

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 809**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)
A61K 38/19	(2006.01)
C12N 5/02	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2008 PCT/US2008/009500**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2009 WO09025730**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08827981 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2185197**

54 Título: **Composiciones novedosas de solución que contiene factor celular y su uso para tratar heridas**

30 Prioridad:

22.08.2007 US 965707 P
30.04.2008 US 125960

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2019

73 Titular/es:

NOVEOME BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
100 Technology Drive, Suite 400
Pittsburgh, PA 15219, US

72 Inventor/es:

MARSHALL, VIVIENNE S.;
SMITH, CHARLOTTE, A.;
TRUMPOWER, CATHERINE, J.;
SING, GEORGE, L. y
PALLADINO, LINDA, O.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 702 809 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones novedosas de solución que contiene factor celular y su uso para tratar heridas

5 **Campo de la invención**

El campo de la invención se refiere a composiciones novedosas de solución que contiene factor celular (mencionadas en este documento como composiciones "CFS"), incluyendo composiciones novedosas de solución que tienen factor celular de liberación sostenida (mencionadas en este documento como composiciones "SR-CFS"), métodos de fabricación de dichas composiciones novedosas y usos de las mismas.

Antecedentes de la invención

Muchas citocinas individuales y factores de crecimiento se han evaluado para su utilidad terapéutica en el tratamiento de muchas enfermedades, trastornos y lesiones variadas. Desafortunadamente, los resultados únicamente han sido parcialmente prometedores. Por ejemplo, se ha demostrado que PDGF-BB es útil en el tratamiento de úlceras diabéticas en los pies; GM-CSF está comercializado en Europa tanto para úlceras venosas como para úlceras diabéticas en los pies; y HGH (hormona del crecimiento humano) está comercializada en Estados Unidos para quemaduras pediátricas. Los fracasos incluyen BDNF, CNTF e IGF-1 que se han evaluado todos en ensayos clínicos diseñados para ensayar su eficacia en el tratamiento de ALS, cada uno con resultados decepcionantes; TGF β 2 fue insatisfactorio en un estudio fase 2 para úlceras venosas; y el tratamiento de combinación de IGF-1 y PDGF fue insatisfactorio en úlceras diabéticas en los pies.

Aunque no está claro el porqué muchas de estas citocinas individuales y factores de crecimiento han fracasado en clínica, una teoría es que las proteínas se estaban administrando en dosis que no eran fisiológicas, es decir, dosis muy elevadas en comparación con los niveles fisiológicos normalmente encontrados *in vivo*. Además, a causa de la interacción compleja entre las citocinas y los factores de crecimiento en un nicho fisiológico dado, la aplicación de solamente un factor, especialmente uno a niveles inusualmente elevados, no puede recrear el nicho fisiológico y, de hecho, puede alterar gravemente su delicado equilibrio.

Acrecentando su escaso éxito en clínica, las citocinas y los factores de crecimiento y otros agentes terapéuticos de base proteínica son típicamente más difíciles de administrar a los pacientes que otros agentes farmacéuticos. Como la eficacia de una proteína está relacionada con su forma, los agentes terapéuticos de base proteínica no pueden someterse a condiciones que podrían causar el desplegamiento o la desnaturalización de la proteína o proteínas contenidas en los mismos. Por consiguiente, es necesario un cuidado especial en la preparación, almacenamiento y administración de los agentes terapéuticos de base proteínica.

Además de evitar cualquier desnaturalización de la proteína, a menudo es deseable poder controlar la cantidad de la proteína administrada a un paciente en el tiempo. Esto ayuda a evitar concentraciones de proteína en el paciente que sean indeseablemente elevada o bajas o que fluctúen demasiado desde un nivel deseado, y en su lugar ayuda a mantener un nivel constante del agente terapéutico en el paciente. Para abordar esto, se han desarrollado o actualmente están en desarrollo formulaciones de liberación sostenida para muchos agentes terapéuticos, incluyendo agentes terapéuticos de base proteínica. Los agentes terapéuticos de base proteínica de liberación sostenida pueden administrarse por una diversidad de métodos, incluyendo, aunque sin limitación, suministro oral de comprimidos o cápsulas, inhalación de polvos, implante, incorporación en una matriz o aplicación tópica de un agente terapéutico encapsulado desde el que se libera de forma gradual la proteína en el tiempo.

La preparación de dichas formulaciones de liberación sostenida es variada. Un proceso incluye mezclar la proteína con un disolvente orgánico. Por ejemplo, una formulación en polvo puede prepararse pulverizando una mezcla de la proteína y un disolvente orgánico en nitrógeno líquido. Otro proceso implica mezclar la proteína con una solución de un polímero bioerosionable/biodegradable en un disolvente orgánico, provocando la formación de micropartículas que contienen la proteína y el polímero por coagulación de la mezcla. En otro proceso más, las proteínas, formulaciones en polvo o micropartículas pueden mezclarse con un disolvente orgánico para producir un líquido o gel que puede inyectarse en un paciente o aplicarse de forma tópica. Desafortunadamente, los inconvenientes para usar disolventes orgánicos son su tendencia a causar desnaturalización de la proteína.

Se han usado aditivos para estabilizar las proteínas en presencia de un disolvente orgánico desnaturalizante. Estos aditivos incluyen tensioactivos (véase la patente de Estados Unidos n.º 5.096.885), aminoácidos (véase la patente de Estados Unidos n.º 4.297.344), polioles (véase la patente de Estados Unidos n.º 5.589.167), polímeros naturales (véase el documento WO 8903671), polímeros sintéticos (véase Pharm. Res. 8:285 291, 1991), y metales (véase la patente de Estados Unidos n.º 6.191.107 B1).

Hasta la fecha, no hay ningún agente terapéutico de base proteínica (es decir, citocinas y factores de crecimiento) disponibles que recree de forma eficaz o imite la combinación compleja y los niveles fisiológicos de las citocinas y factores de crecimiento fisiológicamente relevantes encontrados de forma natural en el organismo en estados de salud y enfermedad o lesión. Cada agente terapéutico de base proteínica actualmente disponible administra una

dosis muchísimo mayor que los niveles de esas citocinas o factores de crecimiento encontrados normalmente en el organismo. Además, nadie ha podido aún administrar estas citocinas y factores de crecimiento fisiológicamente relevantes a niveles fisiológicos. Además, nadie ha podido aún administrar estas citocinas y factores de crecimiento fisiológicamente relevantes a niveles fisiológicos en una formulación de liberación sostenida. Por lo tanto, los solicitantes presentan con la presente por primera vez la presente invención cuyo objetivo es satisfacer la necesidad médica insatisfecha de proporcionar factores de crecimiento y citocinas fisiológicamente relevantes a niveles fisiológicos (composiciones CFS) y, en algunos casos, suministrar esos factores de crecimiento y citocinas fisiológicamente relevantes a niveles fisiológicos usando una formulación de liberación sostenida (composiciones SR-CFS).

Breve resumen de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones novedosas de solución que tiene factor celular (CFS) que recreen la combinación compleja y única y los niveles fisiológicos de dichas citocinas y factores de crecimiento encontrados en nichos biológicos. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar composiciones novedosas de solución que contiene factor celular de liberación sostenida (SR-CFS) que contengan la combinación compleja y única y los niveles fisiológicos de las citocinas y factores de crecimiento encontrados de forma natural en nichos fisiológicos. Como los factores celulares están presentes en niveles comparables a los niveles fisiológicos encontrados en el organismo, son óptimos para su uso en aplicaciones terapéuticas que requieren intervención para mantener, iniciar, reemplazar, acelerar o influir de otro modo en los procesos bioquímicos y biológicos implicados en el tratamiento y/o curación de una enfermedad y/o lesión. En el caso de las composiciones SR-CFS, los factores celulares se liberan lentamente en el tiempo para proporcionar un nivel fisiológico continuo, constante de dichos factores para optimizar la curación y/o la recuperación.

Además de las composiciones CFS novedosas descritas en este documento, un objetivo de la invención también es proporcionar métodos para generar dichas composiciones CFS novedosas, incluyendo la combinación de composiciones derivadas de células (es decir, composiciones ECS combinadas y ACCS combinadas) y composiciones SR-CFS, así como usos terapéuticos de las mismas.

