(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 647 471**

(51) Int. CI.:

A61K 31/74 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2012 PCT/US2012/000027**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO12099703**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2012 E 12737066 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2665482**

(54) Título: **Dispositivo y procedimiento para la curación de heridas**

(30) Prioridad:

18.01.2011 US 201161461445 P
14.02.2011 US 201161463185 P
25.01.2011 US 201161461951 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

STEED, DAVID, L.;
RUPP, RANDALL, G. y
WESSEL, HOWARD, C.

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Dispositivo y procedimiento para la curación de heridas

Campo de la invención

El campo de la invención está dirigido a un novedoso dispositivo para la curación de heridas. En particular, el campo de la invención está dirigido a un novedoso dispositivo para la curación de heridas que comprende una sutura que ha adsorbido nuevas composiciones que contienen factores celulares (referidas en la presente descripción como CFC), tales CFC incluyen composiciones de medio acondicionado obtenidas de células secretoras de citocinas extraembrionarias (células ECS), que incluyen Solución de citocinas Celulares derivadas del Amnios (referidas en la presente descripción como ACCS) obtenida de la solución de Progenitores Multipotentes derivada del Amnios (AMP), y de la Solución de citocinas Fisiológicas (referidas en la presente descripción como PCS), así como procedimientos de fabricación y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

Las terapias basadas en proteínas típicamente son más difíciles de administrar a los pacientes que otros productos farmacéuticos. Debido a que la eficacia de una proteína está relacionada con su forma, los productos terapéuticos basados en proteínas no pueden someterse a condiciones que podrían provocar el despliegue, o la desnaturalización, de la proteína o proteínas contenidas en ella. En consecuencia, es necesario un cuidado especial en la preparación, almacenamiento y administración de terapias basadas en proteínas.

Además, para evitar cualquier desnaturalización de la proteína, a menudo es deseable poder controlar la cantidad de proteína administrada a un paciente a lo largo del tiempo. Esto ayuda a evitar las concentraciones de proteínas dentro del paciente que son indeseablemente altas o bajas o que fluctúan demasiado con respecto a un nivel deseado, y en su lugar ayuda a mantener un nivel constante de la terapia en el paciente. Para abordar esto, las formulaciones de liberación sostenida (también conocidas como liberación controlada/liberación temporizada, etc.) para muchos productos terapéuticos, que incluyen terapias basadas en proteínas, han estado o están actualmente en desarrollo. Los productos terapéuticos basados en proteínas de liberación sostenida pueden administrarse por una variedad de procedimientos, que incluyen, pero no se limitan a administración oral de tabletas o cápsulas, inhalación de polvos, implantación, incorporación en una matriz, o aplicación tópica de un terapéutico encapsulado del cual la proteína se libera gradualmente a lo largo del tiempo.

Las suturas quirúrgicas son dispositivos médicos que se utilizan para unir los tejidos corporales después de una lesión o cirugía. La mayoría de las suturas modernas son sintéticas, incluidas las suturas absorbibles hechas de, por ejemplo, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polidioxanona o caprolactona, todas ellas desglosadas por diversos procesos, incluida la hidrólisis (ácido poliglicólico) y la degradación enzimática proteolítica, y las suturas no reabsorbibles hechas de, por ejemplo, nylon, poliéster o polipropileno. Los materiales naturales utilizados para hacer suturas incluyen seda y tripa. Recientemente, las suturas se han recubierto con sustancias antimicrobianas para reducir las posibilidades de infección. Además de estar hechos de diferentes materiales, las suturas vienen en tamaños muy específicos que van desde el #5 (una sutura "trenzada" fuerte adecuada para uso ortopédico) hasta el #11-0 (una sutura fina "monofilamento" adecuada para uso oftálmico). Las suturas deben ser lo suficientemente fuertes como para sostener el tejido de forma segura pero lo suficientemente flexible como para ser anudadas. También deben ser hipoalergénicas.

Existen numerosas ventajas y desventajas para las suturas tanto "monofilamento" como "trenzadas". Las ventajas de la sutura monofilamento incluyen que es muy suave y tiene una baja fricción en los tejidos, la sutura corre fácilmente a través de los tejidos, varios puntos de sutura continua pueden tirarse fácilmente a través del tejido sin causar daño al tejido, la superficie de la sutura tiende a no albergar microorganismos causantes de infección, por lo que los abscesos son menos comunes que con una sutura trenzada, y es menos probable que la superficie de la sutura atraiga plaquetas que una sutura trenzada, lo que reduce la incidencia de formación de trombos. Las desventajas incluyen que las suturas monofilamento son resbaladizas para que un asistente las sujete, son resbaladizas para atar nudos, pueden torcerse o acoplarse, requieren más lanzamientos de seguridad que una sutura trenzada, los nudos pueden resbalar, lo cual es una desventaja cuando se basa en una puntada que no se desliza pero en realidad es una ventaja cuando ajustan 2 vueltas de nudo, los nudos pueden desenredarse, son intolerantes al efecto de torsión de una serie de puntadas, tienden a formar bucles más que una sutura trenzada, son más elásticos que una sutura trenzada, y tienen más descripción (por ejemplo, resisten a enderezarse si se ha enrollado en su paquete) que las suturas trenzadas.

Las principales diferencias entre una sutura monofilamento y una sutura trenzada es la mayor fricción y el mayor cumplimiento exhibido por la sutura trenzada. Las ventajas de las suturas trenzadas incluyen que son menos resbaladizas, son más fáciles de manejar, tienen menos descripción (por ejemplo, estirarlas eliminará permanentemente la mayoría de los espirales y zigzags), son más fáciles de anudar, los nudos no se resbalan, se necesitan menos lanzamientos en nudos, y su fricción puede usarse como ventaja en puntos subcuticulares. Las desventajas incluyen el aumento de la fricción que significa que no se ejecuta tan fácilmente como una sutura monofilamento, incluso con una única puntada, existe el peligro de la atracción para superar la fricción que causa daños a los tejidos, tirar de la sutura trenzada a través de más de una puntada a la vez es peligroso, excepto por una puntada subcuticular, hay más posibilidades de que la infección se aloje en la sutura trenzada y que no sea accesible a los antibióticos, particularmente con un punto no absorbible.

Además de las suturas clásicas, la malla entrelazada preparada a partir de copolímeros de glicolida y láctida también es adecuada para usar en los procedimientos descritos.

Existen muchas técnicas de sutura diferentes. La técnica más común es la puntada interrumpida simple que es la más simple de realizar y se llama "interrumpida" porque el hilo de sutura se corta entre cada puntada individual. Las puntadas de colchonero verticales y horizontales también se interrumpen, pero son más complejas y especializadas para ajustes particulares. La puntada continua o corrida es más rápida, pero se corre el riesgo de fallar si la sutura se corta en un solo lugar; la sutura continua es una versión más segura de la puntada continua o corrida. La puntada de drenaje torácica y la puntada de esquina son variaciones de la puntada de colchonero horizontal. Otras puntadas incluyen la puntada de la Figura 8 y la puntada subcuticular.

Los solicitantes presentan aquí por primera vez la presente invención cuyo objeto es administrar de forma controlada factores de crecimiento fisiológicamente relevantes y citocinas a niveles fisiológicos a una herida adsorbiendo las composiciones sobre una sutura.

