

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 062**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2015.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 14/78** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2006 PCT/US2006/037906**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2007 WO07038686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2006 E 06804232 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 1933852**

54 Título: **Preparaciones de membrana amniótica y composiciones purificadas y métodos de uso**

30 Prioridad:

**27.09.2005 US 720760 P**

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

**17.05.2019**

73 Titular/es:

**TISSUETECH, INC. (100.0%)  
7000 S.W. 97th Avenue, Suite 212 Miami  
Florida 33173, US**

72 Inventor/es:

**TSENG, SCHEFFER;  
HE, HUA y  
LI, WEI**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 713 062 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

Preparaciones de membrana amniótica y composiciones purificadas y métodos de uso.

Campo de la invención

5 La invención se refiere en general a los campos de la biología y los productos farmacéuticos. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones y métodos para modular la fisiología celular y el procesamiento patológico usando una combinación de compuestos que se pueden encontrar en preparaciones de membrana amniótica.

Antecedentes de la invención

10 La placenta es un órgano temporal que rodea al feto durante la gestación. La placenta permite el transporte de gases y nutrientes, y también proporciona otras funciones metabólicas y endocrinas. La placenta se compone de varios tipos de tejidos. El cordón umbilical conecta la placenta con el feto y transporta el oxígeno al feto. El cordón umbilical tiene dos arterias y una vena. La gelatina de Wharton, un material gelatinoso especializado de tejido conectivo, rodea el cordón umbilical para protegerlo de daños durante el movimiento y desarrollo fetal. La "coraza" externa de la placenta se conoce como el "corion". Gran parte del disco placentario está compuesto por vellosidades coriónicas, que son extensiones del árbol vellosito coriónico. A través de estas estructuras, se produce el intercambio de nutrición fetal. La membrana amniótica (AM) es un saco membranoso avascular que está lleno de líquido amniótico. Esta membrana es la membrana más interna que rodea a un feto en la cavidad amniótica. Este tejido consiste en una capa epitelial y una capa de estroma avascular subyacente.

Resumen de la invención

20 En este documento se proporcionan composiciones purificadas y preparaciones de membrana amniótica (es decir, composiciones que se preparan a partir de materiales de membrana amniótica, que incluyen la membrana amniótica, el estroma amniótico y la gelatina amniótica). Al menos un componente de las composiciones purificadas se obtiene a partir de preparaciones de membrana amniótica. En este documento se describen composiciones purificadas en las que al menos un componente de la composición purificada se obtiene de placenta y corion humanos. En este documento también se describen métodos de preparación de cualquiera de las composiciones y preparaciones purificadas mencionadas anteriormente. En este documento también se describen métodos para almacenar y conservar cualquiera de las composiciones y preparaciones purificadas mencionadas anteriormente. En este documento también se describen métodos para usar cualquiera de las composiciones y preparaciones purificadas mencionadas anteriormente, que incluyen métodos conservantes, métodos de cultivo celular, métodos de cultivo de tejidos, métodos terapéuticos, métodos profilácticos y métodos cosméticos.

30 La invención proporciona una composición según la reivindicación 1.

Se proporcionan composiciones purificadas que comprenden:

- Hialuronano (HA) reticulado de alto peso molecular;
- Gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TSG-6);
- Pentraxina (PTX-3); y
- 35 • Trombospondina (TSP-1).

40 En una realización adicional, al menos una porción de los componentes de las composiciones purificadas se prepara a partir de una membrana amniótica humana. En otra o más realizaciones, las composiciones purificadas comprenden además Smad7. La reticulación del HA comprende un enlace covalente a una cadena pesada de inhibidor de la intertripsina. En una realización adicional o alternativa de las composiciones purificadas, la proporción de proteína a HA es inferior a aproximadamente 100.

En un ejemplo adicional o alternativo de las composiciones purificadas, el procedimiento de preparación para la composición purificada descrita en este documento incluye

- Obtención de una placenta humana congelada o previamente congelada;
- Descongelación de la placenta y aislamiento del material amniótico humano de la placenta descongelada; y
- 45 • Homogeneización del material amniótico humano en una solución reguladora apropiada.

En un procedimiento adicional o alternativo, el procedimiento de preparación para una composición de la invención incluye además:

- Congelación del material amniótico humano; y

- Molienda del material amniótico congelado.

En un ejemplo adicional o alternativo, el procedimiento de preparación incluye además:

- Liofilización del homogeneizado; o
- Centrifugación del homogeneizado y aislamiento del sobrenadante del homogeneizado centrifugado.

5 En un ejemplo adicional o alternativo, el procedimiento de preparación incluye además:

- Liofilización del sobrenadante en polvo.

En una realización adicional o alternativa, las composiciones purificadas comprenden además un portador farmacéuticamente aceptable para una forma de dosificación no sólida o una forma de dosificación sólida de liberación prolongada.

10 En este documento también se describen métodos para inhibir la formación de cicatrices en un sujeto que comprende la etapa de proporcionar una cantidad eficaz de una composición de inhibición de la formación de cicatrices a un sujeto que necesita inhibición de la formación de cicatrices; en el que la composición de inhibición de formación de cicatrices comprende al menos un componente preparado a partir de un material amniótico humano seleccionado de una membrana amniótica humana, una gelatina amniótica humana, un estroma amniótico humano, o una combinación de los mismos extraída de una membrana amniótica.

15 En un ejemplo adicional o alternativo de tales métodos, al menos un componente se extrajo del material amniótico humano. En un ejemplo adicional o alternativo de tales métodos, el material amniótico humano es el estroma amniótico humano.

En un ejemplo adicional o alternativo de tales métodos, el procedimiento de extracción comprende:

- 20
- Obtención de una placenta humana congelada o previamente congelada;
  - Descongelación de la placenta y aislamiento del material amniótico humano de la placenta descongelada;
  - Homogeneización del material amniótico humano en una solución reguladora apropiada;
  - Opcionalmente, liofilización del homogeneizado a un polvo; y
- 25
- Mezcla del homogeneizado o el polvo con un portador farmacéuticamente aceptable para una forma de dosificación no sólida o una forma de dosificación sólida de liberación prolongada.

En un ejemplo adicional o alternativo, el procedimiento de preparación sustituye la etapa de liofilización del homogeneizado con la etapa de:

- Centrifugación del homogeneizado, aislamiento del sobrenadante del homogeneizado centrifugado y, opcionalmente, liofilización del sobrenadante en un polvo.

