suero.

En algunas realizaciones, el método comprende proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 que se aísla a partir de una célula o una pluralidad de células (por ejemplo, un extracto de tejido). En algunas realizaciones, el método comprende proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 que no se aísla de una célula o una pluralidad de células (por ejemplo, un extracto de tejido). En algunas realizaciones, el método comprende proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 que se expresa mediante una pluralidad de células en un biorreactor. En algunas realizaciones, la pluralidad de las células genera constitutivamente proteína TSG-6 o de tipo TSG-6. En algunas realizaciones, la pluralidad de células constitutivamente expresa proteína TSG-6 o de tipo TSG-6. En algunas realizaciones, se pone en contacto la pluralidad de células con al menos un factor que se sabe que sobrerregula proteína TSG-6 o de tipo TSG-6.

#### Expresión constitutiva

En algunas realizaciones, una célula que expresa constitutivamente proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 se genera mediante cualquier método adecuado. En algunas formas de realización, una célula que expresa constitutivamente proteína TSG-6 o de tipo TSG-6 se genera mediante la introducción de mutaciones puntuales en el gen que codifica proteína TSG-6 o de tipo TSG-6. En algunas realizaciones, las mutaciones son mutaciones por sustitución, mutaciones por supresión o mutaciones por inserción.

En algunas realizaciones, se produce una célula que genera constitutivamente HA por cualquier método adecuado. En algunos formas de realización, una célula que genera constitutivamente HA se produce mediante la introducción de mutaciones puntuales en un gen que codifica HAS1, HAS2, HAS3, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las mutaciones son mutaciones por sustitución, mutaciones por supresión, o mutaciones por inserción. En algunas realizaciones, se produce una célula que genera constitutivamente HA por contacto de la célula con al menos un factor que se sabe que sobrerregula HAS1, HAS2, HAS3, o una combinación de los mismos.

#### Generación de líneas celulares

5 En algunas realizaciones, la pluralidad de células comprende células de mamífero. En algunas realizaciones, la pluralidad de células comprende células CHO derivadas de ovario de hámster chino; células HeLa humanas; células HEK293; células epiteliales amnióticas; células mesenquimales estromales amnióticas; o combinaciones de las mismas.

10 En algunas realizaciones, una secuencia génica de interés se clona en un vector de expresión adecuado que después se inserta en una célula huésped. En algunas realizaciones, el vector es pMSG, o pcDNA3.1(+). En algunas realizaciones, la célula huésped se transforma con el vector mediante el uso del método de fosfato de calcio, el método con DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación. En algunas realizaciones, se clona una secuencia génica de interés en un vector de expresión adecuado que después se inserta en el genoma de las células. En algunas realizaciones, el vector es un retrovirus, lentivirus, un adenovirus, o una combinación de los mismos.

15 En algunas realizaciones, la pluralidad de células comprende células bacterianas (por ejemplo, E. coli). En algunas realizaciones, una secuencia génica de interés se clona en un vector de expresión adecuado que después se inserta en una célula huésped. En algunas realizaciones, el huésped es una célula bacteriana. En algunas realizaciones, el vector es pET-3 o pGEX-1. En algunas realizaciones, la célula huésped se transforma con el vector por electroporación o el método de Hanahan. En algunas realizaciones, una secuencia génica de interés se clona en un vector de expresión adecuado que después se inserta en el genoma de las células. En algunas realizaciones, el vector es un retrovirus, lentivirus, un adenovirus, o una combinación de los mismos.

20 En algunas realizaciones, la pluralidad de células comprende células de levadura. En algunas realizaciones, una secuencia génica de interés se clona en vectores de expresión adecuados que a continuación se insertan en una célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped se transforma con el vector mediante métodos de fusión de esferoplastos o acetato de litio. En algunas realizaciones, una secuencia génica de interés se clona en un vector de expresión adecuado que después se inserta en el genoma de las células. En algunas realizaciones, el vector es un retrovirus, lentivirus, un adenovirus, o una combinación de los mismos.

25 En algunas realizaciones, el método comprende además la confirmación de la expresión de la secuencia génica de interés. En algunas realizaciones, se utiliza cualquier método adecuado. En algunos métodos se usa inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia, SDS-PAGE, transferencias tipo Western, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), ensayos de actividad biológica o cromatografía de afinidad.

#### Cultivos iniciadores

35 En algunas realizaciones, se cultiva una pluralidad de células descritas anteriormente mediante cualquier método adecuado.

40 En algunas realizaciones, se expanden primero las células en un cultivo iniciador (por ejemplo, 110 mL de cultivo, durante la noche). En algunas realizaciones, se cultivan las células en F10 de Ham (Sigma), medio basal (BEM), medio esencial mínimo (MEM), RPMI-1640, medio hormonal que sirve de complemento (SHEM), o medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). En algunas realizaciones, un cultivo de células comprende además suero (por ejemplo, suero de ternera fetal, suero de ternera recién nacida, sueros humanos, sueros equinos). En algunas realizaciones, se agita un cultivo celular para aumentar la oxigenación del medio y la dispersión de nutrientes a las células.

45 En algunas realizaciones, se pasan las células varias veces en biorreactores de mayor volumen antes de colocar las células en el biorreactor de producción. En algunas realizaciones, se pasan las células al biorreactor siguiente que aún en contacto con el medio en el que se hicieron crecer previamente las células. En algunas realizaciones, se retiran las células del medio, por ejemplo, mediante centrifugación a baja velocidad antes de ser pasadas al biorreactor siguiente.

50 En algunas realizaciones, se lavan las células con medio fresco antes de sembrar en el siguiente biorreactor para eliminar cualquiera de los productos metabólicos de desecho o componentes del medio no deseados. En algunas realizaciones, el medio es el mismo en cada biorreactor. En algunas realizaciones, los medios varían entre los diferentes biorreactores.

55 En algunas realizaciones, las células expandidas de un biorreactor se diluyen antes de ser añadidas al biorreactor siguiente. En algunas realizaciones, la densidad celular de partida para el biorreactor de producción es de aproximadamente  $2 \times 10^2$  células viables por mL hasta aproximadamente  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  o  $10 \times 10^6$  células viables por mL y mayores.

#### Biorreactor de producción

60 En algunas realizaciones, se mantiene un cultivo celular en la fase inicial de crecimiento en condiciones que conducen a la supervivencia, crecimiento y viabilidad del cultivo celular. Las condiciones ambientales necesarias variarán dependiendo del tipo celular, del organismo del que se deriva la célula, y la naturaleza y carácter de los polipéptidos expresados, HA, y el complejo HC•HArc.

65 En algunas realizaciones, la temperatura del cultivo celular en la fase inicial de crecimiento se seleccionará con base

principalmente en el rango de temperaturas a las que sigue siendo viable el cultivo celular. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento inicial, las células CHO crecen bien a 37°C. En algunas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 42°C. En algunas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 35°C a 40°C.

5 En algunas realizaciones, la temperatura de la fase inicial de crecimiento se mantiene a una única temperatura, constante. En algunas realizaciones, la temperatura de la fase inicial de crecimiento se mantiene dentro de un rango de temperaturas. En algunas realizaciones, se aumenta o disminuye la temperatura durante la fase de crecimiento inicial. En algunas realizaciones, se aumenta o disminuye la temperatura durante la fase de crecimiento inicial de manera constante. En algunas realizaciones, la temperatura se aumenta o disminuye en cantidades discretas a diversos tiempos durante la fase de crecimiento inicial.

15 En algunas realizaciones, se cultivan las células durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables que es un porcentaje dado de la densidad máxima de células viables que las células eventualmente alcanzarían si se dejan crecer sin perturbación. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables deseada de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad máxima de células viables.

20 En algunas realizaciones, las células se cultivan durante un período de tiempo definido, independientemente de su densidad. En algunas realizaciones, las células se cultivaron durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante un mes.

25 En algunas realizaciones, el cultivo celular se agita durante la fase de cultivo inicial a fin de incrementar la oxigenación y la dispersión de los nutrientes a las células.

Cambio de las condiciones de cultivo

30 Después de lograr la densidad celular deseada (o el final del tiempo de crecimiento prescrito), en algunas realizaciones se cambia al menos una de las condiciones de cultivo. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo se modifican cambiando la temperatura del cultivo. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo se modifican al cambiar la osmolaridad del cultivo. Por otro lado, en algunas realizaciones, se impide que cambien las condiciones de cultivo a condiciones no deseadas, por ejemplo, al mantener el pH de la condición de cultivo en o alrededor de condiciones neutras, y si es necesario para evitar un cambio a un pH alcalino (que tiene el potencial de romper los enlaces covalentes entre HA y HC).

35 En algunas realizaciones, el cambio de condiciones es gradual. En algunas realizaciones, el cambio de condiciones se produce durante varias horas. En algunas realizaciones, el cambio de condiciones se produce durante alrededor de 24 horas. En algunas realizaciones, el cambio de condiciones se produce durante varios días. En algunas realizaciones, el cambio de condiciones es abrupto. En algunas realizaciones, el cambio de condiciones se produce en menos de aproximadamente una hora.

Fase de Producción

45 En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo celular durante la fase de producción están determinadas por a) las condiciones en las que el cultivo celular permanece viable b) las condiciones en las que la pluralidad de células (i) expresa proteína TSG-6 o de tipo TSG-6; o (ii) genera HA y c) las condiciones en las cuales se forma el complejo HC•HARC divulgado en este documento (por ejemplo, a niveles comercialmente adecuados).

50 En algunas realizaciones, se agita el cultivo durante la fase de producción con el fin de incrementar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células.

Supervisión de las condiciones de cultivo

55 En algunas realizaciones, se supervisan las condiciones del cultivo celular para asegurar que se produzca un complejo HC•HARC divulgado en este documento en niveles óptimos. En algunas realizaciones, se retiran pequeñas alícuotas del cultivo para análisis. Como ejemplo no limitante, se hace seguimiento a la temperatura, el pH, la densidad celular, la viabilidad celular, la densidad integrada de células viables, los niveles de lactato, los niveles de amonio, la osmolaridad, o el título de un complejo HC•HARC divulgado en este documento.

60 Se supervisan las condiciones del cultivo por cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, la densidad celular se mide usando un hemocitómetro, un contador Coulter, o un examen de densidad celular (CEDEX). En algunas realizaciones, la densidad de células viables se determina mediante la tinción de una muestra de cultivo con azul de tripano. En algunas realizaciones, se supervisan los niveles de lactato, de amonio o de un complejo HC•HARC divulgado en este documento mediante el uso de HPLC. En algunas realizaciones, se determina el nivel de un complejo HC•HARC divulgado en este documento por tinción de Coomassie de geles de SDS-PAGE, transferencia tipo Western, ensayos de Bradford, ensayos de Lowry, ensayos de Biuret, y absorbancia UV.

Aislamiento del complejo HC•Harc obtenido mediante el uso de células vivas

5 En algunas realizaciones, se aísla del cultivo celular y purifica un complejo HC•Harc divulgado en este documento. En algunas formas de realización, se aísla un complejo HC•Harc divulgado en este documento de las células del cultivo y de cualesquiera otros sólidos por centrifugación o filtración. En algunas formas de realización, se aísla un complejo HC•Harc divulgado en este documento de las células del cultivo y de cualesquiera otros sólidos mediante la eliminación de los medios y la lisis de las células. La lisis de las células se realiza mediante cualquier método adecuado.

10 En algunas realizaciones, el complejo HC•Harc se purifica mediante cualquier método adecuado o combinación de métodos. Las realizaciones descritas a continuación no pretenden ser exclusivas, solamente a modo de ejemplo.

15 En algunas realizaciones, se purifica un complejo HC•Harc divulgado en este documento por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño, y de hidroxapatita), filtración en gel, centrifugación, o solubilidad diferencial, precipitación con etanol o mediante cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification Principles and Practice, segunda edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1987; Higgins, S.J. y Hames, B.D. (eds.), Protein Expression: A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, vol 182), Academic Press, 1997.

20 En algunas realizaciones, se purifica un complejo HC•Harc divulgado en este documento por cromatografía de inmunoafinidad. En algunas realizaciones, se generan los anticuerpos anti-HC1, los anticuerpos anti-HC2, o ambos o HABP y se fijan a un soporte estacionario. En algunas realizaciones, el complejo HC•Harc (es decir, la fase móvil) se pasa sobre el soporte. En ciertos casos, el complejo HC•Harc se enlaza a los anticuerpos. En algunas realizaciones se lava el soporte (por ejemplo, con PBS) para eliminar cualquiera de las moléculas no enlazadas o enlazadas débilmente. En algunas realizaciones, se lava luego el soporte con una solución que permite la elución de un complejo HC•Harc divulgado en este documento del soporte (por ejemplo, SDS al 1%, guanidina-HCl 6 M, o urea 8 M).

30 En algunas realizaciones, un complejo HC•Harc divulgado en este documento comprende una etiqueta de afinidad. En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad es una secuencia de una capa de influenza, poli-histidina, o una secuencia de glutatión-S transferasa. En algunas realizaciones, el ligando para la etiqueta de afinidad está fijado al soporte estacionario. En algunas realizaciones, el complejo HC•Harc sin purificar se pasa sobre el soporte. En ciertos casos, el complejo HC•Harc se enlaza al ligando. En algunas realizaciones se lava el soporte (por ejemplo, con PBS) para eliminar cualquiera de las moléculas no enlazadas o enlazadas débilmente. En algunas realizaciones, se lava luego el soporte con una solución que permite la elución de un complejo HC•Harc divulgado en este documento del soporte.

35 En algunas realizaciones, el complejo HC•Harc se purifica mediante una combinación de cromatografía de afinidad de HABP, y cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos anti-HC1, anticuerpos anti-HC2, o ambos.

40 En algunas realizaciones, se añaden inhibidores de proteasa (por ejemplo, fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina) para reducir o eliminar la degradación del complejo HC•Harc durante el proceso de purificación. Se desean particularmente los inhibidores de proteasa cuando se deben lisar las células.

45 IV. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de una forma convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que incluyen excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de un complejo HC•HA en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida. Se pueden usar adecuadamente cualquiera de las técnicas bien conocidas, portadores y excipientes y como se entiende en la técnica. Un resumen de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento puede ser hallado, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, novena Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania 1975; Liberman, H.A. y Lachman, L., Eds, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, NY., 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, séptima Ed. (Lippincott Williams & Wilkins; 1999).

55 Se divulgan en este documento, en ciertas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•Harc) divulgado en este documento.

60 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante, excipiente, conservante, agente para retrasar la absorción, relleno, aglutinante, adsorbente, regulador y/o agente solubilizante.