Las composiciones derivadas de células combinadas poseen varias propiedades y características importantes incluyendo variabilidad disminuida en los niveles de factores celulares fisiológicamente relevantes necesarios para el efecto terapéutico en comparación con composiciones no combinadas. Los factores celulares están presentes en niveles comparables a los niveles fisiológicos encontradas en el organismo y, por tanto, son óptimos para su uso en aplicaciones terapéuticas que requieren intervención para mantener, iniciar, reemplazar, acelerar o influir de otro modo en los procesos bioquímicos y biológicos implicados en el tratamiento y/o la curación de una enfermedad y/o lesión. Los métodos novedosos descritos en este documento de combinación de composiciones derivadas de células para disminuir la variabilidad tienen el efecto de optimizar los niveles de factores secretados de modo que puede conseguirse su potencial terapéutico completo en cada combinación. Además del valor terapéutico de dichas composiciones combinadas, el método de combinación de muestras para disminuir la variabilidad de una composición no combinada a otra tiene las ventajas comerciales importantes de aumentar los rendimientos de producción minimizando el rechazo de la composición no combinada por fracaso en cumplir las especificaciones del producto y, por consiguiente, disminuir los costes de producción y aumentar las ganancias.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención es una composición de solución de citocina celular derivada de amnios que comprende concentraciones fisiológicas de VEGF, TGFβ2, angiogenina, PDGF, TIMP-1 y TIMP-2, en la que la concentración fisiológica es ~5,0-16 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 mg/ml para TIMP-1 y ~1,04 mg/ml para TIMP-2, en la que la composición de solución de citocina celular derivada de amnios se puede obtener por el método de:

- (a) aislar células epiteliales del amnios a partir del amnios de una placenta;
- (b) seleccionar células AMP de las células epiteliales del amnios;
- (c) cultivar las células AMP en medio de base no animal, en el que el medio se suplementa con albúmina humana de calidad clínica añadida hasta una concentración de un 10 % hasta que alcancen confluencia;
- (d) cambiar el medio de cultivo;
- (e) cultivar las células en el medio durante 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días; y
- (f) recoger el medio de cultivo de la etapa (e) para obtener solución de citocina celular derivada de amnios;

en el que el medio de la etapa (c) es Stemline I o II, Optipro, IMDM o DMEM.

El aspecto dos de la invención es la composición del primer aspecto en la que la etapa (f) se repite una pluralidad de veces y la solución de citocina celular derivada de amnios de la etapa (f) se combina para crear una solución de citocina celular derivada de amnios combinada.

El aspecto tres de la invención es la composición de la parte (c) del primer aspecto, en la que el medio es sin suero.

El aspecto cuatro de la invención es la composición de una cualquiera del primer, segundo o tercer aspecto, en la

que el medio basal se complementa además con EGF a una concentración entre 0 y 1 µg/ml.

El aspecto cinco de la invención es una composición de liberación sostenida que comprende la solución de citocina celular derivada de amnios de uno cualquiera del primer o segundo aspecto.

5 El aspecto seis de la invención es un método de generación de una composición de liberación sostenida del quinto aspecto, que comprende las etapas de combinar una composición de solución que contiene factor celular con un agente que puede lograr la liberación sostenida de la composición de solución que contiene factor celular.

10 El aspecto siete de la invención es una composición farmacéutica que comprende la composición de uno cualquiera del primer al quinto aspecto.

El aspecto ocho de la invención es una composición de uno cualquiera del primer al quinto aspecto o séptimo aspecto, para su uso en un método de aceleración de la curación de heridas.

15 **Definiciones**

Como se define en este documento, "aislado" se refiere a material retirado de su entorno original y, por tanto, alterado "por la mano del hombre" de su estado natural.

20 Como se usa en este documento, la expresión "marcador proteínico" significa cualquier molécula de proteína característica de la membrana plasmática de una célula o en algunos casos de un tipo celular específico.

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

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

35 El término "placenta", como se usa en este documento, significa placenta tanto pretérmino como a término.

40 Como se usa en este documento, la expresión "células totipotentes" tendrá el siguiente significado. En mamíferos, las células totipotentes tienen el potencial de llegar a ser cualquier tipo de célula en el organismo adulto; cualquier tipo o tipos celulares de las membranas extraembrionarias (por ejemplo, placenta). Las células totipotentes son el óvulo fertilizado y aproximadamente las primeras cuatro células producidas por su escisión.

45 Como se usa en este documento, la expresión "células madre pluripotentes" tendrá el siguiente significado. Células madre pluripotentes son células madre verdaderas con el potencial de generar cualquier célula diferenciada en el organismo, pero no pueden contribuir a generar los componentes de las membranas extraembrionarias que derivan del trofoblasto. El amnios se desarrolla a partir del epiblasto, no del trofoblasto. Se han confirmado hasta la fecha tres tipos de células madre pluripotentes: células madre embrionarias (ES) (también pueden ser totipotentes en primates), células germinales embrionarias (EG) y células de carcinoma embrionario (EC). Las células EC pueden aislarse de teratocarcinomas, un tumor que se produce ocasionalmente en la gónada de un feto. A diferencia de las otras dos, son habitualmente aneuploides.

50 Como se usa en este documento, la expresión "células madre multipotentes" son células madre verdaderas, pero pueden diferenciarse únicamente en una cantidad limitada de tipos. Por ejemplo, la médula ósea contiene células madre multipotentes que dan lugar a todas las células de la sangre, pero no pueden diferenciarse en otros tipos celulares.

55 Como se usa en este documento, la expresión "tejido extraembrionario" significa tejido ubicado fuera del cuerpo embrionario que está implicado en la protección, nutrición, eliminación de residuos, etc. del embrión. El tejido extraembrionario se descarta en el nacimiento. El tejido extraembrionario incluye, aunque sin limitación, el amnios, el corion (trofoblasto y mesodermo extraembrionario incluyendo el cordón umbilical y los vasos), el saco vitelino, líquido alantoideo y amniótico (incluyendo todos los componentes contenidos en los mismos). El tejido extraembrionario y las células derivadas del mismo tienen el mismo genotipo que el embrión en desarrollo.

60 Como se usa en este documento, la expresión "células secretoras de citocinas extraembrionarias" o "células ECS" significa una población de células derivada del tejido extraembrionario que tiene las características de secretar una combinación única de citocinas fisiológicamente relevantes de una manera temporal fisiológicamente relevante en el espacio extracelular o en el medio de cultivo circundante y que no se ha cultivado en presencia de ningún producto de origen animal, haciendo que estas y los productos celulares derivados de las mismas sean adecuados para uso

clínico humano. En una realización, las células ECS secretan al menos una citocina seleccionada de VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2 y al menos un inhibidor de MMP. En una realización específica, el inhibidor de MMP se selecciona de TIMP-1 y TIMP-2. En otra realización, las células ECS secretan más de una citocina seleccionadas de VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2 y más de un inhibidor de MMP. En una realización específica, el inhibidor de MMP se selecciona de TIMP-1 y TIMP-2. En una realización preferida, las células ECS secretan las citocinas VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2 y los inhibidores de MMP TIMP-1 y/o TIMP-2. El intervalo fisiológico de la citocina o 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 mg/ml para TIMP-1 y ~1,04 mg/ml para TIMP-2. Las células ECS opcionalmente pueden expresar timosina β4. Las células ECS pueden seleccionarse de poblaciones de células y composiciones descritas en esta solicitud y en los documentos US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, solicitudes provisionales de Estados Unidos n.º 60/666.949, 60/699.257, 60/742.067, 60/813.759, solicitud de Estados Unidos n.º 11/333.849, solicitud de Estados Unidos n.º 11/392.892, documento PCTUS06/011392, documento US2006/0078993, documento PCT/US00/40052, patente de Estados Unidos n.º 7.045.148, documentos US2004/0048372 y US2003/0032179.

Como se usa en este documento, la expresión "célula progenitora multipotente derivada de amnios" o "célula AMP" significa una población específica de células ECS que son células epiteliales derivadas del amnios. Además de las características descritas anteriormente para células ECS, las células AMP tienen las siguientes características. No se han cultivado en presencia de ningún producto de origen animal, haciendo que estas y los productos celulares derivados de las mismas sean adecuados para uso clínico humano. Crecen sin capas de alimentación, no expresan la telomerasa proteínica y son no tumorigénicas. Las células AMP no expresan el marcador de célula madre hematopoyética proteína CD34. La ausencia de células CD34 positivas en esta población indica que los aislados no están contaminados con células madre hematopoyéticas tales como sangre de cordón umbilical o fibroblastos embrionarios. Casi el 100 % de las células reacciona con anticuerpos contra citoqueratinas de baja masa molecular, lo que confirma su naturaleza epitelial. Las células AMP recién aisladas no reaccionarán con anticuerpos contra los marcadores de células madre/progenitoras c-kit (CD117) y Thy-1 (CD90). Se conocen en la técnica varios procedimientos usados para obtener células de placenta completa a término o pretérmino (véase, por ejemplo, el documento US 2004/0110287; Anker et al., 2005, Stem Cells 22:1338-1345; Ramkumar et al., 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500). Sin embargo, los métodos usados en este documento proporcionan composiciones y poblaciones de células mejoradas. Las células AMP se han descrito previamente como "células derivadas de amnios" (véanse las solicitudes de provisionales de Estados Unidos n.º 60/666.949, 60/699.257, 60/742.067, la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 60/813.759, la solicitud de Estados Unidos n.º 11/333.849, la solicitud de Estados Unidos n.º 11/392.892 y el documento PCTUS06/011392).