30 También se describen métodos para revertir la formación de cicatrices en un sujeto que comprende la etapa de proporcionar una cantidad eficaz de una composición de reversión de cicatrices a un sujeto con cicatrices; en los que la composición de reversión de cicatrices comprende al menos un componente preparado a partir de un material amniótico humano seleccionado de una membrana amniótica humana, una gelatina amniótica humana, un estroma amniótico humano, o una combinación de los mismos extraída de una membrana amniótica. En otro o en un ejemplo

35 adicional de estos métodos, al menos un componente se extrajo del material amniótico humano. En otro o un ejemplo adicional de estos métodos, el material amniótico humano es el estroma amniótico humano.

En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el procedimiento de extracción comprende:

- Obtención de una placenta humana congelada o previamente congelada;
  - Descongelación de la placenta y aislamiento del material amniótico humano de la placenta descongelada;
- 40
- Homogeneización del material amniótico humano en una solución reguladora apropiada;
  - Opcionalmente, liofilización del homogeneizado a un polvo; y
- Mezcla del homogeneizado o el polvo con un portador farmacéuticamente aceptable para una forma de dosificación no sólida o una forma de dosificación sólida de liberación prolongada.

45 En otro o en un ejemplo adicional, el procedimiento de preparación sustituye la etapa de liofilización del homogeneizado con la etapa de:

- Centrifugación del homogeneizado, aislamiento del sobrenadante del homogeneizado centrifugado y, opcionalmente, liofilización del sobrenadante en un polvo.

5 En este documento también se describen métodos para inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende la etapa de proporcionar una cantidad eficaz de una composición de inhibición de la angiogénesis a un sujeto que necesita inhibición de la angiogénesis; en los que la composición de inhibición de la angiogénesis comprende al menos un componente preparado a partir de un material amniótico humano seleccionado de una membrana amniótica humana, una gelatina amniótica humana, un estroma amniótico humano, o una combinación de los mismos extraída de una membrana amniótica.

10 En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, al menos un componente se extrajo del material amniótico humano. En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el material amniótico humano es el estroma amniótico humano.

En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, la composición comprende:

- Hialuronano (HA) reticulado de alto peso molecular;
- Gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TSG-6);
- 15 • Pentraxina (PTX-3); y
- Trombospondina (TSP-1).

En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el procedimiento de extracción comprende:

- Obtención de una placenta humana congelada o previamente congelada;
- Descongelación de la placenta y aislamiento del material amniótico humano de la placenta descongelada;
- 20 • Homogeneización del material amniótico humano en una solución reguladora apropiada;
- Opcionalmente, liofilización del homogeneizado a un polvo; y
- Mezcla del homogeneizado o el polvo con un portador farmacéuticamente aceptable para una forma de dosificación no sólida o una forma de dosificación sólida de liberación prolongada.

25 En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el procedimiento de preparación sustituye la etapa de liofilización del homogeneizado con la etapa de:

- Centrifugación del homogeneizado, aislamiento del sobrenadante del homogeneizado centrifugado y, opcionalmente, liofilización del sobrenadante en un polvo

30 En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el sujeto que lo necesita es un ser humano con cáncer. En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el sujeto que lo necesita es un humano con degeneración macular relacionada con la edad.

En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, la composición de inhibición de la angiogénesis se proporciona en forma de una forma de dosificación no sólida o una forma de dosificación sólida de liberación prolongada.

En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, la composición de inhibición de la angiogénesis tiene las siguientes propiedades:

- 35 • induce la apoptosis de las células endoteliales implicadas en la formación vascular;
- previene la migración de células endoteliales implicadas en la formación vascular; y
- previene la formación de tubos de células endoteliales implicadas en la formación vascular.

40 Un método para reducir o prevenir la inflamación en un sujeto comprende la etapa de proporcionar una cantidad eficaz de una composición de inhibición de la inflamación a un sujeto que necesita la inhibición o prevención de la inflamación; en el que la composición de inhibición de la inflamación comprende al menos un componente preparado a partir de un material amniótico humano seleccionado de una membrana amniótica humana, una gelatina amniótica humana, un estroma amniótico humano, o una combinación de los mismos extraída de una membrana amniótica.

45 En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, al menos un componente se extrajo del material amniótico humano. En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el material amniótico humano es la membrana amniótica humana.

En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, la composición comprende:

- Hialuronano (HA) reticulado de alto peso molecular;
- Gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TSG-6);
- Pentraxina (PTX-3); y
- Trombospondina (TSP-1).

5 En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el procedimiento de extracción comprende:

- Obtención de una placenta humana congelada o previamente congelada;
- Descongelación de la placenta y aislamiento del material amniótico humano de la placenta descongelada;
- Homogeneización del material amniótico humano en una solución reguladora apropiada;
- Opcionalmente, liofilización del homogeneizado a un polvo; y

10 • Mezcla del homogeneizado o el polvo con un portador farmacéuticamente aceptable para una forma de dosificación no sólida o una forma de dosificación sólida de liberación prolongada.

En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el procedimiento de preparación sustituye la etapa de liofilización del homogeneizado con la etapa de:

15 • Centrifugación del homogeneizado, aislamiento del sobrenadante del homogeneizado centrifugado y, opcionalmente, liofilización del sobrenadante en un polvo.

En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el humano tiene artritis. En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, el humano tiene inflamación en al menos un ojo. En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, la composición de inhibición de la inflamación se proporciona como una forma de dosificación no sólida o una forma de dosificación sólida de liberación prolongada.

20 En otro o en un ejemplo adicional de estos métodos, la composición de inhibición de la inflamación tiene al menos dos de las siguientes propiedades:

- induce la apoptosis de macrófagos en el sitio de la inflamación;
- aumenta la proporción de prostaglandina D2 a prostaglandina E1 en el sitio de la inflamación;
- suprime la actividad de TGF- $\beta$  1 en el sitio de la inflamación; o

25 • inhibe la transducción de la señal de interferón-gamma en el sitio de la inflamación.