Formas de dosificación

65 En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•Harc) como una suspensión acuosa. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende un edulcorante

- 5 o agente saborizante, materias colorantes o tintes y, si se desea, agentes emulsionantes o agentes de suspensión, junto con los diluyentes agua, etanol, propilenglicol, glicerina, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende un agente de suspensión. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y/o goma de acacia. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende un agente dispersante o humectante. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende un fosfátido de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilen-oxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilén sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilén sorbitol. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende un conservante. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende de etil, o n-propil p-hidroxibenzoato. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende un agente edulcorante. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa comprende sacarosa, sacarina o aspartame.
- 10 En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) como una suspensión oleosa. En algunas realizaciones, se formula una suspensión oleosa mediante la suspensión del ingrediente activo en un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco), o en aceite mineral (por ejemplo, parafina líquida). En algunas realizaciones, una suspensión oleosa comprende un agente espesante (por ejemplo, cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico). En algunas realizaciones, una suspensión oleosa comprende agentes edulcorantes (por ejemplo, aquellos indicados anteriormente). En algunas realizaciones, una suspensión oleosa comprende un antioxidante (por ejemplo, hidroxianisol butilado o alfa-tocoferol).
- 15 En algunas realizaciones, se formula un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) divulgado en este documento para inyección parenteral (por ejemplo, a través de inyección o infusión, incluyendo intraarterial, intracardiaca, intradérmica, intraduodenal, intramedular, intramuscular, intraósea, intraperitoneal, intratecal, intravascular, intravenosa, intravítrea, epidural y/o subcutánea). En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) como una solución, suspensión o emulsión estéril.
- 20 En algunas realizaciones, una formulación para administración parenteral incluye soluciones para inyección acuosas y/o no acuosas (oleosas) estériles de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) que puede contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos y/o solutos que vuelven a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y/o suspensiones estériles acuosas y/o no acuosas que pueden incluir un agente de suspensión y/o un agente espesante. En algunas realizaciones, una formulación para administración parenteral incluye estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.
- 25 En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) como una suspensión acuosa. En algunas realizaciones, una suspensión acuosa que comprende agua, solución de Ringer y/o solución isotónica de cloruro de sodio.
- 30 En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) como una emulsión micro de agua en aceite en donde se disuelve el ingrediente activo en la fase oleosa. En algunas realizaciones, se disuelve un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) en un aceite graso (por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, (por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. En algunas realizaciones, se disuelve un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) en una mezcla de aceite de soja y/o lecitina. En algunas realizaciones, se introduce la solución oleosa en una mezcla de agua y glicerol y se procesa para formar una microemulsión.
- 35 En algunas realizaciones, se administra una composición formulada para administración parenteral como una sola inyección en bolo. En algunas realizaciones, se administra una composición formulada para administración parenteral a través de un dispositivo de administración intravenosa continua (por ejemplo, una bomba intravenosa modelo 5400 Deltec CADD-PLUS<sup>MR</sup>).
- 40 En algunas realizaciones, se presenta una formulación para inyección en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes para múltiples dosis, con un conservante añadido. En algunas realizaciones, se almacena una formulación para inyección en forma de polvo o en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua estéril libre de pirógenos, inmediatamente antes del uso.
- 45 En algunas realizaciones, se formula un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) divulgado en este documento para administración tópica. Las formulaciones tópicas incluyen, pero no se limitan a, ungüentos, cremas, lociones, soluciones, pastas, geles, barras, liposomas, nanopartículas. En algunas realizaciones, se administra una formulación tópica mediante el uso de un parche, vendaje o apósito para heridas.
- 50
- 55
- 60
- 65

En algunas realizaciones, una formulación tópica comprende un agente gelificante (o espesante). Los agentes gelificantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, celulosas, derivados de celulosa, éteres de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa), goma guar, goma xantana, goma de algarrobo, alginatos (por ejemplo, ácido algínico), silicatos, almidón, tragacanto, polímeros de carboxivinilo, carragenina, parafina, vaselina, acacia (goma arábica), agar, silicato de aluminio y magnesio, alginato de sodio, estearato de sodio, fucus, bentonita, carbómero, carragenina, carbopol, xantano, celulosa, celulosa microcristalina (CMC), ceratonia, Chondrus, dextrosa, furcellarano, gelatina, goma Gatti, goma guar, hectorita, lactosa, sacarosa, maltodextrina, manitol, sorbitol, miel, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma esterculia, polietilenglicol (por ejemplo, PEG 200-4500), goma tragacanto, etilcelulosa, etil hidroxietil celulosa, etil metil celulosa, metil celulosa, hidroxietil celulosa, hidroxietil metil celulosa, hidroxipropil celulosa, poli(metacrilato de hidroxietilo), oxipoligelatina, pectina, poligelina, povidona, carbonato de propileno, copolímero de metil vinil éter/anhídrido maleico (PVM/MA), poli(metacrilato de metoxietilo), poli(metacrilato de metoxietoxietilo), hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa sódica (CMC), dióxido de silicio, polivinilpirrolidona (PVP: povidona), o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, una formulación tópica divulgada en este documento comprende un emoliente. Los emolientes incluyen, pero no se limitan a, ésteres de aceite de ricino, ésteres de manteca de cacao, ésteres de aceite de cártamo, ésteres de aceite de semilla de algodón, ésteres de aceite de maíz, ésteres de aceite de oliva, ésteres de aceite de hígado de bacalao, ésteres de aceite de almendra, ésteres de aceite de aguacate, ésteres de aceite de palma, ésteres de aceite de sésamo, ésteres de escualeno, ésteres de aceite de Kikui, ésteres de aceite de soja, monoglicéridos acetilados, monoestearato de glicerilo etoxilado, laurato de hexilo, laurato de isohexilo, palmitato de isohexilo, palmitato de isopropilo, palmitato de metilo, oleato de decilo, oleato de isodecilo, estearato de hexadecilo, estearato de decilo, isoestearato de isopropilo, isoestearato de metilo, adipato de diisopropilo, adipato de diisohexilo, adipato de dihexitildecilo, sebacato de diisopropilo, lactato de laurilo, lactato de miristilo, y lactato de cetilo, miristato de oleilo, estearato de oleilo, y oleato de oleilo, ácido pelargónico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido isoesteárico, ácido hidroxiesteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido ricinoleico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido erúcico, alcohol laurílico, alcohol miristílico, alcohol cetílico, alcohol hexadecílico, alcohol estearílico, alcohol isoestearílico, alcohol hidroxiestearílico, alcohol oleílico, alcohol ricinoleílico, alcohol behenílico, alcohol erucílico, alcohol 2-octil dodecanílico, lanolina y derivados de lanolina, cera de abejas, esperma de ballena, miristato de miristilo, estearato de estearilo, cera carnauba, cera de candelilla, lecitina y colesterol.

En algunas realizaciones, se formula un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) divulgado en este documento para administración a un ojo o un tejido relacionado con el mismo. Las formulaciones adecuadas para la administración a un ojo incluyen, pero no se limitan a, soluciones, suspensiones (por ejemplo, una suspensión acuosa), ungüentos, geles, cremas, liposomas, niosomas, farmacosomas, nanopartículas, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) para administración tópica a un ojo mediante rociado, lavado, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) a un ojo a través de una preparación inyectable de depósito.

Como se usa en este documento, un "preparación de depósito" es una formulación de liberación controlada que se implanta en un ojo o un tejido relacionado con el mismo (por ejemplo, la esclerótica) (por ejemplo en forma subcutánea, intramuscular, intravítrea, o debajo de la conjuntiva). En algunas realizaciones, se formula una preparación de depósito mediante la formación de matrices microencapsuladas (también conocidas como matrices microencapsuladas) de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) en polímeros biodegradables. En algunas realizaciones, se formula una preparación de depósito atrapando un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) en liposomas o microemulsiones.

Una formulación para administración a un ojo tiene una tonicidad oftálmicamente aceptable. En ciertos casos, el fluido lacrimal tiene un valor de isotonicidad equivalente al de una solución de cloruro de sodio al 0,9%. En algunas realizaciones, un valor de isotonicidad de aproximadamente 0,6% hasta aproximadamente 0,8% de equivalencia de cloruro de sodio es adecuado para la administración tópica a un ojo. En algunas realizaciones, una formulación para administración a un ojo divulgada en este documento tiene una osmolaridad de aproximadamente 200 hasta aproximadamente 600 mOsm/L. En algunas realizaciones, una formulación para administración a un ojo divulgada en este documento es hipotónica y por lo tanto requiere la adición de cualquier sustancia adecuada para alcanzar el rango de tonicidad adecuado. Las sustancias oftálmicamente aceptables que modulan la tonicidad incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, cloruro de potasio, tiosulfato de sodio, bisulfito de sodio y sulfato de amonio.

Una formulación para administración a un ojo tiene una transparencia oftálmicamente aceptable. Ejemplos de agentes clarificantes oftálmicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, Polisorbato 20, Polisorbato 80, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, una formulación para administración a un ojo comprende un potenciador de la viscosidad oftálmicamente aceptable. En algunas realizaciones, un potenciador de la viscosidad aumenta el tiempo que una

5 formulación divulgada en este documento se mantiene en un ojo. En algunas realizaciones, el aumento del tiempo que una formulación divulgada en este documento permanece en el ojo permite una mayor absorción y efecto del fármaco. Los ejemplos no limitantes de polímeros mucoadhesivos incluyen carboximetilcelulosa, carbómero (polímero de ácido acrílico), poli(metacrilato de metilo), poliacrilamida, policarbófilo, copolímero de ácido acrílico/acrilato de butilo, alginato de sodio y dextrano.

10 En algunas realizaciones, se administra o suministra una formulación para administración a un ojo a los segmentos posteriores de un ojo (por ejemplo, a la retina, la coroides, el vítreo y el nervio óptico). En algunas realizaciones, una formulación tópica para administración a un ojo divulgada en el presente documento para suministro a la parte posterior del ojo comprende un agente solubilizante, por ejemplo, un sulfato de glucano y/o una ciclodextrina. Los sulfatos de glucano que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, sulfato de dextrano, sulfato de ciclodextrina y sulfato de  $\beta$ -1,3-glucano, tanto naturales como sus derivados, o cualquier compuesto que pueda unirse temporalmente a y ser retenido en los tejidos que contienen factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), lo que mejora la estabilidad y/o solubilidad de un fármaco, y/o que mejora la penetración y la absorción oftálmica de una formulación tópica para administración a un ojo divulgada en este documento. Los derivados de ciclodextrina que pueden utilizarse como agente solubilizante incluyen, pero no se limitan a,  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, hidroxietil  $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil  $\gamma$ -ciclodextrina, hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina sulfatada,  $\alpha$ -ciclodextrina sulfatada, sulfobutil éter de  $\beta$ -ciclodextrina.

20 En algunas realizaciones, se formula un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) divulgado en este documento para administración rectal o vaginal. En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) como un supositorio. En algunas realizaciones, una composición adecuada para administración rectal se prepara mezclando un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. En algunas realizaciones, se prepara una composición adecuada para administración rectal mezclando un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) con manteca de cacao, gelatina glicerizada, aceites vegetales hidrogenados, mezclas de polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares o ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol.

#### 30 Dosis

35 La cantidad de composiciones farmacéuticas administradas dependerá en primer lugar del individuo que está siendo tratado. En los casos en los que se administran las composiciones farmacéuticas a un sujeto humano, la dosificación diaria normalmente será determinada por el médico que prescribe con una dosis que varía generalmente según la edad, el sexo, la dieta, el peso, el estado general de salud y la respuesta del individuo, la severidad de los síntomas del individuo, la indicación o condición precisa a tratar, la gravedad de la indicación o condición que se está tratando, el tiempo de administración, la vía de administración, la disposición de la composición, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la discreción del médico que hace la prescripción.

40 En algunas realizaciones, la dosis de un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) está entre aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal/día. En algunas realizaciones, la cantidad del complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) está en el intervalo de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 50 mg/kg/día. En algunas realizaciones, la cantidad de complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) es de aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 7 g/día. En algunas realizaciones, la cantidad de complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) es de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 7 g/día. En algunas realizaciones, la cantidad de complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) es de aproximadamente 0,02 hasta aproximadamente 5 g/día. En algunas realizaciones, la cantidad de complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) es aproximadamente de 0,05 hasta aproximadamente 2,5 g/día. En algunas realizaciones, la cantidad de complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) es de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1 g/día.

55 Un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) divulgado en el presente documento y las terapias de combinación se pueden administrar antes, durante o después de la aparición de una enfermedad o condición, y el momento de administración de la composición que contiene un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) puede variar. Así, por ejemplo, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) se utiliza como un tratamiento profiláctico y se administra continuamente a sujetos con una propensión a desarrollar condiciones o enfermedades con el fin de prevenir la aparición de la enfermedad o condición. Un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) se puede administrar a un sujeto durante o tan pronto como sea posible después de la aparición de los síntomas. La administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) puede ser iniciada dentro de las primeras 48 horas de la aparición de los síntomas, preferiblemente dentro de las primeras 24 horas de la aparición de los síntomas, más preferiblemente dentro de las primeras 6 horas de la aparición de los síntomas, y lo más preferiblemente dentro de las 3 horas de la aparición de los síntomas. La administración inicial puede ser a través de cualquier ruta práctica, tal como, por ejemplo, una inyección intravenosa, una inyección de bolo, infusión durante 5

minutos hasta aproximadamente 5 horas, una píldora, una cápsula, un parche transdérmico, administración bucal, y similares, o combinación de los mismos. Un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) se administra preferiblemente tan pronto como sea posible después de que se detecta la aparición o se sospecha de una enfermedad o condición, y durante un período de tiempo necesario para el tratamiento de la enfermedad, tal como, por ejemplo, desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 3 meses. La duración del tratamiento puede variar para cada sujeto, y puede ser determinado utilizando criterios conocidos. Por ejemplo, se puede administrar un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) o una formulación que contiene un complejo durante al menos 2 semanas, preferiblemente aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 5 años, y más preferiblemente aproximadamente 1 meses hasta 3 años.

En algunas realizaciones, un complejo HC•HA (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) divulgado en este documento se administra en una sola dosis, una vez al día. En algunas formas de realización, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) se administra en dosis múltiples, más de una vez por día. En algunas realizaciones un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) se administra dos veces al día. En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) se administra tres veces por día. En algunas realizaciones, un complejo HC•HA se administra cuatro veces por día. En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o RCHC•HA) se administra más de cuatro veces por día.

En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) se administra para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) se administra a un individuo que ya sufre de una enfermedad o condición, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad o condición. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad y el trascurso de la enfermedad o condición, la terapia previa, el estado de salud del individuo, el peso, y la respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante.

En aplicaciones profilácticas, un complejo HC•HA divulgado aquí (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) se administra a un individuo que está en riesgo de un trastorno particular. Tal cantidad se define como una "cantidad o dosis profilácticamente efectiva". En este uso, las cantidades precisas dependen también del estado de salud del individuo, peso, y similares.

En el caso en el que la condición del individuo no mejora, se administra crónicamente a discreción del médico un complejo HC•HA divulgado en el presente documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC), es decir, durante un período prolongado de tiempo, incluyendo toda la vida del individuo con el fin de mejorar o bien de controlar o limitar los síntomas de la enfermedad o condición del individuo.

En el caso en el que el estado de la persona no mejora, se administra de forma continua a discreción del médico un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC); alternativamente, la dosis de fármaco que se administra se puede reducir de forma temporal o suspender temporalmente por un cierto período de tiempo (es decir, un "descanso de los medicamentos"). La duración de suspensión del medicamento puede variar entre 2 días y 1 año, incluyendo a modo de ejemplo, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 15 días, 20 días, 28 días, 35 días, 50 días, 70 días, 100 días, 120 días, 150 días, 180 días, 200 días, 250 días, 280 días, 300 días, 320 días, 350 días o 365 días. La reducción de la dosis durante un descanso del medicamento puede ser de 10% - 100%, incluyendo, a modo de ejemplo solamente, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%.

Una vez se ha producido la mejora de las condiciones del individuo, se administra una dosis de mantenimiento si es necesario. Posteriormente, se puede reducir la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, en función de los síntomas, hasta un nivel en el que subsiste la mejoría de la enfermedad, trastorno o condición. Los individuos pueden, sin embargo, requieren un tratamiento intermitente a largo plazo por cualquier recurrencia de los síntomas.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede estar en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración única de dosis precisas. En una forma de dosificación unitaria, la formulación se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC). La dosis unitaria puede estar en la forma de un empaque que contiene cantidades discretas de la formulación. Ejemplos no limitantes son comprimidos o cápsulas empacados, y polvos en viales o ampollas. Las composiciones acuosas en suspensión pueden envasarse en contenedores que no pueden volver a cerrarse de una sola dosis. Alternativamente, se pueden usar recipientes que se pueden volver a cerrar de dosis múltiples, en cuyo caso es típico incluir un conservante en la composición. A modo de ejemplo solamente, las formulaciones para inyección parenteral pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, que incluyen, pero no se limitan a ampollas, o en recipientes para múltiples dosis, con un conservante añadido.