Por el término "sin componentes animales" cuando se hace referencia a determinadas composiciones, condiciones de crecimiento, medio de cultivo, etc. descritos en este documento, se entiende que no se usa ningún material de origen animal, tal como suero de origen animal, diferente de materiales humanos de calidad clínica, tal como proteínas humanas producidas de forma recombinante, en la preparación, crecimiento, cultivo, expansión, almacenamiento o formulación de determinada composición o proceso.

Por la expresión "sin suero" cuando se hace referencia a determinadas composiciones, condiciones de crecimiento, medio de cultivo, etc. descritos en este documento, se entiende que no se usa ningún suero de origen animal (es decir, que no sea de origen no humano) en la preparación, crecimiento, cultivo, expansión, almacenamiento o formulación de determinada composición o proceso.

Por el término "expandido", en referencia a composiciones celulares, significa que la población celular constituye una concentración significativamente mayor de células de la que se obtiene métodos previos. Por ejemplo, el nivel de células por gramo de tejido amniótico en composiciones expandidas de células AMP es al menos 50 y hasta 150 veces mayor que la cantidad de células en el cultivo primario después de 5 pases, en comparación con un aumento de aproximadamente 20 veces en dichas células usando métodos 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 la cantidad de células en el cultivo primario después de 3 pases. Por consiguiente, una población "expandida" tiene una mejora de al menos 2 veces y hasta de 10 veces en las cantidades de células por gramo de tejido amniótico sobre los métodos previos. El término "expandido" pretende cubrir únicamente aquellas situaciones en que una persona ha intervenido para elevar la cantidad de células.

Como se usa en este documento, el término "pase" significa una técnica de cultivo celular en que las células que crecen en cultivo que han obtenido confluencia o están cerca de la confluencia en un recipiente de cultivo tisular se retiran del recipiente, se diluyen con medio de cultivo fresco (es decir, diluido 1:5) y se colocan en un nuevo recipiente de cultivo tisular para permitir su crecimiento continuado y viabilidad. Por ejemplo, las células aisladas del amnios se mencionan como células primarias. Dichas células se expanden en cultivo haciéndolas crecer en el medio de cultivo descrito en este documento. Cuando dichas células primarias se subcultivan, cada ronda de subcultivo se menciona como un pase. Como se usa en este documento, "cultivo primario" significa la población celular recién aislada.

Como se usa en este documento, "medio acondicionado" es un medio en que una célula o población de células

- específicas se ha cultivado, y después 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. Dichos factores incluyen, aunque sin limitación, hormonas, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos, quimioquinas, receptores, inhibidores y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado. Se describen ejemplos de métodos de preparación de medios acondicionados en la patente de Estados Unidos 6.372.494. Como se usa en este documento, el medio acondicionado también se refiere a componentes, tales como proteínas, que se recuperan y/o purifican del medio acondicionado o de células ECS, incluyendo células AMP.
- 10 Como se usa en este documento, la expresión composición de "solución que contiene factor celular" o "CFS" significa una composición que tiene concentraciones fisiológicas de uno o más factores seleccionados de VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2 y al menos un inhibidor de MMP. Los ejemplos de inhibidores de MMP adecuados incluyen, aunque sin limitación, TIMP-1 y TIMP-2. Las composiciones CFS incluyen medios acondicionados derivados de células ECS, composiciones de solución de citocina celular derivada de amnios (véase la definición a continuación), composiciones de solución de citocina fisiológica (véase la definición a continuación) y formulaciones de liberación sostenida de dichas composiciones CFS.
- 15 Como se usa en este documento, la expresión "solución de citocina celular derivada de amnios" o "ACCS" significa medio acondicionado que se ha obtenido de células AMP o de células AMP expandidas. La solución de citocina celular derivada de amnios o ACCS se ha mencionado previamente como "suspensión de citocinas derivada de amnios".
- 20 Como se usa en este documento, la expresión composición de "solución de citocinas fisiológicas" o "PCS" significa una composición que no se obtiene de células y que tiene concentraciones fisiológicas de uno o más factores seleccionados de VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2 y al menos un inhibidor de MMP. Los ejemplos de inhibidores de MMP adecuados incluyen, aunque sin limitación, TIMP-1 y TIMP-2.
- 25 Como se usa en este documento, el término "suspensión" 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, aunque sin limitación, agua, soluciones osmóticas tales como soluciones salinas y/o de azúcar, medios de cultivo celular y otras soluciones acuosas o no acuosas.
- 30 El término "lisado" como se usa en este documento se refiere a la composición obtenida cuando las células, por ejemplo, células AMP, se lisan y opcionalmente los desechos celulares (por ejemplo, membranas celulares) se retiran. Esto puede conseguirse por medios mecánicos, por congelación y descongelación, por sonicación, mediante el uso de detergentes, tales como EDTA o por digestión enzimática usando, por ejemplo, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas.
- 35 La expresión "fisiológico" o "nivel fisiológico", como se usa en este documento, significa el nivel en que una sustancia en un sistema vivo se encuentra y que es relevante para el funcionamiento apropiado de un proceso bioquímico y/o biológico.
- 40 Como se usa en este documento, el término "combinado" significa una pluralidad de composiciones que se han combinado para crear una nueva composición que tiene características más constantes o coherentes en comparación con las composiciones no combinadas. Por ejemplo, la ACCS combinada tiene características más constantes o coherentes en comparación con ACCS no combinada. Los ejemplos de composiciones combinadas incluyen "combinaciones SP" (más de un conjunto de ACCS/una placenta), "combinaciones MP1" (una colección de ACCS/placenta, múltiples placentas) y "combinaciones MP2" (más de una colección de ACCS/placenta, múltiples placentas).
- 45 Como se usa en este documento, el término "sustrato" significa un recubrimiento definido sobre una superficie a la que se adhieren las células, sobre la que crece y/o a la que migran. Como se usa en este documento, el término "matriz" significa una sustancia en que crecen las células o sobre la que pueden definirse o no en sus componentes. La matriz incluye sustancias tanto biológicas como no biológicas. Como se usa en este documento, el término "armazón" significa una estructura tridimensional (3D) (sustrato y/o matriz) en que o sobre la que crecen las células. Puede estar compuesto de componentes biológicos, componentes sintéticos o una combinación de ambos. Además, puede construirse de forma natural por las células o construirse de forma artificial. Además, el armazón puede contener componentes que tienen actividad biológica en condiciones apropiadas.
- 50 Como se usa en este documento, el término "sustrato" significa un recubrimiento definido sobre una superficie a la que se adhieren las células, sobre la que crece y/o a la que migran. Como se usa en este documento, el término "matriz" significa una sustancia en que crecen las células o sobre la que pueden definirse o no en sus componentes. La matriz incluye sustancias tanto biológicas como no biológicas. Como se usa en este documento, el término "armazón" significa una estructura tridimensional (3D) (sustrato y/o matriz) en que o sobre la que crecen las células. Puede estar compuesto de componentes biológicos, componentes sintéticos o una combinación de ambos. Además, puede construirse de forma natural por las células o construirse de forma artificial. Además, el armazón puede contener componentes que tienen actividad biológica en condiciones apropiadas.
- 55 La expresión "producto celular" o "productos celulares", como se usa en este documento, se refiere a todas y cada una de las sustancias generadas y secretadas por una célula, incluyendo, aunque sin limitación, factores proteínicos (es decir, factores de crecimiento, factores de diferenciación, factores de injerto, citocinas, morfógenos, proteasas (es decir, para promover la deslaminación celular endógena, inhibidores de proteasa), componentes de la matriz extracelular (es decir, fibronectina, etc.).
- 60
- 65

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa esa cantidad de un agente terapéutico necesaria para conseguir un efecto fisiológico deseado (es decir, curación de heridas acelerada).

5 Como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que los componentes, además del agente terapéutico, que comprende la formulación, son adecuados para su administración al paciente que se está tratando de acuerdo con la presente invención.

10 Como se usa en este documento, la expresión "componente terapéutico" significa un componente de la composición que ejerce un beneficio terapéutico cuando se administra la composición al sujeto.

Como se usa en este documento, la expresión "proteína terapéutica" incluye una amplia gama de proteínas biológicamente activas incluyendo, aunque sin limitación, factores de crecimiento, enzimas, hormonas, citocinas, inhibidores de citocinas, factores de coagulación sanguínea, factores peptídicos de crecimiento y diferenciación.

