

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 438**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/50 (2015.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2012 PCT/US2012/000017**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12096796**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2012 E 12734721 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2663637**

54 Título: **Accs para uso en la aceleración de la curación de lesiones del tejido conectivo**

30 Prioridad:

10.01.2011 US 201161460913 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2017

73 Titular/es:

**NOVEOME BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
100 Technology Drive, Suite 200
Pittsburgh, PA 15219 , US**

72 Inventor/es:

**SING, GEORGE, L. y
STEED, DAVID, L.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 646 438 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

Accs para uso en la aceleración de la curación de lesiones del tejido conectivo

5 Campo de la invención

El campo de la invención está dirigido a métodos de aceleración de la curación de lesiones y trastornos del tejido conectivo. En particular, el campo de la invención se refiere a la aceleración de la curación de lesiones y trastornos de tendones y ligamentos. Tales métodos utilizan composiciones novedosas que incluyen, pero no se limitan a, 10 células extraembrionarias secretoras de citocinas (en el presente documento denominadas células ECS), que incluyen, pero no se limitan a, células progenitoras multipotentes derivadas del amnios (en el presente documento denominadas células AMP) y medios acondicionados derivados del mismo (en el presente documento denominados solución de citocina celular derivada del amnios o ACCS, ACCS combinada incluida) y solución de citocina fisiológica (en el presente documento denominada PCS), por sí solas o en combinación unas con otras y/o 15 con otros agentes.

Descripción de la técnica relacionada

Sharma, P. and Maffulli, N. (Disability and Rehabilitation, 2008; 30(20-22): 1733-1745) discuss emerging treatments 20 for tendinopathy and tendon injury.

Breve resumen de la invención

La presente invención viene definida por las reivindicaciones.

25 Es un objetivo de la presente descripción que comprende la invención proporcionar métodos novedosos de aceleración de la curación de lesiones y trastornos del tejido conectivo, en particular, lesiones y trastornos de tendón y ligamento. Tales métodos de aceleración de la curación de lesiones y trastornos del tejido conectivo utilizan composiciones novedosas que incluyen células extraembrionarias secretoras de citocinas (en el presente 30 documento denominadas células ECS), que incluyen células progenitoras multipotentes derivadas del amnios (AMP), medios acondicionados y/o productos celulares derivadas del mismo (en el presente documento denominados solución de citocina celular derivada del amnios o ACCS, ACCS combinada incluida) y solución de citocina fisiológica (en el presente documento denominada PCS), por sí solas y/o en combinación unas con otras y/o con otros agentes entre los que se incluyen agentes activos y/o inactivos.

35 En un ejemplo, la lesión y enfermedad del tejido conectivo se selecciona de entre el grupo que consiste en esguinces, distensiones, contusiones, tendinitis/tendinosis, avulsiones, bursitis, tenosinovitis, fracturas por fatiga y cirugía.

40 Una forma de realización específica del método del aspecto 1 es una donde el medio acondicionado es solución de citocina celular derivada del amnios (ACCS), ACCS combinada incluida. En una forma de realización más concreta, la ACCS y la ACCS combinada se formulan para liberación sostenida.

45 En un ejemplo, la ACCS o la ACCS combinada se administran combinados con otros agentes o modalidades de tratamiento, donde los agentes activos se seleccionan de entre el grupo que consiste en factores de crecimiento, citocinas, inhibidores, agentes inmunosupresores, esteroides, quimiocinas, anticuerpos, antibióticos, antifúngicos, antivirales, mitomicina C y otros tipos de células, y donde las otras modalidades de tratamiento se seleccionan de entre el grupo que consiste en reposo, hielo, compresión, elevación, terapia física y ejercicio.

50 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntos.

Definiciones

55 Tal y como se define en el presente documento, "aislado" se refiere a material retirado de su ambiente original y, por tanto, alterado "por la mano del hombre" a partir de su estado natural.

Tal y como se define en el presente documento, un "gen" es el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones anteriores y siguientes a la región codificadora, así como secuencias 60 intervinentes (intrones) entre segmentos codificadores individuales (exones).

Tal y como se usa en el presente documento, el término “marcador proteico” significa cualquier molécula de proteína característica de una célula o población celular. El marcador proteico puede estar situado sobre la membrana plasmática de una célula o, en algunos casos, puede ser una proteína secretada.

5

Tal y como se usa en el presente documento, “enriquecido” significa concentrado selectivamente o con mayor cantidad de uno o más materiales mediante eliminación de los materiales no deseados o selección y separación de los materiales deseables a partir de una mezcla (es decir, células individuales con marcadores celulares específicos procedentes de una población celular heterogénea en la que no todas las células de la población expresan el marcador).

10

Tal y como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente purificado” significa una población de células sustancialmente homogénea para un marcador o combinación de marcadores determinados. Sustancialmente homogénea significa que al menos el 90 %, y preferentemente el 95 %, es homogénea para un

15

marcador o combinación de marcadores determinados.

Tal y como se usa en el presente documento, el término “placenta” significa tanto placenta a término como pretérmino.

20

Tal y como se usa en el presente documento, el término “células totipotentes” debe tener el significado siguiente. En los mamíferos, las células totipotentes tienen potencial para llegar a ser cualquier tipo de célula en el cuerpo adulto; cualquier tipo(s) de célula(s) de las membranas extraembrionarias (por ejemplo, la placenta). Las células totipotentes son el huevo fertilizado y aproximadamente las primeras 4 células producidas por su escisión.

25

Tal y como se usa en el presente documento, el término “células madre pluripotentes” debe tener el significado siguiente. Las células madre pluripotentes son células madre verdaderas con potencial para fabricar cualquier célula diferenciada del cuerpo, pero no pueden contribuir a la fabricación de los componentes de las membranas extraembrionarias que derivan del trofoblasto. El amnios se desarrolla a partir del epiblasto, no del trofoblasto. Hasta la fecha se han confirmado tres tipos de células madre pluripotentes: células madre embrionarias (ES)

30

(también pueden ser totipotentes en primates), células germinales embrionarias (EG) y células del carcinoma embrionario (EC). Estas células EC se pueden aislar a partir de teratocarcinomas, un tumor que se produce ocasionalmente en la gónada de un feto. A diferencia de las otras dos, normalmente son aneuploides.

35

Tal y como se usa en el presente documento, el término “células madre multipotentes” son células madre verdaderas, pero que solo se pueden diferenciar para convertirse en un número de tipos limitado. Por ejemplo, la médula ósea contiene células madre multipotentes que dan lugar a todas las células de la sangre, pero pueden no ser capaces de diferenciarse para convertirse en otros tipos de células.

40

Tal y como se usa en el presente documento, el término «tejido extraembrionario» significa tejido situado fuera del cuerpo embrionario que está implicado en la protección, nutrición, eliminación de residuos, etc. del embrión. El tejido embrionario incluye, pero no se limita a, el amnios, el corion (trofoblasto y mesodermo extraembrionario que incluye el cordón y los vasos umbilicales), el saco vitelino, el alantoides y el líquido amniótico (incluyendo todos los componentes contenidos en él). El tejido extraembrionario y las células derivadas del mismo tienen el mismo genotipo que el embrión en desarrollo.

45

Tal y como se usa en el presente documento, el término “células extraembrionarias” o “células EE” significa una población de células derivadas del tejido extraembrionario.

50

Tal y como se usa en el presente documento, el término “células extraembrionarias secretoras de citocinas” o “células ECS” significa una población de células derivadas del tejido extraembrionario que tienen la característica de secretar VEGF, angiogenina, PDGF, TGF β 2 y los inhibidores de MMP TIMP-1 y/o TIMP-2 a niveles fisiológicamente relevantes, de una forma temporal fisiológicamente relevante, al espacio extracelular o a los medios de cultivo circundantes. Las células ECS no se han cultivado en presencia de materiales animales no humanos, lo que las hace a ellas y a los productos celulares derivados de ellas adecuados para su uso clínico en

55

humanos, ya que no están xenocontaminados. Las células ECS se pueden seleccionar de entre poblaciones de células y composiciones descritas en esta solicitud y en los documentos US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/666,949, 60/699,257, 60/742,067, 60/813,759, la solicitud de Estados Unidos n.º 11/333,849, la solicitud de Estados Unidos n.º 11/392,892, los documentos PCTUS06/011392, US2006/0078993, PCT/US00/40052, la patente US7045148, el

60

documento US2004/0048372 y el documento US2003/0032179, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad en

el presente documento por referencia. Anteriormente, las células ECS se han denominado células secretoras del factor trófico (TSE).