Las dosis diarias adecuadas para un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) son de aproximadamente 0,01 a 2,5 mg/kg por peso corporal. Una dosis diaria indicada en mamífero más grandes, incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, está en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg hasta

aproximadamente 100 mg, administrada convenientemente en dosis divididas, incluyendo, pero no limitado a, hasta cuatro veces al día o en forma de liberación prolongada. Formas de dosificación unitaria adecuadas para administración oral incluyen aproximadamente de 1 a 50 mg de ingrediente activo. Los rangos anteriores son una mera sugerencia, ya que el número de variables con respecto a un régimen de tratamiento individual es grande, y no son infrecuentes desviaciones considerables de estos valores recomendados. Tales dosificaciones se pueden alterar dependiendo de una cantidad de variables, no limitadas a la actividad de un complejo HC•HA utilizado (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC), la enfermedad o condición a tratar, el modo de administración, los requerimientos del sujeto individual, la gravedad de la enfermedad o condición que se está tratando, y el juicio del médico.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos regímenes terapéuticos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, incluyendo, pero no limitado a, la determinación de la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre DL<sub>50</sub> y DE<sub>50</sub>. Se prefieren los complejos HC•HA que exhiben altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosis para uso en humanos. La dosis de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE<sub>50</sub> con toxicidad mínima. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

#### VI. Combinaciones

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos aquí se utilizan en combinación con un segundo agente terapéutico. En algunas formas de realización, se administran un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) y un segundo agente terapéutico en la misma forma de dosificación. En algunas formas de realización, se administran un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) y un segundo agente terapéutico en formas de dosificación separadas.

En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) y un segundo agente terapéutico se administran al mismo tiempo (por ejemplo, simultáneamente, esencialmente simultáneamente o dentro del mismo protocolo de tratamiento).

En algunas realizaciones, se administran un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) y un segundo agente terapéutico, secuencialmente. En algunas realizaciones, se administra un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) antes o después del segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, el período de tiempo entre la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) y un segundo agente activo varía desde unos pocos minutos hasta varias horas, dependiendo de las propiedades de cada agente farmacéutico, tales como la potencia, solubilidad, biodisponibilidad, vida media en plasma y perfil cinético del agente farmacéutico. La variación circadiana de la concentración de la molécula objetivo también puede determinar el intervalo de dosis óptima. En algunas realizaciones, el tiempo entre la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) y un segundo agente activo es de aproximadamente menos de una hora, menos de un día, menos de una semana, o menos de un mes.

En algunas realizaciones, la coadministración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HARC) da como resultado el requerimiento de una menor dosis del complejo HC•HA que la requerida cuando se administra un complejo HC•HA solo. En algunas realizaciones, la coadministración de un segundo agente terapéutico da como resultado el requerimiento de una menor dosis del segundo agente que la requerida cuando se administra el segundo agente solo. Los métodos para determinar experimentalmente las dosis terapéuticamente efectivas de fármacos y otros agentes para uso en regímenes de tratamiento de combinación se describen en la literatura. Por ejemplo, el uso de dosificación metronómica, es decir, proporcionar dosis menores más frecuentes, con el fin de minimizar los efectos secundarios tóxicos, ha sido descrito ampliamente en la literatura. El tratamiento de combinación incluye además tratamientos periódicos que se inician y se detienen en diferentes ocasiones para ayudar en el manejo clínico del individuo.

En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico se selecciona a partir de agentes citotóxicos, agentes anti-angiogénesis y/o agentes antineoplásicos. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico se selecciona a partir de agentes alquilantes, antimetabolitos, epidofilotoxinas; enzimas antineoplásicas, inhibidores de la topoisomerasa, procarbazinas, mitoxantronas, complejos de coordinación de platino, modificadores de la respuesta biológica e inhibidores de crecimiento, agentes terapéuticos hormonales/antihormonales, factores de crecimiento hematopoyéticos, inhibidores de aromatasa, antiestrógenos, antiandrógenos, corticosteroides, agonistas de gonadorelina, agentes activos de microtúbulos, nitrosoureas, lípido o agentes dirigidos a proteína quinasa, IMiD, proteína o agentes dirigidos a lípido fosfatasa, agentes antiangiogénicos, inhibidores de Akt, inhibidores de IGF-I, moduladores de FGF3, inhibidores de mTOR, miméticos de Smac, inhibidores de HDAC, agentes que inducen la diferenciación celular, antagonistas del receptor de bradiquinina 1, antagonistas de angiotensina II, inhibidores de ciclooxigenasa, inhibidores de heparanasa, inhibidores de linfoquina, inhibidores de citoquina, inhibidores de IKK,

5 inhibidores de P38MAPK, inhibidores de HSP90, inhibidores de multiquinasa, bisfosfonato, derivados de rapamicina, inhibidores de la ruta antiapoptótica, agonistas de la ruta apoptótica, agonistas de PPAR, agonistas de RAR, inhibidores de isoformas de Ras, inhibidores de telomerasa, inhibidores de proteasa, inhibidores de metaloproteína, inhibidores de aminopeptidasa, activadores de SHIP-AQX-MN100, Humax-CD20 (ofatumumab), antagonistas de CD20, fusiones de la toxina difteria-IL2, o combinaciones de los mismos.

10 En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico se selecciona de ARRY-797, dacarbazina (DTIC), actinomicinas C2, C3, D, y F1, ciclofosfamida, melfalán, estramustina, maitansinol, rifamicina, estreptovaricina, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, detorrubicina, carminomicina, idarrubicina, epirubicina, esorubicina, mitoxantrona, bleomicinas A, A<sub>2</sub> y B, camptotecina, irinotecano, topotecano, 9-aminocamptotecina, 10,11-  
15 metilendioxicamptotecina, 9-nitrocamptotecina, bortezomib, temozolomida, TAS103, NPI0052, Combretastatina, Combretastatina A-2, Combretastatina A-4, calicheamicinas, neocarzinostatinas, eptilonas AB, C y variantes semisintéticas, Herceptina, Rituxan, anticuerpos CD40, asparaginasa, interleucinas, interferones, leuprolida, y pegaspargasa, 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, ptorafur, 5'-desoxifluorouridina, UFT, MITC, capecitabina S-1, dietilestilbestrol, tamoxifeno, toremefina, tolmudex, timitaq, flutamida, flouximesterona, bicalutamida, finasteride, estradiol, trioxifeno, dexametasona, acetato de leuproelina, estramustina, droloxifeno, medroxiprogesterona, acetato de megestrol, aminoglutetimida, testolactona, testosterona, dietilestilbestrol, hidroxiprogesterona, mitomicinas A, B y C, porfiromicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, tetraplato, platino-DACH, ormaplatino, talidomida, lenalidomida, CI-973, telomestatina, CHIR258, Rad 001, SAHA, tubacina, 17-AAG, sorafenib, JM-216, podofilotoxina, epipodofilotoxina, etopósido, tenipósido, Tarceva, Iressa, imatinib, miltefosina, Perifosina, aminopterina, metotrexato, metopterina, dicloro-  
20 metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, azatioprina, alopurinol, cladribina, fludarabina, pentostatina, 2-cloroadenosina, desoxicitidina, arabinósido de citosina, citarabina, azacitidina, 5-azacitosina, gemcitabina, 5-azacitosina-arabinósido, vincristina, vinblastina, vinorelbina, leurosina, leurosidina y vindesina, paclitaxel, taxotere y/o docetaxel.

25 En algunas realizaciones, el segundo agente activo es niacina, un fibrato, una estatina, un polipéptido mimético de Apo-A1 (por ejemplo, DF-4, Novartis), un sobrerregulador transcripcional de apoA-I, un inhibidor de ACAT, un modulador de CETP, antagonistas de los receptores de la glicoproteína (GP) IIb/IIIa, antagonistas del receptor de P2Y12, inhibidores de Lp-PLA2, un agente anti-TNF, un antagonista del receptor de IL-1, un antagonista del receptor de IL-2, un agente citotóxico, un agente inmunomodulador, un antibiótico, un bloqueador coestimulador de células T, un agente  
30 antirreumático modificador del trastorno, un agente agotador de células B, un agente inmunosupresor, un anticuerpo antilinfocito, un agente alquilante, un antimetabolito, un alcaloide vegetal, terpenoides, un inhibidor de la topoisomerasa, un antibiótico antitumoral, un anticuerpo monoclonal, una terapia hormonal (por ejemplo, inhibidores de aromataza), o combinaciones de los mismos.

35 En algunas realizaciones, el segundo ingrediente activo es la niacina, bezafibrato; ciprofibrato; clofibrato; gemfibrozilo; fenofibrato; DF4 (Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH<sub>2</sub>); DF5; RVX-208 (Resverlogix); avasimibe; sulfato de pactimiba (CS-505); CI-1011 (2,6-diisopropilfenil[[2, 4,6-triisopropilfenil]acetil]sulfamato); CI-976 (2,2-dimetil-N-(2,4,6-trimetoxifenil)dodecanamida); VULM1457 (1-(2,6-diisopropil-fenil)-3-[4-(4'-nitrofeniltio)fenil]urea); CI-976 (2,2-dimetil-N-(2,4,6-trimetoxifenil)dodecanamida); E-5324 (n-butil-N'-(2-(3-(5-etil-4-fenil-1H-imidazol-1-il)propoxi)-6-metilfenil)urea);  
40 HL-004 (N-(2,6-diisopropilfenil) tetradeciltioacetamida); KY-455 (N-(4,6-dimetil-1-pentilindolin-7-il) -2,2-dimetil-propanamida); FY-087 (N-[2-[N'-pentil-(6,6-dimetil-2,4-heptadiinil)amino]etil]-(2-metil-1-naftil-tio)acetamida); MCC-147 (Mitsubishi Pharma); F 12511 ((S)-2',3',5'-trimetil-4'-hidroxi-alfa-dodeciltioacetanilida); SMP-500 (Sumitomo Pharmaceuticals); CL 277082 (2,4-difluoro-fenil-N[[4-(2,2-dimetilpropil)fenil]metil]-N-(heptil)urea); F-1394 ((1s,2S)-2-[3-(2,2-dimetilpropil)-3-nonilureido]aminociclohexano-1-il-3-[N-(2,2,5,5-tetrametil-1,3-dioxano-4-carbonil)amino]propionato);  
45 CP-113818 (amida del ácido N-(2,4-bis(metil-tio)-6-metilpiridin-3-il)-2-(hexiltio)decanoico); YM-750; torcetrapib; anacetrapid; JTT-705 (Japan Tobacco/Roche); abciximab; eptifibatida; tirofiban; roxifiban; variabilin; XV 459 (N(3)-(2-(3-(4-formamidinofenil)isoxazolin-5-il)acetil)-N(2)-(1-butiloxicarbonil)-2,3-diaminopropionato); SR 121566A (ácido 3-[N-(4-[4-(aminoiminometil)fenil]-1,3-tiazol-2-il)-N-(1-carboximetilpiperid-4-il)amino]propiónico, triclorhidrato); FK419 (ácido (S)-2-acetilamino-3- [(R)- [1-[3-( piperidin-4-il) propionil] piperidin-3-il-carbonil] amino] propiónico trihidratado); clopidogrel; prasugrel; cangrelor; AZD6140 (AstraZeneca); MRS 2395 (3-(2-cloro-6-metilaminopurin-9-il)-2-(2,2-dimetilpropioniloximetilo)-propil éster del ácido 2,2-dimetil-propiónico); BX 667 (Berlex Biosciences); BX 048 (Berlex Biosciences); darapladib (SB 480848); SB-435495 (GlaxoSmithKline); SB-222657 (GlaxoSmithKline); SB-253514 (GlaxoSmithKline); alefacept, efalizumab, metotrexato, acitretina, isotretinoína, hidroxiurea, mofetil micofenolato, sulfasalazina, 6-tioguanina, Dovonex, Taclonex, betametasona, tazaroteno, hidroxicloroquina, sulfasalazina, etanercept, adalimumab, infliximab, abatacept, rituximab, trastuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD45 AFIN-12 (NCI), anticuerpo anti-B1 yodo-131 (Corixa Corp.), anticuerpo monoclonal anti-CD66 BW 250/183 (NCI, Hospital General de Southampton), anticuerpo monoclonal anti-CD45 (NCI, Baylor College of Medicine), anticuerpo anti-integrina an3 (NCI), BIW-8962 (BioWa Inc.), anticuerpo FC8 (NCI), anticuerpo muJ591 (NCI), anticuerpo monoclonal MN-14 indio In111 (NCI), anticuerpo monoclonal MN-14 itrio Y 90 (NCI), Anticuerpo Monoclonal F105 (NIAID), anticuerpo monoclonal RAV 12 (Raven Biotechnologies), CAT-192 (anticuerpo monoclonal anti-TGF-Beta1 humano, Genzyme), anticuerpo 3F8 (NCI), 177Lu-J591 (Weill Medical College de la Universidad de Cornell), TB-403 (BioInvent International AB), anakinra, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina A, leflunomida, d-penicilamina, amitriptilina o nortriptilina, clorambucilo, mostaza nitrogenada, prasterona, LJP 394 (abetimus sódico), LJP 1082 (La Jolla Pharmaceutical), eculizumab, belimumab, rhuCD40L (NIAID), epratuzumab, sirolimus, tacrolimus, pimecrolimus, talidomida, globulina antitumoral equina (Atgam, Pharmacia Upjohn), globulina antitumoral de conejo (Timoglobulina, Genzyme), Muromonab-CD3 (Oficina de la FDA para el Desarrollo de Productos Huérfanos), basiliximab, daclizumab, riluzol, cladribina, natalizumab, interferón beta-1b,