15 Como se usa en este documento, el término "tejido" se refiere a una agregación de células especializadas de forma similar unificadas en la realización de una función particular.

Como se usa en este documento, los términos "uno" o "una" significa uno o más; al menos uno.

20 Como se usa en este documento, el término "complementario" significa conjuntamente, junto con, además de, en combinación con y similares.

25 Como se usa en este documento, el término "coadministrar" puede incluir administración simultánea o secuencial de dos o más agentes.

30 Como se usa en este documento, el término "agente" significa un agente activo o un agente inactivo. Por la expresión "agente activo" se entiende un agente que puede 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 acondicionados de células, etc. por la expresión "agente inactivo" se entiende un agente que no tiene un efecto fisiológico cuando se administra. Dichos agentes pueden llamarse de forma alternativa "excipientes farmacéuticamente aceptables". Los ejemplos no limitantes incluyen cápsulas de liberación en el tiempo y similares.

35 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" están reconocidas en la técnica y se refieren a modos de administración diferentes de administración enteral y tópica, habitualmente por inyección e incluye, sin limitación, inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular, epidural, intracerebral e intraesternal.

40 Las expresiones "liberación sostenida", "liberación prolongada", "liberación en el tiempo", "liberación controlada" o "liberación continua", como se usan en este documento, significan un agente, típicamente un agente terapéutico o fármaco, que se formula para disolverse lentamente y liberarse en el tiempo.

45 Los términos "bioerosionable" o "bioerosión", como se usan en este documento, significan una combinación de procesos físicos (es decir, disolución) y químicos (es decir, escisión de enlaces químicos) que provocan la descomposición de una sustancia.

Los términos "biodegradable" o "biodegradación", como se usan en este documento, significan un agente biológico (es decir, una enzima, microbio o célula) que es responsable de la descomposición de una sustancia.

50 Los términos "biorreabsorbible" o "bioabsorbible", como se usan en este documento, significan la eliminación de un producto de descomposición por actividad celular (es decir, fagocitosis).

55 Como se usa en este documento, el término "nanopartícula" significa partículas de menos de 100 nm de diámetro que muestran propiedades nuevas o potenciadas dependientes del tamaño en comparación con partículas más grandes del mismo material.

60 "Tratamiento", "tratar" o "que trata", como se usan en este documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad o afección de un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que aparezca la enfermedad o la afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o afección, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la enfermedad o la afección, es decir, detener su desarrollo; (c) aliviar y/o mejorar la enfermedad o la afección, es decir causar la regresión de la enfermedad o afección; o (d) curar la enfermedad o la afección, es decir, detener su desarrollo o progresión. La población de sujetos tratada por las composiciones de la invención incluye sujetos que padecen la afección o la enfermedad indeseable, así como sujetos en riesgo de desarrollo de la afección o la enfermedad.

65 Como se usa en este documento, una "herida" es cualquier alteración, de cualquier causa, de la anatomía normal

(anatomía interna y/o externa) incluyendo, aunque sin limitación, lesiones traumáticas tales como lesiones mecánicas (es decir, contusión, penetración), térmicas, químicas, eléctricas, por radiación, por conmoción y por incisión; lesión provocada tales como cirugía operatoria y hernias de incisión resultantes, fistulas, etc.; heridas agudas, heridas crónicas, heridas infectadas y heridas estériles, así como heridas asociadas con estados patológicos (es decir, úlceras causadas por neuropatía diabética o úlceras del sistema gastrointestinal o genitourinario). Una herida es dinámica y el proceso de curación es un conjunto de procesos celulares integrados e interrelacionados que empiezan en el momento de la formación de la herida y continúan más allá del cierre inicial de la herida hasta llegar a una cicatriz estable. Estos procesos celulares están mediados o modulados por sustancias humorales incluyendo, aunque sin limitación, citocinas, linfoquinas, factores de crecimiento y hormonas. De acuerdo con la presente invención, "curación de heridas" se refiere a mejora, por alguna forma de intervención, de los procesos celulares naturales y sustancias humorales de reparación tisular de modo que la curación sea más rápida, y/o el área curada resultante tenga menos cicatrización y/o el área herida posea fuerza tisular que es más cercana a la de un tejido no lesionado y/o el tejido herido obtenga algún grado de recuperación funcional.

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

Descripción detallada

De acuerdo con la presente invención pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, ed., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III; Celis, ed., 1994, "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volúmenes I-III; Coligan, ed., 1994, "Current Protocols in Immunology" Volúmenes 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".

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la decena de la unidad del límite inferior salvo que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está divulgado. También se divulgan los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños que pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, también se divulgan intervalos que excluyen cualquiera de esos dos límites incluidos.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el habitualmente comprendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque también puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

Debe apreciarse que como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

Obtención y cultivo de células

Células ECS- Se describen en la técnicas diversos métodos para aislar células a partir del tejido extraembrionario, que entonces pueden usarse para producir las células ECS de la presente invención (véanse, por ejemplo, el documento US2003/0235563, el documento US2004/0161419, el documento US2005/0124003, la solicitudes provisionales 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, el documento PCTUS06/011392, el documento US2006/0078993, el documento PCT/US00/40052, la patente de Estados Unidos n.º 7.045.148, el documento US2004/0048372 y el documento US2003/0032179).

Identificación de células ECS- Una vez aislado el tejido extraembrionario, es necesario identificar las células en el tejido que tienen las características asociadas con células ECS (véase la definición anterior). Por ejemplo, las células se ensayan para su capacidad de secretar una combinación única de citocinas en el espacio extracelular o en el medio de cultivo circundante. Las células adecuadas son aquellas en que se produce la citocina o citocinas en

el intervalo fisiológico de ~5,0-16 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 mg/ml para TIMP-1 y ~1,04 mg/ml para TIMP-2. Las células adecuadas opcionalmente pueden secretar timosina β₄.

- 5 Células AMP- En una realización particular, se preparan composiciones de células AMP usando las etapas de a) recuperación del amnios de la placenta, b) disociación de las células epiteliales del amnios de la membrana amniótica, c) aislamiento de las células AMP de las células epiteliales del amnios, d) cultivo de las células AMP en un medio basal con la adición de una proteína humana derivada de forma natural o producida de forma recombinante; y opcionalmente d) proliferación adicional de las células usando aditivos y/o factores de crecimiento
10 adicionales. Los detalles están contenidos en la publicación de Estados Unidos n.º 2006-0222634-A1.

Las células AMP se cultivan de la siguiente manera: las células AMP se cultivan en un medio basal. Dicho medio incluye, aunque sin limitación, Epilife (Cascade Biologicals), Opti-pro, VP-SFM, IMDM, Advanced DMEM, K/O DMEM, 293 SFM II (todos hechos por Gibco; Invitrogen), HPGM, Pro 293S-CDM, Pro 293A-CDM, UltraMDCK,
15 UltraCulture (todos hechos por Cambrex), Stemline I y Stemline II (ambos hechos por Sigma-Aldrich), DMEM, DMEM/F-12, F12 de Ham, M199, y otros medios basales comparables. Dichos medios pueden contener opcionalmente proteína humana de calidad clínica o pueden complementarse con proteína humana de calidad clínica. Como se usa en este documento, una "proteína humana" es una que se produce de forma natural o una que se produce usando tecnología recombinante. En determinadas realizaciones específicas, "proteína humana" también
20 significa que incluye un líquido humano o derivado o preparación del mismo, tal como suero o líquido amniótico humano, que contiene proteína humana.

En una realización más preferida, las células se cultivan usando un sistema que está libre de productos animales que evitan la xenocontaminación. En esta realización, el medio de cultivo es Stemline I o II, Opti-pro, IMDM o
25 DMEM, y se complementa opcionalmente con albúmina humana de calidad clínica añadida hasta concentraciones de un 10 %. En realizaciones preferidas, el medio es sin suero además de ser sin componentes animales.

Opcionalmente, se usan otros factores. En una divulgación, se usa factor de crecimiento epidérmico (EGF) a una concentración entre 0-1 mg/ml. En una divulgación preferida, la concentración de EGF es de aproximadamente
30 10 ng/ml. Los factores de crecimiento alternativos que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, TGFα o TGFβ₁ (5 ng/ml; intervalo de 0,1-100 ng/ml), activina A, toxina colérica (preferiblemente a un nivel de aproximadamente 0,1 mg/ml; intervalo de 0-10 mg/ml), transferrina (5 mg/ml; intervalo de 0,1-100 mg/ml), factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF 40 ng/ml (intervalo de 0-200 ng/ml), aFGF, FGF-4, FGF-8; (todos en el intervalo de 0-200 ng/ml), proteínas morfogénicas óseas (es decir, BMP-4) u otros factores de crecimiento que se
35 sabe que potencian la proliferación celular. Todos los suplementos son de calidad clínica.