Tal y como se usa en el presente documento, el término “célula progenitora multipotente derivada del amnios” o célula “AMP” significa una población específica de células que son células epiteliales derivadas del amnios. Las células AMP tienen las características siguientes. No se han cultivado en presencia de materiales animales no humanos, lo que las hace a ellas y a los productos celulares derivados de ellas adecuados para su uso clínico en humanos, ya que no están xenocontaminados. Las células AMP se cultivan en medio basal suplementado con albúmina sérica humana. En una forma de realización preferida, las células AMP secretan las citocinas VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2, así como los inhibidores de MMP TIMP-1 y/o TIMP-2. El intervalo fisiológico de la citocina o las citocinas en la combinación única es el siguiente: ~5-16 ng/mL para VEGF, ~3,5-4,5 ng/mL para angiogenina, ~100-165 pg/mL para PDGF, ~2,5-2,7 ng/mL para TGFβ2, ~0,68 µg/mL para TIMP-1 y ~1,04 µg/mL para TIMP-2. Las células AMP crecen sin capas alimentadoras, no expresan la proteína telomerasa y no son tumorigénicas. Las células AMP no expresan el marcador de células madre hematopoyéticas proteína CD34. La ausencia de células CD34 positivas en esta población indica que los materiales aislados no están contaminados con células madre hematopoyéticas tales como sangre del cordón umbilical o fibroblastos embrionarios. Virtualmente, el 100 % de las células reaccionan con anticuerpos para citoqueratinas de bajo peso molecular, lo que confirma su naturaleza epitelial. Las células derivadas del amnios recién aisladas, a partir de las cuales se aíslan las células AMP, no reaccionarán con anticuerpos para los marcadores de células madre/progenitoras c-kit (CD117) y Thy-1 (CD90). En la técnica se conocen diversos procedimientos usados para obtener células de placenta a término o pretérmino (véase, por ejemplo, el documento US 2004/0110287; Anker y col., 2005, Stem Cells 22:1338-1345; Ramkumar y col., 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500). Sin embargo, los métodos usados en el presente documento proporcionan composiciones y poblaciones celulares mejoradas.

Cuando se hace referencia a ciertas composiciones, condiciones de crecimiento, medios de cultivo, etc. descritos en el presente documento, el término “libre de animales” significa que no se usan materiales derivados de animales no humanos, tales como suero, proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, etc. bovinos, en la preparación, el crecimiento, el cultivo, la expansión el almacenamiento o la formulación de ciertas composiciones o procedimientos. “Materiales no derivados de animales no humanos” significa que los materiales nunca han estado dentro de, o en contacto con, un cuerpo animal o sustancia que no sean humanos, por lo que no están xenocontaminados. Solo se usan materiales de grado clínico, tales como proteínas humanas producidas recombinantemente, en la preparación, el crecimiento, el cultivo, la expansión, el almacenamiento y/o la formulación de tales composiciones y/o procedimientos.

En lo que se refiere a composiciones celulares, el término “expandidas” significa que la población celular constituye una concentración significativamente más elevada de células de la que se obtiene usando métodos anteriores. Por ejemplo, la concentración de células por gramo de tejido amniótico en composiciones expandidas de células AMP es de al menos 50 y hasta 150 veces más elevada que el número de células epiteliales del amnios en el cultivo primario tras 5 pases, en comparación con un aumento de aproximadamente 20 veces en tales células usando métodos anteriores. En otro ejemplo, la concentración de células por gramo de tejido amniótico en composiciones expandidas de células AMP es de al menos 30 y hasta 100 veces más elevada que el número de células epiteliales del amnios en el cultivo primario tras 3 pases. Por consiguiente, una población “expandida” tiene una mejora de al menos 2 veces, y hasta 10 veces, en el número de células por gramo de tejido amniótico respecto a los métodos anteriores. El término “expandida” está destinado a cubrir solo aquellas situaciones en las que una persona ha intervenido para elevar el número de células.

Tal y como se usa en el presente documento, el término “pase” significa una técnica de cultivo celular en la que las células que crecen en cultivo han alcanzado la confluencia o están próximas a la confluencia en un recipiente de cultivo tisular, se han retirado del vaso, se han diluido con medios de cultivo frescos (es decir, diluido 1:5) y se han colocado en un nuevo recipiente de cultivo tisular para permitir su crecimiento y viabilidad continuos. Por ejemplo, las células aisladas del amnios se denominan células primarias. Tales células expanden en cultivo mediante crecimiento en el medio de crecimiento descrito en el presente documento. Cuando tales células primarias están subcultivadas, cada ronda de subcultivo se denomina pase. Tal y como se usa en el presente documento, “cultivo primario” significa la población celular recién aislada.

Tal y como se usa en el presente documento, el término “diferenciación” significa el procedimiento mediante el cual las células se hacen progresivamente más especializadas.

Tal y como se usa en el presente documento, el término “eficiencia de diferenciación” significa el porcentaje de células de una población que se están diferenciando o son capaces de diferenciarse.

5 Tal y como se usa en el presente documento, el término “medio acondicionado” es un medio en el que se ha cultivado un célula o población celular específicas y, a continuación, se ha retirado. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar apoyo o afectar al comportamiento de otras células. Tales factores incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos, quimiocinas, receptores, inhibidores

10 y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado. En la patente US6372494, que se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia, se describen ejemplos de métodos de preparación de medios acondicionados.

15 Tal y como se usa en el presente documento, el término “solución de citocina celular derivada del amnios” o “ACCS”, ACCS combinada incluida, significa un medio acondicionado derivado de células AMP que se han cultivado en medio basal suplementado con albúmina sérica humana. La ACCS se ha denominado anteriormente “suspensión de citocina celular derivada del amnios”.

20 Tal y como se usa en el presente documento, el término “nivel fisiológico” significa el nivel en que se encuentra una sustancia en un sistema vivo y que es relevante para el funcionamiento adecuado de un proceso bioquímico y/o biológico.

25 Tal y como se usa en el presente documento, el término “solución fisiológica de citocina” o composición “PCS” significa una composición que no deriva de células y que tiene concentraciones fisiológicas de uno o más factores seleccionados de entre VEGF, angiogenina, PDGF y TGF β 2 y al menos un inhibidor de MMP. Los ejemplos de inhibidores de MMP adecuados incluyen, pero no se limitan a, el TIMP-1 y TIMP-2. Se pueden encontrar detalles sobre la PCS en la publicación de Estados Unidos n.º US-2009-0054339A1, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia.

30 Tal y como se usa en el presente documento, el término “combinada” significa una pluralidad de composiciones que se han combinado para crear una nueva composición que tiene unas características más constantes o consistentes que las composiciones no combinadas.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” significa la cantidad de un agente terapéutico necesaria para alcanzar un efecto fisiológico deseado (es decir, tratar una lesión o enfermedad del tejido conectivo).

35 Tal y como se usa en el presente documento, el término “lisado” se refiere a la composición obtenida cuando las células, por ejemplo, las células AMP, se lisan y, opcionalmente, se eliminan los desechos celulares (por ejemplo, las membranas celulares). Esto se puede conseguir por medios mecánicos, mediante congelación y descongelación, por sonicación, mediante el uso de detergentes, tales como EDTA, o mediante digestión enzimática usando, por ejemplo, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas. En algunos casos, puede ser deseable lisar las células y retener la porción de membrana celular y desechar la porción restante de las células lisadas. En otros casos, puede ser deseable retener ambas porciones.

45 Tal y como se usa en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” significa que los componentes, además del agente terapéutico, que comprenden la formulación, son adecuados para administración al paciente que está siendo tratado de acuerdo con la presente invención.

Tal y como se usa en el presente documento, el término “tejido” se refiere a un agregado de células similarmente especializadas unidas para llevar a cabo una función concreta.