interferón beta-1a, tizanidina, baclofeno, mesalazina, asacol, pentasa, mesalamina, balsalazida, olsalazina, 6-mercaptopurina, AIN457 (anticuerpo monoclonal anti-IL-17, Novartis), teofilina, D2E7 (mAb anti-TNF humano de Knoll Pharmaceuticals), Mepolizumab (anticuerpo anti-IL-5, SB 240563), Canakinumab (anticuerpo anti-IL-1 Beta, NIAMS), anticuerpo receptor anti-IL-2 (Daclizumab, NHL-BI), CNTO 328 (anticuerpo anti-IL-6, Centocor), ACZ885 (anticuerpo monoclonal anti-interleuquina1beta completamente humano, Novartis), CNTO 1275 (anticuerpo monoclonal anti-IL-12 completamente humano, Centocor), (3S)-N-hidroxi-4-((4-[(4-hidroxi-2-butilil)oxi]fenil)sulfonil)-2,2-dimet-hil-3-tiomorfolina carboxamida (apratostat), golimumab (CNTO 148), Onercept, BG9924 (Biogen Idec), Certolizumab Pegol (CDP870, UCB Pharma), AZD9056 (AstraZeneca), AZD5069 (AstraZeneca), AZD9668 (AstraZeneca), AZD7928 (AstraZeneca), AZD2914 (AstraZeneca), AZD6067 (AstraZeneca), AZD3342 (AstraZeneca), AZD8309 (AstraZeneca), [ácido (1R)-3-metil-1- ((2S)-3-fenil-2-[(pirazin-2-ilcarbonil)amino]propanoil)amino)butil]borónico (Bortezomib), AMG-714 (anticuerpo monoclonal anti-IL-15 humano, Amgen), ABT-874 (anticuerpo monoclonal anti-IL-12, Abbott Labs.), MRA (Tocilizumab, un anticuerpo monoclonal receptor anti-IL-6, Chugai Pharmaceutical), CAT-354 (un anticuerpo monoclonal anti-interleuquina-13 humana, Cambridge Antibody Technology, MedImmune), aspirina, ácido salicílico, ácido gentísico, salicilato de magnesio colina, salicilato de colina, salicilato de magnesio colina, salicilato de colina, salicilato de magnesio, salicilato de sodio, diflunisal, carprofeno, fenoprofeno, fenoprofeno de calcio, flurobiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, nabutona, ketolorac, ketorolac trometamina, naproxeno, oxaprozina, diclofenaco, etodolac, indometacina, sulindac, tolmetina, meclofenamato, meclofenamato de sodio, ácido mefenámico, piroxicam, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, CS-502 (Sankyo), JTE- 522 (Japan Tobacco Inc.), L-745.337 (Almirall), NS398 (Sigma), betametasona (Celestone), prednisona (Deltasona), alclometasona, aldosterona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desoxicorticosterona, desonida, desoximetasona, desoxicortona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, flucolorolona, fludrocortisona, fludrocortida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortolona, fluorometolona, fluperolona, fluprednidenol, fluticasona, formocortal, formoterol, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarboato, prednisona, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, ulobetasol; cisplatino; carboplatino; oxaliplatino; mecloretamina; ciclofosfamida; clorambucilo; vincristina; vinblastina; vinorelbina; vindesina; azatioprina; mercaptopurina; fludarabina; pentostatina; cladribina; 5-fluorouracilo (5FU); flouxuridina (FUDR); arabinósido de citosina; metotrexato; trimetoprima; pirimetamina; pemetrexed; paclitaxel; docetaxel; etopósido; tenipósido; irinotecano; topotecano; amsacrina; etopósido; fosfato de etopósido; tenipósido; dactinomicina; doxorubicina; daunorubicina; valrubicina; idarubicina; epirubicina; bleomicina; plicamicina; mitomicina; trastuzumab; cetuximab; rituximab; bevacizumab; finasteride; goserelina; aminoglutetimida; anastrozol; letrozol; vorozol; exemestano; 4-androsteno-3,6,17-triona ("6-OXO"; 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD); formestano; testolactona; fadrozol, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un antibiótico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un agente antibacteriano. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromomicina, geldanmicina, herbimicina, loracarbef, ertapenem, doripenem, imipenem, cilastatina, meropenem, cefadroxil, cefazolina, cefalotina, cefalexina, cefaclor, cefamandol, ceftiofina, defprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuten, ceftizoxima, ceftriaxona, cefepima, ceftobiprol, teicoplanina, vancomicina, azitromicina, claritromicina, dritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina, aztreonam, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, metilicina, nafcilina, oxacilina, penicilina, piperacilina, ticarcilano, bacitracina, colistina, polimixina B, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovfloxacina, mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilimida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprima, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxtetraciclina, tetraciclina, arsfenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, linezolida, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampicina, tinidazol, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un antibiótico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un agente antiviral. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es aciclovir, famciclovir, valaciclovir, abacavir, aciclovir, adfovir, amantadina, amprenavir, arbidol., atazanavir, artipla, brivudina, cidofovir, combivir, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, fomvirsen, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, ganciclovir, gardasilo, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, inhibidores de la integrasa, interferones, incluyendo el interferón tipo III, el interferón de tipo II, el interferón tipo I, lamivudina, lopinavir, lovirida, MK-0518, maraviroc, moroxidina, nelfmavir, nevirapina, nexavir, análogos de nucleósidos, oseltamivir, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, estavudina, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir, zidovudina, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un antibiótico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un agente antifúngica. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es amrofilina, utenafina, naftifina, terbinafina, flucitazona, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol, clotrimazol, econazol, miconazol, oxiconazol, sulconazol, terconazol, tioconazol, nikomicina Z, caspofungina, micafungina, anidulafungina, anfotericina B, nistatina liposomal, pimelicina, griseofulvina, ciclopirox olamina, haloprogina, tolnaftato,

undecilinato, clioquinol, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un antibiótico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un agente antiparasitario. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es amitraz, amoscanato, avermectina, carbadox, dietilcarbimizina, dimetridazol, diminazeno, ivermectina, macrofilaricida, malatión, mitabán, oxamniquina, permetrina, praziquantel, prantel pamoato, selamectina, estibogluconato de sodio, tiabendazol, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) es administrado conjuntamente con un trasplante de tejido. En algunas formas de realización, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) se administra conjuntamente con un trasplante de células madre. En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) se administra conjuntamente con un trasplante de órgano.

En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) se administra simultáneamente (por ejemplo, simultáneamente, esencialmente simultáneamente o dentro del mismo protocolo de tratamiento) con un trasplante de tejido. En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) se administra antes o después de un trasplante de tejido. En algunas realizaciones, el período de tiempo entre la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) y el trasplante de tejido va desde un par de minutos a varias horas, dependiendo de las propiedades de cada agente farmacéutico, tal como la potencia, solubilidad, biodisponibilidad, vida media en plasma y perfil cinético del agente farmacéutico. La variación circadiana de la concentración molécula objetivo también puede determinar el intervalo óptimo de dosis. En algunas realizaciones, el tiempo entre la administración de un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) y un segundo agente activo es de aproximadamente menos de una hora, menos de un día, menos de una semana, o menos de un mes.

En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) es administrado conjuntamente con un trasplante de tejidos y un agente inmunosupresor. En algunas realizaciones, un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) se administra conjuntamente con un trasplante de tejido y un inhibidor de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus); un inhibidor de mTOR (sirolimus, everolimus); un agente antiproliferativo (azatioprina o ácido micofenólico); un corticosteroide (por ejemplo, prednisolona o hidrocortisona); un anticuerpo monoclonal receptor anti-IL-2R $\alpha$  (por ejemplo, basiliximab o daclizumab); anticuerpos policlonales anti-células T (por ejemplo, anti-timocito globulina (ATG) o anti-linfocito globulina (ALG)); o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, se recubre un tejido con un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc). En algunas realizaciones, se recubre una pluralidad de células madre con un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc). En algunas realizaciones, se recubre un órgano con un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc). En algunas realizaciones, el recubrimiento de un tejido con un complejo HC•HA divulgado en este documento evita que sobre un tejido actúe el sistema inmunológico del huésped.

En algunas realizaciones, se pone en contacto un órgano, tejido, o una pluralidad de células madre con un complejo HC•HA divulgado en este documento. En algunas realizaciones, se pone en contacto un órgano, tejido, o una pluralidad de células madre con una composición que comprende un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc). En algunas realizaciones, la composición tiene un pH de aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, la composición tiene un pH de 7,4. En algunas realizaciones, la composición comprende además potasio, magnesio, y Rafinosa. En algunas realizaciones, la composición comprende además al menos uno de adenosina, glutatina, alopurinol, y almidón de hidroxietilo. En algunas realizaciones, la composición es una solución UW complementada con un complejo HC•HA divulgado en este documento.

En algunas realizaciones, se pone en contacto el órgano, tejido o pluralidad de células madre con un complejo HC•HA divulgado en este documento (por ejemplo, HC•HAN y/o HC•HArc) durante aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, o aproximadamente 48 horas. En algunas realizaciones, el contacto se produce a una temperatura que protege a los tejidos y en acondicionamiento vascular (por ejemplo, por debajo de la temperatura ambiente). En algunas realizaciones, el contacto se produce a 4°C.

Ejemplos

Preparación de AME, y AMP

Todos los procedimientos para los materiales anteriores se llevan a cabo de forma aséptica.

Se lava la MA humana congelada obtenida a través de Bio-tissue (Miami, FL) 2-3 veces con PBS para eliminar el medio de almacenamiento. Para preparar AME, se pesa la MA (~ 10 mg/cm<sup>2</sup>), se transfiere a un tubo de centrifuga estéril de

50 ml y se centrifuga a 4°C durante 5 min a 5000 x g para eliminar el exceso de líquido. Se pesa la MA, se transfiere a una placa de Petri estéril de 100 mm o 150 mm, y se congela en la fase aérea de un recipiente con nitrógeno líquido durante 20 min antes de ser cortada en trozos pequeños con un bisturí desechable y se homogeniza con un Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) en PBS. Se mezcla el homogeneizado a 4°C durante 30 min y se centrifuga a 15.000 x g durante 30 min. Se recoge el sobrenadante, denominado como AME, y se almacena en alícuotas (0,5 ml) a -80°C.

Para preparar AMP liofilizado, se liofiliza AME mediante un SpeedVac (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY) a 4°C durante 4 h para eliminar el 89% del peso debido al agua y se almacena a -80°C.

#### Ejemplo 1 - Extracción secuencial de la MA

La MA criopreservada humana, obtenida a través de Bio-tissue, Inc. (Miami, FL), se cortó en trozos pequeños, se congeló en nitrógeno líquido, y se molió hasta un polvo fino mediante un BioPulverizer. Se mezcló el polvo con Regulador A (Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 1% (v/v)) en proporción 1:1 (g/ml) a 4°C durante 1 h. Se centrifugó la mezcla a 48.000 x g durante 30 min a 4°C y se almacenó el sobrenadante (Extracto A) a -80°C. Se lavó luego el sedimento tres veces con Regulador A antes de ser extraído con Regulador B (Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, NaCl 1 M, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 1% (v/v)) a 4°C durante 1 h. Después de la centrifugación, se almacenó el sobrenadante (Extracto B). Se lavó el sedimento restante con Regulador B antes de la adición de Regulador C (acetato de sodio 100 mM, pH 5,8, clorhidrato de guanidina 4 M, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 1%) a 4°C durante 24 h. Nuevamente después de la centrifugación, se almacenó el sobrenadante (Extracto C). Se complementaron los Reguladores A, B, y C con los siguientes inhibidores de proteasa y fosfatasa: cóctel inhibidor de proteasa (dilución 1:100 de acuerdo con la sugerencia del fabricante), PMSF 0,5 mM, fluoruro de sodio 50 mM, y vanadato de sodio 0,2 mM. Se determinaron las concentraciones de proteína en los extractos de MA mediante el kit de ensayo de proteína BCA, mientras que las concentraciones de HA mediante un kit de ensayo cuantitativo de HA con base en ELISA.

#### Ejemplo 2 - Purificación del complejo nativo (HC•HAN)

El procedimiento completo para la preparación de extractos de MA humana se llevó a cabo de forma aséptica para experimentos posteriores basados en el cultivo de células como se reportó recientemente. La mayoría de las etapas de preparación fueron las mismas descritas anteriormente con las siguientes modificaciones. Se mezcló el polvo de MA con el regulador PBS frío sin inhibidores de proteasa en proporción 1:1 (g/ml). Se centrifugó la mezcla a 48.000 x g a 4°C durante 30 min. El sobrenadante se denominó como Extracto P.

Se disolvió el Extracto P (preparado en PBS) en mezcla de CsCl/guanidina HCl 4 M a la densidad inicial de 1,35 g/ml, y se centrifugó a 125.000 x g durante 48 h a 15°C. Se recolectaron un total de 15 fracciones (0,8 ml/fracción) desde la parte superior hasta la parte inferior de cada tubo. Además de la densidad, se midió la concentración de proteínas y HA en cada fracción mediante el ensayo de proteínas BCA y el kit de ensayo cuantitativo de HA, respectivamente. Se reunieron las fracciones # 8-15, que contenían HA pero no proteínas detectables, se ajustó con CsCl/guanidina HCl 4 M a la densidad inicial de 1,40 g/ml, se centrifugó, y se fraccionó en la misma forma descrita anteriormente. Se reunieron las fracciones # 3-15, que contenían HA pero no proteínas detectables, y se dializaron contra agua destilada para eliminar CsCl y guanidina HCl. Se mezcló el dializado con 3 volúmenes de etanol al 95% (v/v) que contenía 1,3% (p/v) de acetato de potasio a 0°C durante 1 h. Después de centrifugación a 15.000 x g, se lavó el sedimento con etanol al 70% (v/v) y se centrifugó. Se secó el sedimento brevemente al aire, se almacenó a -80°C, y se denominó como el complejo HC•HAN.

#### Ejemplo 3 - Caracterización bioquímica del complejo covalente HC•HA y su asociación con TSG-6 en AME

Se obtuvo membrana amniótica de tres donantes distintos. Se extrajo la membrana amniótica secuencialmente con Reguladores A, B, y C, que consistían de concentraciones crecientes de sal (NaCl 0,15 M, NaCl 1,0 M, y guanidina HCl 4 M, respectivamente). Se utilizaron entonces el ensayo cuantitativo de HA basado en ELISA y el ensayo de proteína BCA para medir los niveles de HA y de proteína de estos 3 extractos.

El resultado mostró que HA estaba presente en todos, pero era en su mayoría (más de 70%) extraído por el Regulador A en el Extracto A soluble en agua, así como en AME, dando como resultado una proporción mucho mayor de HA/proteína, y tenía un PM promedio de  $6 \times 10^6$  Daltons (Da).

Ya que el inhibidor inter- $\alpha$  (I $\alpha$ I) es un inhibidor natural de HAasa, se confirmó la presencia de I $\alpha$ I en estroma de MA por inmunocoloración.

La transferencia tipo Western mostró que el I $\alpha$ I purificado (Fig. 1B, carril 2) consistía de una banda principal a ~250 kDa, que representa el I $\alpha$ I intacto, y varias bandas con PM más pequeños, que son presumiblemente productos de degradación del I $\alpha$ I. Sin tratamiento (Ninguno), el Extracto A contenía una banda correspondiente a I $\alpha$ I, pero también tenía una banda de APM, que como se muestra a continuación era un complejo formado por HA de APM y HC de I $\alpha$ I (complejo HC•HA), que no pudo entrar al gel debido a su gran tamaño, y otras dos bandas principales de 75 kDa

(correspondientes a una HC libre) y de 120 kDa (que consiste de una HC acoplada covalentemente ya sea a la bikunina o a TSG-6) (Fig. 1B, carril 3). Se observaron resultados similares en el Extracto C (Fig. 1B, carril 5), pero no en el Extracto B (Fig. 1B, carril 4). Para caracterizar mejor al complejo HC•HA, se utilizó HAasa para digerir HA en pequeños fragmentos para que HC pudiera entrar en el gel. La digestión con HAasa (Fig. 1B, carriles 6-8) eliminaron completamente un complejo HC•HA retenido en el pozo para producir una banda de HC de 75 kDa en los Extractos A, B y C. También se utilizaron NaOH 0,02 N durante 1 h para hidrolizar cualquier enlace éster formado entre HC y HA, y se observó que tal tratamiento causó una gran reducción de las bandas inmunorreactivas de IαI, con la excepción de la 120 especie de 120 kDa, y aumentó dramáticamente la intensidad de la banda de HC de 75 kDa. (Fig. 1B, carriles 9-11).

Se encontró un resultado similar en AME preparado por centrifugación a baja velocidad (15.000 x g, L) o a alta velocidad (48.000 x g, H) centrifugación (Fig. 1D).

#### Ejemplo 4 - Purificación bioquímica del complejo HC•HA de AME

Se utilizaron columnas de centrifugación Microcon con un corte de PM de 30, 50, o 100 kDa (Millipore, Billerica, MA) para obtener un "filtrado" y un "retenido" de AME. Se observó que se suprimió significativamente la actividad promotora de TGF-β1 por el retenido, pero no por el filtrado, de estos tres cortes de PM de hasta 100 kDa. Este resultado sugiere que se retuvo la actividad supresora en el complejo de APM mayor a 100 kDa.

Para probar esta hipótesis, se purificó un complejo HC•HA sometiendo AME a dos rondas sucesivas de ultracentrifugación con CsCl en presencia de guanidina HCl 4 M con la densidad inicial de 1,35 g/ml y 1,40 g/ml, respectivamente.

Después de ultracentrifugación, se subdividió cada tubo en un total de 15 fracciones (desde baja densidad hasta alta densidad) y supervisado por el ensayo cuantitativo de HA con base en ELISA y el ensayo de proteína BCA para HA y los contenidos de proteína, respectivamente. Se agruparon las fracciones que contenían HA, pero no las proteínas de estas dos rondas. Como resultado, se reunieron las fracciones # 8-15 de la primera ronda antes de someterlas a la segunda ronda. Del mismo modo, se reunieron las fracciones # 4-15 de la segunda ronda y se las denominó como "complejo HC•HA purificado".

En comparación con AME, que comenzó con 1.370 µg de proteína y 62 µg de HA por ml, el complejo HC•HA purificado no contenía proteínas detectables. Incluso si se lo concentró 10 veces, el complejo HC•HA purificado aún no contenía proteínas detectables mediante el ensayo de proteína BCA. A juzgar por el límite de detección del ensayo de BCA de 25 µg/ml, se estimó que nuestra purificación bioquímica resultó en al menos una purificación de 550 veces.