Diversas preparaciones de AM ejercen una serie de efectos fisiológicamente significativos en células de mamíferos y tejidos de mamíferos intactos. Tales efectos incluyen la supresión de la señalización de TGF- $\beta$ , el aumento de la apoptosis de los macrófagos, la disminución de la proliferación celular de, la disminución de la migración celular y el aumento de la apoptosis de las células endoteliales vasculares, la protección de las células epiteliales de la córnea y el limbo y los queratocitos de la apoptosis inducida por el almacenamiento o el tratamiento de dispa, y disminuyendo la inflamación en los tejidos. Además de las piezas de AM intacta, otras preparaciones descritas en este documento incluyen piezas de estroma de AM, AM procesadas (por ejemplo, molidas o pulverizadas) o estroma de AM, y varios extractos de estroma de AM y AM intacta. Los extractos de AM pueden estar en forma líquida o en polvo liofilizado.

30 Las composiciones también incluyen formas espesas o en gel de extractos de AM que se pueden preparar mezclando los extractos de AM con un espesante tal como uno o más componentes de matriz extracelular (ECM). Se conoce un gran número de componentes de la ECM, tal como el colágeno, el ácido hialurónico (HA) y la fibrina.

Aunque se pueden usar preparaciones, materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, en este documento se describen preparaciones, métodos y materiales apropiados. Además, las realizaciones particulares que se analizan a continuación son solo ilustrativas y no pretenden ser limitativas.

40 Ciertas definiciones

El término "aceptable" con respecto a una formulación, composición o ingrediente, como se usa en este documento, significa que no tiene un efecto perjudicial persistente sobre la salud general del sujeto que se está tratando.

45 Los "antioxidantes" incluyen, por ejemplo, hidroxitolueno butilado (BHT), ascorbato de sodio, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio y tocoferol. En ciertas realizaciones, los antioxidantes mejoran la estabilidad química cuando se requiere.

Los "aglutinantes" imparten cualidades cohesivas e incluyen, por ejemplo, ácido algínico y sales de los mismos; derivados de celulosa, tales como carboximetilcelulosa, metilcelulosa (por ejemplo, Methocel®), hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (por ejemplo, Klucel®), etilcelulosa (por ejemplo, Ethocel®), y celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel®); dextrina microcristalina; amilosa; silicato de magnesio y aluminio; ácidos polisacáridos; bentonitas; gelatina; copolímero de polivinilpirrolidona/acetato de vinilo; crosspovidona; povidona; almidón; almidón pregelatinizado; tragacanto, dextrina, un azúcar, tal como sacarosa (por ejemplo, Dipac®), glucosa, dextrina, melaza, manitol, sorbitol, xilitol (por ejemplo, Xylitab®) y lactosa; una goma natural o sintética tal como goma arábiga, tragacanto, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, polivinilpirrolidona (por ejemplo, Polyvidone® CL, Kollidon® CL, Polyplasdone® XL-10), alerce arabinogalactano, Veegum®, polietilenglicol, ceras, sodio alginato, y similares.

El término "portador", como se usa en este documento, se refiere a compuestos químicos o agentes relativamente no tóxicos que facilitan la incorporación de un compuesto en células o tejidos.

Los "materiales portadores" incluyen cualquier excipiente usado comúnmente en la industria farmacéutica y se deben seleccionar en función de la compatibilidad con los compuestos descritos en este documento, y las propiedades de perfil de liberación de la forma de dosificación deseada. Los materiales portadores de ejemplo incluyen, por ejemplo, aglutinantes, agentes de suspensión, agentes de desintegración, agentes de relleno, surfactantes, solubilizantes, estabilizantes, lubricantes, agentes humectantes, diluyentes y similares. Los "materiales portadores farmacéuticamente compatibles" pueden incluir, pero no se limitan a, acacia, gelatina, dióxido de silicio coloidal, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, maltodextrina, glicerina, silicato de magnesio, polivinilpirrolidona (PVP), colesterol, ésteres de colesterol, caseinato de sodio, soja lecitina, ácido taurocólico, fosfatidilcolina, cloruro de sodio, fosfato tricálcico, fosfato dipotásico, celulosa y conjugados de celulosa, azúcares estearoil lactilato de sodio, carragenina, monoglicérido, diglicérido, almidón pregelatinizado y similares. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999).

Los términos "coadministración" o similares, como se usan en este documento, pretenden abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un solo paciente, y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes se administran por la misma o diferente vía de administración o al mismo tiempo o diferente.

El término "liberación retardada", como se usa en este documento, se refiere al suministro, de modo que la liberación se puede lograr en una ubicación generalmente predecible más distal a la que se habría logrado si no hubiera habido alteraciones de liberación retardada.

Los "agentes dispersantes" y/o los "agentes moduladores de la viscosidad" incluyen materiales que controlan la difusión y la homogeneidad de un fármaco a través de medios líquidos o un método de granulación o método de mezcla. En algunas realizaciones, estos agentes también facilitan la efectividad de un recubrimiento o matriz de erosión. Los facilitadores de difusión/agentes de dispersión de ejemplo incluyen, por ejemplo, polímeros hidrófilos, electrolitos, Tween® 60 u 80, PEG, polivinilpirrolidona (PVP; comercialmente conocida como Plasdone) y agentes dispersantes basados en carbohidratos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa (por ejemplo, HPC, HPC-SL y HPC-L), hidroxipropil metilcelulosas (por ejemplo, HPMC K100, HPMC K4M, HPMC K15M, y HPMC K100M), carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, estearato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), celulosa no cristalina, silicato de magnesio y aluminio, trietanolamina, alcohol polivinílico (PVA), copolímero de vinilpirrolidona/acetato de vinilo (S630), polímero 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol con óxido de etileno y formaldehído (también conocido como tyloxapol), poloxámeros (por ejemplo, Pluronic F68®, F88® y F108®, que son copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno); y poloxaminas (por ejemplo, Tetronic 908®, también conocido como Poloxamine 908®, que es un copolímero de bloques tetrafuncional derivado de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina (BASF Corporation, Parsippany, N.J.)), polivinilpirrolidona K12, polivinilpirrolidona K17, polivinilpirrolidona K25, o polivinilpirrolidona K30, copolímero de polivinilpirrolidona/acetato de vinilo (S-630), polietilenglicol, por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular desde aproximadamente 300 a aproximadamente 6000, o aproximadamente 3350 a aproximadamente 4000, o aproximadamente 7000 a aproximadamente 5400, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polisorbato-80, alginato de sodio, gomas, tales como, por ejemplo, goma tragacanto y goma arábiga, goma guar, xantanas, incluyendo goma xantana, azúcares, celulosa, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polisorbato-80, alginato de sodio, monolaurato de sorbitán polietoxilado, monolaurato de sorbitán polietoxilado, povidona, carbómeros, alcohol polivinílico (PVA), alginatos, quitosanos y combinaciones de los mismos. Como agentes dispersantes también se pueden usar plastificantes tales como celulosa o trietil celulosa. Los agentes dispersantes particularmente útiles en dispersiones liposómicas y dispersiones autoemulsionantes son dimiristoil fosfatidilcolina, fosfatidilcolina natural de huevos, fosfatidil glicerol natural de huevos, colesterol y miristato de isopropilo.