50 Tal y como se usa en el presente documento, el término “proteína terapéutica” incluye una amplia gama de proteínas biológicamente activas que incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, enzimas, hormonas, citocinas, inhibidores de citocinas, factores de coagulación sanguínea y factores de crecimiento y diferenciación peptídicos.

55 Tal y como se usa en el presente documento, el término “trasplante” se refiere a la administración de una composición que comprende células, que incluye una suspensión celular o células incorporadas en una matriz o un tejido, que están en forma no diferenciada, parcialmente diferenciada o totalmente diferenciada, a un humano u otro animal.

60 Tal y como se usa en el presente documento, los términos “uno” o “una” significan uno/a o más; al menos uno/a.

Tal y como se usa en el presente documento, el término “adyuvante” significa conjuntamente, junto con, además de, de forma conjunta con y similares.

- 5 Tal y como se usa en el presente documento, el término “coadministrar” puede incluir la administración simultánea o secuencial de dos o más agentes.

- Tal y como se usan en el presente documento, “tratamiento”, “tratar” o “tratando” cubren cualquier tratamiento de una enfermedad o afección de un mamífero, especialmente un humano, e incluyen: (a) prevención de que la enfermedad o afección se presente en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad o afección pero que todavía no ha sido diagnosticado de tenerla; (b) inhibición de la enfermedad o afección, es decir, freno de su desarrollo; (c) alivio o mejora de la enfermedad o afección, es decir, provocando la regresión de la enfermedad o afección (d) cura de la enfermedad o afección, es decir, detención de su desarrollo o progresión. La población de sujetos tratados mediante los métodos de la invención incluye sujetos que padecen la enfermedad o afección no deseadas, así como sujetos en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.
- 10
- 15

Tal y como se usa en el presente documento, el término “curación acelerada” significa que la velocidad a la que cura una lesión o herida es más rápida en un sujeto tratado que en un sujeto no tratado.

20 Descripción detallada

- De acuerdo con la presente invención, los expertos en la materia pueden emplear técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante convencionales. Tales técnicas se explican en su totalidad en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, ed., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III; Celis, ed., 1994, "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III; Coligan, ed., 1994, "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III; Gait ed., 1984, "Oligonucleotide Synthesis"; Hames & Higgins eds., 1985, "Nucleic Acid Hybridization"; Hames & Higgins, eds., 1984, "Transcription And Translation"; Freshney, ed., 1986, "Animal Cell Culture"; IRL Press, 1986, "Immobilized Cells And Enzymes"; Perbal, 1984, "A Practical Guide To Molecular Cloning."
- 25
- 30

- Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene, hasta un décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior y el inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o que interviene en ese intervalo establecido están abarcados en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden estar incluidos independientemente en los intervalos menores y están también abarcados en la invención y sometidos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando los intervalos establecidos incluyen uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de ambos límites incluidos también están incluidos en la invención.
- 35

- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento significan lo que un experto normal en la materia, a la que esta invención pertenece, entiende. Aunque también se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.
- 40

- Cabe señalar que, tal y como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de “unos/unas”, “y” y “los/las” incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.
- 45

Usos terapéuticos - Las composiciones de la invención son útiles en métodos de tratamiento de lesiones y trastornos del tejido conectivo que incluyen, pero no se limitan a:

- 50 Desgarros y roturas - Los tendones y ligamentos están sometidos a desgarros y roturas. Entre las afecciones que hacen que un desgarro o una rotura sea más probable se incluyen las inyecciones de esteroides en un tendón o ligamento, ciertas enfermedades (tales como la gota o el hiperparatiroidismo) y el hecho de tener la sangre tipo O. Un desgarro o una rotura pueden ser un problema grave y pueden derivar en dolor intenso y discapacidad permanente si no se tratan.
- 55

Habitualmente, los desgarros y las roturas se tratan quirúrgicamente o médicamente, dependiendo de la gravedad de la lesión.

- 60 Esguinces - Las articulaciones del cuerpo están soportadas por ligamentos. Los ligamentos son bandas fuertes de

tejido conectivo que conectan un hueso a otro. Un esguince es un simple estiramiento o desgarro de los ligamentos. Las áreas más vulnerables a los esguinces son los tobillos, las rodillas y las muñecas. La mayoría de los esguinces leves curan con reposo, hielo, compresión, elevación y ejercicio y/o terapia física. Los esguinces moderados también pueden requerir un periodo de inmovilización. Los esguinces graves pueden requerir cirugía para reparar los ligamentos desgarrados.

Distensiones - Los huesos están soportados por una combinación de músculos y tendones. Los tendones conectan los músculos a los huesos. Una distensión es el resultado de una lesión en un músculo o un tendón. La distensión puede ser un simple estiramiento del músculo o tendón, o puede ser un desgarro parcial o completo de la combinación de músculo y tendón. El tratamiento recomendado para una distensión es el mismo que para un esguince: reposo, hielo, compresión y elevación, seguidos de ejercicios sencillos y/o terapia física para aliviar el dolor y restaurar la movilidad. Para un desgarro grave, los tejidos pueden necesitar reparación quirúrgica.

Contusiones - Una contusión es un hematoma provocado por un golpe en el músculo, tendón o ligamento. La mayoría de contusiones son leves y responden bien al reposo, el hielo y la compresión y la elevación del área lesionada. Si los síntomas persisten, se debería buscar atención médica para impedir el daño permanente de los tejidos blandos.

Tendonitis/Tendinosis - Una inflamación en un tendón o en el recubrimiento de un tendón se denomina tendonitis, que es una inflamación de los tendones. La tendonitis está provocada por series de esfuerzos pequeños que agravan repetidamente el tendón. La tendonitis se puede tratar mediante reposo para eliminar la tensión, medicación antiinflamatoria, inyecciones de esteroides, férulas y ejercicios y/o terapia física para corregir el desequilibrio muscular y mejorar la flexibilidad. La inflamación persistente puede provocar daños al tendón, que pueden necesitar corrección quirúrgica.

Bursitis - Una bursa es un saco lleno de fluido que se localiza entre un hueso y un tendón o músculo. Una bursa permite que el tendón se deslice suavemente sobre el hueso. Los pequeños esfuerzos repetitivos y el uso excesivo pueden provocar que la bursa se hinche. Esta hinchazón e irritación se denomina bursitis. Mucha gente experimenta bursitis en combinación con tendonitis. Normalmente, la bursitis se puede aliviar mediante reposo y, posiblemente, con medicación antiinflamatoria. Los médicos también pueden inyectar en la bursa medicación adicional para reducir la inflamación.

Fracturas por fatiga - Cuando uno de los huesos sufre fatiga por un uso excesivo, se pueden producir pequeñas roturas en el hueso. La lesión se denomina una fractura por fatiga. Los síntomas tempranos pueden ser dolor e hinchazón en la región de la fractura por fatiga. Los huesos de la pantorrilla y el pie son especialmente propensos a las fracturas por fatiga. Puede que la fractura no se vea en una prueba inicial rutinaria de rayos X y se requiera una gammagrafía ósea para obtener el diagnóstico. Estas lesiones se tratan mediante reposo, modificación de la actividad, inmovilización con escayola y, raramente, mediante cirugía.

Tenosiniovitis - Otro problema de tendón crónico debido al uso excesivo es la tenosinovitis, que es una inflamación y/o irritación entre un tendón y su vaina sinovial que lo rodea (epitenón). La vaina reduce la fricción entre el tendón y el retináculo (o, infrecuentemente, un ligamento) que acerca el tendón a la articulación. El tendón debe ser capaz de deslizarse libremente dentro de la vaina.

Avulsión - Una avulsión es una lesión aguda de tendón que es consecuencia de altas cargas a tracción, en las que un tendón se ve arrancado a la fuerza de su sitio de unión sobre el hueso. En una mayoría de las lesiones por esfuerzos a tracción de la unidad musculotendinosa, se produce un desgarro de fibras en la unión musculotendinosa, lo que produce una distensión. En algunos otros casos, estas fibras permanecen intactas y el tendón se separa de su sitio de unión óseo. Las lesiones por avulsión se producen en regiones en las que un músculo grande se une a sitio relativamente pequeño sobre el hueso.