El análisis en gel de agarosa confirmó que HA en complejo HC•HA purificado era de especies de APM, tenían un PM promedio mayor a  $1 \times 10^6$  Da (Fig. 4C). Se concentró HC•HA purificado 20 veces antes de cargarlo en SDS-PAGE. La posterior coloración con azul de Coomassie confirmó que excepto por la banda visible correspondiente a HC del individuo (75-80 kDa), había pocas bandas de proteína visibles en complejo HC•HA purificado (Fig. 4D). La identidad de esta banda de proteína de HC se confirmó adicionalmente mediante análisis de transferencias tipo Western (Fig. 4E). Se detectó el complejo HC•HA purificado en el pozo (incapaz de entrar en el gel debido a su APM junto con HA) (consultar las FIG. 4D y 4E), pero desaparecieron por completo después de la digestión con HAasa y parcialmente por tratamiento con NaOH. Mientras tanto, la intensidad de la banda de HC (75-80 kDa) se mejoró notablemente, ya que fue liberado de HA de APM o porque se rompió el enlace éster formado entre HC y HA, respectivamente (Fig. 4E).

El análisis de la transferencia tipo Western con un anticuerpo anti-TSG-6 no detectó ninguna TSG-6 en la preparación del complejo HC•HA purificado.

#### Ejemplo 5 - Reconstitución in vitro del complex HC•HA (HC•HARc)

Para definir aún más la función biológica del complejo HC•HA purificado, se reconstituyó el complejo HC•HA in vitro utilizando tres componentes definidos incluyendo HA de APM (Healon<sup>MR</sup>, Advanced Medical Optics, CA), IAI (purificado por nuestro laboratorio) y TSG-6 (amablemente proporcionados por el Dr. Anthony J Day).

HABP (proteína de enlace a HA) se entrecruza con una placa de 96 pozos Covalink-NH. En resumen, las placas Covalink-NH (NUNC, Placerville, NJ) se esterilizan y se secan en alcohol al 70% durante 2 h antes de añadirles 50 µl de 0,184 mg/ml de sulfo-NHS (Pierce, Rockford, IL) en H<sub>2</sub>O destilada que contiene 0,04 mg/ml de HABP (Seikagaku, Corporation, Tokio, Japón) por 96 pozos. El entrecruzamiento se realizó mediante la adición de 1 µl de 0,123 mg/ml de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) en H<sub>2</sub>O destilada por pozo. La placa se incubó durante la noche a 4°C o durante 2 horas a 23°C antes de remover la solución de acoplamiento, y se lavó 3 veces con PBS que contenía NaCl 2 M y MgSO<sub>4</sub> 50 mM seguido por 3 lavados con PBS.

Para determinar la capacidad máxima de enlazamiento a HA, se usaron placas entrelazadas con HABP inmediatamente mediante la adición de 50 µl de 1,5 a 200 µg/ml de HA de APM ( $> 4 \times 10^6$  Da, Advanced Medical Optics, Santa Ana, CA) en PBS con MgCl<sub>2</sub> 5 mM con o sin 40 µg/ml de IαI humano (purificado por nuestro laboratorio) y/o 6 µg/ml de TSG-6 recombinante humana (proporcionada por el Dr. AJ Day). La mezcla se incubó a 25°C durante 24 h, y se remueve el

componente no enlazado por lavados con PBS 4 veces. Se cuantificó HA enlazado mediante el mismo kit de HA y se lo sometió a digestión con HAasa o tratamiento con NaOH antes de la transferencia tipo Western.

5 A continuación, se añaden 50 µl de concentraciones seriadas de 1,5 a 200 µg/ml de HA solo de APM (▲) o con concentración adicional de 40 µg/ml de lal solo (■) o ambos 40 µg/ml de lal y 6 µg/ml de TSG-6 (●) (Fig. 5A).

10 Después del lavado, el ensayo cuantitativo de HA basado en ELISA mostró que la cantidad de HA enlazado se redujo significativamente cuando se añade con lal, pero aumenta significativamente cuando se añade tanto con lal como con TSG-6. Este resultado es consistente con la noción de que la adición de lal solo podría interferir con el enlazamiento de HA con HABP, mientras que la adición de TSG-6 facilita el entrecruzamiento entre HA y lal, promoviendo, por lo tanto, el enlazamiento con HABP.

15 El resultado anterior también indicó que en la reconstitución *in vitro* del complejo que contiene HA sobre una superficie plástica inmovilizada se optimiza alcanzando una capacidad de enlazamiento del 100% cuando se utilizaron 25 µg/ml de HA de APM (Fig. 5A).

20 Con base en los datos anteriores, se aplicó el mismo volumen de 50 µl de 25 µg/ml de HA de APM a cada pozo de las condiciones anteriores (Fig. 5A). Después de un extenso lavado para eliminar los componentes no enlazados, se sometió cada pozo que contenía el HA enlazado a 50 unidades/ml de digestión con HAasa o tratamiento con NaOH 0,05 N como se mencionó anteriormente, y se solubilizaron en el regulador de muestras de Laemmli para la transferencia tipo Western con un anticuerpo anti-lal. En comparación con lal (Fig. 5B, carril 2) y HA de APM solos (Fig. 5B, carril 3), lal intacto, pero no sus fragmentos degradados, estaba presente en los pozos recubiertos con HABP/HA y retenido después de un lavado extensivo (Fig. 5B, carril 4). Como era de esperar, no había banda inmunorreactiva de lal donde se añadió HA con TSG-6 sola (Fig. 5B, carril 5).

25 Es importante destacar que, cuando se incubaron juntos HA, lal, y TSG-6 (Fig. 5B, carril 6), se observó una banda adicional de APM en la parte inferior del pozo de carga mientras que se redujo la intensidad de la banda de lal, presumiblemente porque algunos lal había sido consumidos en la transferencia de HC a HA de APM por TSG-6. Esta banda de HC•HA y lal fueron eliminados por digestión con HAasa (Fig. 5B, carril 10) o tratamiento con NaOH (Fig. 5B, carril 14), resultando en la liberación (aparición) de una banda de HC de ~75-80 kDa.

30 Por comparación, se digirió lal intacto (Fig. 5B, carril 4) mediante HAasa en al menos dos bandas, incluyendo una banda de 120 kDa de mayor PM y una banda de ~75-80 kDa, donde la primera probablemente corresponda a un complejo HC•bikunina enlazado por sulfato de condroitina ya que pudo ser escindido por NaOH (Fig. 5B, carril 12), pero resistente al tratamiento con hialuronidasa (Fig. 5B, carril 8).

40 Estos datos verificaron que un complejo HC•HA podría ser efectivamente reconstituido *in vitro* a partir de HA y lal en presencia de TSG-6. Una vez que se formó el complejo, TSG-6 no estaba covalentemente asociada en este complejo, ya que puede ser lavada, un hallazgo que fue apoyado por la transferencia tipo Western utilizando un anticuerpo anti-TSG-6.

Ejemplo 6 - Acciones antiinflamatorias y anticicatrizantes del complejo HC•HA purificado a partir de AME o por reconstitución *in vitro*

45 Para las células RAW264.7 macrófagos de ratón, el complejo HC•HA purificado a partir de AME redujo la propagación de las células y aumentó el redondeo de las células tan pronto como 2 horas después de la introducción al medio. El ensayo de MTT mostró que el complejo HC•HA purificado a partir de AME disminuyó significativamente la viabilidad celular más que HA de APM o AME solos ( $P = 0,002$  y  $0,02$ , respectivamente) (Fig. 7).

50 Para confirmar además que dicha actividad inhibitoria sobre la viabilidad de los macrófagos residía en el complejo HC•HA, se comparó el complejo HC•HA purificado a partir de AME (denominado HC•HA nativo o HC•HAN) con aquel reconstituido *in vitro* (HC•HArc; véase más arriba) usando el ensayo de MTT de macrófagos.

55 En comparación con el control cultivado en la placa recubierta con HABP (Ctrl), la adición de HA solo de APM (HA) y la adición de HA de APM, ya sea con 40 µg/ml de lal (HA/lal) o 6 µg/ml de TSG-6 (HA/TSG-6) no provocó ninguna diferencia significativa en la viabilidad de los macrófagos ( $P = 0,30$ ,  $0,19$ , y  $0,08$ , respectivamente) (Fig. 6A).

60 Por el contrario, tanto HC•HArc como HC•HAN redujeron significativamente la viabilidad de los macrófagos ( $P = 0,0003$  y  $0,007$ , respectivamente, Fig. 6A), mientras que HC•HArc y HC•HAN mostraron un actividad inhibitoria similar ( $P = 0,64$ , Fig. 6A).

65 Para determinar si HC•HAN y HC•HArc ejercieron una acción anticicatrizante similar, se sembraron  $3 \times 10^4$ /ml de fibroblastos corneales humanos, que habían sido transfectados con adenovirus que contenía o bien promotor TGF-β1 - luciferasa o CMV-β-gal durante 48 h antes de ser sometidos al ensayo de actividad promotora de TGF-β1. En comparación con el control (Ctrl), no se suprimió significativamente la actividad promotora de TGF-β1 por HA, HA/lal, o

HA/TSG-6 ( $P = 0,07$ ,  $0,06$  y  $0,10$ , respectivamente, Fig. 6B). Por el contrario, tanto HC•Harc como HC•HAN mostraron una supresión significativa ( $P = 0,004$  y  $0,005$ , respectivamente, Figura 6B).

5 Nuevamente, el grado de supresión de la actividad promotora de TGF- $\beta$ 1 ejercida por HC•HAN no fue significativamente diferente de HC•Harc ( $P = 0,20$ ). El mismo resultado se obtuvo mediante la adición de estos componentes como una solución en el pozo (sin estar ligados a la placa entrecruzada con HABP).

Ejemplo 7 - HA en AM se enlaza covalentemente con las HC de Ial

10 Para investigar si Ial se enlaza covalentemente con HA de APM en extractos de MA, se utilizó ya sea HAasa para digerir HA en pequeños fragmentos (que correrían en SDS-PAGE) o NaOH débil para hidrolizar cualquiera de los enlaces éster entre las HC y HA. HA de APM en estos extractos fue digerido completamente por 20 unidades/ml de HAasa a 37°C durante 2 h, pero no se hidroliza por NaOH 0,2 N a 25°C durante 4 h. Sin embargo, se encontró la cantidad de proteínas totales visualizadas por coloración con azul de Coomassie de los Extractos A, B y C después de que el tratamiento con NaOH 0,2 N parecía ser menor que aquellos sin tal tratamiento.

20 Para optimizar el tratamiento con NaOH a fin de no causar la hidrólisis de la proteína, se sometió el Extracto A a una gama de concentraciones de NaOH a 25°C durante 1 h. En forma similar a lo que se había reportado, Ial purificado (Fig. 1A, carril 2) produjo una banda principal a ~250 kDa cuando se analizó mediante una transferencia tipo Western, que representa Ial intacto. También se observaron otras bandas con PM más pequeños, que son presumiblemente productos de degradación de Ial.

25 El Extracto A no tratado contenía una banda correspondiente a Ial, pero también tenía una banda de APM que aún permanecen en el pozo con la carga de gel y otras dos bandas grandes de 75 y 120 kDa (Fig. 1A, carriles 3 y 4). La banda de APM probablemente es de componentes de Ial enlazados covalentemente con HA de APM, donde su tamaño les impide entrar en el gel. La banda de 75 kDa se presume que corresponden a una HC libre y la banda de 120 kDa es probable que sea una HC acoplada covalentemente ya sea a la bikunina o a TSG-6.

30 El tratamiento con NaOH 0,02 N causó una gran reducción de las bandas inmunorreactivas de Ial, con la excepción de la especie de 120 kDa, y se incrementó dramáticamente la intensidad de la banda de 75 kDa y la aparición de una banda de 80 kDa, donde es probable que las especies de 75 y 80 kDa correspondan a HC1 y HC2, respectivamente.

35 El tratamiento con NaOH 0,05-0,2 N condujo a la eliminación completa de todas las bandas, excepto para las bandas de 75 y 80 kDa, donde las mayores concentraciones de NaOH tenían una intensidad algo menor de estas bandas, presumiblemente debido a la hidrólisis de la proteína. Por lo tanto, en los experimentos subsiguientes se escogió NaOH 0,05 N para el tratamiento de extractos de MA y se compararon los resultados con los digeridos con HAasa.

40 La coloración con azul de Coomassie mostró que la carga de la muestra de los Extractos A, B y C fue similar para las muestras no tratada (ninguno), digerida con HAasa (HAasa), y tratada con NaOH (NaOH). Por lo tanto, se usaron luego las mismas muestras para el análisis de transferencia tipo Western con el anticuerpo anti-Ial. Como se muestra en la Fig. 1B, el Extracto C no tratado (carril 5) tenía perfiles de banda similares a los del Extracto A descrito anteriormente (Fig. 1A, carril 3 y Fig. 1B, carril 3), mientras que no se detectó Ial en el Extracto B (carril 4). La digestión con HAasa (carriles 6-8) eliminó por completo la banda de APM (retenida en el pozo) en los Extractos A y C, lo que sugiere que esta banda es un complejo Ial-HA de APM. Para los Extractos A y C, se incrementó la banda de 75 kDa después de la digestión con HAasa, por lo que también se hizo visible en el Extracto de B. Estos resultados demostraron claramente que las HC y HA estaban enlazados y presentes tanto en los extractos solubles en agua (Extractos A, B y P) como en los insolubles en agua (Extracto C).

50 Notablemente, las bandas de 250 y 120 kDa se volvieron mucho más agudas y más intensas después de la digestión con HAasa (Fig. 1B, carriles 6 y 8) lo que indica que algunas de estas especies pueden ser liberadas de HA.

55 Debido a que tanto la banda de 250 como de 120 kDa fueron completamente eliminadas por NaOH 0,05 N (Fig. 1A), lo que resulta en el mayor aumento de la banda de 75 kDa (la banda de 80 kDa era difícil de observar en la mayoría de los puntos de tiempo) (Fig. 1B, carriles 9-11), esto indicaba que las bandas de 250 y 120 kDa son complejos de las HC y otros componentes enlazados por enlaces éster. Estos resultados son, por tanto, consistentes con la conclusión de que la especie de 250 y de 120 kDa corresponden a Ial intacto y un complejo que contiene HC (por ejemplo, HC•bikunina o TSG-6•HC), respectivamente.

Ejemplo 8 - Supresión de TGF- $\beta$  por Extracto isotónico de MA

60 Para probar si el Extracto P suprime la transcripción de TGF- $\beta$ , se utilizó un ensayo promotor de TGF- $\beta$ 1 basado en la luciferasa. La supresión de la actividad promotora de TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos corneales humanos era dependiente de la dosis en el rango de concentraciones de proteína de 0,2 a 125  $\mu$ g/ml de Extracto P (Fig. 3A). Un valor tan bajo como 1  $\mu$ g/ml de proteínas suprimió significativamente la activación promotora de TGF- $\beta$ 1 y hubo una supresión mayor al 50%, cuando se añadieron 125  $\mu$ g/ml de proteínas (que contenía ~5  $\mu$ g/ml de HA) ( $p = 0,008$ ). Por el contrario, 1  $\mu$ g/ml del HA de APM de control (grado médico) no suprimió significativamente la activación promotora de TGF- $\beta$ 1 ( $P = 0,20$ , Fig. 3B).

No se logró una supresión significativa de la actividad promotora por 5, 25, y 125 µg/ml de HA de APM (P = 0,10, 0,09, y 0,06, respectivamente, Fig. 3B).