Generación de medio acondicionado de solución que contiene factor celular

La generación del medio acondicionado de ECS se obtiene como se describe a continuación para ACCS, excepto
40 que se usan células ECS.

Generación de ACCS- Las células AMP de la invención pueden usarse para generar ACCS. En una divulgación, las células AMP se aíslan como se describe en este documento y se siembran 1×10^6 células/ml en matraces T75 que contienen entre 5-30 ml de medio de cultivo, preferiblemente entre 10-25 ml de medio de cultivo y mucho más
45 preferiblemente aproximadamente 10 ml de medio de cultivo. Las células se cultivan hasta que son confluentes, el medio se cambia y en una realización, se recóge la ACCS 1 día después de la confluencia. En otra realización, el medio se cambia y la ACCS se recoge 2 días después de la confluencia. En otra realización, el medio se cambia y la ACCS se recoge 4 días después de la confluencia. En otra realización, el medio se cambia y la ACCS se recoge 5 días después de la confluencia. En una realización preferida, el medio se cambia y la ACCS se recoge 3 días
50 después de la confluencia. En otra realización preferida, el medio se cambia y la ACCS se recoge 3, 4, 5, 6 o más días después de la confluencia. Los expertos en la materia reconocerán que también se contemplan otros medios para recoger la ACCS de los cultivos de células AMP, tal como usando otros recipientes de cultivo tisular incluyendo, aunque sin limitación, fábricas celulares, matraces, fibras huecas o aparato de cultivo en suspensión, o recogiendo la ACCS de cultivos subconfluentes y/o de proliferación activa. También se contempla que la ACCS se
55 crioconserva después de la recogida. También se contempla que la ACCS se liofilice después de la recogida. También se contempla por la invención que la ACCS se formule para liberación sostenida después de la recogida. También se contempla que la producción de ACCS se aumente en escala para la generación de producto suficiente para ensayo clínico y para comercialización. Los expertos en la materia están familiarizados con las metodologías de crioconservación y liofilización, y de formulación de liberación sostenida.

También se contempla que las composiciones CFS tales como ACCS y ACCS combinada, se diluyan con diluyente apropiado antes de su uso. los diluyentes apropiados incluyen, sin limitación, solución salina normal, PBS, solución de lactato de Ringer, medio de cultivo celular, medio de cultivo celular acondicionado, agua y similares. dichas diluciones pueden ser 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:100, etc. Además, las diluciones pueden ser de menos de 1:2 (es decir, 1:1, 1:0.5, etc.). La dilución apropiada requerida dependerá del uso pretendido y, por lo tanto, tendrá que determinarse empíricamente por los expertos en la materia.
60
65

Las composiciones CFS de la invención, incluyendo ACCS y ACCS combinada, se caracterizan por ensayo de las citocinas fisiológicamente relevantes en el intervalo fisiológicamente relevante de ~5,0-16 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 mg/ml para TIMP-1 y ~1,04 mg/ml para TIMP-2. La ACCS y la ACCS combinada se ensayan opcionalmente para la presencia de timosina β4.

Generación de composiciones de solución de citocinas fisiológicas (PCS)

Una forma no obtenida de células de ACCS (mencionada en este documento como composición de solución de citocinas fisiológicas ("PCS") se genera combinando niveles fisiológicos de uno o más de VEGF, angiogenina, PDGF, TGFβ2, y uno o más inhibidores de MMP (es decir, TIMP-1 y/o TIMP-2) en un vehículo. Opcionalmente, la PCS contiene timosinap4. Los niveles fisiológicos para estas citocinas son los mismos que los encontrados en ACCS. Los vehículos adecuados incluyen solución salina normal, PBS, solución de lactato de Ringer, medio de cultivo celular, medio de cultivo celular acondicionado, agua, etc. Dichas composiciones son adecuadas para criopreservación, liofilización, formulación de liberación sostenida, aumento de escala y similares. se contempla que la PCS puede producirse de modo que contenga niveles más concentrados de los factores que los encontrados en ACCS y que pueda diluirse posteriormente con diluyente apropiado antes de su uso. Los diluyentes apropiados incluyen, sin limitación, solución salina normal, PBS, solución de lactato de Ringer, medio de cultivo celular, medio de cultivo celular acondicionado, agua y similares. dichas diluciones pueden ser 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:100, etc. Dichas diluciones también pueden ser de menos de 1:2 (es decir, 1:1, 1:0.5, etc.). La dilución apropiada requerida dependerá del uso pretendido y, por lo tanto, tendrá que determinarse empíricamente por los expertos en la materia.

Las composiciones de la invención pueden prepararse en una diversidad de formas dependiendo de su uso pretendido. Por ejemplo, una composición puede ser un líquido que comprende un agente de la invención, es decir, ACCS o ACCS combinada. Una composición líquida también incluye un gel. La composición líquida puede ser acuosa o estar en forma de una pomada, ungüento, crema o similar. La composición líquida también puede formularse de tal manera que sea adecuada para una aplicación por pulverizador o aerosol.

Una suspensión acuosa útil 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 acuosa o solución/suspensión es preferiblemente viscosa y mucoadhesiva, o incluso más preferiblemente, tanto como viscosa como mucoadhesiva.

Composiciones de liberación sostenida

Las composiciones CFS, incluyendo, aunque sin limitación, ACCS, ACCS combinada y PCS, pueden formularse como composiciones CFS de liberación sostenida (mencionadas en este documento como "SR-CFS"). Los expertos en la materia están familiarizados con las metodologías para crear composiciones de liberación sostenida de agentes terapéuticos, incluyendo agentes terapéuticos basados en proteína tales como ACCS, ACCS combinada o PCS.

La SR-CFS, incluyendo, aunque sin limitación, SR-ACCS y SR-PCS, puede prepararse por cualquiera de los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, la tecnología de formulación en liposomas multivesiculares es útil para la liberación sostenida de agentes terapéuticos proteínicos y peptídicos. Qui, J., et al., (ACTA Pharmacol Sin, 2005, 26(11):1395-401) describe esta metodología para la formulación de interferón alfa-2b de liberación sostenida. Vyas, S.P., et al., (Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32(6):699-707) describe la encapsulación de interferón alfa pegilado en liposomas multivesiculares. La ACCS (incluyendo ACCS combinada) y PCS son adecuadas para su uso en formulación de liberación sostenida en liposomas multivesiculares.

La tecnología de nanopartículas también es útil para crear SR-CFS. Por ejemplo, Packhaeuser, C.B., et al., (J Control Release, 2007, 123(2):131-40) describe sistemas de depósito parenterales biodegradables basados en nanopartículas de dialquilaminoalquil-amina-poli(alcohol vinílico)-g-poli(láctido-co-glicólido) cargadas con 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., et al., (Pharm Res 2003, 20(12):2011-20) describe nanopartículas biodegradables sin tensioactivo para tratamiento por aerosol que se basa en los polímeros ramificados DEAPA-PVAL-g-PLGA y concluye que DEAPA-PVAL-g-PLGA son sistemas de suministro de fármacos versátiles. La ACCS (incluyendo ACCS combinada) y PCS son adecuadas para su uso en formulaciones de liberación sostenida basadas en nanopartículas.

Las formulaciones de liberación sostenida basadas en polímeros con también muy útiles. Chan, Y.P., et al., (Expert Opin Drug Deliv, 2007, 4(4):441-51) proporciona una revisión del sistema Medusa (Flamel Technologies), que se usa para la liberación sostenida de tratamientos proteínicos y peptídicos. Hasta ahora, el sistema Medusa se ha aplicado a 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 con hepatitis C (IFN-alfa(2b)). Chavanpatil, M.D., et al., (Pharm Res, 2007, 24(4):803-10) describe nanopartículas de tensioactivo-polímero como una plataforma novedosa para suministro celular sostenido y potenciado de moléculas solubles en agua. Takeuchi, H., et al., (Adv Drug Deliv Res,

2001,47(1):39-54) describe sistemas nanoparticulados mucoadhesivos para el suministro de fármacos peptídicos, incluyendo liposomas y nanopartículas poliméricas. Wong, H.L., et al., (Pharm Res, 2006, 23(7):1574-85) describe un nuevo sistema híbrido de polímero-lípido que ha demostrado aumentar la citotoxicidad de doxorubicina contra células cancerosas de mama resistentes a múltiples fármacos. Las composiciones CFS, incluyendo, aunque sin limitación, ACCS (incluyendo ACCS combinada) y PCS son adecuadas para su uso en las metodologías de formulación de liberación sostenida mencionadas anteriormente.

Además, otras metodologías de liberación sostenida conocidas para los expertos en la materia, aunque no se describen específicamente en este documento, también son adecuadas para su uso con las composiciones CFS.