Cirugía - La reparación de tendones y ligamentos se puede realizar usando anestesia local, anestesia regional o anestesia general. El cirujano hace una incisión en la piel sobre el tendón o ligamento lesionado y cose los extremos dañados o desgarrados del tendón o ligamento. Si el tendón o ligamento está gravemente dañado, puede ser necesario un injerto. En este caso, con frecuencia se usa un trozo de tendón o ligamento de otra parte del cuerpo. Si es necesario, los tendones y ligamentos se vuelven a unir al tejido circundante. El objetivo de la reparación es devolver el funcionamiento normal de las articulaciones o los tejidos circundantes después de la lesión. Entre los riesgos posibles se incluyen la formación de tejido cicatrizal que impide los movimientos suaves, la pérdida parcial de uso de la articulación implicada y la rigidez de la articulación.

Obtención y cultivo de células

Células ECS - En la técnica se describen diversos métodos de aislamiento de células del tejido extraembrionario, las cuales, a continuación, pueden usarse para producir las células ECS de la presente invención (véanse, por ejemplo, los documentos US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos n.º. 60/666,949, 60/699,257, 60/742,067, 60/813,759, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/333,849, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/392,892, los documentos PCTUS06/011392, US2006/0078993, PCT/US00/40052, la patente US7045148 y los documentos US2004/0048372 y US2003/0032179).

10 Identificación de células ECS - Una vez que se ha aislado el tejido extraembrionario, es necesario identificar qué células tienen las características asociadas a las células ECS (véase la definición dada anteriormente). Por ejemplo, se ensaya la capacidad de las células para secretar VEGF, angiogenina, PDGF, TGF β y los inhibidores de MMP TIMP-1y/o TIMP-2 al espacio extracelular o a los medios de cultivo circundantes. En algunos casos, puede ser difícil o imposible detectar ciertos factores usando ensayos estándar. Esto puede ser porque ciertos factores son secretados por las células a niveles fisiológicos que están por debajo del nivel de detección de los métodos de ensayo. También puede ser que el(los) factor(es) estén siendo utilizados por la célula ECS y/o por otras células locales y, por tanto, se impide su acumulación a niveles detectables usando ensayos estándar. También es posible que la forma temporal en la que se secretan los factores no coincida con el momento de la toma de muestras.

15 Las composiciones de células AMP se preparan usando las etapas de a) recuperación del amnios de la placenta; b) disociación de las células epiteliales de la membrana amniótica usando una proteasa; c) cultivo de las células en un medio basal con la adición de una proteína humana procedente de la naturaleza o producida recombinantemente (es decir, albúmina sérica humana) que no sea una proteína animal no humana; d) selección de células AMP del cultivo de células epiteliales y, opcionalmente, e) proliferación adicional de las células, opcionalmente usando aditivos y/o factores de crecimiento (es decir, EGF humano recombinante) adicionales. Detalles de esto están incluidos en la publicación de Estados Unidos n.º 2006-0222634-A1, que se incorpora en el presente documento por referencia.

30 Cultivo de las células AMP - Se cultivan las células en un medio basal. Tal medio incluye, pero no se limita a, medio de cultivo para células epiteliales EPILIFE® (Cascade Biologicals), medio de cultivo libre de suero OPTI-PRO™, medio libre de suero VP-SFM, medio basal altamente enriquecido IMDM, medio DMEM de baja osmolaridad KNOCKOUT™ DMEM y medio definido libre de suero 293 SFM II (todos fabricados por Gibco; Invitrogen), medio de crecimiento progenitor hematopoyético HPGM, medio libre de suero Pro 293S-CDM, medio libre de suero Pro 293A-CDM y medio libre de suero UltraMDCK™ (todos fabricados por Cambrex), medio de expansión de células T STEMLINE® y medio de expansión de células madre hematopoyéticas STEMLINE® II (ambos fabricados por Sigma-Aldrich), medio de cultivo DMEM y medio de crecimiento con mezcla de nutrientes DMEM/F-12 (ambos fabricados por Gibco), medio de cultivo con mezcla de nutrientes Ham's F-12 y medio de cultivo basal M199 (ambos fabricados por SigmaAldrich), así como otros medios basales comparables. Tales medios deben contener proteína humana o estar suplementados con proteína humana. Tal y como se usa en el presente documento, el término "proteína humana" es una que se produce de forma natural o una que se produce usando tecnología recombinante, por ejemplo, albúmina sérica humana. En formas de realización específicas, el medio basal es medio basal altamente enriquecido IMDM, medio de expansión de células T STEMLINE® T o medio de expansión de células madre hematopoyéticas STEMLINE® II, o medio de cultivo libre de suero OPTI-PRO™, o combinaciones de los mismos y la proteína humana es albúmina sérica humana añadida en al menos un 0,5 % y hasta un 10 %. En formas de realización específicas, la albúmina sérica humana está en desde aproximadamente un 0,5 % hasta aproximadamente un 2 %. En una forma de realización específica, la albúmina sérica humana está en un 0,5 %. La albúmina sérica humana puede proceder de un líquido o una forma seca (polvo) e incluye, pero no se limita a, albúmina sérica humana recombinante, albúmina sérica humana normal PLASBUMIN® y la fracción de sangre humana PLASMANATE® (ambas fabricadas por Talecris Biotherapeutics).

En una forma de realización más preferida, las células se cultivan usando un sistema que está libre de productos animales no humanos para evitar la xenocontaminación. En esta forma de realización, el medio de cultivo es medio basal altamente enriquecido IMDM, medio de expansión de células T STEMLINE® T o medio de expansión de células madre hematopoyéticas STEMLINE® II, medio de cultivo libre de suero OPTI-PRO™, o medio de cultivo DMEM, con albúmina humana (albúmina sérica humana normal PLASBUMIN®) añadida en cantidades de hasta un 10 %.

60 La invención contempla además el uso de cualquiera de los medios basales anteriores donde las proteínas

derivadas de animales se sustituyen por proteínas humanas recombinantes y el suero derivado de animales, tal como BSA, se sustituye por albúmina sérica humana. En formas de realización preferidas, el medio está libre de suero además de estar libre de animales.

- 5 Opcionalmente, se usan otros factores. En una forma de realización, se usa factor de crecimiento epidérmico (EGF) en una concentración de entre 0-1 mg/mL. En una forma de realización preferida, la concentración del EGF es de alrededor de 10-20 µg/mL. Los factores de crecimiento alternativos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, TGF α o TGF β 2 (5 ng/mL; intervalo 0,1-100 ng/mL), activina A, toxina colérica (preferentemente en una concentración de aproximadamente 0,1 µg/mL; intervalo 0-10 µg/mL), transferrina (5 µg/mL; intervalo 0,1-100
- 10 µg/mL), factores de crecimiento fibroblástico (bFGF 40 ng/mL (intervalo 0-200 ng/mL), aFGF, FGF-4, FGF-8; (todos en el intervalo 0-200 ng/mL), proteínas morfogenéticas óseas (es decir, BMP-4) u otros factores de crecimiento conocidos para mejorar la proliferación celular. Todos los suplementos son de grado clínico.

Generación de medio acondicionado

- 15 Medio acondicionado de células ECS - Se obtiene como se describe a continuación para la ACCS, excepto que se usan células ECS.