A fin de probar adicionalmente si esta actividad estaba relacionada con HA solo o con el complejo HA-proteína, se digirieron tanto HA de APM como el Extracto P con HAasa o se calentó a 95°C durante 10 min antes de la prueba. Los resultados mostraron que ambos tratamientos eliminaron significativamente el efecto supresor del Extracto P (P = 0,06 y 0,12 para HAasa y el tratamiento térmico, respectivamente, Fig. 3C y 3D). Por el contrario, no causan un cambio significativo en el grupo tratado con HA de APM (P = 0,31 y 0,70, para HAasa y el tratamiento térmico, respectivamente, Fig. 5C y 5D). Estos datos indicaron que tanto HA como las proteínas en el extracto de P eran necesarias para la supresión de la actividad promotora de TGF-β1.

Ejemplo 9 - Caracterización y validación de acciones antiangiogénicas de un complejo HC•HA

AME se prepara como se describió anteriormente. Se purifica el complejo HC•HA a partir de la AME usando dos rondas de ultracentrifugación en CsCl y guanidina HCl 4 M. AME y el complejo HC•HA se diluyen en serie.

Experimentos 1A

La potencia antiangiogénica relativa de AME y HC•HA se compara con base a los mismos µg/ml de HA en los siguientes 4 ensayos in vitro usando HUVEC cultivadas en el medio de crecimiento de células endoteliales complementado con 2% de FBS, 0,1 ng/ml de EGF, 1 µg/ml de hidrocortisona, y 1 ng/mL de bFGF, con o sin 1 a 100 µg/ml de VEGF: (1) Actividad de MMP con base en el ensayo del zimógeno utilizando sustratos de MMP tales como colágeno, fibrinógeno, o gelatina, (2) Proliferación con base en la morfología, el ensayo de MTT, la marcación con BrdU y el ensayo de Vida & Muerte; (3) Migración con base en la quimiotaxis, y (4) Formación de tubos de HUVEC en Matrigel.

Experimento 1B

Después, en el Experimento # 1B, la acción antiangiogénica del complejo HC•HA purificado se examina en los siguientes ensayos in vivo: (1) Ensayo de la membrana corioalantoidea (CAM) de pollito, (2) Ensayo in vivo en Matrigel en el abdomen inferior derecho de ratones hembra, y (3) Ensayo de angiogénesis de la córnea. Para estos tres ensayos in vivo, se inducirá la angiogénesis por impregnación de bFGF o VEGF o ambos ya sea en Matrigel o en ELVAX (copolímero de vinilo - etileno) con o sin un complejo HC•HA a una concentración determinada en el Experimento # 1A.

Tanto en el Experimento # 1A como en el Experimento # 1B, se comparará la acción antiangiogénica de un complejo HC•HA con aquel del control de HA de APM de grado médico (Healon<sup>MR</sup>, Advanced Medical Optics, CA) con los mismos µg/ml de HA, y aquellos de PBS como control negativo. Se usará un mínimo de tamaño de muestra de 5 para los análisis estadísticos.

Ejemplo 10 - Exploración de cómo un complejo HC•HA interrumpe la señalización mediada por receptores de HA y VEGFR

Para ambos experimentos a continuación, se comparará la acción antiangiogénica de un complejo HC•HA con la de HA de APM.

Experimento # 2A

Se incuban previamente células HUVEC con anticuerpos para CD44 (Cat. # 16-0441, eBioscience, San Diego, CA), RHAMM, HARE, o TLR mientras se utilizan sus respectivos anticuerpos de isotipo como control. Se evaluarán similarmente la morfología, viabilidad, proliferación y muerte de HUVEC como se describe en el Experimento # 1B y se hizo la comparación entre el control de PBS, HA de APM, y un complejo HC•HA.

Experimento # 2B

Para un marco de tiempo de 15 min a 2 h con o sin adición de VEGF, del cual se ha determinado la concentración óptima en el Experimento # 1B, se recolectan lisados de células HUVEC y se someten a análisis de transferencias tipo Western utilizando anticuerpos específicos para ERK, PBK y Akt fosforilados o totales utilizando la histona 3 como control de carga.

Ejemplo 11 - Validación de la potencia del complejo HC•HA purificado para ejercer acciones antiinflamatorias y anticicatrizantes in vivo

La potencia del complejo HC•HA en ejercer acciones antiinflamatorias y anticicatrizantes se demuestra por el ensayo de MTT de macrófagos con o sin activación por 200 U/ml de IFN-γ en DMEM con ITS, así como por el ensayo promotor de TGF-β1 utilizando fibroblastos corneales humanas cultivados en DMEM/FBS, respectivamente. Estos resultados se comparan con los controles positivos incluyendo AM y AME criopreservados, y los controles negativos, incluyendo plástico y HA de APM solo.

Además, la potencia relativa entre el complejo HC•HA y AME basado en los mismos µg/ml de HA se determina sometiendo sus diluciones en serie a estos dos ensayos que utilizan HA de APM solo como control negativo. La concentración más apropiada del complejo HC•HA basado en los µg/ml de HA se utiliza a continuación para validar su potencia antiinflamatoria mediante la correlación de su ensayo de MTT con otros ensayos de muerte/apoptosis de macrófagos tales como el ensayo de VIDA/MUERTE (Molecular Probes), tinción nuclear Hoechst-33342 y el kit de detección ELISAPLUS (Roche) de muerte celular. Además, estos resultados se correlacionan con la activación de macrófagos juzgada por la expresión en la membrana de MHCII, CD80 y CD86, con el análisis de transferencias tipo Western de expresión de Cox-2 (Fig. 12), y con la relación de PGE2/PGD2 (Fig. 13), y los niveles antiinflamatorio (IL-10) y proinflamatorio (IL-1, IL-6, y las citoquinas TNF-α) por ensayos ELISA. Del mismo modo, la potencia anticicatrizante juzgada por la supresión de la actividad promotora de TGF-β1 se correlaciona con el cambio fenotípico de queratocitos humanos o células mesenquimales estromales amnióticas humanas en fibroblastos y miofibroblastos, como se juzga por la expresión de keratocano, Factina, fibronectina ED-A, S-100A4, y α-SMA usando inmunocoloración y análisis de transferencias tipo Western, y mediante el control de la señalización mediada por Smad usando inmunocitocalización de los Smad 2, 3 y 4.

Ejemplo 12 - Comparativa del complejo HC•HA extraído de membrana amniótica y de membrana coriónica

Se extrajo complejo HC•HA de la membrana coriónica utilizando los mismos protocolos utilizados para la extracción de complejo HC•HA de la membrana amniótica.

	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Promedio	
Rendimiento del extracto					
Peso húmedo (g)	10,0	17,7	29,1	59,0	38±18
Peso del polvo (g)	5,5	11,4	19,2	54,6	30±21
Pérdida de tejido (%)	45	36	34	7	31±16
PBS (ml)	11,1*	11,4	19,2	54,6	36±25***
Extracto (ml)	12,0*	12,5	24,0	63,0	44±28***
Proteína & HA					
Antes de la purificación					
Concentración de proteína (µg/ml de extracto)	1884	1764	1828	1826±60	
Proteína total (µg)	23555**	42343	115201	78772±51519***	
Concentración de HA (µg/ml de extracto)	0,90	0,96	0,92	0,93±0,03	
HA total (µg)	11,3**	22,9	57,7	40,3±24,6***	
Relación HA:Proteína	1:2093	1:1868	1:1987	1:1982±113	
Después de la purificación					
Concentración de proteína (µg/ml de extracto purificado)	172	62	136	123±56	
Proteína total (µg)****	825,4	297,6	650,7	591±269	
HA (µg/ml de extracto purificado)	0,59	-	0,84	0,72±0,02	
HA total (µg)****	2,85	-	4,02	3,43±0,83	
Relación HA:Proteína	1:292	-	1:162	1:227±93	
Factor de pureza de la proteína (µg/ml de Extracto) / (µg/ml de extracto purificado)	11	28	13	17±8	
Rendimiento de HA (%) (HA total después de purificación / HA total antes de purificación)	25,2	-	7,0	16,1±12,9	
Rendimiento total de HA/ml de CHE (µg/ml de CHE)	0,26	-	0,37	0,31±0,08	
Rendimiento total de HA/corion (µg/extracto total (ml) de corion total)	6,36		23,09	14,7±11,8	

Tabla 2: Rendimiento del extracto, contenido de proteína & HA para 3 donantes con corion entero excepto para el donante 1, del cual se incluyó una parte. Los datos con respecto a HA para el donante 2 fueron excluidos debido a la pérdida de la muestra como resultado de la rotura de un tubo de diálisis. El volumen de extracto muestreado para cada uno de los donantes para la purificación es de 10,97 ml.

\*Se añadió PBS al Extracto en proporción de 1:2 (Extracto:PBS). Esta porción de extracto fue excluida del resto de las mediciones.

\*\*Calculado con base en una porción de extracto de 12,5 ml

\*\*\*Promedio con base en el donante 2 y el donante 3 únicamente

\*\*\*\*Con base en el volumen final del extracto purificado que es de 4,8 ml por donante

Hubo una pérdida significativa de tejido durante la pulverización (31±16%) y una pérdida adicional de tejido durante la homogeneización para reducir el tejido húmedo en la forma en polvo y del extracto posteriormente. Una alternativa es utilizar un mezclador y un homogeneizador para una preparación a gran escala de MA & lisado de gelatina y extracto de

placenta.

	Extracto			Extracto purificado			Rendimiento de HA (µg/ml de extracto)	Rendimiento de HA (µg/ml de extracto total (ml) de MA/CH total)
	Proteína (µg/ml)	HA (µg/ml)	Relación de HA:Proteína	Proteína (µg/ml)	HA (µg/ml)	Relación de HA:Proteína		
AME	214±36	28,6±5,3	1:7,5	Indetectable	41,2±1,8	-	72,1	~2163*
CHE	1826±60	0,93±0,03	1:1963	123±56	0,72±0,02	1:227±93	0,31±0,08	14,73±11,83

Tabla 3: Proteína promedio & concentración de HA y relación de CHE en comparación con AME antes y después de la purificación.

(1) \* Calculado con base al volumen de extracto de AM ~30 ml (el rendimiento de HC•HA purificado a partir de un MA-Hua He)

A partir de la Tabla 3, se observa que el contenido de proteína en CHE es significativamente como el de AME tanto en el extracto como en el extracto purificado. Por el contrario, el contenido de HC•HA (medido por el contenido de HA) es significativamente menor en CHE comparado con AME antes y después de la purificación. El bajo porcentaje de rendimiento de HA (6-25%) como se observa en la Tabla 1 se debe al alto contenido de proteína después de ultracentrifugación lo que resulta en un pequeño volumen final de fracción reunida (4,8 ml por donante). La alta concentración de proteína en CHE después de las 2 rondas de ultracentrifugación puede ser debida al alto contenido de proteínas antes de la purificación con relación a AME (~8,5 veces) y puede ser necesaria una tercera ronda de ultracentrifugación para aumentar la pureza. Otra razón para las proteínas que permanecen presentes incluso después de dos rondas de ultracentrifugación con CsCl y guanidina es que puede haber un fuerte enlazamiento entre las proteínas y los complejos HC•HA. Estas proteínas pueden tener potencialmente un papel importante en la promoción de la formación y/o la regulación de la función del complejo HC•HA. Actualmente estamos en el proceso de identificación y caracterización de estas proteínas

Ejemplo 13: Curva de dosificación de ELISA con BrdU para HC•HA (AME) y HC•HA (CHE) con recubrimiento de fibronectina y VEGF.

Se recubrieron placas de 96 pozos (n = 3) con fibronectina. Se siembran luego HUVEC a razón de 4000 células/pozo de HC•HA en los pozos previamente recubiertos durante 48 horas (véase la tabla más abajo). Se incluyen dos grupos (n = 3) con 10 ng/ml de VEGF (VEGF viejo (fecha de recepción) o VEGF nuevo (fecha de recepción: 3/10/10)) añadido de forma simultánea durante la siembra. Se añade la etiqueta de BrdU durante las últimas 6 horas del periodo de cultivo. ELISA con BrdU se realizó como se describe en H-095.

Concentración de HA (µg/ml)											
HC•HA (AME)	25	12,5	5	1	0,5	0,25	0,05	0,025	0,01	0,005	
HC•HA (CHE)	-	-	-	1	0,5	0,25	0,05	0,025	0,01	0,005	
Control (Medio)	0										
VEGF viejo	0										
VEGF nuevo	0										

Tabla 4: Concentraciones de HA para HC•HA (AME) y HC•HA (CHE) para establecer una curva de dosis.

A las 48 horas, las células de control son en su mayoría en forma de huso y la densidad celular se ha incrementado significativamente desde las 24 horas. No se observa ninguna diferencia entre el grupo de VEGF nuevo y el grupo de control. La densidad celular en el grupo de VEGF viejo parece ser notablemente inferior al de control. En los grupos HC•HA (AME) y HC•HA (CHE), la densidad celular es significativamente menor en las muestras de 25 µg/ml y 1 µg/ml, respectivamente, y aumenta al disminuir la concentración de HC•HA. No se puede observar ninguna diferencia entre las células en el grupo de control y las células en los grupos con concentración de HC•HA por debajo de 1 µg/ml para HC•HA (AME) y 0,05 µg/ml para HC•HA (CHE). Comparadas a las 24 horas, las células tratadas con HC•HA (AME) y (CHE) se han vuelto más planas.

Conclusiones:

ELISA con BrdU es más sensible y mejor para ilustrar los cambios dependientes de la dosis que los cambios morfológicos.

La inhibición dependiente de la dosis de la proliferación por HC•HA (CHE) y HC•HA (AME) sigue una curva logarítmica.

La dosis efectiva más baja de HC•HA (CHE), como la medida por ELISA con BrdU está entre 0,25 y 1 µg/ml, mientras que la de HC•HA (AME) está entre 1 y 5 µg/ml.

HC•HA (CHE) es 25 veces más potente que HC•HA (AME) de acuerdo con IC50 (3,0 versus 0,12), con base en la concentración de HA.

5

Reivindicaciones

1. Un método para producir un complejo HC•HA reconstituido (HC•HArC), que comprende
  - 5 a. proporcionar una mezcla de reacción que comprende:
    - 10 i. proteína de enlazamiento a HA (HABP) fijada a un soporte estacionario;
    - ii. hialuronano (HA);
    - iii. HC1 y HC2 (cadena pesada 1 y cadena pesada 2) de  $\alpha 1$  (inhibidor de tripsina inter alfa) aisladas de suero; y
    - iv. TSG-6; y
  - b. incubar la mezcla de reacción durante un período de tiempo suficiente para producir un complejo HC•HA reconstituido.
- 15 2. Un método como el reivindicado en la reivindicación 1, en donde se genera al menos una de HA, TSG-6 por una pluralidad de células en la reacción de mezcla.
3. Un método como el reivindicado en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende además aislar y purificar el complejo HC•HArC.
- 20 4. Un método como el reivindicado en la reivindicación 3, en donde el complejo HC•HArC se aísla por centrifugación, filtración, o una combinación de los mismos.
- 25 5. Un método como el reivindicado en la reivindicación 3, en donde el complejo HC•HArC se purifica por cromatografía, filtración en gel, centrifugación, solubilidad diferencial, precipitación con etanol, o una combinación de los mismos.
6. Un método como el reivindicado en la reivindicación 3, en donde el complejo HC•HArC se purifica por cromatografía de afinidad.