Breve resumen de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un novedoso dispositivo para la curación de heridas y procedimientos para usar el dispositivo. Tal dispositivo para la curación de heridas comprende una sutura trenzada no absorbible o biodegradable que ha absorbido nuevas composiciones que contienen factores celulares (referidos en la presente descripción como CFC, que incluye ACCS) o soluciones de citocinas fisiológicas (referidas en la presente descripción como PCS). El CFC, que incluye ACCS, o PCS, contiene una combinación compleja y única de niveles fisiológicos de citocinas para la curación de heridas y factores de crecimiento que se encuentran naturalmente en el cuerpo. Las suturas trenzadas biodegradables pueden romperse con el tiempo en el cuerpo, mientras que las suturas no absorbibles persisten hasta eliminarse. De acuerdo con la invención, las suturas trenzadas biodegradables se absorben con el CFC, que incluye ACCS, o PCS, que quedan atrapadas en los espacios entre los filamentos trenzados de las suturas. El CFC, que incluye ACCS, o PCS, se libera en el área local de la herida a lo largo del tiempo como resultado de una combinación del factor de proteína liberado por difusión y/o la erosión de la sutura biodegradable. Por lo tanto, las composiciones de curación de heridas se entregan precisamente en el área de la herida para un efecto máximo. Debido a que los factores celulares están presentes en niveles comparables a los niveles fisiológicos encontrados en el cuerpo, son óptimos para su uso en aplicaciones terapéuticas que requieren intervención para apoyar, iniciar, reemplazar, acelerar o influir en los procesos bioquímicos y biológicos involucrados en el tratamiento y/o la curación de una lesión o herida. Los factores celulares también se liberan lentamente a lo largo del tiempo para proporcionar un nivel fisiológico continuo y constante de dichos factores para optimizar la curación y/o recuperación. Además, el CFC, que incluye ACCS, o PCS, puede formularse antes de su absorción en la sutura. Dichas formulaciones pueden incluir formulaciones de liberación sostenida/liberación controlada/liberación en el tiempo o la adición de agentes gelificantes o espesantes para mejorar la adsorción sobre la sutura o la malla entrelazada. Los detalles sobre las formulaciones de CFC de liberación sostenida, que incluye ACCS, o PCS, pueden encontrarse en US-2009-0054339-A1, publicado el 26/02/2009. El CFC, que incluye ACCS, o PCS también puede tener heparina añadida antes de sumergir la sutura, o las suturas pueden tener heparina adsorbida sobre ellas antes de sumergirlas en el CFC, que incluye ACCS, o PCS. Se sabe que la heparina puede unirse a las proteínas que tienen motivos de unión a heparina y puede servir para efectuar una liberación lenta de las proteínas encontradas en el CFC, que incluye ACCS, o PCS. Además, el CFC, que incluye ACCS, o PCS, puede liofilizarse antes de la absorción en la sutura. Dicha liofilización puede incluir la adición de otros agentes, por ejemplo colágeno. Una característica importante del novedoso dispositivo para la curación de heridas descrito en la presente descripción es que es el primer dispositivo descrito es capaz de administrar numerosos factores de curación de heridas (por ejemplo, VEGF, TIMP-1, TIMP-2, PDGF, TGFβ2, Angiogenina) simultáneamente, lentamente y en concentraciones fisiológicas directamente al sitio de la herida.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención es un dispositivo para la curación de heridas que comprende una composición que contiene factor celular (CFC) adsorbida sobre una sutura trenzada.

En una modalidad del primer aspecto, el CFC es una Solución de citocinas Celulares derivadas del Amnios (ACCS).

En otra modalidad del primer aspecto, el ACCS es ACCS concentrado.

En aún otra modalidad del primer aspecto, el CFC es una solución de citocina fisiológica (PCS).

En aún otra modalidad del primer aspecto, el PCS es PCS concentrado.

En otra modalidad del primer aspecto, la sutura es no absorbible o biodegradable.

En una modalidad específica del primer aspecto, la sutura biodegradable se hace de ácido poliglicólico, ácido poliglutámico, polidioxanona, polilactida o caprolactona, o combinaciones de los mismos. En otra modalidad específica del primer aspecto, la sutura no absorbible se hace de nylon, poliéster, polipropileno o seda.
En otra modalidad específica del primer aspecto, el CFC comprende concentraciones fisiológicas de VEGF, TGFβ2, Angiogenina, PDGF, TIMP-1 y TIMP-2.

En una modalidad muy específica del primer aspecto, la concentración fisiológica es ~ 5,0-16ng/mL para el VEGF, -3,5-4,5ng/mL para el Angiogenin, ~ 100-165pg/mL para el PDGF, ~ 2,5-2,7ng/mL para el TGFβ2, ~ 0,68µg/mL para el TIMP-1 y ~ 1,04µg/mL para el TIMP-2.

Un segundo aspecto de la invención es un kit que comprende el dispositivo para la curación de heridas del primer aspecto.

Un tercer aspecto de la invención es un dispositivo según el primer aspecto para su uso en un procedimiento para promover la curación de heridas en un sujeto que lo necesite, donde dicho dispositivo es para suturar la herida.

En una modalidad particular del tercer aspecto, la sutura es una sutura continua de la herida.

Un cuarto aspecto de la invención es un dispositivo según el primer aspecto para uso en un procedimiento para el suministro de una mezcla de factores proteicos directamente a una herida de manera que los factores proteicos se entregan simultáneamente a la herida, donde el dispositivo es para su aplicación a la herida.

Definiciones

Como se define en la presente descripción, "aislado" se refiere a material retirado de su entorno original y, por lo tanto, se altera "por la mano del hombre" desde su estado natural.

Como se usa en la presente descripción, "enriquecido" significa concentrar selectivamente o aumentar la cantidad de uno o más materiales mediante la eliminación de los materiales no deseados o la selección y separación de materiales deseables de una mezcla (es decir, células separadas con marcadores celulares específicos de una población celular heterogénea en el que no todas las células de la población expresan el marcador).

Como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente purificado" significa una población de células sustancialmente homogénea para un marcador particular o combinación de marcadores. Por sustancialmente homogéneo se entiende al menos el 90%, y preferiblemente el 95% homogéneo para un marcador particular o combinación de marcadores.

El término "placenta" como se usa en la presente descripción significa tanto placenta como el término placenta.

Como se usa en la presente descripción, el término "células totipotentes" tendrá el siguiente significado. En los mamíferos, las células totipotentes tienen el potencial de convertirse en cualquier tipo de célula en el cuerpo adulto; cualquier tipo de célula(s) de las membranas extraembrionarias (por ejemplo, la placenta). Las células totipotentes son el óvulo fertilizado y aproximadamente las primeras 4 células producidas por su escisión.

Como se usa en la presente descripción, el término "células madre pluripotentes" tendrá el siguiente significado. Las células madre pluripotentes son verdaderas células madre con el potencial de producir cualquier célula diferenciada en el cuerpo, pero no pueden contribuir a fabricar los componentes de las membranas extraembrionarias que se

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 Madres Embrionarias (ES) (también pueden ser totipotentes en primates), células Germinales Embrionarias (EG), y células de Carcinoma Embrionario (EC). Estas células EC pueden aislarse de los teratocarcinomas, un tumor que ocasionalmente se produce en la gónada de un feto. A diferencia de las otras dos, generalmente son aneuploides.

Como se usa en la presente descripción, el término "células madre multipotentes" son células madre verdaderas, pero solo pueden diferenciarse en un número limitado de tipos. Por ejemplo, la médula ósea contiene células madre multipotentes que dan lugar a todas las células de la sangre pero que no pueden diferenciarse en otros tipos de células.