- Generación de ACCS - Las células AMP de la invención se pueden usar para generar ACCS. En una forma de realización, se aíslan las células AMP tal y como se describe en el presente documento y se siembran 1x10⁶ células/mL en matraces T75 que contienen entre 5-30 mL de medio de cultivo, preferentemente entre 10-25 mL de medio de cultivo, y más preferentemente aproximadamente 10 mL de medio de cultivo. Se cultivan las células hasta alcanzar la confluencia, se cambia el medio y, en una forma de realización, se recoge la ACCS 1 día después de la confluencia. En otra forma de realización, se cambia el medio y se recoge la ACCS 2 días después de la confluencia. En otra forma de realización, se cambia el medio y se recoge la ACCS 3 días después de la confluencia. En otra forma de realización, se cambia el medio y se recoge la ACCS 4 días después de la confluencia. En otra forma de realización, se cambia el medio y se recoge la ACCS 5 días después de la confluencia. En otra forma de realización preferida, se cambia el medio y se recoge la ACCS 3, 4, 5, 6 o más días
- 25 después de la confluencia. Los expertos en la materia reconocerán que otras formas de realización para la recogida de ACCS procedente de cultivos de células AMP, tales como el uso de otros recipientes para el cultivo de tejidos, que incluyen, pero no se limitan a, fábricas de células, matraces, fibras huecas o aparatos de cultivo en suspensión, o para la recogida de ACCS subconfluente y/o cultivos que proliferan activamente, también están contempladas por los métodos de la invención. También está contemplado por la presente invención que se criopreserve la ACCS después de la recogida. También está contemplado que se liofilice la ACCS después de la recogida. También está contemplado que se formule la ACCS para liberación sostenida después de la recogida.
- 30
- 35

- Las composiciones de la invención se pueden preparar de una variedad de formas, dependiendo del uso previsto de las composiciones. Por ejemplo, una composición útil en la puesta en práctica de la invención puede ser un líquido que comprende un agente de la invención, es decir, células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, en solución, en suspensión o ambas (solución/suspensión). El término "solución/suspensión" se refiere a una composición líquida donde una primera porción del agente activo está presente en solución y una segunda porción del agente activo está presente en forma particulada, en suspensión
- 40 en una matriz líquida. Una composición líquida también incluye un gel. La composición líquida puede ser acuosa o en forma de un ungüento, una pomada, una crema o similares.
- 45

- Una suspensión acuosa o solución/suspensión útil para la puesta en práctica de los métodos de la invención puede contener uno o más polímeros como agentes de suspensión. Los polímeros útiles incluyen polímeros hidrosolubles tales como los polímeros celulósicos y polímeros insolubles en agua tales como los polímeros entrecruzados que contienen grupos carboxilo. Una suspensión acuosa o solución/suspensión de la presente invención es preferentemente viscosa o mucoadhesiva, o incluso más preferentemente, tanto viscosa como mucoadhesiva.
- 50

- Composiciones farmacéuticas - La presente descripción que comprende la invención proporciona composiciones farmacéuticas de células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal, o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea con reconocimiento general para su uso en animales y, más concretamente, en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o medio con el que se administra la composición. Tales
- 55 vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los derivados del
- 60

petróleo y los de origen animal, vegetal o sintético, tales como el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o de agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin, se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos aceptables y otros más resultan familiares a los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Kits de tratamiento- La invención también contempla un artículo de fabricación que comprende material de embalaje

y una composición farmacéutica de la invención contenida dentro del material de embalaje, donde la composición farmacéutica comprende composiciones de células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS. El material de embalaje comprende una etiqueta o un prospecto que indica que las células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, se pueden usar para el tratamiento de lesiones y trastornos del tejido conectivo.

Formulación, dosificación y administración

Las composiciones que comprenden células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, se pueden administrar a un sujeto para proporcionar diversas funciones celulares o tisulares, por ejemplo, para tratar lesiones y trastornos del tejido conectivo. Tal y como se usa en el presente documento, "sujeto" puede significar un humano o un animal no humano.

Tales composiciones se pueden formular de cualquier forma convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables y, opcionalmente, comprendiendo excipientes y auxiliares. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Las composiciones se pueden embalar con instrucciones escritas para su uso en el tratamiento de lesiones y trastornos del tejido conectivo o en la restauración de una función metabólica terapéuticamente importante. Las composiciones también se pueden administrar al receptor en uno o más vehículos fisiológicamente aceptables. Los vehículos para las células pueden incluir, pero no se limitan a, soluciones salinas tamponadas con fosfato (PBS) o solución de Ringer lactada que contiene una mezcla de sales en concentraciones fisiológicas.

Las composiciones farmacéuticas útiles en la puesta en práctica de ciertas formas de realización de la invención (es decir, las que usan administración tópica) incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas pueden ser líquido, gel, ungüento, pomada, formulaciones de liberación sostenida u otras formulaciones adecuadas para su administración a tejidos conectivos, tendones y ligamentos incluidos. La composición comprende una composición de la invención (es decir, células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS) y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En diversas formas de realización, las composiciones pueden comprender un líquido que comprende un agente activo en solución, en suspensión o ambas. En el presente documento, el término "suspensión" incluye una composición líquida donde una primera porción del agente activo está presente en solución y una segunda porción del agente activo está presente en forma particulada, en suspensión en una matriz líquida. Tal y como se usan en el presente documento, las composiciones líquidas incluyen geles.

Preferentemente, la composición líquida es acuosa. Alternativamente, la composición puede tomar forma de un ungüento. En una forma de realización preferida, la composición es una composición acuosa gelificable in situ, más preferentemente una solución acuosa gelificable in situ. Tal composición puede comprender un agente gelificante en una concentración efectiva para promover la gelificación en contacto con el cuerpo. Los agentes gelificantes adecuados incluyen, de forma no restrictiva, polímeros termoestables tales como los copolímeros en bloque

etilendiamina tetrasustituidos de óxido de etileno y óxido de propileno (por ejemplo, poloxamina 1307); policarbófilo y polisacáridos tales como gelano, carragenano (por ejemplo, kappa-carragenano e iota-carragenano), quitosano y gomas de alginato. La expresión "gelificable in situ" incluye no solo líquidos de baja viscosidad que pueden formar geles, sino también líquidos más viscosos tales como geles semifluidos y tixotrópicos que exhiben una viscosidad sustancialmente mayor o rigidez de gel tras su administración.

Las composiciones acuosas de la invención tienen un pH y una osmolaridad fisiológicamente compatibles. Preferentemente, estas composiciones incorporan medios para inhibir el crecimiento microbiano, por ejemplo, a través de la preparación y embalaje en condiciones estériles y/o a través de la inclusión de una cantidad antimicrobianamente efectiva de un conservante aceptable. Los conservantes adecuados incluyen, de forma no restrictiva, sustancias que contienen mercurio tales como sales fenilmercuríicas (por ejemplo, acetato, borato y nitrato fenilmercuríico) y timerosal; dióxido de cloro estabilizado, compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de cetilpiridinio; imidazolidinil urea, parabenos tales como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y sales de los mismos; fenoxietanol, clorofenoxietanol, fenoxipropanol, clorobutanol, clorocresol; alcohol feniletílico, EDTA disódico; ácido sórbico y sales de los mismos.

La composición puede comprender una formulación de depósito que comprende un agente activo para administración. La formulación de depósito comprende una composición de la invención (es decir, células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS). Las micropartículas que comprenden las composiciones se pueden integrar en un polímero biocompatible farmacéuticamente aceptable o en un encapsulante lipídico. Las formulaciones de depósito se pueden adaptar para liberar todo, o sustancialmente todo, el material activo a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. El polímero o la matriz lipídica, si están presentes, se pueden adaptar para que se desgraden lo suficiente como para ser transportados desde el sitio de administración tras la liberación de todo, o sustancialmente todo, el agente activo. La formulación de depósito puede ser una formulación líquida que comprende un polímero farmacéuticamente aceptable y un agente activo disuelto o disperso. Tras su inyección, el polímero forma un depósito en el sitio de inyección, por ejemplo, mediante gelificación o precipitación.

La composición puede comprender un artículo sólido que se puede introducir en una ubicación adecuada en el sitio de la lesión o la enfermedad, donde el artículo libera el agente activo. La liberación a partir de tal artículo se hace preferentemente a los tendones y/o ligamentos, con los que, generalmente, el artículo está en contacto íntimo. Generalmente, los artículos sólidos adecuados para su implantación comprenden polímeros y pueden ser bioerosionables o no bioerosionables. Los polímeros bioerosionables que se pueden usar en la preparación de implantes que llevan la composición de acuerdo con la presente invención incluyen, sin restricción, poliésteres alifáticos tales como polímeros y copolímeros de poli(glicolida), poli(lactida), poli(épsilon-caprolactona), poli(hidroxitbutirato) y poli(hidroxi valerato), poliaminoácidos, poliortoésteres, polianhídridos, policarbonatos alifáticos y poliéter lactosa. Los elastómeros de silicona son ilustrativos de los polímeros no bioerosionables adecuados.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente la concentración adecuada, o dosis, de las células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS o PCS, para un fin concreto. El experto en la materia reconocerá que una dosis preferida es una que produce un efecto terapéutico,

tal como el tratamiento de lesiones y trastornos del tejido conectivo en un paciente con necesidad del mismo. Por supuesto, las dosis adecuadas de las células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, requerirán una determinación empírica en el momento de su uso en base a diversas variables que incluyen, pero no se limitan a, la severidad y tipo de enfermedad, lesión, trastorno o afección que se está tratando, la edad, el peso, el sexo y la salud del paciente, otras medicaciones que se estén administrando al paciente y similares. Un experto en la materia también reconocerá que el número de dosis (régimen de dosis) que se van a administrar también necesita determinarse empíricamente en base a, por ejemplo, la severidad y tipo de enfermedad, lesión, trastorno o afección que se está tratando. En una forma de realización preferida, una dosis es suficiente. Otra forma de realización preferida contempla 2, 3, 4 o más dosis.