El término "diluyente" se refiere a compuestos químicos que se usan para diluir el compuesto de interés antes de la entrega. Los diluyentes también se pueden usar para estabilizar los compuestos porque se pueden proporcionar un

ambiente más estable. Las sales disueltas en soluciones reguladoras (que también pueden proporcionar control de pH o mantenimiento) se usan como diluyentes en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, una solución salina regulada con fosfato. En ciertas realizaciones, los diluyentes aumentan el volumen de la composición para facilitar la compresión o crean un volumen suficiente para una mezcla homogénea para el llenado de la cápsula. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, lactosa, almidón, manitol, sorbitol, dextrosa, celulosa microcristalina tal como Avicel®, fosfato de calcio dibásico, fosfato dicálcico dihidrato; fosfato tricálcico, fosfato de calcio; lactosa anhidra, lactosa secada por aspersión; almidón pregelatinizado, azúcar compresible, tal como Di-Pac® (Amstar); manitol, hidroxipropilmetilcelulosa, estearato acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, diluyentes a base de sacarosa, azúcar de confitería; monobásico monohidrato de sulfato de calcio, dihidrato de sulfato de calcio; trihidrato de lactato de calcio, dextratos; sólidos de cereales hidrolizados, amilosa; celulosa en polvo, carbonato de calcio; glicina, caolín; manitol, cloruro de sodio; inositol, bentonita, y similares.

Un "recubrimiento entérico" es una sustancia que permanece sustancialmente intacta en el estómago, pero se disuelve y libera el fármaco en el intestino delgado o colon. En general, el recubrimiento entérico comprende un material polimérico que evita la liberación en el ambiente de bajo pH del estómago, pero que se ioniza a un pH más alto, por lo general un pH de 6 a 7, y de este modo se disuelve suficientemente en el intestino delgado o colon para liberar el agente activo en el mismo

Los "agentes de relleno" incluyen compuestos tales como lactosa, carbonato de calcio, fosfato de calcio, fosfato de calcio dibásico, sulfato de calcio, celulosa microcristalina, polvo de celulosa, dextrosa, dextratos, dextrano, almidones, almidón pregelatinizado, sacarosa, xilitol, lactitol, manitol, sorbitol, cloruro de sodio, polietilenglicol y similares.

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usan en este documento, se refieren a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se administra y que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se va a tratar. El resultado puede ser una reducción y/o alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para usos terapéuticos es la cantidad de la composición que incluye un compuesto como se describe en este documento requerido para proporcionar una disminución clínicamente significativa en los síntomas de la enfermedad sin efectos secundarios adversos indebidos. Una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual se puede determinar usando técnicas, tales como un estudio de aumento de dosis. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye, por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz. Una "cantidad eficaz" de un compuesto descrito en este documento, es una cantidad eficaz para lograr un efecto farmacológico deseado o una mejora terapéutica sin efectos secundarios adversos indebidos. Se entiende que "una cantidad de efecto" o "una cantidad terapéuticamente eficaz" pueden variar de un sujeto a otro, debido a la variación en el metabolismo de la composición, edad, peso, estado general del sujeto, la condición que se va a tratar, la gravedad de la condición que se va a tratar y el juicio del médico que prescribe.

Los términos "potenciar" o "que potencia", como se usan en este documento, significan aumentar o prolongar, ya sea en potencia o duración, un efecto deseado. De este modo, con respecto a la mejora del efecto de los agentes terapéuticos, el término "potenciación" se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, ya sea en potencia o en duración, el efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema. Una "cantidad eficaz de mejora", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad adecuada para potenciar el efecto de otro agente terapéutico en un sistema deseado.

Los términos "kit" y "artículo de fabricación" se usan como sinónimos.

El término "modular", como se usa en este documento, significa interactuar con un objetivo ya sea directa o indirectamente para alterar la actividad del objetivo, incluyendo, solo a modo de ejemplo, mejorar la actividad del objetivo, para inhibir la actividad del objetivo, limitar la actividad del objetivo o ampliar la actividad del objetivo

Como se usa en este documento, el término "modulador" se refiere a un compuesto que altera la actividad de una molécula. Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución en la magnitud de una cierta actividad de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de una o más actividades de una molécula. En ciertas realizaciones, un inhibidor evita completamente una o más actividades de una molécula. En ciertas realizaciones, un modulador es un activador, que aumenta la magnitud de al menos una actividad de una molécula. En ciertas realizaciones, la presencia de un modulador da como resultado una actividad que no se produce en ausencia del modulador.

El término "diluyente no soluble en agua" representa compuestos usados por lo general en la formulación de productos farmacéuticos, tales como fosfato de calcio, sulfato de calcio, almidones, almidones modificados y celulosa microcristalina y microcelulosa (por ejemplo, que tiene una densidad desde aproximadamente 0.45 g/cm<sup>3</sup>, por ejemplo, Avicel, celulosa en polvo) y talco.

Por "farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a un material, tal como un portador o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, esto

es, el material se puede administrar a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

El término "combinación farmacéutica", como se usa en este documento, significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo e incluye combinaciones fijas y no fijas de los ingredientes activos. El término "combinación fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento y un coagente, se administran a un paciente simultáneamente en forma de una sola entidad o dosificación. El término "combinación no fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento y un coagente, se administran a un paciente como entidades separadas, ya sea simultánea, concurrente o secuencialmente sin límites de tiempo intermedios específicos, en el que dicha administración proporciona niveles eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Lo último también se aplica a la terapia de cóctel, por ejemplo, la administración de tres o más ingredientes activos.