Composiciones farmacéuticas de composiciones CFS incluyendo, aunque sin limitación, ACCS, ACCS combinada, PCS, SR-ACCS (incluyendo ACCS combinada) y SR-PCS

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de composiciones CFS y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o enumerado en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en seres 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, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tal 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, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades mínimas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin, y también otros que son conocidos para los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Kits de tratamiento que comprenden composiciones CFS incluyendo, aunque sin limitación, ACCS, ACCS combinada, PCS, SR-ACCS (incluyendo ACCS combinada) y SR-PCS

También se divulga 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 composiciones CFS. El material de envasado comprende una etiqueta o prospecto que indica que las composiciones CFS contenidas en el mismo pueden usarse para aplicaciones terapéuticas tales como, por ejemplo, curación de heridas.

Formulación, dosificación y administración de composiciones CFS incluyendo, aunque sin limitación, ACCS, ACCS combinada, PCS, SR-ACCS (incluyendo ACCS combinada) y SR-PCS

Las composiciones que comprenden composiciones CFS pueden administrarse a un sujeto para proporcionar diversas funciones celulares o tisulares, por ejemplo, para acelerar la curación de heridas. Como se usa en este documento, "sujeto" puede significar un ser humano o un animal no humano.

Dichas composiciones pueden formularse de cualquier manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que opcionalmente comprenden excipientes y auxiliares. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida. Las composiciones pueden envasarse con instrucciones escritas para su uso terapéutico. Las composiciones también pueden administrarse al destinatario en uno o más vehículos fisiológicamente aceptables. Los vehículos para composiciones CFS pueden incluir, aunque sin limitación, soluciones de solución salina normal, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución de lactato de Ringer que contiene una mezcla de sales en concentraciones fisiológicas, o medio de cultivo celular.

Además, un experto en la materia puede determinar fácilmente la dosis apropiada de las composiciones CFS para un propósito particular. Una dosis preferida está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1000 microgramos por centímetro cuadrado de área aplicada. Otros intervalos de dosis preferidos son de 1,0 a 50.0 microgramos/área aplicada. Se ha descubierto que cantidades relativamente pequeñas de las composiciones CFS son terapéuticamente útiles. Una ejemplificación de dicha utilidad terapéutica es la capacidad de ACCS (incluyendo ACCS combinada) de acelerar la curación de heridas (para detalles véase la publicación de Estados Unidos n.º 2006/0222634 y la publicación de Estados Unidos n.º 2007/1231297). Un experto en la materia también reconocerá que la cantidad de dosis ha administrar también tiene que determinarse empíricamente basándose en, por ejemplo,

la gravedad y tipo de enfermedad, trastorno o lesión que se está tratando. Por ejemplo, una dosis es suficiente para obtener un efecto terapéutico (es decir, acelerar la curación de heridas). Otras divulgaciones contemplan 2, 3, 4 o más dosis para efecto terapéutico.

5 Los expertos en la materia reconocerán que una dosis preferida es una que produce un efecto terapéutico (una cantidad terapéuticamente eficaz) tal como acelerar la curación de heridas, en un paciente que lo necesita. Por supuesto, las dosis apropiadas de las composiciones CFS requerirán determinación empírica en el momento de uso basándose en varias variables incluyendo, aunque sin limitación, la gravedad y el tipo de lesión, trastorno o afección que se está tratando; la edad, peso, género, salud del paciente; otras medicaciones y tratamientos que se están administrando al paciente; y similares. Un experto en la materia también reconocerá que la cantidad de dosis (régimen de dosificación) a administrar también tiene que determinarse empíricamente basándose en, por ejemplo, la gravedad y el tipo de lesión, trastorno o afección que se está tratando. Además, un experto en la materia reconoce que la frecuencia de dosificación tiene que determinarse empíricamente basándose en la gravedad y el tipo de lesión, trastorno o afección que se está tratando. En determinadas divulgaciones, una dosis se administra cada día durante una cantidad dada de días (es decir, una vez al día durante 7 días, etc.). En otras divulgaciones, pueden administrarse múltiples dosis en un día (cada 4 horas, etc.). También se contemplan múltiples dosis por día durante múltiples días.

20 En divulgaciones adicionales, al menos un agente adicional puede combinarse con las composiciones CFS. Dichos agentes pueden actuar de forma sinérgica con las composiciones CFS de la invención para potenciar el efecto terapéutico. Dichos agentes incluyen, aunque sin limitación, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, anticuerpos, inhibidores, antibióticos, agentes inmunosupresores, esteroides, antifúngicos, antivíricos u otros tipos celulares (es decir, células madre o células de tipo células madre, por ejemplo, células AMP). Los agentes inactivos incluyen vehículos, diluyentes, estabilizantes, agentes gelificantes, vehículos de suministro, ECM (naturales sintéticas), armazones y similares. Cuando las composiciones CFS se administran conjuntamente con otros agentes farmacéuticamente activos, pueden necesitarse incluso menos de las composiciones CFS para que sean terapéuticamente eficaces.

30 Las composiciones CFS pueden administrarse por inyección en un sitio diana de un sujeto, preferiblemente mediante un dispositivo de suministro, tal como un tubo, por ejemplo, catéter. En una divulgación preferida, el tubo contiene además una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la que pueden introducirse las composiciones CFS en el sujeto en una ubicación deseada. Ejemplos no limitantes específicos de administración de las composiciones CFS a los sujetos también pueden incluir la administración por inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección intrarterial, inyección intracardiaca, inyección intradérmica, inyección intratecal, inyección epidural, inyección intraperitoneal o inyección intracerebral. También se contemplan las infusiones (es decir, infusión subdural, intratecal o intracerebral). Si la administración es intravenosa, puede prepararse una suspensión líquida inyectable y administrarse mediante un goteo continuo o como un bolo. En algunos casos, pueden ser apropiado administrar las composiciones CFS usando una bomba de infusión.

40 La cronología de administración de las composiciones CFS dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad, trastorno o lesión que se está tratando. En una divulgación, las composiciones CFS se administran lo más pronto posibles después del diagnóstico o la lesión. En otra divulgación, las composiciones CFS se administran más de una vez después del diagnóstico o lesión. En determinadas divulgaciones, cuando se requiere cirugía, las composiciones CFS se administran en el momento de la cirugía. En otras divulgaciones más, las composiciones CFS se administran en el momento de, así como después de la cirugía. Dicha administración posquirúrgica puede adoptar la forma de una única administración o de múltiples administraciones.

50 Las composiciones CFS también pueden insertarse en un dispositivo de suministro, por ejemplo, una jeringa, en diferentes formas. Por ejemplo, las composiciones CFS pueden ser parte de una solución contenida en dicho dispositivo de suministro. Como se usa en este documento, el término "solución" incluye un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones de tampón acuoso, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de dichos vehículos y diluyentes es bien conocido en la técnica. La solución es preferiblemente estéril y fluida en la medida que exista una fácil capacidad de inyección. Preferiblemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y opcionalmente puede conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Las soluciones de la invención pueden prepararse incorporando las composiciones CFS en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según se requiera, otros ingredientes enumerados anteriormente.

60 Las composiciones CFS pueden administrarse sistémicamente (por ejemplo, por vía intravenosa), de forma local (por ejemplo, por aplicación directa bajo visualización durante cirugía) o de forma tópica. Para dicha administración, las composiciones pueden estar en una preparación de suspensión líquida inyectable o en un medio biocompatible que es inyectable en forma líquida y se vuelve semisólido en el sitio del tejido dañado. También puede usarse un dispositivo de suministro endoscópico controlable.

65 Las matrices de soporte en que pueden incorporarse o incrustarse las composiciones de CFS incluyen matrices que

son compatibles con el destinatario y que se degradan en productos que no son dañinos para el destinatario.

Las matrices biodegradables naturales y/o sintéticas son ejemplos de dichas matrices. Las matrices biodegradables naturales incluyen coágulos de plasma, por ejemplo, derivados de un mamífero, colágeno, fibronectina y matrices de laminina. El material de matriz sintético adecuado debe ser biocompatible para impedir complicaciones inmunológicas. También debe ser reabsorbible. La matriz debe poderse configurar en una diversidad de formas y debe tener suficiente resistencia para evitar que se hunda tras el implante. Los estudios recientes indican que los polímeros de poliéster biodegradables hechos de ácido poliglicólico cumplen todos estos criterios (Vacanti, et al., J. Ped. Surg. 23:3-9 (1988); Cima, et al., Biotechnol. Bio- eng. 38:145 (1991); Vacanti, et al., Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 (1991)). Otras matrices de soporte biodegradable sintéticas incluyen polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Ejemplos adicionales de polímeros sintéticos y métodos de incorporación o incrustación de composiciones en estas matrices también son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.298.002 y 5.308.701.