Como se usa en la presente descripción, 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 y TGFβ2 y los inhibidores MMP TIMP-1 y/o TIMP-2 a niveles fisiológicamente relevantes de una manera temporal fisiológicamente relevante en el espacio extracelular o en los medios de cultivo circundantes. Las células ECS no se han cultivado en presencia de ningún material animal no humano, por lo que los productos celulares derivados de ellos son adecuados para uso clínico humano ya que no están contaminados con xeno. Las células ECS pueden seleccionarse de poblaciones de células y composiciones descritas en esta solicitud y en US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos Nos. 60/666,949, 60/699,257, 60/742,067, 60/813,759, la Solicitud de los Estados Unidos No. 11/333,849, la Solicitud de los Estados Unidos No. 11/392,892, PCTUS06/011392, US2006/0078993, PCT/US00/40052, la Patente de los Estados Unidos No. 7,045,148, US2004/0048372, y US2003/0032179 . Las células ECS se han denominado anteriormente células TSE.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "célula de Progenitores Multipotentes derivada del Amnios" o "célula AMP" significa una población específica de células que son células epiteliales derivadas del amnios. Las células AMP tienen las siguientes características. No se han cultivado en presencia de ningún material animal no humano, por lo que los productos celulares derivados de ellos son adecuados para uso clínico humano ya que no están contaminados con xeno. Las células AMP se cultivan en medio basal suplementado con albúmina sérica humana. En una modalidad preferida, las células AMP secretan las citocinas VEGF, Angiogenina, PDGF y TGFβ2 y los inhibidores MMP TIMP-1 y/o TIMP-2. El rango fisiológico de las citocinas o citocinas en la combinación única es el siguiente: ~5-16ng/mL para el VEGF, ~3,5-4,5ng/mL para Angiogenina, ~100-165pg/ml para el PDGF, ~2,5-2,7ng/mL para el TGFβ2, ~0,68µg/ml para el TIMP-1 y ~1,04µg/ml para el TIMP-2. Las células AMP pueden expresar opcionalmente el Thymosin β4. Las células AMP crecen sin capas de alimentación, no expresan la proteína telomerasa y no son tumorígenas. Las células AMP no expresan la proteína CD34 marcadora de células madre hematopoyéticas. La ausencia de células CD34 positivas en esta población indica que los aislados no están contaminados con células madre hematopoyéticas tales como la sangre del cordón umbilical o fibroblastos embrionarios. Prácticamente el 100% de las células reaccionan con anticuerpos contra citoqueratinas de bajo peso molecular, lo que confirma su naturaleza epitelial. Las células derivadas de amnios recién aisladas, a partir de las cuales se aíslan las células de AMP, no reaccionarán con los anticuerpos contra los marcadores de células madre/progenitoras c-kit (CD117) y Thy-1 (CD90). Se conocen en la técnica varios procedimientos utilizados para obtener células de placenta a término completo o pretérmino (ver, por ejemplo, US 2004/0110287; Anker y otros, 2005, Stem Cells 22:1338-1345; Ramkumar y otros, 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500). Sin embargo, los procedimientos usados en la presente descripción proporcionan composiciones mejoradas y poblaciones de células.

Por el término "libre de animal" cuando se refiere a ciertas composiciones, condiciones de crecimiento, medios de cultivo, etc. descritos en la presente descripción, se entiende que no hay materiales derivados de animales no humanos, tales como suero bovino, proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, etc., se usan en la preparación, crecimiento, cultivo, expansión, almacenamiento o formulación de la determinada composición o proceso. Por "materiales no derivados de animales no humanos" se entiende que los materiales nunca han estado en contacto o en contacto con un cuerpo o sustancia animal no humana, por lo que no están contaminados con xeno. Solamente los materiales de grado clínico, tales como proteínas humanas producidas de forma recombinante, se usan en la preparación, crecimiento, cultivo, expansión, almacenamiento y/o formulación de tales composiciones y/o procesos.

El término "expandido", con referencia a las composiciones celulares, significa que la población celular constituye una concentración de células significativamente mayor que la que se obtiene mediante el uso de procedimientos previos. Por ejemplo, el nivel de células por gramo de tejido amniótico en las composiciones expandidas de células AMP es al menos 50 y hasta 150 veces mayor que el número de células epiteliales del amnios en el cultivo primario después de 5 pases, en comparación con un aumento de aproximadamente 20 veces de tales células mediante el

uso de procedimientos previos. En otro ejemplo, el nivel de células por gramo de tejido amniótico en composiciones expandidas de células AMP es al menos 30 y hasta 100 veces mayor que el número de células epiteliales del amnios en el cultivo primario después de 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 con respecto a los procedimientos previos. El término "expandido" está destinado a cubrir solo aquellas situaciones en las que una persona ha intervenido para elevar el número de células.

Tal como se usa en la presente descripción, el término "pase" se refiere a una técnica de cultivo celular en la que células que crecen en un cultivo que ha alcanzado confluencia o están próximas a confluenciar en un recipiente de cultivo de tejido se eliminan del vaso, diluidas con medio de cultivo nuevo (es decir diluido 1:5) y se colocan en un nuevo recipiente de cultivo de tejido para permitir su crecimiento y viabilidad continuos. Por ejemplo, las células aisladas del amnios se denominan células primarias. Tales células se expanden en el cultivo haciéndolo crecer en el medio de crecimiento descrito en la presente descripción. Cuando tales células primarias se subcultivan, cada ronda de subcultivo se denomina pase. Como se usa en la presente descripción, "cultivo primario" significa población de células recién aisladas.

Tal como se usa en la presente descripción, "medio acondicionado" es un medio en el que se ha cultivado una célula o población de células específica, y luego se ha eliminado. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte o afectar el comportamiento de otras células. Tales factores incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos, quimiocinas, receptores, inhibidores y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado. Los ejemplos de procedimientos para preparar medios condicionados se describen en la Patente de Estados Unidos 6,372,494.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "Solución de citocinas Celulares derivadas del Amnios" o "ACCS" significa medio acondicionado que se ha derivado de células de AMP que se han cultivado en medios basales suplementados con albúmina de suero humano.

El término "nivel fisiológico" tal como se usa en la presente descripción significa el nivel en que se encuentra una sustancia en un sistema vivo y que es relevante para el funcionamiento apropiado de un proceso bioquímico y/o biológico.

Tal como se usa en la presente descripción, el término "Solución de citocinas Fisiológicas" o composición "PCS" significa una composición que no deriva de células y que tiene concentraciones fisiológicas de uno o más factores seleccionados de VEGF, Angiogenina, PDGF y TGFβ2 y al menos un inhibidor MMP. Los ejemplos de inhibidores MMP adecuados incluyen, pero no se limitan a, TIMP-1 y TIMP-2. Los detalles sobre PCS pueden encontrarse en la Publicación de Estados Unidos Núm. US-2009-0054339-A1.

Como se usa en la presente descripción, el término "solución" como se usa en "Solución de citocinas Celulares derivadas del Amnios" significa un líquido que contiene componentes dispersados, es decir, citocinas. Los componentes dispersados pueden estar completamente solubilizados, parcialmente solubilizados, suspendidos o dispersados de otro modo en el líquido. Los líquidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones osmóticas tales como soluciones de sal y/o azúcar, medios de cultivo celular y otras soluciones acuosas o no acuosas.

El término "lisado", como se usa en la presente descripción, se refiere a la composición obtenida cuando las células, por ejemplo, células AMP, se lisan y, opcionalmente, se eliminan los restos celulares (por ejemplo, membranas celulares). Esto puede lograrse por medios mecánicos, mediante congelación y descongelación, mediante sonicación, mediante el uso de detergentes, tales como EDTA, o mediante digestión enzimática mediante el uso, por ejemplo, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas. En algunos casos, puede ser deseable lisar las células y retener la porción de membrana celular y descartar la porción restante de las células lisadas.

Tal como se usa en la presente descripción, el término "agrupado" significa una pluralidad de composiciones que se han combinado para crear una nueva composición que tiene características más constantes o consistentes en comparación con las composiciones no agrupadas. Por ejemplo, los ACCS agrupados tienen características más constantes o consistentes en comparación con los ACCS no agrupados. Los ejemplos de composiciones agrupadas incluyen "SP agrupados" (más de una colección ACCS/una placenta), "MP1 agrupados" (una colección ACCS/placenta, placentas múltiples) y "MP2 agrupados" (más de una colección ACCS/placenta, múltiples placentas).