La presente invención proporciona un método de tratamiento de lesiones y trastornos del tejido conectivo mediante administración a un sujeto de células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS o PCS, en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por "terapéuticamente efectiva" se entiende la dosis de células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, que es suficiente para obtener un efecto terapéutico. Por tanto, la concentración de células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, en una unidad de dosis administrada de acuerdo con la presente invención es efectiva en, por ejemplo, el tratamiento de lesiones y trastornos del tejido conectivo.

En formas de realización adicionales, puede ser deseable coadministrar otros agentes, incluyendo agentes activos y/o agentes inactivos, con las células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, para tratar lesiones y trastornos del tejido conectivo. Los agentes activos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, quimiocinas, anticuerpos, inhibidores, antibióticos, antifúngicos, antivirales, agentes inmunosupresores, otros tipos de células y similares. Los agentes inactivos incluyen vehículos, diluyentes, estabilizantes, agentes gelificantes, vehículos de entrega, ECM (natural y sintética), matrices y similares. Cuando las células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, se administran conjuntamente con otros agentes farmacéuticamente activos, incluso pueden ser necesarias menos células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, para que sean terapéuticamente efectivas.

Las células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, se pueden administrar mediante inyección en un sitio diana de un sujeto, preferentemente mediante un dispositivo de entrega, tal como un tubo, por ejemplo, un catéter. En una forma de realización preferida, el tubo contiene adicionalmente una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la cual se pueden introducir las células y/o la ACCS en una ubicación deseada del sujeto.

El momento de la administración de células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, dependerá del tipo y la severidad de la lesión o enfermedad del tejido conectivo que está siendo tratada. En una forma de realización preferida, las células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, se administran tan pronto como sea posible después de que se ha producido la lesión o se ha diagnosticado la enfermedad. En otra forma de realización preferida, las células ECS, que incluyen células AMP y/o ACCS, ACCS combinada o PCS, se administran más de una vez tras la lesión o el diagnóstico.

También se desvelan composiciones que comprenden células que se han diferenciado totalmente o parcialmente a partir de células ECS, células AMP incluidas. Tales composiciones de células totalmente o parcialmente diferenciadas se obtienen mediante tratamiento de las células ECS, células AMP incluidas, con reactivos apropiados y en condiciones apropiadas, donde las células experimentan una diferenciación parcial o completa para convertirse en, por ejemplo, células del tejido conectivo. Los expertos en la materia están familiarizados con las condiciones capaces de lograr tal diferenciación parcial o completa. Las células se pueden tratar bajo condiciones de diferenciación antes de su uso (es decir, antes de su trasplante, administración, etc.) o simultáneamente a su uso. En ciertas formas de realización, las células se tratan bajo condiciones de diferenciación antes y durante su uso.

Composiciones de liberación sostenida

La ACCS, ACCS combinada o PCS se pueden formular como composiciones de liberación sostenida. Los expertos en la materia están familiarizados con las metodologías para crear composiciones de liberación sostenida de agentes terapéuticos, agentes terapéuticos a base de proteínas tales como ACCS, ACCS combinada o PCS incluidos.

Las composiciones de liberación sostenida se pueden fabricar mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la tecnología de formulación de liposomas multivesiculares es útil para la liberación sostenida de productos terapéuticos a base de proteínas y péptidos. Qui, J., y col., (ACTA Pharmacol Sin, 2005, 26(11):1395-401) describen esta metodología para la formulación de interferón alfa-2b de liberación sostenida. Vyas, S.P., y col., (Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32(6):699-707) describen la encapsulación de interferón alfa pegilado en liposomas multivesiculares. La ACCS, ACCS combinada y PCS, son adecuadas para su uso en la formulación de liberación sostenida de liposomas multivesiculares.

La tecnología de nanopartículas también es útil para la creación de composiciones de liberación sostenida. Por ejemplo, Packhaeuser, C.B., y col., (J Control Release, 2007, 123(2):131-40) describen sistemas de depósito parenteral biodegradables basados en nanopartículas de dialquilaminoalquilamina-poli(alcohol vinílico)-g-poli(lactida-co-glicolida) cargadas con insulina y concluyen que esos depósitos a base de nanopartículas son candidatos para el diseño de dispositivos de liberación controlada para macromoléculas bioreactivas (es decir, proteínas). Dailey, L.A., y col., (Pharm Res 2003, 20(12):2011-20) describen nanopartículas biodegradables libres de tensioactivos para terapia a base de aerosoles, que se basa en los polímeros ramificados DEAPA-PVAL-g-PLGA y concluyen que los DEAPA-PVAL-g-PLGA son sistemas de liberación de fármacos versátiles. La ACCS, ACCS combinada y PCS, son adecuadas para su uso en formulaciones de liberación sostenida a base de nanopartículas.

Las formulaciones de liberación sostenida a base de polímeros también son muy útiles. Chan, Y.P., y col., (Expert

Opin Drug Deliv, 2007, 4(4):441-51) proporcionan una revisión del sistema Medusa (Flamel Technologies), que se usa para la liberación sostenida de terapias proteicas y peptídicas. Hasta ahora, el sistema Medusa se ha aplicado a la inyección subcutánea de IL-2 e IFN-alfa(2b) en modelos animales (ratas, perros, monos) y en ensayos clínicos en pacientes con cáncer renal (IL-2) y hepatitis C (IFN-alfa(2b)). Chavanpatil, M.D., y col., (Pharm Res, 2007, 24(4):803-10) describen nanopartículas de tensioactivo-polímero como una plataforma novedosa para la liberación celular sostenida y mejorada de moléculas hidrosolubles. Takeuchi, H., y col., (Adv Drug Deliv Res, 2001, 47(1):39-54) describen sistemas de nanopartículas mucoadhesivas para la liberación de fármacos peptídicos, nanopartículas de liposomas y poliméricas incluidas. Wong, H.L., y col., (Pharm Res, 2006, 23(7):1574-85) describen un nuevo sistema híbrido polímero-lípido que ha demostrado incrementar la citotoxicidad de la doxorubicina contra células del cáncer de mama resistentes a múltiples fármacos. La ACCS, ACCS combinada y PCS, son adecuadas para su uso en las metodologías de formulación de liberación sostenida mencionadas anteriormente.

Además, aunque no se describen en el presente documento, también son adecuadas para su uso otras metodologías de liberación sostenida que resultan familiares a los expertos en la materia.

Los expertos en la materia reconocerán que cualquiera de, y todos, los métodos y modalidades estándar de tratamiento de lesiones y trastornos del tejido conectivo que se usan actualmente en la práctica clínica y el desarrollo clínico son adecuados para la puesta en práctica de los métodos de la invención. Las vías de administración, la formulación, la coadministración con otros agentes (si procede) y similares se tratan en detalle en otra parte del presente documento.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y una descripción de cómo hacer y usar los métodos y las composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los autores de la invención consideran su invención. Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud en lo que respecta a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deberá responder por algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados y la presión es la presión atmosférica o cerca de ella.

Ejemplo 1: Preparación de composiciones de células AMP.

Se disociaron células epiteliales del amnios de la membrana amniótica de partida usando los agentes de disociación PXXIII. El intervalo de peso promedio de un amnios fue de 18-27 g. El número de células recuperadas por g de amnios fue de aproximadamente 10^{10} para la disociación con PXXIII.