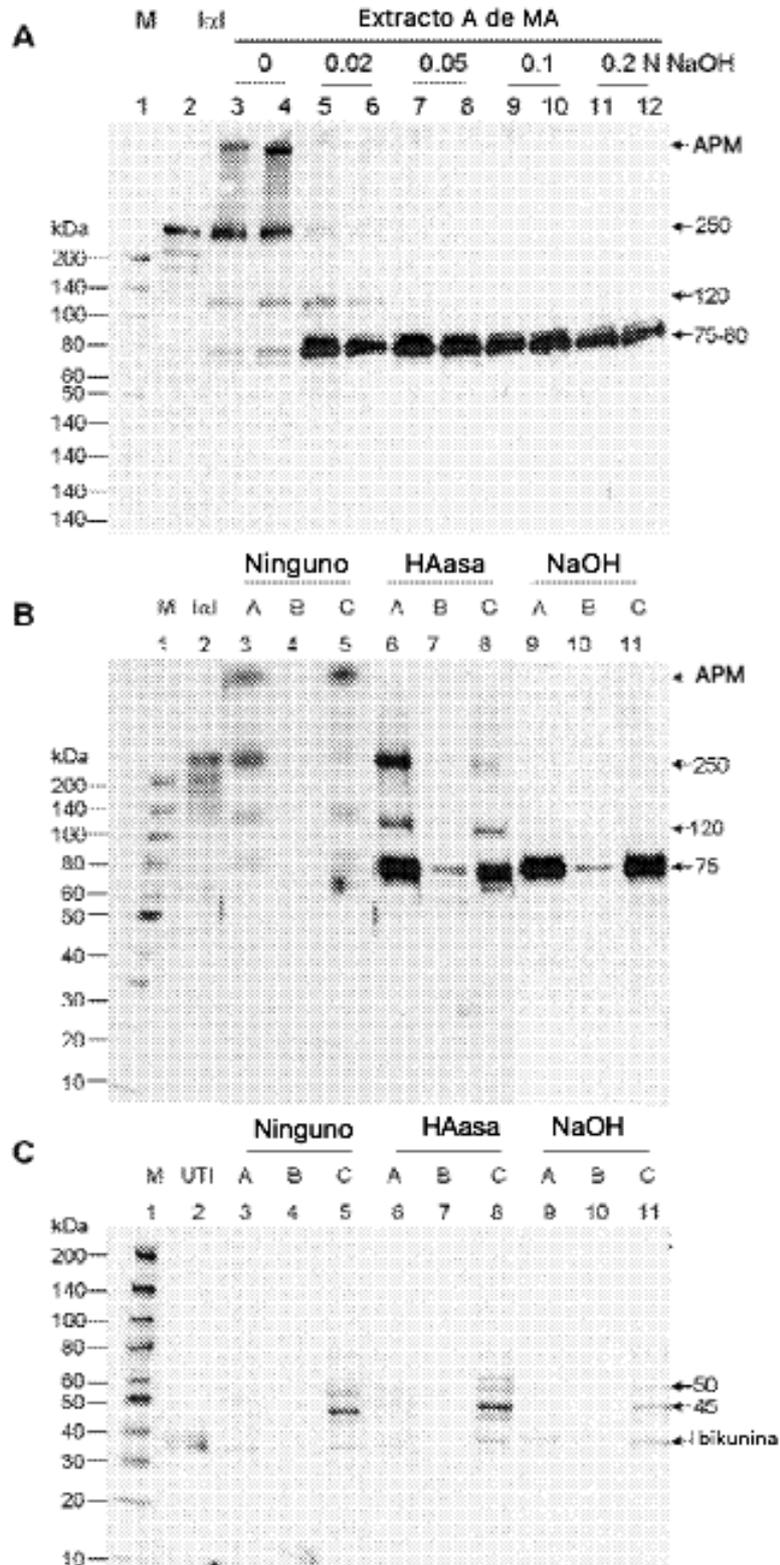


FIGURA 1

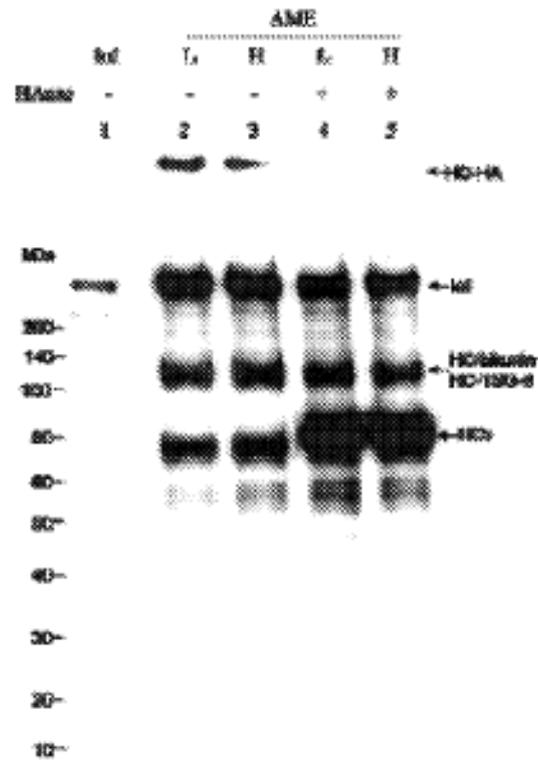


FIGURA 1D

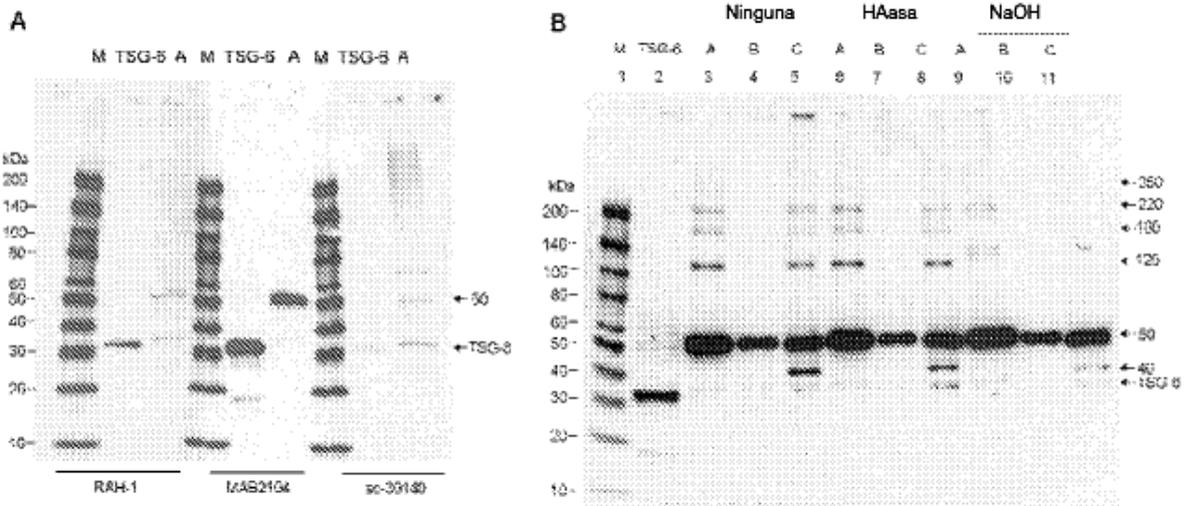


FIGURA 2

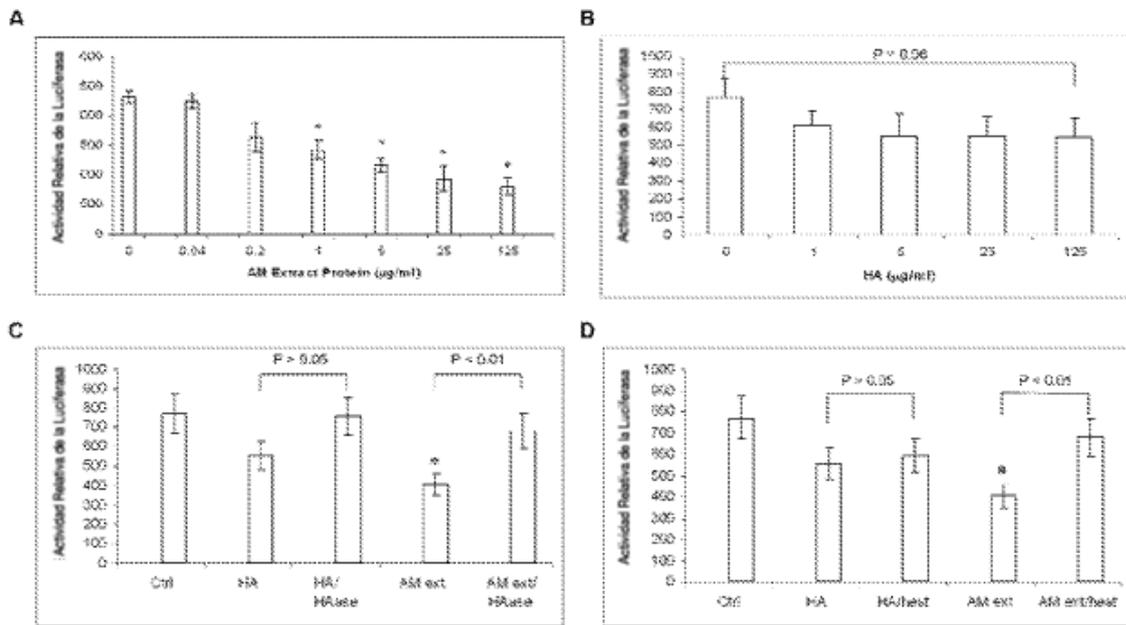


FIGURA 3

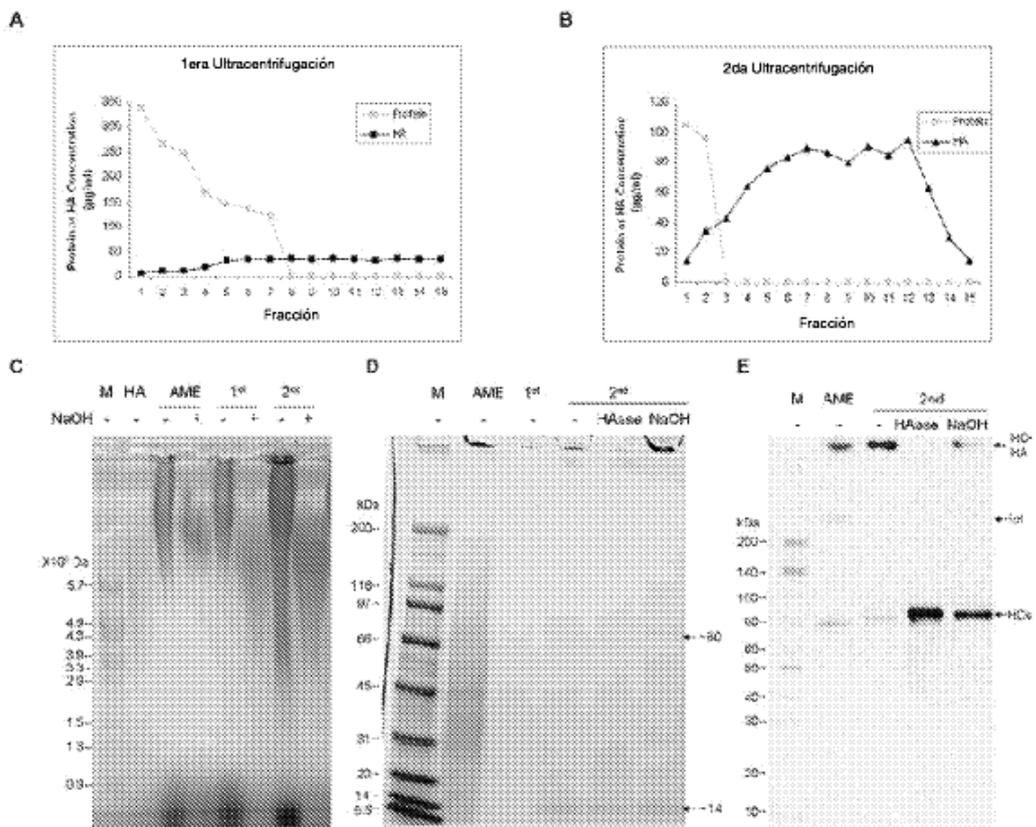


FIGURA 4

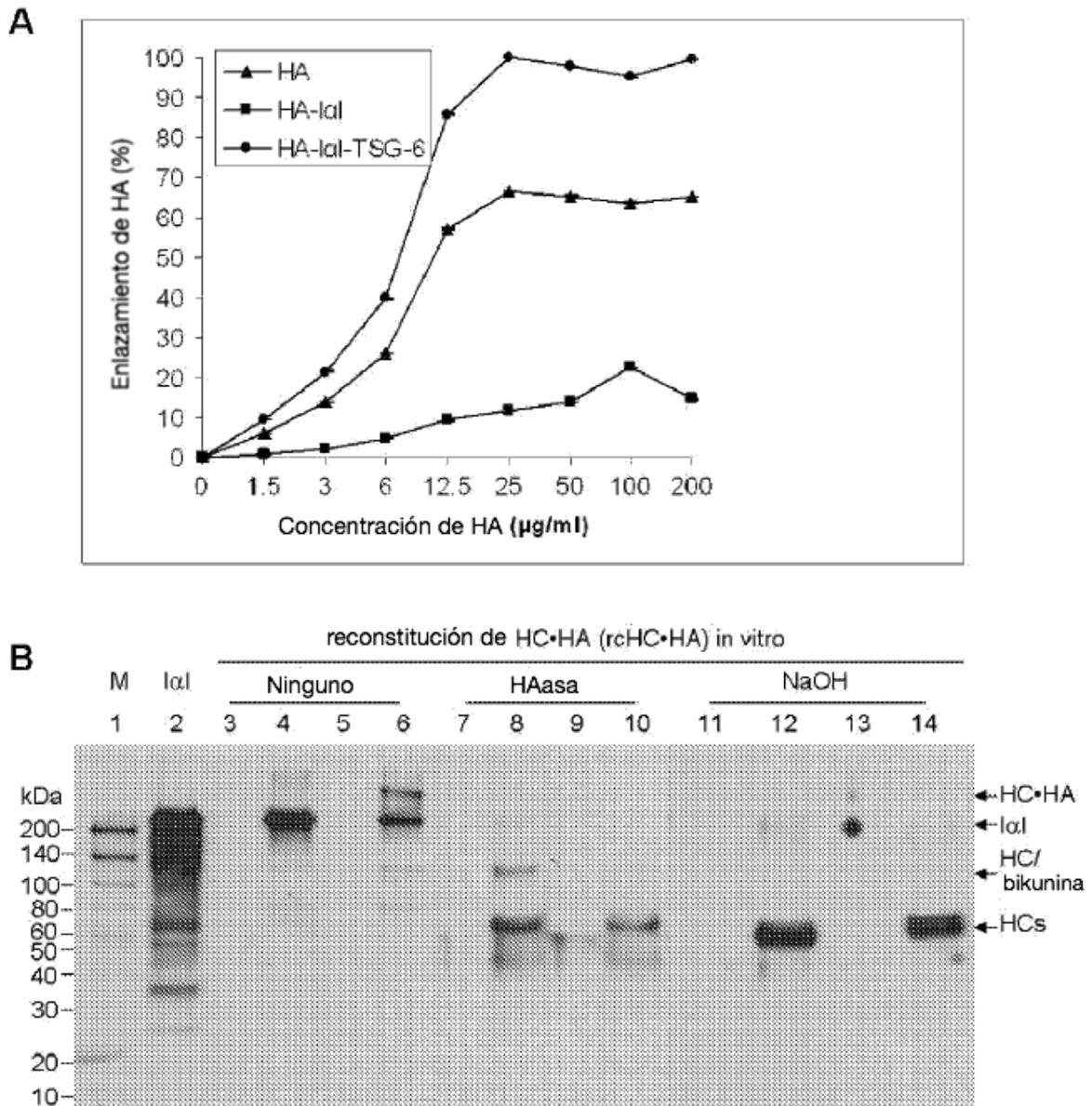


FIGURA 5

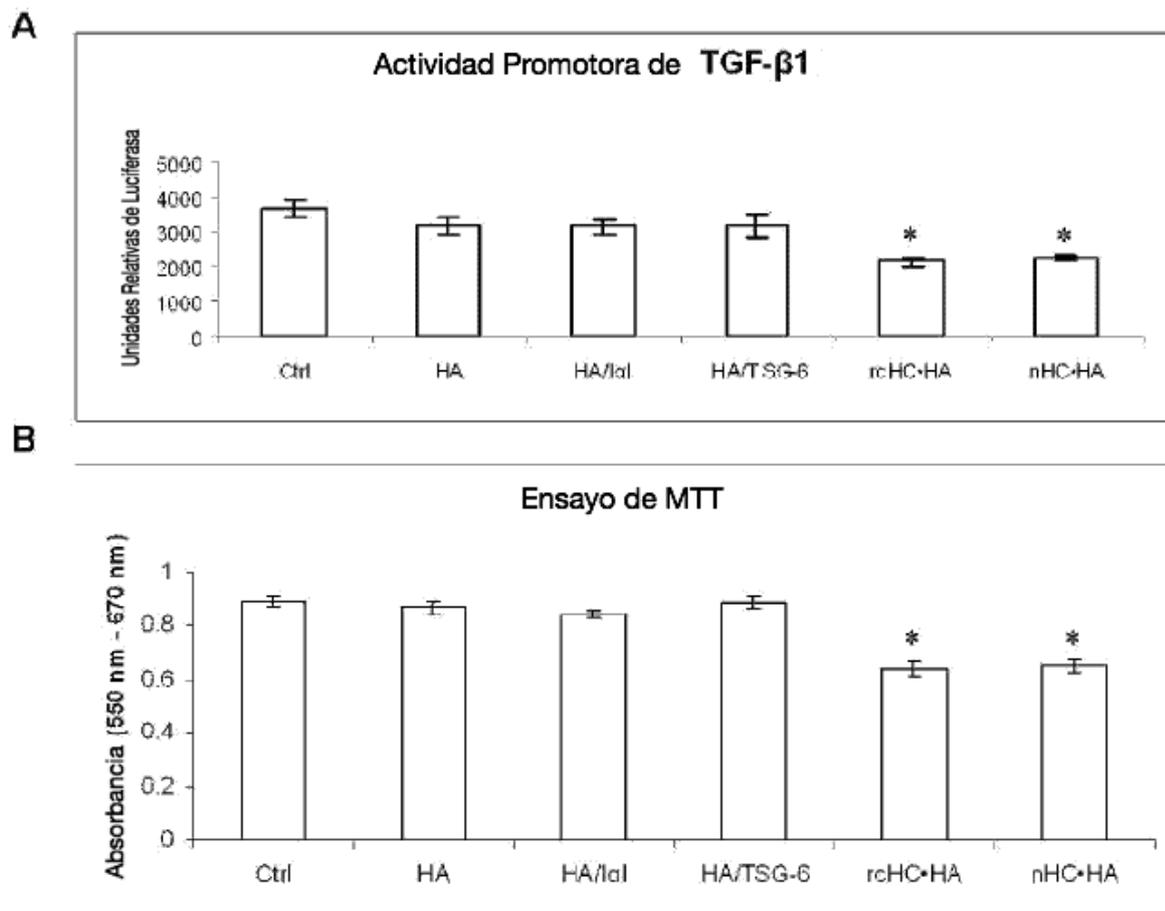


FIGURA 6

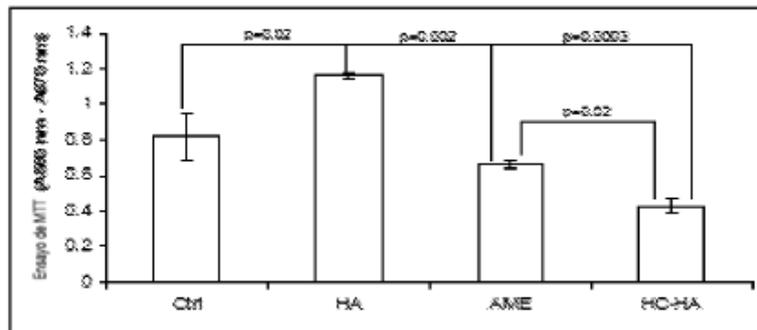


FIGURA 7

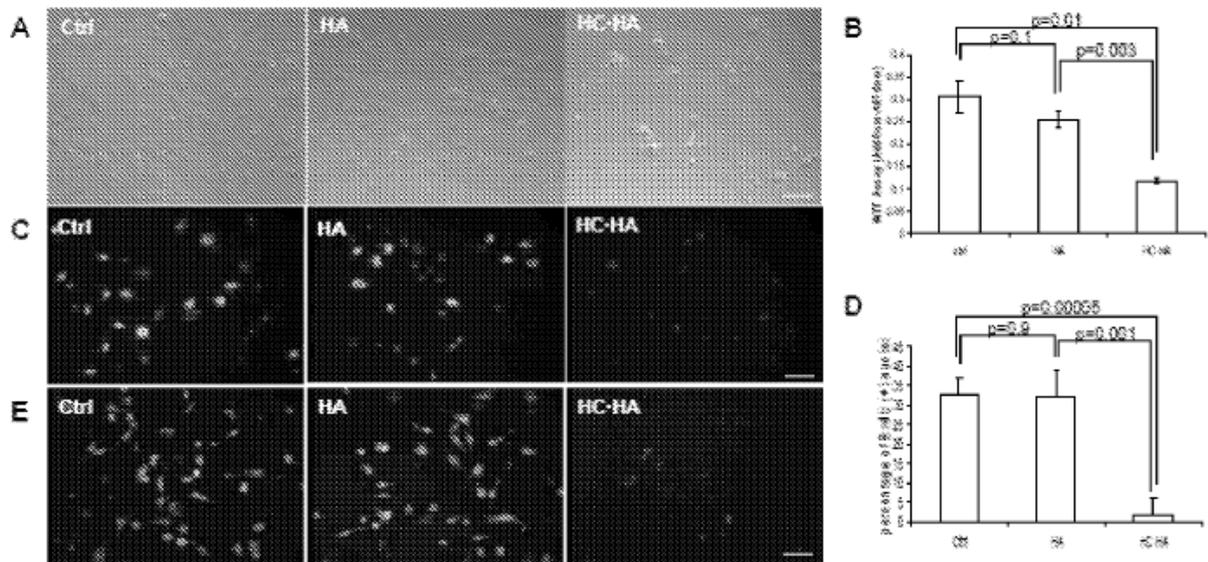