Tal como se usa en la presente descripción, el término "sustrato" significa un recubrimiento definido sobre una superficie a la que las células se unen, crecen sobre y/o migran. Como se usa en la presente descripción, el término "matriz" significa una sustancia en que las células crecen dentro o fuera que pueden o no estar definidas en sus componentes. La matriz incluye sustancias biológicas y no biológicas. Tal como se usa en la presente descripción, el término "armazón" significa una estructura tridimensional (3D) (sustrato y/o matriz) en la que las células crecen o permanecen. Puede componerse de componentes biológicos, componentes sintéticos o una combinación de ambos. Además, puede construirse naturalmente por células o construirse artificialmente. Además, el armazón puede contener componentes que tienen actividad biológica en condiciones apropiadas.

El término "producto celular" o "productos celulares" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier sustancia fabricada y secretada por una célula, que incluye, pero no se limita a, factores proteicos (es decir, factores de crecimiento, factores de diferenciación, factores de injerto, citocinas, morfógenos, proteasas (es decir, promover la delaminación celular endógena, inhibidores de proteasa), componentes de la matriz extracelular (es decir, fibronectina, etc.).

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad de un agente terapéutico necesaria para lograr un efecto fisiológico deseado (es decir, acelerar la curación de heridas).

Como se usa en la presente descripción, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que los componentes, además del agente terapéutico, que comprende la formulación, son adecuados para la administración al paciente que se está tratando.

Como se usa en la presente descripción, el término "proteína terapéutica" se 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, crecimiento de péptidos y factores de diferenciación.

Como se usa en la presente descripción, el término "tejido" se refiere a una agregación de células especializadas similares unidas en la modalidad de una función particular.

Como se usa en la presente descripción, los términos "un" o "una" significa uno o más; al menos uno.

Como se usa en la presente descripción, el término "adjunto" significa conjuntamente, junto con, además de, junto con, y similares.

Como se usa en la presente descripción, el término "coadministrar" puede incluir la administración simultánea o secuencial de dos o más agentes.

Tal como se usa en la presente descripción, el término "agente" significa un agente activo o un agente inactivo. Por el término "agente activo" se entiende un agente que es capaz de tener un efecto fisiológico cuando se administra a un sujeto. Los ejemplos no limitantes de agentes activos incluyen factores de crecimiento, citocinas, antibióticos, células, medios condicionados de células, etc. Por el término "agente inactivo" se entiende un agente que no tiene un efecto fisiológico cuando se administra. Tales agentes alternativamente pueden llamarse "excipientes aceptables farmacéuticamente". Los ejemplos no limitantes incluyen cápsulas de liberación temporal y similares.
Los términos "administración parenteral" y "administrada parenteralmente" se reconocen en la técnica y se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural, intracerebral e inyección o infusión intraesternal.

Los términos "administración enteral" y "administrado enteralmente" se reconocen en la técnica y se refieren a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente por vía oral o rectal.

El término "administración tópica" y "administrado tópicamente" se reconocen en la técnica y se refieren a modos de administración distintos de la administración parenteral y enteral, habitualmente mediante la aplicación a la piel.

El término "adsorber" como se usa en la presente descripción se refiere al acto de un líquido, gas o una sustancia disuelta que se acumula en la superficie de un sólido.

Los términos "liberación sostenida", "liberación prolongada", "liberación en el tiempo", "liberación controlada" o "liberación continua" como se usan en la presente descripción significan un agente, generalmente un agente

terapéutico o fármaco, que se libera con el tiempo.

Los términos "bioerosionable" o "bioerosión" tal como se usan en la presente descripción significan una combinación de procesos físicos (es decir, disolución) y químicos (es decir, escisión de enlaces químicos) que dan como resultado la descomposición de una sustancia.

El término "biodegradable" o "biodegradación" como se usa en la presente descripción significa que un agente biológico (es decir, una enzima, microbio o célula) es responsable de la descomposición de una sustancia.

Los términos "biorreabsorbible" o "bioabsorbible" como se usan en la presente descripción significan la eliminación de un producto de degradación por actividad celular (es decir, fagocitosis). El término "no absorbible" tal como se usa en la presente descripción significa que una sustancia no se descompone mediante un proceso químico.

"Tratamiento", "tratar" o "tratando", tal como se usa en la presente descripción, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad o condición de un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de enfermedad o condición en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o condición pero que todavía no se ha diagnosticado que la padece; (b) inhibir la enfermedad o condición, es decir, detener su desarrollo; (c) aliviar y/o mejorar la enfermedad o condición, es decir, causar la regresión de la enfermedad o condición; o (d) curar la enfermedad o condición, es decir, detener su desarrollo o progresión. La población de sujetos tratados incluye sujetos que padecen la condición o enfermedad indeseable, así como sujetos con riesgo de desarrollar la condición o enfermedad.

Como se usa en la presente descripción, una "herida" es cualquier interrupción, de cualquier causa, de la anatomía normal (anatomía interna y/o externa) que incluye pero no se limita a, lesiones traumáticas tales como mecánica (es decir, contusión, penetración), térmica, química, eléctricas, conmoción y lesiones por incisión; lesiones electivas como cirugía quirúrgica y hernias incisionales resultantes, fístulas, etc.; heridas agudas, heridas crónicas, heridas infectadas y heridas estériles, así como heridas asociadas con estados de enfermedad (es decir, úlceras causadas por neuropatía diabética o úlceras del tracto gastrointestinal o genitourinario). Una herida es dinámica y el proceso de curación es un continuo que requiere una serie de procesos celulares integrados e interrelacionados que comienzan en el momento de la herida y van más allá del cierre inicial de la herida hasta la llegada a una cicatriz estable. Estos procesos celulares están mediados o modulados por sustancias humorales que incluyen, pero no se limitan a, citocinas, linfoquinas, factores de crecimiento, y hormonas. De acuerdo con la presente invención, "curación de heridas" se refiere a mejorar, mediante alguna forma de intervención, los procesos celulares naturales y las sustancias humorales de la reparación tisular de forma tal que la curación es más rápida, y/o el área cicatrizada resultante tiene menos cicatrices y/o el área herida posee una resistencia tisular más cercana a la del tejido ileso y/o el tejido herido alcanza cierto grado de recuperación funcional.

Como se usa en la presente descripción, el término "modelo animal estándar para curación de heridas" se refiere a cualquier modelo animal aceptado en la técnica para la curación de heridas en el que las composiciones de la invención muestran eficacia medida por curación acelerada de heridas. Ejemplos no limitantes de modelos adecuados se describen en Hayward PG, Robson MC: Animal models of wound contraction. En Barbul A, y otros: Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair: Normal and Chronic Wounds. John Wiley & Sons, Nueva York, 1990; DelBecarro, y otros: The use of specific thromboxane inhibitors to preserve the dermal microcirculation after burning. Surgery 87: 137-141, 1980; Robson, y otros: Increasing dermal perfusion after burning by decreasing thromboxane production. J Trauma 20: 722-725, 1980; Polo, y otros: An in vivo model of human proliferative scar. J Surg Res 74: 187-195, 1998.). Los expertos en la técnica conocen otros modelos adecuados.

Descripción detallada

Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente de cualquier otra forma, entre los límites superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y se abarcan además dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Donde el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos se incluyen además en la invención.

A menos que se definan de cualquier otra forma, todos los términos científicos y técnicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta

invención. Aunque cualquiera de los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse además, en la práctica o el estudio de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación.