Los "plastificantes" son compuestos usados para ablandar el material de microencapsulación o los recubrimientos de película para hacerlos menos quebradizos. Los plastificantes apropiados incluyen, por ejemplo, polietilenglicoles tales como PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350 y PEG 800, ácido esteárico, propilenglicol, ácido oleico, trietilcelulosa y triacetina. En algunas realizaciones, los plastificantes también pueden funcionar como agentes dispersantes o agentes humectantes.

El término "polipéptido" o "proteína" como se usa en este documento puede ser el polipéptido de longitud completa, o un fragmento o segmento de un polipéptido, y puede abarcar un tramo de residuos de aminoácidos de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente al menos 10 aminoácidos, más generalmente al menos 20 aminoácidos, a menudo al menos 30 aminoácidos, más a menudo al menos 50 aminoácidos o más del polipéptido de longitud completa.

Los "solubilizantes" incluyen compuestos tales como triacetina, trietilcitrate, etil oleato, etil caprilato, lauril sulfato de sodio, docusato de sodio, vitamina E TPGS, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, N-hidroxiethylpirrolidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropil ciclodextrinas, etanol, n-butanol, alcohol isopropílico, colesterol, sales biliares, polietilenglicol 200-600, glicofurol, transcutool, propilenglicol y dimetil isosorbida y similares

Los "estabilizantes" incluyen compuestos tales como cualquier agente antioxidante, soluciones reguladoras, ácidos, conservantes y similares.

"Sustancialmente puro" o "purificado" cuando se usa en el contexto de un material biológico, materia amniótica y/o un contexto de proteínas significa por lo general que el material está aislado de otras proteínas contaminantes, ácidos nucleicos y otros productos biológicos derivados de fuente original del organismo. La pureza, o "aislamiento" se puede analizar mediante métodos estándar, y normalmente tendrá al menos aproximadamente un 10% de pureza, más normalmente al menos aproximadamente un 20% de pureza, generalmente al menos aproximadamente un 30% de pureza, y más generalmente al menos aproximadamente un 40% de pureza; en realizaciones adicionales al menos aproximadamente un 50% de pureza, o más a menudo al menos aproximadamente un 60% de pureza; en otras realizaciones más, al menos aproximadamente un 95% de pureza

Los "agentes de suspensión" incluyen compuestos tales como polivinilpirrolidona, por ejemplo, polivinilpirrolidona K12, polivinilpirrolidona K17, polivinilpirrolidona K25, o polivinilpirrolidona K30, copolímero de vinil pirrolidona/acetato de vinilo (S630), polietilenglicol, por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular desde aproximadamente 300 a aproximadamente 6000, o aproximadamente 3350 a aproximadamente 4000, o aproximadamente 7000 a aproximadamente 5400, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, estearato acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, polisorbato-80, hidroxietilcelulosa, alginato de sodio, gomas, tales como, por ejemplo, goma de tragacanto y goma arábiga, goma de guar, xantanos, incluyendo goma de xantano, azúcares, celulósicos, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polisorbato 80, alginato de sodio, monolaurato de sorbitán polietoxilado, monolaurato de sorbitán polietoxilado, povidona y similares.

Los "surfactantes" incluyen compuestos tales como lauril sulfato de sodio, docusato de sodio, Tween 60 u 80, triacetina, vitamina E TPGS, monooleato de sorbitán, monooleato de polioxietileno sorbitán, polisorbatos, polaxómeros, sales biliares, monoestearato de glicerilo, copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno, por ejemplo, Pluronic® (BASF), y similares. Algunos otros surfactantes incluyen glicéridos de ácidos grasos de polioxietileno y aceites vegetales, por ejemplo, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno (60); y alquiléteres de polioxietileno y alquilfenil éteres, por ejemplo, octoxinol 10, octoxinol 40. En algunas realizaciones, se pueden incluir surfactantes para mejorar la estabilidad física o para otros fines.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" se usa para referirse a un animal, preferiblemente un mamífero, que incluye un ser humano o no humano. Los términos paciente y sujeto se pueden usar indistintamente.

Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento", como se usan en este documento, incluyen aliviar, atenuar o mejorar una enfermedad o síntomas de afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas



metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o afección, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, causar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección ya sea de manera profiláctica y/o terapéuticamente.

- 5 Los "agentes humectantes" incluyen compuestos tales como ácido oleico, monoestearato de glicerilo, monooleato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, monooleato de polioxietileno sorbitán, monolaurato de polioxietileno sorbitán, docusato de sodio y oleato de sodio, laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, triacetina, Tween 80, vitamina E TPGS, sales de amonio y similares

Breve descripción de los dibujos

- 10 Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se usan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

- 15 La figura 1A es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que muestra la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 por diversos extractos de AM. PL: control plástico. FRO/P: membrana amniótica congelada, porción placentaria. FRO/F: membrana amniótica congelada, porción fetal. FRE/P: membrana amniótica fresca, porción placentaria. FRE/F: membrana amniótica fresca, porción fetal. La figura 1B es una tabla que compara los valores de P de las diversas preparaciones placentarias.

- 20 La figura 2 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que muestra la curva de respuesta a la dosis de la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1. RLU: unidades de luciferasa relativas.

La figura 3 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que muestra el efecto de diversas preparaciones de extracto de AM en la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1.

La figura 4 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que muestra el efecto de diversas preparaciones de extracto de AM en la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ RII.

- 25 La figura 5 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que demuestra que los extractos de AME y gelatina solubles derivados después de la centrifugación no alteran el efecto supresor en las actividades del promotor de TGF- $\beta$ . HA, AM (total (T), baja velocidad (LS), alta velocidad (HS)) y gelatina (total (T), baja velocidad (LS), alta velocidad (HS)) mostró supresión de la activación del promotor de TGF- $\beta$ 1 en comparación con el control de PBS cuando se normaliza con la actividad de beta-galactosidasa.

- 30 La figura 6 es un ejemplo no limitante de un conjunto de imágenes microscópicas de fibroblastos de la córnea humanos que muestran cambios en la morfología celular ya sea 18 o 48 horas después del tratamiento con diversos compuestos. PBS: el control de PBS; HA: ácido hialurónico; AME: extracto de membrana amniótica; L/AME: extracto de membrana amniótica liofilizada; AMJ: gelatina de membrana amniótica; L/AMJ: gelatina de membrana amniótica liofilizada.