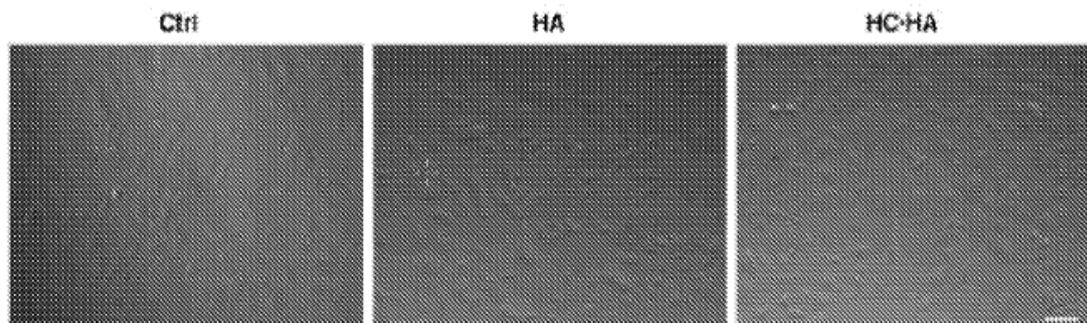
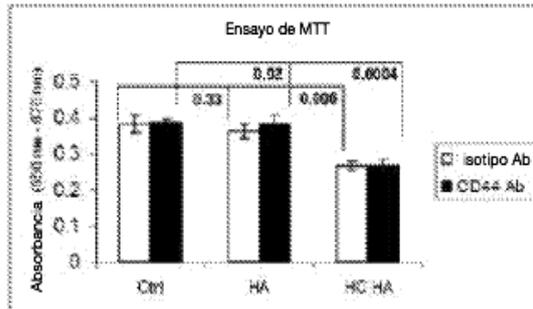


FIG. 8



A. Añadido 24 h después de la siembra



B. Añadido simultáneamente con la siembra

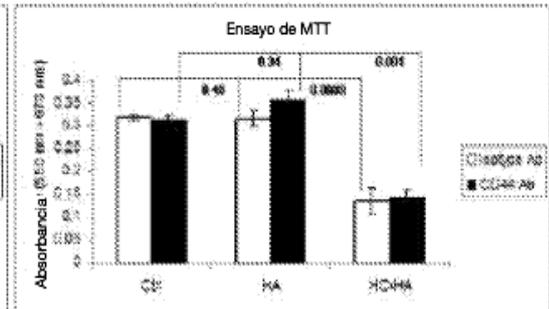


FIG. 9

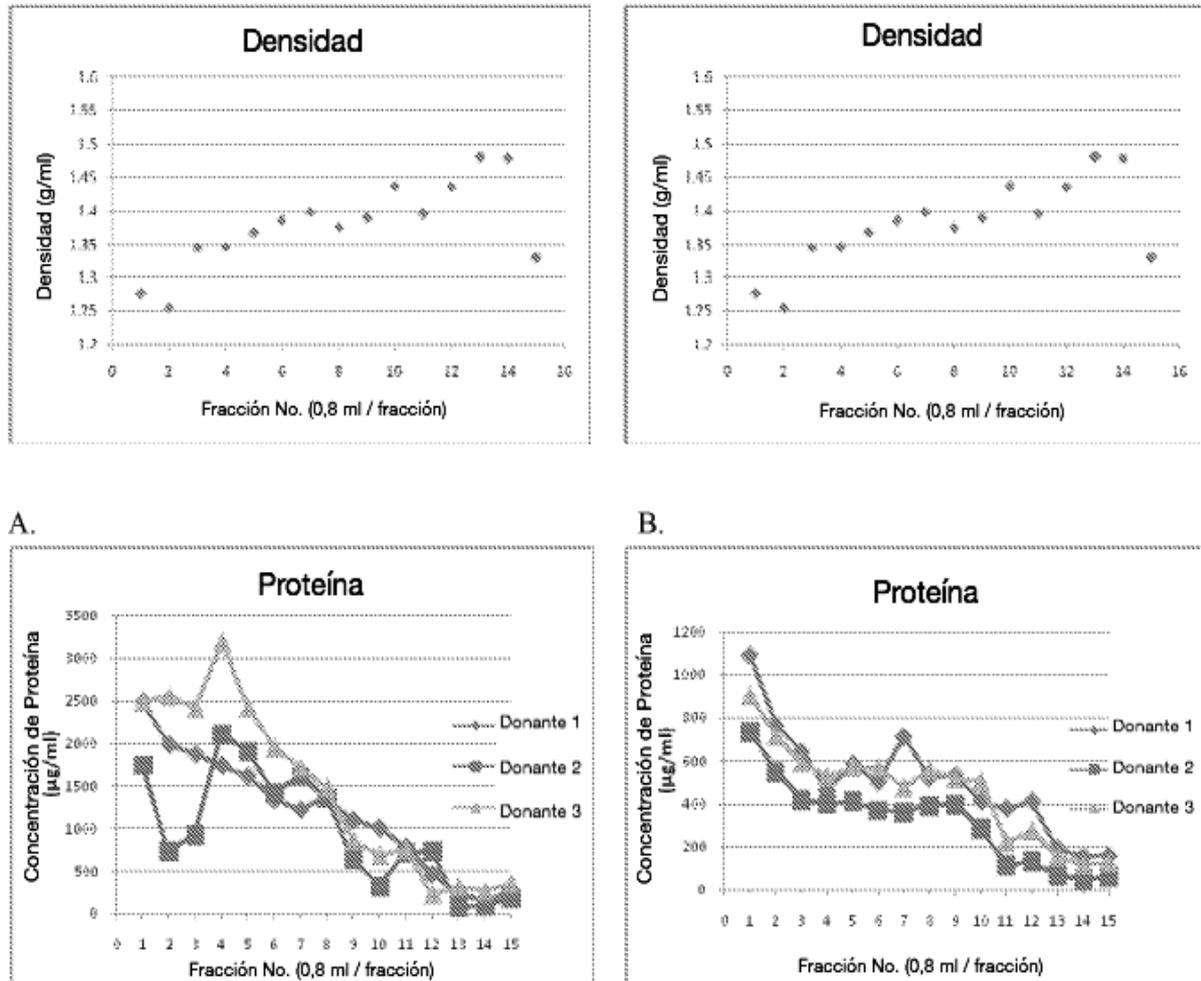


Figura 10

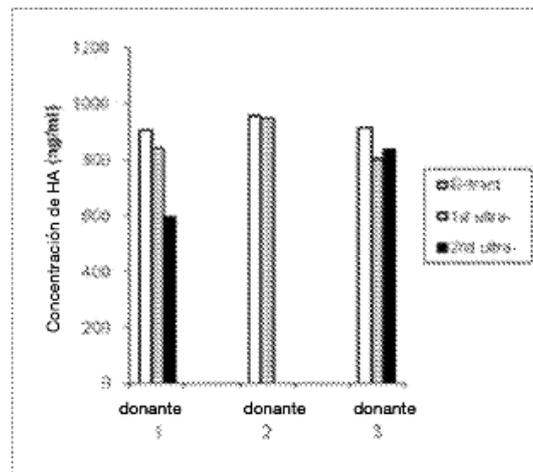


FIGURA 11

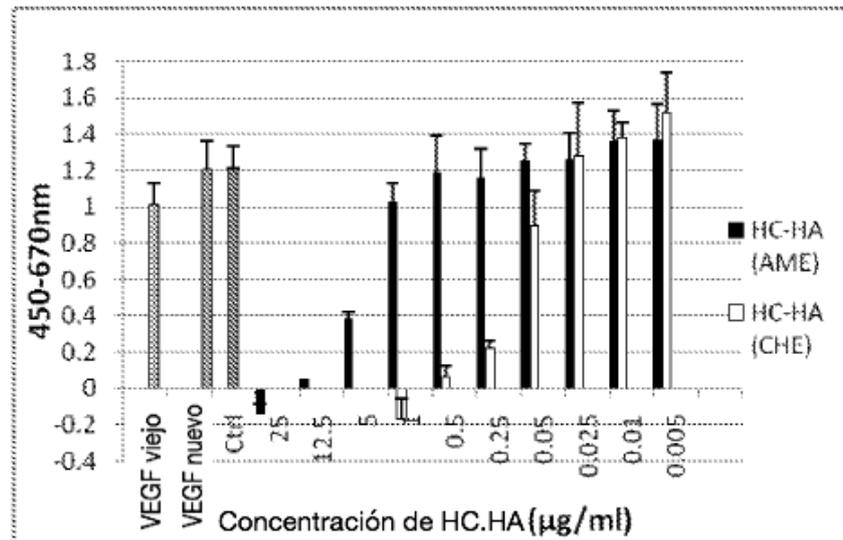


FIGURA 12

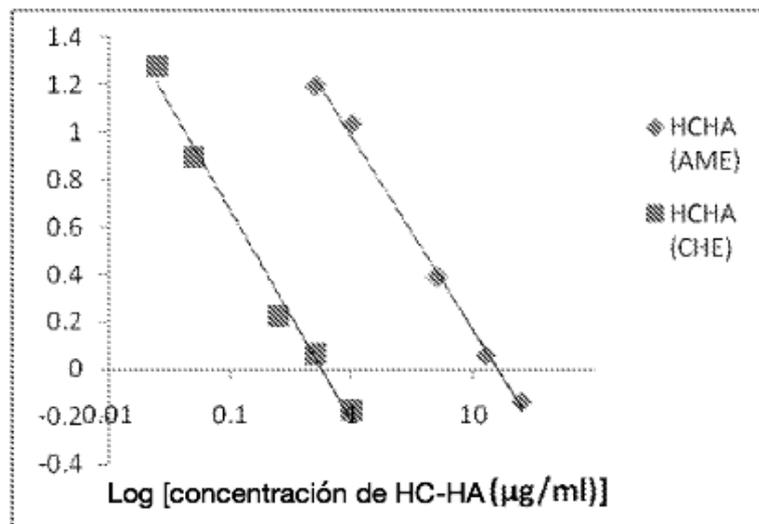


FIGURA 13