Se hace constar que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas las formas singulares "un, "uno", y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Obtención y Cultivo de Células

Células ECS - En la técnica se describen diversos procedimientos para aislar células del tejido extraembrionario, que luego pueden usarse para producir las células ECS (ver, por ejemplo, US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, Solicitud Provisional de Estados Unidos Núms. 60/666,949, 60/699,257, 60/742,067, 60/813,759, Solicitud de Estados Unidos Núm. 11/333,849, Solicitud de Estados Unidos Núm. 11/392,892, PCTUS06/011392, US2006/0078993, PCT/US00/40052, Patente de Estados Unidos Núm. 7,045,148, US2004/0048372, y US2003/0032179).

Identificación de células ECS - Una vez que se ha aislado el tejido extraembrionario, es necesario identificar qué células del tejido tienen las características asociadas con las células ECS (consulte la definición anterior). Por ejemplo, las células se analizan en cuanto a su capacidad para secretar VEGF, Angiogenina, PDGF y TGFβ2 y los inhibidores MMP TIMP-1 y/o TIMP-2 en el espacio extracelular o en los medios de cultivo circundantes. En algunos casos, puede ser difícil o imposible detectar ciertos factores mediante el uso de ensayos estándares. Esto puede deberse a que ciertos factores son secretados por las células a niveles fisiológicos que están por debajo del nivel de detección de los procedimientos de ensayo. También puede ser que el(los) factor(es) esté(n) siendo utilizado(s) por la célula ECS y/o por otras células locales, evitando así la acumulación a niveles detectables mediante el uso de ensayos estándares. También es posible que la forma temporal en que se secretan los factores no coincida con el momento del muestreo.

Las composiciones de células AMP se preparan mediante el uso de las etapas de a) recuperar el amnios de la placenta, b) disociar las células epiteliales de la membrana amniótica mediante el uso una proteasa, c) cultivar las células en un medio basal con la adición de una proteína humana derivada naturalmente o producida recombinantemente (es decir, albúmina de suero humano) y ninguna proteína animal no humana; d) seleccionar las células AMP del cultivo de células epiteliales, y opcionalmente e) la proliferación adicional de las células, opcionalmente mediante el uso aditivos y/o factores de crecimiento adicionales (es decir, EGF humano recombinante). Los detalles se encuentran en la Publicación de Estados Unidos Núm. 2006-0222634-A1.

Cultivo de las células AMP - Las células se cultivan en un medio basal. Tal medio incluye, pero no se limita a, medio de cultivo EPILIFE® para células epiteliales (Cascade Biologicals), medio de cultivo sin suero OPTI-PRO™, medio sin suero VP-SFM, medio basal altamente enriquecido IMDM, DMEM de KNOCKOUT™ bajo medio de osmolalidad, medio sin suero definido 293 SFM II (todos fabricados por Gibco; Invitrogen), medio de crecimiento progenitor hematopoyético HPGM, medio sin suero Pro 293S-CDM, medio sin suero Pro 293A-CDM, medio sin 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, medio de crecimiento de mezcla de nutrientes DMEM/F-12 (ambos fabricados por Gibco), Medio de cultivo de mezcla de nutrientes F-12 de Ham, medio de cultivo basal M199 (ambos fabricados por Sigma-Aldrich) y otros medios basales comparables. Dichos medios deberían contener proteínas humanas o complementarse con proteínas humanas. Como se usa en la presente descripción, una "proteína humana" es una que se produce de forma natural o una que se produce por medio del uso de tecnología recombinante. La "Proteína humana" también pretende incluir un derivado humano o una preparación del mismo, tal como suero humano, que contiene proteína humana. En descripciones específicas, los medios basales son medio basal IMDM altamente enriquecido, medio de expansión de células T STEMLINE® 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 la albúmina sérica humana que es al menos 0,5% y hasta 10%. En descripciones particulares, la albúmina sérica humana es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2%. En una descripción específica la albúmina humana es del 0,5%. La albúmina humana puede provenir de una forma líquida o seca (en polvo) e incluye, pero no se limita a, albúmina sérica humana recombinante, albúmina sérica humana PLASBUMIN® normal y fracción sanguínea humana PLASMANATE® (ambas fabricadas por Talecris Biotherapeutics).

En una descripción más preferida, las células se cultivan por medio de un sistema que está libre de productos de animales no humanos para evitar la contaminación por xeno. En esta descripción, el medio de cultivo es medio basal altamente enriquecido IMDM, medio de expansión de células T STEMLINE® o medio de expansión de células madre

hematopoyéticas STEMLINE® II, medio de cultivo sin suero OPTI-PRO™, o medio de cultivo DMEM, con albúmina de suero humano (es decir, albúmina de suero humano normal PLASBUMIN®) sumado a cantidades del 10%.

La invención contempla además el uso de cualquiera de los medios basales anteriores donde las proteínas derivadas de animales se reemplazan con proteínas humanas recombinantes y el suero derivado de animales, tal como BSA, se reemplaza con albúmina de suero humano. En las descripciones preferidas, los medios están libres de suero además de estar libres de componentes animales.

Opcionalmente, se usan otros factores, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a una concentración de entre 0-1µg/ml o la concentración de EGF alrededor de 10-20ng/mL. Todos los suplementos son de grado clínico.

Generación de CFC, que incluye ACCS

El medio acondicionado ECS se obtiene como se describe a continuación para ACCS, excepto que se usan células ECS.

Generación de ACCS - Las celdas AMP pueden usarse para generar ACCS. En una descripción, las células AMP se aíslan como se describe en la presente descripción y se siembran 1x106 células/mL en matraces T75 que contienen entre 5-30mL de medio de cultivo, preferiblemente entre 10-25mL de medio de cultivo, y con la máxima preferencia, aproximadamente 10mL de medio de cultivo. Las células se cultivan hasta que confluyen, el medio se cambia y el ACCS se recoge 1 día después de la confluencia. En otra descripción, el medio se cambia y el ACCS se recoge 2 días después de la confluencia. En otra descripción, el medio se cambia y el ACCS se recoge 4 días después de la confluencia. En otra descripción, el medio se cambia y el ACCS se recoge 5 días después de la confluencia. En una descripción preferida, el medio se cambia y el ACCS se recoge 3 días después de la confluencia. En otra descripción, el medio se cambia y el ACCS se recoge 3, 4, 5, 6 o más días después de la confluencia. Los expertos en la técnica reconocerán que existen otros medios para recoger el ACCS de cultivos de células AMP, como el uso de otros recipientes de cultivo tisular, que incluyen, pero no se limitan a, fábricas de células, matraces, fibras huecas o aparatos de cultivo en suspensión, o la recolección de ACCS de subfluencia y/o culturas que proliferan activamente, también se contemplan. También se contempla en la presente invención que los ACCS se crioconservan después de la recolección. También se contempla que los ACCS se liofilicen después de la recolección. También se contempla que los ACCS se formulen para liberación sostenida después de la recolección. Los expertos en la técnica están familiarizados con la liofilización de la crioconservación y las metodologías de formulación de liberación sostenida.

El ACCS de la invención se caracteriza por el ensayo de citocinas fisiológicamente relevantes secretadas en el intervalo fisiológicamente relevante de ~5-16ng/mL para VEGF, ~3,5-4,5ng/mL para Angiogenin, ~100-165pg/mL para PDGF, ~2,5-2,7ng/mL para TGFβ2, ~0,68µg mL para TIMP-1 y ~1,04µg/mL para TIMP-2.

También se contempla por la invención que los ACCS, que incluye los ACCS agrupados, se concentren antes del uso. El nivel adecuado de concentración requerido dependerá del uso previsto y, por lo tanto, deberá determinarse empíricamente.