Método de obtención de células AMP seleccionadas - Se sembraron en placas células epiteliales del amnios inmediatamente después de su aislamiento del amnios. Después de ~2 días en cultivo, se retiraron las células no adherentes y se mantuvieron las células adherentes. Esta conexión a un recipiente plástico de cultivo celular es el método de selección usado para obtener la población deseada de células AMP. Las células AMP adherentes y no adherentes parecen tener un perfil de expresión del marcador de superficie celular similar, pero las células adherentes tienen mayor viabilidad y son la población de células deseada. Se cultivaron las células AMP adherentes en medio basal suplementado con albúmina sérica humana hasta que alcanzaron $\sim 120\,000$ - $150\,000$ células/cm². En este momento, los cultivos eran confluentes. Los cultivos de células adecuados alcanzarán este número de células en entre ~5-14 días. El logro de este parámetro es un indicador del potencial proliferativo de las células AMP y las células que no alcanzan este parámetro no se seleccionan para su análisis y uso posterior. Una vez que las células AMP alcanzaron $\sim 120\,000$ - $150\,000$ células/cm², se recogieron y se criopreservaron. Este momento de recogida se denomina p0.

Ejemplo 2: Generación de ACCS

Las células AMP de la invención se pueden usar para generar ACCS, ACCS combinada incluida. Se aislaron las células AMP tal y como se ha descrito anteriormente y se sembraron $\sim 1 \times 10^5$ células/mL en matraces T75 que contenían ~10 mL de medio de cultivo tal y como el descrito anteriormente. Se cultivaron las células hasta alcanzar la confluencia, se cambió el medio y se recogió la ACCS 3 días después de la confluencia. Opcionalmente, la ACCS se volvió a recoger después de 3 días y, opcionalmente, otra vez después de 3 días. Los expertos en la materia reconocerán que otras formas de realización para la recogida de ACCS procedente de cultivos confluentes, tales como el uso de otros recipientes para el cultivo de tejidos, que incluyen, pero no se limitan a, fábricas de

células, matraces, fibras huecas o aparatos de cultivo en suspensión, etc., también están contempladas por los métodos de la invención (véase la Descripción detallada anterior). También está contemplado por la presente invención que se criopreserve, liofilice, irradie o formule para liberación sostenida la ACCS después de su recogida. También está contemplado que la ACCS se recoja en momentos diferentes (véase la Descripción detallada para 5 obtener más detalles).

Ejemplo 3: Generación de composiciones de PCS Las composiciones de PCS siguientes se producen mediante combinación de la citocina o el factor indicados a niveles fisiológicos en un vehículo:

- 10 Composición A: VEGF y TIMP-1; Composición B: VEGF, angiogenina y TIMP-1; Composición C: VEGF, angiogenina, PDGF-BB y TIMP-1; Composición D: VEGF, angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2 y TIMP-1; Composición E: VEGF y TIMP-2; Composición F: VEGF, angiogenina y TIMP-2; Composición G: VEGF, angiogenina, PDGF-BB y TIMP-2; Composición H: VEGF, angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2 y TIMP-2; Composición I: VEGF, TIMP-1 y TIMP-2; Composición J: VEGF, angiogenina, TIMP-1 y TIMP-2; Composición K: VEGF, angiogenina, PDGF-BB, 15 TIMP-1 y TIMP-2; Composición L: VEGF, angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2; Composición M: angiogenina y TIMP-1; Composición N: angiogenina, PDGF-BB y TIMP-1; Composición O: angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2 y TIMP-1; Composición P: angiogenina y TIMP-2; Composición Q: angiogenina, PDGF-BB y TIMP-2; Composición R: angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2 y TIMP-2; Composición S: angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2; Composición T: PDGF-BB y TIMP-1; Composición U: PDGF-BB, TGFβ2 y TIMP-1; Composición V: 20 PDGF-BB y TIMP-2; Composición W: PDGF-BB, TGFβ2 y TIMP-2; Composición X: PDGF BB, TIMP-1 y TIMP-2; Composición Y: PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2. Una composición preferida es la Composición L.

Las composiciones A-Y contienen, opcionalmente, timosina β4. Los expertos en la materia reconocerán que, en ciertas formas de realización, pueden ser adecuados otros inhibidores de MMP (es decir, TIMP-3, TIMP-4 o 25 inhibidores de MMP sintéticos) (J. Frederick Woessner, Jr., J. Clin. Invest. 108(6): 799-800 (2001); Brew, K., y col., Biochim Biophys Acta. 2000 Mar 7; 1477(1-2):267-83).

Se añaden VEGF, angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2 a las concentraciones fisiológicas siguientes: ~5-16 ng/mL para VEGF, ~3,5-4,5 ng/mL para angiogenina, ~100-165 pg/mL para PDGF, ~2,5-2,7 ng/mL para 30 TGFβ2, ~0,68 μg/mL para TIMP-1 y ~1,04 μg/mL para TIMP-2. La VEGF se puede conseguir en Invitrogen, n.º de catálogo PHG0144, PHG0145, PHG0146, PHG0141 o PHG0143; la angiogenina se puede conseguir en R&D Systems, n.º de catálogo 265-AN-050 o 265-AN-250; el PDGF-BB se puede conseguir en Invitrogen, n.º de catálogo PHG0044, PHG0045, PHG0046, PHG0041, PHG0043; el TGFβ2 se puede conseguir en Invitrogen, n.º de catálogo PHG9114; el TIMP-1 se puede conseguir en R&D Systems, n.º de catálogo 970-TM-010; y el TIMP-2 se 35 puede conseguir en R&D Systems, n.º de catálogo 971-TM-010. La VEGF, la angiogenina, el PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2 se añaden a un vehículo tal como solución salina normal, PBS, solución de Ringer lactada, medio de cultivo celular, agua u otra solución acuosa adecuada conocida por los expertos en la materia.

Ejemplo 4: Generación de composiciones de liberación sostenida

40 Las composiciones de liberación sostenida de ACCS, ACCS combinada o PCS incluidas, se producen mediante combinación de composiciones de ACCS, ACCS combinada o PCS incluidas, con cualquiera de las tecnologías de formulación de liberación sostenida descritas en el presente documento (véase la Descripción detallada) o, de lo contrario, que resulten familiares a los expertos en la materia.

45 **Ejemplo 5: Uso de células AMP y ACCS en un modelo animal de lesión del tejido conectivo.**

El objetivo de este estudio era evaluar el efecto de las células AMP y la ACCS sobre la curación del tendón de Aquiles usando un modelo de rata.

50

Materiales y métodos

Animales: en este experimento, se usaron ciento veintiséis ratas Sprague-Dawley hembra (Charles River, Cambridge, MA), que pesaban aproximadamente 300 g y tenían 10 semanas de edad. Se mantuvieron dos 55 animales por jaula y se les dio comida y agua a voluntad. Cada jaula (n = 63) se asignó de forma aleatoria a tres grupos diferentes: Grupo A - Solución salina, Grupo B - ACCS y Grupo C - Células AMP. El estudio fue aprobado por el Comité permanente de la HMA en materia de animales y se adhirió a todas las directrices institucionales en materia de cuidado y tratamiento de animales de laboratorio.

Procedimiento quirúrgico: se anestesiaron las ratas con ketamina (60 mg/kg IP) y xilazina (10 mg/kg IP) y se mantuvieron usando gas isoflurano (1-2 %) a través del cono nasal. A continuación, se afeitó la pata trasera derecha usando una maquinilla de cortar el pelo y se esterilizó usando alcohol al 70 %, betadine y alcohol al 70 %, secuencialmente. Usando disección cortante, se expuso el tendón de Aquiles y se transectó en su punto medio. A

5 continuación, se inyectaron ambos extremos libres con 100 ml de solución salina, ACCS o 100 000 células AMP diluidas en 100 ml de PBS. A continuación, se suturaron los tendones juntos usando suturas trenzadas de etileno 6-0 (Ethicon, Somerville, NJ) usando una técnica Kessler modificada. Se cerró la piel usando suturas de nylon 6-0 (Ethicon). A continuación, se envolvieron las patas en gasa petrolada y, a continuación, se inmovilizaron usando una escayola que se colocó desde los dedos hasta el abdomen, consiguiendo una estabilidad en tres puntos

10 (tobillo-rodilla-cadera) (Scotchcast 3M). A continuación, se devolvieron las ratas a sus jaulas y se les permitió que curaran durante 1, 2 o 4 semanas. Se observaron diariamente las ratas en busca de signos de apetito, dolor, infección, hinchazón y parálisis muscular. Se retiraron todas las escayolas en 1 semana. Se sacrificaron los animales mediante sobredosis de isoflurano (10 %) y se diseccionaron los tendones de Aquiles libres del tejido blando ajeno y se cosecharon junto con el hueso calcáneo y partes del complejo muscular de gastrocnemio y

15 sóleo. Los especímenes para pruebas mecánicas se congelaron inmediatamente a -70 °C. Los especímenes para histología se diseccionaron de forma similar sin el calcáneo. Se cosecharon los tendones contralaterales no lesionados de todos los animales como controles.