- 35 La figura 7 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que demuestra el efecto de AME (a 25 o 125  $\mu$ g/ml), con o sin liofilizado (L), en la supresión de la actividad de TGF- $\beta$ 1. La actividad se mide en unidades relativas de luciferasa (RLU).

- 40 La figura 8 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que muestra el efecto de la adición de gel de colágeno (Col), extracto de AM, AME o gel de colágeno mezclado con extracto de AM (Col + AME) en la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ . BSA se usó como control.

La figura 9 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que compara el efecto del tratamiento con AME, HA o HA + AME, en comparación con un ensayo de control con BSA solo, sobre la supresión de la actividad de TGF $\beta$ 1. La actividad del promotor se muestra como unidades relativas de luciferasa (RLU).

- 45 La figura 10 es un ejemplo no limitante de un análisis de rangos de hialuronano MW en extractos de AM de diversos extractos de AM, separados por electroforesis en gel de agarosa. Las membranas amnióticas extraídas con solución reguladora A, B, C se trataron con o sin hialuronidasa y se separaron electroforéticamente con un gel de agarosa al 0.5%.

- 50 La figura 11 es un ejemplo no limitante de un análisis de rangos de hialuronano MW en extractos de AM de diversos extractos de AM, separados por electroforesis en gel de agarosa. La membrana amniótica extraída con solución reguladora de PBS se trató con o sin hialuronidasa (10 unidades/ml en Tris-HCl, pH 7.5, NaCl 150 mM) durante 2 horas a 37 °C y se pasó a través de geles de agarosa al 0.5%. HA: control positivo de ácido hialurónico; L: extracto de AM después de la centrifugación a baja velocidad; H: extracto de AM después de la centrifugación a alta velocidad.

La figura 12 es un ejemplo no limitante de una fotografía de una transferencia de western que demuestra que el inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina ( $I\alpha I$ ) está presente en los extractos de AM.  $I\alpha I$  estaba presente en el extracto A y C de AM, aunque la señal de bikunina era muy débil (~39 kDa). Antes de transferir a la transferencia Western, el extracto se separó en un gel de acrilamida desnaturalizado al 4-15%.

- 5 La figura 13 es un ejemplo no limitante de una inmunotransferencia que demuestra que el inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina ( $I\alpha I$ ) está presente en los extractos de AM incluso después de una centrifugación a baja (LS) o alta velocidad (HS).

10 La figura 14 es un ejemplo no limitante de una inmunotransferencia de TSG-6 (gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral), ya sea con (+) o sin (-) tratamiento con hialuronidasa. Las muestras incluyeron extracto de AM total sin centrifugación (T), extracto de AM después de la extracción en solución reguladora isotónica con bajo contenido de sal (solución reguladora A); solución reguladora con alto contenido de sal (B); o guanidina HCl 4 M (C); como se detalla en el ejemplo 2. TSG-6 estuvo presente en el extracto total, el extracto de solución reguladora A y el extracto de solución reguladora C. La adición de hialuronidasa no pareció alterar el nivel de TSG-6 en los extractos.

15 La figura 15 es un ejemplo no limitante de un análisis de inmunotransferencia de la desglicosilación de TSG-6 en AM. Los extractos de AM A, B y C se trataron con (+) o sin 20 unidades/ml de PNGasa F a 37 °C, durante 3 horas. La glicosilación de TSG-6 en AM se analizó luego mediante transferencia de western. El lisado celular de fibroblasto de la córnea humano (HCF) se usó como control positivo.

20 La figura 16 es un ejemplo no limitante de un análisis de inmunotransferencia de complejos TSG-6 potenciales en AM por digestión con condroitina sulfato ABC liasa. Los extractos de AM A, B y C se trataron sin (-) o con (+) 1 unidad/ml de ABC liasa a 37 °C, durante 2 horas. La posible interrupción de los complejos de TSG-6 se analizó luego mediante transferencia de western usando un anticuerpo antiTSG-6 RAH-1: 1:1000.

25 La figura 17 es un ejemplo no limitante de una inmunotransferencia de complejos de TSG-6 potenciales en AM por digestión con condroitina sulfato ABC liasa. Este es el mismo experimento que se muestra en la figura 16, excepto que se usó un anticuerpo TSG-6 diferente. En este documento, el anticuerpo antiTSG-6 se obtuvo de R & D Systems (No. de catálogo MAB2104).

La figura 18 es un ejemplo no limitante de una inmunotransferencia que demuestra la presencia de Pentraxina (PTX3) en AM, usando un anticuerpo monoclonal de rata antiPTX3 obtenido de Alexis Biochemicals. HCF: fibroblasto de la córnea humano, T, A, B, C: extracto de AM total, A, B, C, respectivamente; Hase, Hialuronidasa.

30 La figura 19 es un ejemplo no limitante de una inmunotransferencia que demuestra la presencia de TSP-1 en AM. Se indican la TSP-1 monomérica (180 kDa) y la supuesta TSP-1 trimérica (540 kDa). El control positivo, TSP-1, se purificó a partir de plaquetas humanas (Calbiochem, cat. No. 605225) y se cargó como 100 ng/carril.

35 La figura 20 es un ejemplo no limitante de una inmunotransferencia que demuestra la presencia de Smad 7 en AM. La AM se extrajo con PBS o urea (urea 2M en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5). Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína total para cada extracto. Smad 7 se detectó con Smad 7 antihumana de cabra (AF2029, 1:1000, R & D Systems). Smad 7 migró como una banda de ~51 kDa.

40 La figura 21 un ejemplo no limitante de imágenes microscópicas de células estromales de membrana amniótica (AMSC) en AM. A: Las AMSC presentaron morfología dendrítica y mantuvieron contactos intercelulares in situ. B: tinción con ensayo vivo y muerto para la viabilidad celular. La morfología dendrítica y los contactos intercelulares se visualizaron mejor con este método. C: AMSC no expresó  $\alpha$ -SMA. D: Las AMSC no expresaron desmina. En contraste, como control positivo, las células mesenquimales del cordón umbilical mostraron una fuerte tinción tanto en  $\alpha$ -SMA como en desmina (inserto de C y D, respectivamente). E: Todas las AMSC expresaron vimentina. Las líneas de puntos indican la separación entre el epitelio de AM y las capas estromales de AM. La contratinción nuclear se realizó por DAPI (C, D) y PI (E), respectivamente. La barra representa 50  $\mu$ m.