Generación de PCS

Se genera una forma derivada no celular de CFC denominada Solución de Citocinas Fisiológicas (PCS) combinando niveles fisiológicos de VEGF, Angiogenina, PDGF, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2, en un vehículo. Los niveles fisiológicos de estas citocinas son los mismos que se encuentran en ACCS. Los vehículos adecuados incluyen solución salina normal, PBS, solución de Ringer lactato, medio de cultivo celular, etc. Tales composiciones son adecuadas para crioconservación, liofilización, formulación de liberación sostenida y similares.

Se contempla que el PCS puede producirse de manera que contenga niveles de factores más concentrados que los encontrados en los CFC, que incluye ACCS, y que posteriormente se diluya con un diluyente apropiado antes de su uso. Los diluyentes apropiados incluyen, pero no se limita a, solución salina normal, PBS, solución de Ringer lactato, medio de cultivo celular, medio de cultivo celular condicionado, agua y similares. Tales diluciones pueden ser 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:100, etc. Las concentraciones y diluciones apropiadas requeridas dependerán del uso previsto y, por lo tanto, deberán determinarse empíricamente.

Las composiciones de la invención pueden prepararse de varias formas dependiendo del uso previsto de las composiciones. Por ejemplo, una composición útil en la práctica de la invención puede ser un líquido que comprende un agente de la invención, es decir, CFC, que incluye ACCS o PCS, en solución, en suspensión o en ambos

(solución/suspensión). El término "solución/suspensión" se refiere a una composición líquida en la que una primera porción del agente activo está presente en la solución y una segunda porción del agente activo está presente en forma de partículas, en la suspensión en una matriz líquida. Una composición líquida también incluye un gel. La composición líquida puede ser acuosa o en forma de una pomada, ungüento, crema o similar.

Una suspensión o solución/suspensión acuosa útil para poner en práctica los procedimientos de la invención puede contener uno o más polímeros como agentes de suspensión. Los polímeros útiles incluyen polímeros solubles en agua tales como polímeros celulósicos y polímeros insolubles en agua tales como polímeros que contienen carboxilo reticulados. Una suspensión o solución/suspensión acuosa de la presente invención es preferiblemente viscosa o mucoadhesiva, o incluso más preferiblemente, viscosa y mucoadherente.

Formulación alternativa de CFC, que incluye ACCS, o PCS

El CFC, que incluye ACCS, o PCS, puede formularse como composiciones de liberación sostenida/liberación controlada/liberación temporizada. Los expertos en la técnica están familiarizados con las metodologías para crear tales composiciones de agentes terapéuticos, que incluyen agentes terapéuticos basados en proteínas tales como CFC, que incluye ACCS, o PCS.

El CFC de liberación sostenida/liberación controlada/liberación temporizada, que incluye ACCS, o PCS puede obtenerse mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la tecnología de formulación de liposomas multivesiculares es útil para la liberación sostenida de productos terapéuticos de proteínas y péptidos. Qui, J., y otros, (ACTA Pharmacol Sin, 2005, 26(11):1395-401) describen esta metodología para la formulación del interferón alfa-2b de liberación sostenida. Vyas, S.P., y otros, (Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32(6):699-707) describen la encapsulación del interferón alfa pegilado en liposomas multivesiculares. Los CFC, que incluye ACCS, o PCS, son adecuados para su uso en formulaciones de liberación sostenida de liposomas multivesiculares.
La tecnología de nanopartículas también es útil para crear CFC, que incluye ACCS, o las composiciones PCS_liberación sostenida/liberación controlada/liberación temporizada. Por ejemplo, Packhaeuser, C.B., y otros, (J Control Release, 2007, 123(2):131-40) describen sistemas de depósitos parenterales biodegradables basados en nanopartículas de dialquilaminoalquil-amina-poli(alcohol vinílico)-g-poli(láctido-co-glicólido) cargadas de insulina y concluyen que los depósitos basados en nanopartículas son candidatos adecuados para el diseño de dispositivos de liberación controlada para macromoléculas bioactivas (es decir, proteínas). Dailey, L.A., y otros, (Pharm Res 2003, 20(12):2011-20) describen nanopartículas biodegradables libres de agentes tensioactivos para la terapia en aerosol que se basa en los polímeros ramificados DEAPA-PVAL-g- PLGA y concluyen que DEAPA-PVAL-g-PLGA son sistemas versátiles de administración de medicamentos. Los CFC, que incluye ACCS, o PCS, son adecuados para su uso en formulaciones de liberación sostenida basadas en nanopartículas.

Las formulaciones de liberación sostenida basadas en polímeros también son muy útiles. Chan, Y.P., y otros, (Expert Opin Drug Deliv, 2007, 4(4):441-51) proporcionan una revisión del sistema Medusa (Flamel Technologies), que se utiliza para la liberación sostenida de terapias de proteínas y péptidos. 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 otros, (Pharm Res, 2007, 24(4):803-10) describen nanopartículas de polímero tensioactivo como una nueva plataforma para el suministro celular sostenido y potenciado de moléculas solubles en agua. Takeuchi, H., y otros, (Adv Drug Deliv Res, 2001, 47(1):39-54) describen sistemas nanoparticulados mucoadhesivos para la administración de fármacos peptídicos, que incluyen liposomas y nanopartículas poliméricas. Wong, HL, y col., (Pharm Res, 2006, 23 (7): 1574-85) describen un nuevo sistema híbrido polímero-lípido que ha demostrado aumentar la citotoxicidad de la doxorrubicina contra células cancerígenas de mama resistente a múltiples fármacos. Los CFC, que incluye ACCS, o PCS, son adecuados para su uso en las metodologías de formulación de liberación sostenida antes mencionadas.

Además, otras metodologías de liberación sostenida familiares para los expertos en la técnica, aunque no se describen específicamente en la presente descripción, también son adecuadas para su uso con el CFC, que incluye las composiciones ACCS, o PCS.

Composiciones Farmacéuticas - La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de CFC, que incluye ACCS o PCS y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o enlistado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluye

los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin, y otros más están familiarizados con los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con grupos carboxilo libres tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Kits de tratamiento - La invención también proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica de la invención contenida dentro del material de envasado, en el que la composición farmacéutica comprende composiciones de CFC, que incluye ACCS, o PCS, y una sutura trenzada no absorbible o bioerosionable (el dispositivo para la curación de heridas). El material de envasado comprende una etiqueta o prospecto que indica que el dispositivo para la curación de heridas puede usarse para promover la curación de heridas en un sujeto que lo necesite.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la concentración o dosis apropiada de CFC, que incluye ACCS, o PCS, para un propósito particular. El experto en la técnica reconocerá que una dosis preferida es una que produce un efecto terapéutico, tal como promover la curación de heridas, en un paciente que lo necesite. Por supuesto, las dosis adecuadas de CFC, que incluye ACCS, o PCS, requerirán una determinación empírica en el momento del uso en función de varias variables, incluidas, entre otras, la gravedad y el tipo de lesión o herida que se trata; edad del paciente, peso, sexo, salud; otros medicamentos y tratamientos que se administran al paciente; y similares. Un experto en la técnica también reconocerá que el número de dosis (régimen de dosificación) que debe administrarse también debe determinarse empíricamente basándose en, por ejemplo, la gravedad y el tipo de enfermedad, lesión, trastorno o condición que se trata. En una descripción preferida, una dosis es suficiente.

La presente invención se refiere a un procedimiento para promover la curación de heridas administrando una dosis terapéuticamente efectiva de CFC, que incluye ACCS, o PCS, a un sujeto a través del dispositivo para la curación de heridas. Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende la dosis de CFC, que incluye ACCS, o PCS, que es suficiente para provocar un efecto terapéutico. Por lo tanto, la concentración de CFC, que incluye ACCS, o PCS, en una unidad de dosis administrada de acuerdo con la presente invención es efectiva, por ejemplo, en la promoción de la curación de heridas.