Una de las ventajas de una matriz polimérica biodegradable es que las composiciones CFS pueden incorporarse directamente en la matriz de soporte de modo que se liberen lentamente según se degrada la matriz de soporte *in vivo*. Además de las composiciones CFS, otros factores, incluyendo nutrientes, factores de crecimiento, inductores de la diferenciación o desdiferenciación (es decir, que causan que las células diferenciadas pierden las características de diferenciación y adquieren características tales como proliferación y una función más general), productos de secreción, inmunomoduladores, inhibidores de la inflamación, factores de regresión, compuestos biológicamente activos que potencian o permiten el crecimiento interior de la red linfática o fibras nerviosas, ácido hialurónico y fármacos, que son conocidos para los expertos en la materia y están disponibles en el mercado con instrucciones en cuanto a lo que constituye una cantidad eficaz, de proveedores tales como Collaborative Research, Sigma Chemical Co., factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), podrían incorporarse en la matriz o proporcionarse junto con la matriz. Asimismo, los polímeros que contienen péptidos tales como el péptido de adhesión RGD (Arg-Gly-Asp) pueden sintetizarse para su uso en la formación de matrices (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.988.621, 4.792.525, 5.965.997, 4.879.237 y 4.789.734).

En otro ejemplo, las composiciones CFS pueden incorporarse en una matriz de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company). Se ha desarrollado una diversidad de tecnologías de encapsulación (por ejemplo, Lacy et al., Science 254:1782-84 (1991); Sullivan et al., Science 252:718-712 (1991); documento WO 91/10470; documento WO 91/10425; patente de Estados Unidos n.º 5.837.234; patente de Estados Unidos n.º 5.011.472; patente de Estados Unidos n.º 4.892.538). Durante procedimientos de cirugía abierta que implican el acceso físico directo a un tejido enfermo o dañado, todas las formas descritas de las preparaciones de suministro de composición CFS son opciones disponibles. Estas composiciones pueden administrarse repetidamente a intervalos hasta que se consiga un efecto terapéutico deseado, es decir, curación de heridas acelerada.

Las matrices tridimensionales a usar son matrices estructurales que proporcionan un almacén para guiar el proceso de curación y formación de tejido. Los almacenes pueden adoptar formas que varían desde fibras, geles, telas, láminas de tipo esponja y estructuras 3D complejas con poros y canales fabricadas usando estrategias de fabricación de formas sin sólido (SFFF) complejas. Como se usa en este documento, la expresión "almacén" significa una estructura tridimensional (3D) (sustrato y/o matriz). Puede estar compuesto de componentes biológicos, componentes sintéticos o una combinación de ambos. Además, puede construirse de forma natural por las células o construirse de forma artificial. Además, el almacén puede contener componentes que tienen actividad biológica en condiciones apropiadas. La estructura del almacén puede incluir una malla, una esponja o formarse a partir de un hidrogel.

El diseño y la construcción de la armadura para formar una matriz tridimensional es de suma importancia. La matriz debe ser un molde poroso inyectable, adaptable, no tóxico, para el crecimiento interior vascular. Los poros deben permitir el crecimiento interior vascular. Estos son poros generalmente interconectados en el intervalo entre aproximadamente 100 y 300 micrómetros, es decir, que tienen un espaciado intersticial entre 100 y 300 micrómetros, aunque pueden usarse aberturas más grandes. La matriz debe conformarse para maximizar el área superficial, para permitir la difusión adecuada de nutrientes, gases y factores de crecimiento. Actualmente, se prefiere una estructura porosa que es relativamente resistente a la compresión, aunque se ha demostrado que incluso si se comprimen uno o dos de los típicamente seis lados la matriz, esa matriz aún es eficaz para producir crecimiento tisular.

La matriz polimérica puede hacerse flexible o rígida, dependiendo de la forma, estructura y función final deseadas. Para la reparación de un defecto, por ejemplo, se corta una esterilla fibrosa flexible para que se aproxime al defecto completo, entonces se ajusta al defecto preparado quirúrgicamente según lo necesario durante el implante. Una ventaja de usar las matrices fibrosas es la facilidad de recolocación y reordenamiento de las estructuras en el momento del implante.

También se divulga el suministro de composiciones CFS junto con cualquiera de las matrices de soporte anteriores, así como membranas derivadas de amnios. Dichas membranas pueden obtenerse como un subproducto del

proceso descrito en este documento para la recuperación de células AMP, o por otros métodos, tal como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.326.019 que describe un método para generar, almacenar y usar un injerto quirúrgico de membrana amniótica humana, el documento US 2003/0235580 que describe membranas amnióticas reconstituidas y recombinantes para el suministro sostenido de moléculas terapéuticas, proteínas o metabolitos, a un sitio en un hospedador, el documento U.S. 2004/0181240, que describe una membrana amniótica que cubre una superficie tisular que puede evitar adhesiones, excluir bacterias o inhibir actividad bacteriana, o para promover la curación y crecimiento de tejido, y la patente de Estados Unidos n.º 4.361.552, que se refiere a la preparación de membranas amnióticas reticuladas y a su uso en métodos para tratar quemaduras y heridas. De acuerdo con la presente invención, las composiciones CFS pueden incorporarse en dichas membranas.

Usos terapéuticos ejemplares de composiciones CFS que incluyen, aunque sin limitación, ACCS, ACCS combinada, PCS, SR-ACCS (incluyendo ACCS combinada) y SR-PCS

Curación de heridas - Las composiciones CFS de la presente invención son eficaces en acelerar la curación de heridas en heridas causadas por varias fuentes, incluyendo, aunque sin limitación, lesiones incisivas, por compresión, térmicas, por radiación, penetrantes, por conmoción, agudas, crónicas, infectadas y estériles. La presente invención se basa en el descubrimiento de que las composiciones CFS pueden acelerar el proceso de curación de heridas para todos los tipos de herida, particularmente cuando se administran de forma tópica, es decir, a la superficie del sitio de la herida. Usando las composiciones CFS, todos los tipos de herida, mecánicas o térmicas, agudas o crónicas, infectadas o estériles, experimentan curación más rápidamente que heridas similares que se dejan curar de forma natural o que se tratan con los métodos actualmente disponibles. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico dentro del significado de la presente invención se determinará por el médico o veterinario que atiende al paciente. Dichas cantidades se averiguan fácilmente por un experto en la materia y posibilitarán una curación de heridas acelerada cuando se administran de acuerdo con la presente invención. Los factores que influyen en esa cantidad terapéuticamente eficaz incluirán la actividad específica del agente terapéutico que se está usando, el tipo de herida (mecánica o térmica, grosor completo o parcial, etc.), el tamaño de la herida, la profundidad de la herida (si el grosor es completo), la ausencia o la presencia de infección, el tiempo que ha pasado desde que se produjo la lesión y la edad, estado físico, existencia de otras enfermedades patológicas y estado nutricional del paciente. Adicionalmente, otra medicación que pueda estar recibiendo el paciente afectará a la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico a administrar.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de la manera en que generar las composiciones y métodos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los autores de la invención consideran su invención. Se han hecho esfuerzos por asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben justificarse algunos errores experimentales y desviaciones. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la masa molecular es masa molecular promedio, la temperatura es en grados Celsius y la presión es atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplo 1: preparación de composiciones de células AMP

Recuperación de células AMP - Las células AMP se disociaron de membrana amniótica de partida usando los agentes de disociación PXXIII y tripsina. El intervalo de peso promedio del amnios fue 18-27 g. El número de células recuperadas por gramo de amnios fue de aproximadamente $10\text{-}15 \times 10^6$ para disociación con PXXIII y $5\text{-}8 \times 10^6$ para disociación con tripsina.

Método de obtención de células AMP seleccionadas: las células se sembraron en placa inmediatamente después del aislamiento del amnios. Después de ~2 días en cultivo se retiraron las células no adherentes y se mantuvieron las células adherentes. Esta adhesión a un recipiente de cultivo tisular de plástico 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 de marcadores de superficie celular similar, pero las células adherentes tienen mayor viabilidad y son la población deseada de células. Las células AMP adherentes se cultivaron hasta que alcanzaron ~120 000-150 000 células/cm². En este punto, los cultivos eran confluentes. Los cultivos celulares adecuados alcanzarán esta cantidad de células entre ~5-14 días. Obtener este criterio es un indicador del potencial proliferativo de las células AMP y las células que no consiguen este criterio no se seleccionan para análisis y uso adicional. Una vez que las células AMP alcanzaron ~120 000-150 000 células/cm², se recogieron y criopreservaron. Este punto temporal de recogida se llama p0.