45 La figura 22 es un ejemplo no limitante de la rápida diferenciación de miofibroblastos de AMSC in vitro. P0 = células primarias de AMSC. P1 = Pasaje 1; P2 = Pasaje 2. PO, P1, P2 se refieren al Pasaje 0, 1 y 2 respectivamente. A y E: P0 (4 días); B y F: P0 (7 días); C y G: P1; D y H: P2. Las células en E, F, G, H se inmunotifieron con anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ SMA de ratón; A: las AMSC cultivados en plástico en DMEM con FBS al 10% mostraron una forma típica de célula de fibroblasto. La barra representa 100  $\mu$ m.

50 La figura 22 I es un ejemplo no limitante de un gráfico de líneas que demuestra que los miofibroblastos positivos a  $\alpha$ -SMA aumentaron dramáticamente desde 71.9  $\pm$  3.7% en el cultivo primario de 1 semana a 93.9  $\pm$  4.1% en el pasaje 1 y 98.5  $\pm$  1.7% en el pasaje 2.

La figura 22 J es un ejemplo no limitante de un análisis de inmunotransferencia que demuestra el aumento de la expresión de proteínas de la  $\alpha$ -SMA y la fibronetina ED-A (Fn). PO y P2 se refieren al Pasaje 0 y al Pasaje 2, respectivamente. B-actina se usa como control.

5 Las figuras 23A a 23H son ejemplos no limitantes de imágenes microscópicas que demuestran que miofibroblastos diferenciados de AMSC se revirtieron en fibroblastos cuando se cultivaron nuevamente en la matriz estromal de AM. Los miofibroblastos derivados de AMSC en P2 se subcultivaron en colágeno de tipo I (A, C, E, G) o matriz de estroma de AM (B, D, F, H) en DMEM con FBS al 10% durante 7 días. Las barras representan 100  $\mu\text{m}$ . El de vivo y muerto mostró que las células tanto en el colágeno (C) como en la matriz del estroma de AM (D) permanecieron al 100% de viabilidad, pero presentaron una forma celular diferente. La tinción doble con faloidina y  $\alpha$ -SMA mostró fibras de estrés vívidas (E) y una fuerte expresión de  $\alpha$ -SMA (G) en miofibroblastos en cultivos de colágeno. En contraste, la tinción con faloidina se volvió débil y con manchas (F), y la  $\alpha$ -SMA se oscureció en las células subcultivadas en la matriz estromal de AM (H). I: Un análisis de inmunotransferencia mostró una expresión disminuida de la fibronectina ED-A (Fn) y una expresión no detectable de  $\alpha$ -SMA de AMSC sembradas en matriz de estroma de AM en comparación con las sembradas en colágeno de tipo I.

15 Las figuras 24A a 24H son ejemplos no limitantes de imágenes microscópicas que demuestran que los extractos de estroma de AM (ASE) previnieron la diferenciación de Miofibroblastos de AMSC. Se realizaron tinción con faloidina (panel superior) y tinción con  $\alpha$ -SMA (panel inferior). A y E: células cultivadas sin ASE durante 4 días; B y F: células cultivadas durante 4 días con ASE; C y G: células cultivadas sin ASE durante 10 días; D y H: células cultivadas con ASE durante 10 días. Las células en A, B, C y D se tiñeron con faloidina conjugada con FITC mientras que las células en E, F, G y H se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -SMA de ratón. Las AMSC mantuvieron una forma fibroblástica del huso después de 4 días de cultivo en plástico en DMEM/FBS al 10% sin (A) o con (B) ASE. Sin embargo, en ese momento, las células ya comenzaron a expresar  $\alpha$ -SMA sin ASE (E), pero no expresaron  $\alpha$ -SMA cuando se añadió ASE (F). Cuando los cultivos se extendieron durante 10 días, las células se agrandaron y mostraron fibras de estrés prominentes (C) y una fuerte expresión de  $\alpha$ -SMA (G) sin ASE. En contraste, las AMSC se añadieron en esferas de diferentes tamaños con la adición de ASE. Estas esferas no expresaron fibras de tensión (D), pero expresaron una tinción débil de  $\alpha$ -SMA (H). La barra representa 100  $\mu\text{m}$ .

25 Las figuras 25A y 25B son ejemplos no limitantes de imágenes microscópicas que demuestran que el extracto de estroma amniótico (ASE) revierte los miofibroblastos diferenciados. Los miofibroblastos diferenciados de AMSC en plástico en DMEM/FBS al 10% en el pasaje 2 se cultivaron con la adición de ASE durante 1 semana. A: las células regresaron de una forma escamosa a una forma alargada o de huso B: la tinción de  $\alpha$ -SMA se redujo notablemente. C: un análisis de inmunotransferencia que demuestra que los niveles de EDA fibronectina y  $\alpha$ -SMA se redujeron en comparación con el control sin ASE. La barra representa 100  $\mu\text{m}$ .

30 Las figuras 26A a 26L son ejemplos no limitantes de imágenes microscópicas que demuestran que la reversión de los miofibroblastos por ASE no se asoció con la proliferación celular. Las AMSC (pasaje 2) se cultivaron en DMEM/ITS sin (A, B, C, D) o con ASE (E, F, G, H) durante 0, 2, 4 o 6 días según se indica. Las fibras de estrés que expresan  $\alpha$ -SMA disminuyeron gradualmente desde el día 0 hasta el día 6 después de la adición de ASE (I, J, K, L) y se correlacionaron con los cambios morfológicos (E a H).

35 Las figuras 27A a 27D son ejemplos no limitantes de imágenes microscópicas que demuestran que el extracto de AM suprimió la migración de fibroblastos de los explantes de limbo humano y dio como resultado menos fibroblastos en el crecimiento. A, B: el crecimiento de los explantes de limbo humano cultivados tanto en SHEM (Control) como en SHEM/AME (AME). C, D: Después de 14 días en cultivo, los explantes de limbo humano se retiraron de los pocillos de cultivo, se embebieron, se dividieron en trozos y se tiñeron con tinción con hematoxilina y eosina.