En modalidades adicionales de la presente invención, puede ser deseable coadministrar otros agentes, que incluyen agentes activos y/o agentes inactivos, con el dispositivo para la curación de heridas para promover la curación de heridas. Los agentes activos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, quimioquinas, anticuerpos, inhibidores, antibióticos, antifúngicos, antivirales, agentes inmunosupresores, otros tipos de células y similares. Los agentes inactivos incluyen vehículos, diluyentes, estabilizadores, agentes gelificantes, agentes espesantes (es decir, albúmina de suero humano, ácido hialurónico), vehículos de administración, ECMs (naturales y sintéticos), armazones, colágeno y similares. Cuando el dispositivo para la curación de heridas se administra conjuntamente con otros agentes farmacéuticamente activos, puede ser necesario incluso menos de CFC, que incluye ACCS, o PCS, en el dispositivo para la curación de heridas para ser terapéuticamente eficaz.

El momento de la administración del dispositivo para la curación de heridas dependerá del tipo y la gravedad de la lesión o herida que se trate. En una modalidad preferida, el dispositivo para la curación de heridas se administra tan pronto como sea posible después de que se produce la lesión o herida.

Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera y todos los procedimientos y modalidades estándar para tratar lesiones y heridas actualmente en práctica clínica y desarrollo clínico son adecuados para practicar los procedimientos de la invención. Las rutas de administración, formulación, administración conjunta con otros agentes (si es apropiado) y similares se discuten en detalle en otra parte de la presente descripción.

Ejemplos de Usos Terapéuticos del dispositivo para la curación de heridas

Curación de heridas - El dispositivo para la curación de heridas de la presente invención es efectivo para acelerar la curación de heridas causadas por varias fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, incisión, compresión, térmica, penetrante, conmoción cerebral, aguda, crónica, infectada, y lesiones estériles. La presente invención se basa en el descubrimiento de que el ACCS, que se adsorbe sobre la sutura, puede acelerar el proceso de curación de heridas para todos los tipos de heridas. Por consiguiente, mediante el uso del dispositivo para la curación de heridas, todos los tipos de heridas, mecánicas o térmicas, agudas o crónicas, infectadas o estériles, pueden experimentar curación más rápidamente que las heridas similares que se dejan curar naturalmente o que se tratan con los procedimientos actualmente disponibles. Además, el dispositivo para la curación de heridas que comprende una malla entrelazada es adecuado para su uso para prevenir la formación de hernias después de la cirugía, particularmente la cirugía abdominal. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un agente terapéutico dentro del significado de la presente invención será determinada por un médico o veterinario que atienda al paciente. Dichas cantidades las determina fácilmente un experto en la técnica y permitirán la curación acelerada de heridas cuando se administren de acuerdo con la presente invención. Se incluirán los factores que influyen en qué cantidad terapéuticamente efectiva se incluirá, la actividad específica del agente terapéutico utilizado, el tipo de herida (mecánica o térmica, espesor total o parcial, quirúrgica, etc.), el tamaño de la herida, la profundidad de la herida (si es de grosor completo), la ausencia o presencia de infección, el tiempo transcurrido desde la lesión, la edad, la condición física, la existencia de otras enfermedades (es decir, obesidad y/o diabetes) y el estado nutricional del paciente. Adicionalmente, otros medicamentos que el paciente pueda estar recibiendo afectarán la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico a administrar.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción y descripción completa de cómo hacer y usar las composiciones y procedimientos de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta 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 medio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1: Preparación de composiciones de células AMP.

Las células epiteliales de amnios se disociaron de la membrana amniótica de partida mediante el uso los agentes de disociación PXXIII. El rango de peso promedio de un amnios fue de 18-27 g. El número de células recuperadas por g de amnios fue de aproximadamente 10-15 x 106 para la disociación con PXXIII.

Procedimiento para obtener células AMP seleccionadas - Las células epiteliales de amnios se sembraron inmediatamente después del aislamiento del amnios. Después de ~2 días en cultivo, se eliminaron las células no adherentes y se mantuvieron las células adherentes. Esta unión a un recipiente de cultivo de tejido plástico es el procedimiento de selección utilizado para obtener la población deseada de células AMP. Las células AMP adherentes y no adherentes parecen tener un perfil de expresión de marcador de superficie celular similar, pero las células adherentes tienen una mayor viabilidad y son la población de células deseada. Las células AMP adherentes se cultivaron en un medio basal suplementado con albúmina sérica humana hasta que alcanzaron ~120,000-150,000 células/cm2. En este punto, los cultivos fueron confluentes. Los cultivos celulares adecuados alcanzarán este número de células entre ~5-14 días. Alcanzar este criterio es un indicador del potencial proliferativo de las células AMP y las células que no alcanzan este criterio no se seleccionan para su posterior análisis y uso. Una vez que las células AMP alcanzaron ~120 000-150 000 células/cm2, se recolectaron y crioconservaron. Este punto de tiempo de la colección se llama p0.

Ejemplo 2: Generación de ACCS

Las células AMP pueden usarse para generar ACCS, que incluye el ACCS agrupado. Las células AMP se aislaron como se describió anteriormente y se sembraron ~1 x 106 células/mL en matraces T75 que contienen ~10 mL de medio de cultivo como se describió anteriormente. Las células se cultivaron hasta confluir, se cambió el medio y se recogió el ACCS 3 días después de la confluencia. Opcionalmente, el ACCS se recopila nuevamente después de 3 días, y opcionalmente nuevamente después de 3 días. Los expertos en la técnica reconocerán que también se contemplan otros medios para recoger el ACCS de cultivos confluentes, como el uso de otros recipientes de cultivo tisular, que incluyen, pero no se limitan a, fábricas de células, matraces, fibras huecas o aparatos de cultivo en suspensión, etc. (ver Descripción Detallada anterior) También se contempla que los ACCS se crioconservan,

liofilizan, irradian o formulan para liberación sostenida después de la recogida. También se contempla que los ACCS se recopilen en diferentes momentos (ver Descripción Detallada para más detalles).

Ejemplo 3: Generación de ACCS agrupados

El ACCS se obtuvo esencialmente como se describió anteriormente. El ACCS se recolectó varias veces a partir de un cultivo de AMP derivado de una placenta y estas múltiples colecciones de ACCS se combinaron. Dichos grupos se denominan "grupos SP" (más de una colección ACCS/una placenta). Alternativamente, los cultivos de AMP se derivaron de varias placentas, es decir, de 5 o 10 placentas. Se cultivaron las células AMP de cada placenta y se recolectó una colección de ACCS de cada cultivo y luego se agruparon todas. Estos grupos se denominan "grupos MP1" (una colección ACCS/placenta, placentas múltiples). Alternativamente, los cultivos de células AMP se derivaron de varias placentas, es decir, de 5 o 10 placentas. Se cultivaron las células de AMP de cada placenta y se realizó más de una colección de ACCS de cada cultivo de células de AMP y luego se agruparon. Estos grupos se denominan "grupos MP2" (más de una colección ACCS/placenta, placentas múltiples).

Ejemplo 4: Producción de PCS

Se producen las siguientes composiciones de PCS:
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, 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: 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.

VEGF, Angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2 se agregan en los siguientes niveles fisiológicos: ~5-16ng/mL para el VEGF, ~3,5-4,5 ng/mL para Angiogenina, ~100-165pg/mL para el PDGF, ~2,5-2,7ng/mL para el TGFβ2, ~0,68µg mL para el TIMP-1 y ~1,04µg/mL para el TIMP-2.