Pruebas mecánicas: en el día de la evaluación, se descongelaron los especímenes a temperatura ambiente y se

20 prepararon para las pruebas tensiles. Para la sujeción, se retiró cuidadosamente el músculo del tendón proximal mediante disección roma para producir un abanico de fibras de tendón que, a continuación, se sujetaron usando una pinza Pennington grande (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ) y papel de lija de grano 1200 húmedo (Home Depot, Boston, MA). A continuación, se sujetó el extremo distal del tendón usando otra pinza Pennington únicamente proximal a la inserción calcánea. A continuación, se aseguraron verticalmente a su vez las dos pinzas

25 Pennington en una máquina de ensayo de materiales (Instron 5565, Norwood, MA) usando mordazas neumáticas con superficies de mordaza dentadas. A continuación, se registró la anchura, el grosor y la longitud de los tendones (distancia entre los extremos de las pinzas Pennington) usando un calibre deslizante. Se calculó el área transversal asumiendo una geometría rectangular. Durante la preparación del tejido y el montaje en la máquina de ensayo de materiales, se mantuvieron los tendones húmedos usando gasa con solución salina. Inicialmente, se sometieron

30 los tendones a 3 ciclos de preacondicionamiento al 2 % de extensión para eliminar cualquier histéresis. A continuación, la máquina tiró inmediatamente del espécimen a una velocidad constante de 2 mm/s hasta la rotura. Se midió la fuerza ejercida sobre el espécimen usando una célula de carga de 100 N (Instron) y se recogieron todos los datos del software BlueHill 2 (Instron). A continuación, se transfirieron los datos a una hoja de cálculo Excel y se analizó la resistencia a la rotura (definida como la fuerza necesaria para la rotura, N), la resistencia

35 última a la tracción (definida como la fuerza o tensión máxima por unidad de área, MPa), el % de alargamiento (definido como el cambio de longitud respecto a la longitud inicial, mm/mm) y el módulo de Young (una medida de la elasticidad de un material, MPa). Después de las pruebas mecánicas, se volvieron a congelar los especímenes a 70 °C para su evaluación posterior.

40 Histología: se sumergieron los tendones en formalina durante 24 horas y, a continuación, se enjuagaron en PBS. A continuación, se cortaron los tendones a través del plano sagital para su evaluación histológica. A continuación, se montaron las secciones embebidas en formalina en portas y se sometieron a tinción hematoxilina-eosina y tinción tricrómica de Masson usando métodos estándar.

45 Análisis estadístico: se asumió que los datos eran paramétricos y se analizaron usando análisis de la varianza de dos vías (ANNOVA), con el grupo de tratamiento y el tiempo como factores independientes. Se usó un post-ensayo Bonferroni para corregir los valores p y minimizar los errores tipo I. Un valor p de menos de 0,05 se considerará estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron usando Graphpad Prism 5 para Windows.

50 Resultados:

El módulo de Young es una medida de la rigidez/elasticidad relativa de un material. Cuanto más cerca está el módulo de Young de un tendón curado al de un tendón normal, sin lesionar, más similitud habrá bajo estrés mecánico. Un exceso de rigidez (de dos o más órdenes de magnitud) por encima de la normalidad no es deseable,

55 ya que el tendón mostrará una reducción de la capacidad para disipar energía y puede volverse frágil y desgarrarse. En este experimento, los tendones tratados con células AMP que se dejaron curar durante 4 semanas exhibieron una mejora estadísticamente significativa ($p = 0,1$ %) respecto a los tendones tratados con solución salina y los tratados con ACCS en ese mismo momento. De hecho, mediante esta medición, los tendones tratados con AMP se acercaron mucho a los tendones no tratados. Incluso a las 2 semanas, se observó una tendencia en la

60 misma dirección. En 1 semana no se reveló tendencia alguna.

La resistencia última a la tracción es una medida de la tensión máxima que un material puede soportar cuando está siendo estirado o traccionado. En este experimento, se observó una tendencia definida a la mejora de la resistencia con los tendones tratados con células AMP, que empezaba a las 2 semanas y continuaba mejorando a las 4 5 semanas. Sin embargo, esta tendencia positiva no fue estadísticamente significativa.

El área transversal mide el área transversal del tendón a medida que cura. Cuanto más grande sea el área del tendón, más grande es la cantidad de tejido nuevo generado. Este es un descubrimiento positivo, especialmente durante la fase temprana del proceso de curación, ya que aporta una mayor calidad de curación gracias a la mayor 10 resistencia del tendón. Las histologías con tinción hematoxilina-eosina y tricrómica revelaron que, los tendones tratados con células AMP, a las 4 semanas tenían un área transversal considerablemente más grande que los tratados tanto con solución salina como con ACCS.

La resistencia a la rotura mide la capacidad de un material para resistir la rotura o ruptura provocada por una fuerza 15 tensil. En estos experimentos, la resistencia a la rotura no exhibió ninguna diferencia discernible. Sin embargo, a las 2 semanas, habían curado más tejidos hasta el punto en el que pudieron someterse al análisis mediante tensiometría, tanto en los grupos ACCS como en los AMP, lo que sugería que había una mejora temprana en la curación cuando se trataban con ACCS y AMP en comparación con la solución salina.

20 Las conclusiones preliminares son 1) parece 1 semana es demasiado pronto y no se ha producido curación suficiente para cualquiera de las mediciones significativas que se van a tomar mediante cualquiera de los métodos utilizados; 2) los tejidos tratados tanto con ACCS como con AMP tenían una mejor curación a las 2 semanas; las células AMP parecen proporcionar el mayor efecto, especialmente a las 4 semanas. Se especula que esto se debe a que las células aportan un suministro continuo de los factores secretados necesarios, mientras que la ACCS es 25 esencialmente una dosis única. Experimentos posteriores ensayarán la entrega de ACCS mediante liberación sostenida; 3) los experimentos posteriores deberían incluir intervalos de tiempo más largos, tales como a las 6 u 8 semanas, para determinar si la mejora se prolonga más allá de las 4 semanas; los tendones tratados con células AMP demostraron una velocidad de curación y una restauración de las propiedades materiales normales más rápidas, especialmente, en lo que respecta al módulo de Young.

30 A lo largo de toda la memoria descriptiva se ha hecho referencia a diversas publicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición seleccionada de entre solución de citocina derivada del amnios (ACCS) y ACCS combinada, para uso en un método de aceleración de la curación de lesiones de tendón y ligamento en un paciente con necesidad de la misma.
2. Composición para uso de la reivindicación 1 donde la lesión de tendón o ligamento se selecciona de entre desgarros, roturas, esguinces, distensiones, contusiones, avulsiones y cirugía.
- 10 3. Composición para uso de la reivindicación 1 donde la ACCS o la ACCS combinada se formulan para liberación sostenida.
4. Composición para uso de la reivindicación 1, donde la ACCS o la ACCS combinada se administran en combinación con otros agentes o modalidades de tratamiento, donde:
 - 20 (a) los otros agentes son agentes activos seleccionados de entre factores de crecimiento, citocinas, inhibidores, agentes inmunosupresores, esteroides, quimiocinas, anticuerpos, antibióticos, antifúngicos, antivirales, mitomicina C y otros tipos de células; y
 - (b) las otras modalidades de tratamiento se seleccionan de entre reposo, hielo, compresión, elevación, ejercicio y terapia física.

25