Ejemplo 2: generación de ACCS

Las células AMP de la invención pueden usarse para generar ACCS, incluyendo ACCS combinada. Las células AMP se aislaron como se describe anteriormente y $\sim 1 \times 10^6$ células/ml se sembraron en matraces T75 que contienen ~10 ml de medio de cultivo. Las células se cultivaron hasta que fueron confluentes, el medio se cambió y se recogió

la ACCS tres días después de la confluencia. Los expertos en la materia reconocerán que también se contemplan otros medios para recoger ACCS de los cultivos confluyentes, tal como usando otros recipientes de cultivo tisular incluyendo, aunque sin limitación, fábricas celulares, matraces, fibras huecas o aparato de cultivo en suspensión, etc. (véase la descripción detallada anteriormente). También se contempla que la ACCS se crioconserva, liofilice o formule para liberación sostenida después de su recogida. También se contempla que la ACCS se recoja en un punto temporal diferente (véase la descripción detallada para los detalles).

Ejemplo 3: generación de ACCS combinada

La ACCS se obtuvo esencialmente como se describe anteriormente. En determinadas realizaciones, la ACCS se recogió múltiples veces de un cultivo de células AMP derivado de una placenta y estos múltiples conjuntos de ACCS se combinaron juntas. Dichas combinaciones se mencionan como "combinaciones SP" (más de un conjunto de ACCS/una placenta). En otra realización, los cultivos de células AMP se obtuvieron de varias placentas, es decir, de 5 o 10 placentas. Las células AMP de cada placenta se cultivaron y se recogió un conjunto de ACCS de cada cultivo y después se combinaron todos. Estas combinaciones se llaman "combinaciones MP1" (un conjunto ACCS/placenta, múltiples placentas). En otra realización más, los cultivos de células AMP se obtuvieron de varias placentas, es decir, de 5 o 10 placentas. Las células AMP de cada placenta se cultivaron y se realizó más de un conjunto de ACCS de cada cultivo de células AMP y después se combinaron. Estas combinaciones se llamaron "combinaciones MP2" (más de un conjunto de ACCS/ placenta, múltiples placentas).

Ejemplo 4: detección de citocinas en ACCS no combinada y combinada usando ELISA

Se realizan ELISA convencionales conocidos para los expertos en la materia en ACCS de células AMP obtenidas de 10 placentas diferentes. Además de ensayar cada muestra ACCS individualmente, también se ensayaron muestras ACCS combinadas para determinar si se reduce la variabilidad de los resultados de ELISA entre las muestras. La ACCS se obtiene como se describe anteriormente. Las combinaciones se hacen de la siguiente manera: la combinación 1 está compuesta de ACCS de las placentas 1-5; la combinación 2 está compuesta de ACCS de las placentas 6-10 y la combinación 3 está compuesta de ACCS de las placentas 1-10. Además, se realiza ELISA de las combinaciones SP, MP1 y MP2.

Ejemplo 5: generación de composiciones PCS

Se producen las siguientes composiciones PCS combinando la citocina o factor indicado a niveles fisiológicos en un vehículo:

- 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, TGF β 2 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, TGF β 2 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, TGF β 2, TIMP-1 y TIMP-2
- Composición M: angiogenina y TIMP-1
- Composición N: angiogenina, PDGF-BB y TIMP-1
- Composición O: angiogenina, PDGF-BB, y TIMP-1
- Composición P: angiogenina y TIMP-2
- Composición Q: angiogenina, PDGF-BB y TIMP-2
- Composición R: angiogenina, PDGF-BB, TGF β 2 y TIMP-2
- Composición S: angiogenina, PDGF-BB, TGF β 2, TIMP-1 y TIMP-2
- Composición T: PDGF-BB y TIMP-1
- Composición U: PDGF-BB, TGF β 2 y TIMP-1
- Composición V: PDGF-BB y TIMP-2
- Composición W: PDGF-BB, TGF β 2 y TIMP-2
- Composición X: PDGF-BB, TIMP-1 y TIMP-2
- Composición Y: PDGF-BB, TGF β 2, TIMP-1 y TIMP-2

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

5 El VEGF, la angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2 se añaden a los siguientes niveles fisiológicos: ~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 mg/ml para TIMP-1 y ~104 mg/ml para TIMP-2. El VEGF puede obtenerse de Invitrogen, catalogo n.º PHG0144, PHG0145, PHG0146, PHG0141 o PHG0143; la angiogenina puede obtenerse de R&D Systems, catalogo n.º 265-AN-050 o 265-AN-250; PDGF-BB puede obtenerse de Invitrogen, catalogo n.º PHG0044, n.º PHG0045, n.º PHG0046, n.º PHG0041, n.º PHG0043; TGFβ2 puede obtenerse de Invitrogen, catalogo n.º PHG9114; TIMP-1 puede obtenerse de R&D Systems, catalogo n.º 970-TM-010; y TIMP-2 puede obtenerse de R&D Systems, catalogo n.º 971-TM-010. VEGF, angiogenina, PDGF-BB, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2 se añaden a un vehículo tal como solución salina normal, PBS, solución de lactato de Ringer, medio de cultivo celular, agua u otra solución acuosa adecuada conocida para los expertos en la materia.

15 Las composiciones PCS se ensayan en modelos animales convencionales para la curación de heridas para evaluar la actividad (véanse las definiciones anteriormente para modelos animales convencionales para curación de heridas).

Ejemplo 6: generación de composiciones CFS de liberación sostenida

20 Las composiciones SR-ACCS, tales como, por ejemplo, AR-ACCS (incluyendo ACCS combinada) o SR-PCS, se producen combinando composiciones CFS con cualquiera de las tecnologías de formulación de liberación sostenida descritas en este documento (véase la descripción detallada) o conocidos de otro modo para los expertos en la materia.

Ejemplo 7: efectos de ACCS en un modelo animal de curación de heridas crónicas

25 Un modelo animal aceptado en la técnica para herida de granulación crónica se usó para estudiar los efectos de ACCS sobre la curación de heridas crónicas (Hayward PG, Robson MC: Animal models of wound contraction. En Barbul A, et al.: Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair: Normal and Chronic Wounds. John Wiley & Sons, Nueva York, 1990.).

30 Resultados: la ACCS fue eficaz en no permitir la proliferación de biocarga bacteriana tisular. La ACCS permitió una curación acelerada de la herida de granulación significativamente más rápida que en los grupos de control infectados no tratados.

Ejemplo 8: uso de composiciones CFS PCS, SR-ACCS y SR-PCS en un modelo animal de curación de heridas crónicas

35 Un modelo animal aceptado en la técnica para herida de granulación crónica (Hayward PG, Robson MC: Animal models of wound contraction. En Barbul A, et al.: Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair: Normal and Chronic Wounds. John Wiley & Sons, Nueva York, 1990) se usó para estudiar los efectos de las composiciones CFS PCS, SR-ACCS o SR-PCS de la invención sobre la curación de heridas crónicas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de solución de citocinas celulares derivada de amnios que comprende concentraciones fisiológicas de VEGF, TGFβ2, angiogenina, PDGF, TIMP-1 y TIMP-2, en la que la concentración fisiológica es ~5,0-16 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 mg/ml para TIMP-1 y ~104 mg/ml para TIMP-2, en la que la composición de solución de citocinas celulares derivada de amnios se obtiene por el método de:
- 5
- 10 (a) aislamiento de células epiteliales de amnios del amnios de una placenta;
(b) selección de células AMP de las células epiteliales del amnios;
(c) cultivo de las células AMP en medio que no es de base animal, en la que el medio se complementa con albúmina humana de calidad clínica hasta una concentración de un 10 % hasta que alcanzan confluencia;
(d) cambio del medio de cultivo;
(e) cultivo de las células en el medio durante 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días; y
- 15 (f) recogida del medio de cultivo de la etapa (e) para obtener solución de citocinas celulares derivada de amnios;
- en la que el medio de la etapa (c) es Stemline I o II, Opti-pro, IMDM o DMEM.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la etapa (f) se repite una pluralidad de veces y la solución de citocinas celulares derivada de amnios obtenida en la etapa (f) se combina para crear una solución de citocinas celulares derivada de amnios combinada.
- 20
3. La composición de la reivindicación 1(c), en la que el medio es sin suero.
- 25 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el medio basal se complementa además con EGF a una concentración de entre 0 y 1 µg/ml.
5. Una composición de liberación sostenida que comprende la solución de citocinas celulares derivada de amnios de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 30
6. Un método de generación de una composición de liberación sostenida de la reivindicación 5, que comprende las etapas de combinar una composición de solución que contiene factor celular con un agente que puede lograr la liberación sostenida de la composición de solución que contiene factor celular.
- 35 7. Una composición farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7, para su uso en un método de aceleración de la curación de heridas.