El VEGF puede obtenerse de Invitrogen, catálogo #PHG0144, PHG0145, PHG0146, PHG0141 o PHG0143; la Angiogenina puede obtenerse de R&D Systems, catálogo #265-AN-050 o 265-AN-250; el PDGF-BB puede obtenerse de Invitrogen, catálogo #PHG0044, #PHG0045, #PHG0046, #PHG0041, #PHG0043; el TGFβ2 puede obtenerse de Invitrogen, catálogo #PHG9114; el TIMP-1 puede obtenerse de R&D Systems, catálogo #970-TM-010; y el TIMP-2 puede obtenerse de R&D Systems, catálogo #971-TM-010.

El VEGF, Angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2 se agregan a un vehículo tal como solución salina normal, PBS, solución de Ringer lactato, medio de cultivo celular u otras soluciones acuosas adecuadas conocidas por los expertos en la técnica.

Ejemplo 5: Producción del dispositivo para la curación de heridas

El dispositivo para la curación de heridas de la invención se fabrica adsorbiendo sobre una sutura trenzada no absorbible o biodegradable, que incluye ACCS, ACCS concentrado, PCS o PCS concentrados. Las suturas trenzadas adecuadas están disponibles comercialmente (ejemplos no limitantes incluyen suturas bioerosionables como sutura absorbible trenzada DEXON™ S y sutura trenzada recubierta con POLYSORB™ y suturas no reabsorbibles como SURGILON™, SURGIDAC™, TI• CRON™, Covidien, Norwalk, CT 06856, Estados Unidos). La malla entrelazada adecuada está disponible comercialmente en Ethicon, Inc., Somerville, NJ (por ejemplo, Vicryl™ Knitted Mesh (Polyglycan 910).

El CFC, que incluye ACCS, ACCS concentrados, PCS o PCS concentrados, puede adsorberse como líquido en las suturas trenzadas o en la malla entrelazada o puede someterse a una formulación alternativa antes de la absorción. Las formulaciones alternativas incluyen liberación sostenida/liberación controlada/liberación temporizada como se describe en detalle en otra parte de la descripción. También se contemplan formulaciones en las que se agregan agentes gelificantes o espesantes tales como albúmina de suero humano, ácido hialurónico o colágeno al CFC, que

incluye ACCS, ACCS concentrado, PCS o PCS concentrado. Tales agentes aumentan la capacidad del CFC, que incluye ACCS, ACCS concentrados, PCS o PCS concentrados para adsorberse en la superficie o liberarse de la superficie.

El dispositivo para la curación de heridas puede empacarse con la sutura o malla de punto y el CFC, que incluye ACCS, ACCS concentrados, PCS o PCS concentrados ya adsorbidos en él o puede empacarse con los dos componentes empaquetados por separado y luego combinados justo antes del uso.

Ejemplo 7: Adsorción de ACCS en suturas y posterior liberación de proteínas fuera de las suturas

El objetivo de este experimento fue evaluar la capacidad de varias suturas para adsorber el ACCS y evaluar la capacidad de las suturas para que las proteínas contenidas en el ACCS eluyan. Se probaron dos tipos de suturas en este estudio: Tamaño 1 DEXON™ S (Covidien, Norwalk, CT) y Tamaño 1 MERSILENE™ (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Ambas suturas no estaban recubiertas ya que se determinó en un experimento previo que las suturas revestidas inhiben la adsorción de líquido. DEXON™ es una sutura absorbible y MERSILENE™ es una sutura de poliéster no reabsorbible. Cada tipo de sutura se colocó en 50X ACCS concentrado durante 30 minutos. Las suturas se enjuagaron luego durante varios períodos de tiempo y los enjuagues se analizaron mediante ELISA para determinar la cantidad de ACCS adsorbido o liberado. Los resultados de ELISA para Angiogenina y TIMP-2 mostraron que ambos tipos de sutura se adsorben y liberan las proteínas ACCS. DEXON™ S pareció liberar más ACCS en los enjuagues. La cantidad exacta de adsorción no estaba clara en este experimento, sin embargo, parece que cada pieza de 10 cm de sutura liberó entre 5 -6,5 µL de 50X ACCS en 15 minutos.

Ejemplo 6: Evaluación del dispositivo para la curación de heridas en un Modelo Animal

Un objetivo de la invención es disminuir la falla de la herida en lesiones quirúrgicas y traumáticas tratando estas heridas agudas con el dispositivo para la curación de heridas. Mecánicamente, las incisiones de laparotomía abdominal fallidas forman hernias incisionales. Clínicamente, esto se manifiesta como defectos en la capa músculo-tendinosa-peritoneal de la pared abdominal. Por lo tanto, es importante centrarse en la curación muscular, facial y de la piel. Las consecuencias clínicas graves de tales fallas son la dehiscencia aguda de la pared abdominal y la evisceración, el encarcelamiento y la obstrucción de las vísceras peritoneales, la pérdida de la capacidad de la pared abdominal para mantener la postura del torso y el dolor crónico.

El objetivo del experimento es evaluar la capacidad del dispositivo para la curación de heridas para reducir o prevenir la formación de hernias en un modelo animal de hernia incisional. El experimento utilizará ratas macho Sprague-Dawley que se someterán a una incisión abdominal y luego se tratarán con el dispositivo para la curación de heridas o los controles apropiados. Al final del período de estudio, después de la eutanasia, se extirpará una sección de 5 x 10 cm de la pared abdominal de cada animal. El músculo se extenderá y se fijará en una tabla de disección (en cada una de las cuatro esquinas) con el lado peritoneal hacia arriba. Junto a cada muestra, se colocará una regla junto con identificadores individuales, y se tomará una imagen equidistante a la distancia de cada muestra para garantizar una escala adecuada. Se observará la presencia o ausencia de hernia y se medirá el tamaño de la hernia.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para la curación de heridas que comprende una composición que contiene factor celular (CFC) adsorbida sobre una sutura.

2. El dispositivo para la curación de heridas de la reivindicación 1, donde la sutura es una sutura trenzada.

3. El dispositivo para la curación de heridas de la reivindicación 1 o 2, donde el CFC es una solución de citocina celular derivada del amnios (ACCS), donde opcionalmente el ACCS es un ACCS concentrado.

4. El dispositivo para la curación de heridas de la reivindicación 1 o 2, donde el CFC es una solución fisiológica de citocina (PCS), donde opcionalmente el PCS es PCS concentrado.

5. El dispositivo para la curación de heridas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la sutura es no absorbible o bioerosionable.

6. El dispositivo para la curación de heridas de la reivindicación 5, donde la sutura biodegradable o la malla entrelazada está hecha de ácido poliglicólico, ácido poliglutámico, polidioxanona, polilactida o caprolactona.

7. El dispositivo para la curación de heridas de la reivindicación 5, donde la sutura no absorbible está hecha de nylon, poliéster, polipropileno o seda.

8. El dispositivo para la curación de heridas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el CFC comprende concentraciones fisiológicas de VEGF, TGFβ2, Angiogenina, PDGF, TIMP-1 y TIMP-2.

9. El dispositivo para la curación de heridas de la reivindicación 8 donde la concentración fisiológica es ~5,0-16ng/mL para el VEGF, ~3,5-4,5ng/mL para la Angiogenina, ~100-165pg/mL para el PDGF, ~2,5-2,7ng/mL para el TGFβ2, ~0,68µg mL para el TIMP-1 y ~1,04µg/mL para el TIMP-2.

10. Un kit que comprende el dispositivo para la curación de heridas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un procedimiento para promover la curación de heridas en un sujeto que lo necesite, donde dicho dispositivo es para suturar la herida.

12. El dispositivo para el uso de la reivindicación 11 donde la sutura es una sutura continua de la herida.

13. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un procedimiento para el suministro de una mezcla de factores proteicos directamente en una herida de manera que los factores proteicos se entregan simultáneamente a la herida, donde el dispositivo es para su aplicación a la herida.