40 La figura 28A es un ejemplo no limitante de una fotografía de una placa de ensayo de 48 pocillos que demuestra la supresión del crecimiento de fibroblastos por AME. A. El crecimiento de los explantes de limbo humano después de 14 días de crecimiento en SHEM (Control) y SHEM con 25  $\mu\text{g/ml}$  de AME (AME) se recolectó por separado y se sembró en cada 96 pocillos a 2000 células/pocillo. Las células de Control se sembraron en las columnas 1-3 (1: Control; 2: PBS; 3: AME; y las de AME se sembraron en las columnas 4-6 (1: Control; 2: PBS; 3: AME. El ensayo de MTT se realizó después de 10 días de cultivo.

45 La figura 28B es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que muestra la cuantificación y el análisis estadístico de la supresión relativa del crecimiento de fibroblastos por AME.

Las figuras 29A y 29B son ejemplos no limitantes de imágenes microscópicas del crecimiento de explantes de limbo humano cultivados tanto en el control SHEM (figura 29A) como en el SHEM con AME (figura 29B) durante 14 días.

50 La figura 30 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras de la producción relativa de NO en células cultivadas ya sea en plástico o en una membrana amniótica intacta, con o sin estimulación por IFN- $\gamma$ . Las células Raw264.7 se sembraron en cada uno de los 24 pocillos a  $2.5 \times 10^5$  en DMEM/ITS ( $n = 3$  para cada grupo). Las células se estimularon con o sin 200  $\mu\text{g/ml}$  de IFN- $\gamma$ , y se recogió el medio de cultivo para el ensayo de NO. Pl: plástico. iAM: membrana amniótica intacta.

55 La figura 31 es un ejemplo no limitante de un panel de gráficos de barras que cuantifican los niveles de prostaglandina D2 (PGD2) y prostaglandina E2 (PGE2) en células raw264.7 cultivadas en plástico o iAM, ya sea con

o sin estimulación de IFN- $\gamma$ . A: síntesis de PGD2. B: síntesis de PGE2. C: La proporción de PGD2/PGE2 en Raw264.6 cuando se cultiva en el plástico e iAM.

La figura 32 es un ejemplo no limitante de un gráfico de barras que demuestra la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 en células Raw264.7 cultivadas en plástico o iAM, ya sea con o sin estimulación con IFN- $\gamma$ .

5 La figura 33 es un ejemplo no limitante de una imagen microscópica que muestra la muerte de macrófagos inducida por AME. Las células Raw264.7 se sembraron a  $2 \times 10^5$  en cada uno de los 24 pocillos en DMEM/10% de suero bovino fetal. Después de 1 h, se añadieron al medio de cultivo 125  $\mu$ g/ml de PBS (control - figura 33A) o 125  $\mu$ g/ml de AME en PBS (AME - figura 33B).

10 Las figuras 34A a 34C son un ejemplo no limitante de gráficos de barras que demuestran que ASE inhibe preferencialmente las células HUVEC. A: Medición de células HUVEC viables. B: Medición de células HCF viables. C: Medición de células RCE viables.

15 La figura 35 es un ejemplo no limitante de imágenes microscópicas de células HUVEC. Los resultados mostraron que las células HUVEC estaban vivas en el control sin la adición de ASE (figura 35Aa) pero mostraron una muerte celular pronunciada después del tratamiento con ASE (figura 35Ad). Por el contrario, tanto las células HCF como las RCE no revelaron ninguna muerte celular notable en cultivos sin la tinción de Hoechst-33342 con tratamiento con ASE (figura 35Ab y 35Ac, respectivamente) o con (35Ae y 35Af, respectivamente) mostraron HUVECS tratados con ASE tenían  $61.6 \pm 7.7$  % de núcleos condensados y fragmentados (figura 35Bd), que fue significativamente más alto que  $3.1 \pm 1.8$  % del control sin tratamiento con ASE (figura 35Ba, véase también 2C,  $p < 0.001$ ). Por el contrario, no hubo una apoptosis obvia en ya sea las HCF ni en las RCE sin (figura 35Bb y 35Bc, respectivamente) o con el tratamiento con ASE (figura 35Be y 35Bf, respectivamente).

20 La figura 36 es un ejemplo no limitante de una gráfica de barras que demuestra que la adición de ASE aumenta el número de células HUVEC apoptóticas.

25 La figura 37 es un ejemplo no limitante que muestra el efecto de ASE en la inhibición de la migración de HUVEC estimulada por VEGF. A: Control (sin VEGF o ASE). B: La adición de VEGF aumentó la migración celular. C: Adición de VEGF y 200  $\mu$ g/ml de ASE. La adición del ASE retrasó la migración inducida por VEGF. La figura 37D es un gráfico de barras que cuantifica la migración celular que ocurrió en las figuras 37A, 37B y 37C.

30 La figura 38 es un ejemplo no limitante de un panel de imágenes microscópicas (A-C) y un gráfico de barras (D) que demuestra que la adición de ASE inhibe la formación de tubos. Para realizar el ensayo de formación de tubos in vitro, se sembraron células HUVEC en Matrigel. A: Formación de tipo tubo en el cultivo control. B: La adición de 100  $\mu$ g/ml de ASE añadida al cultivo inhibió la formación de tubos. C: La adición de 200  $\mu$ g/ml de ASE añadida al cultivo inhibió la formación de tubos. D: gráfico de barras que cuantifica el número de tubos formados por campo de A, B y C.

Descripción detallada de la invención

Composiciones

35 En este documento se describen composiciones purificadas que ejercen una serie de efectos fisiológicamente significativos en células de mamíferos y tejidos de mamíferos intactos. Las composiciones purificadas comprenden al menos cuatro componentes:

- Hialuronano (HA) reticulado de alto peso molecular;
- Gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TSG-6);
- 40 • Pentraxina (PTX-3); y
- Trombospondina (TSP-1).

Los componentes adicionales también se pueden incluir en composiciones purificadas que tienen estos cuatro componentes, que incluyen: Smad7.

45 Cualquiera o todos los componentes de las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden preparar a partir de un material amniótico humano, incluidas las preparaciones y extractos de gelatina amniótica humana (como se describe en este documento), preparaciones y extractos de membrana amniótica humana (como se describe en este documento), y preparaciones y extractos de estroma amniótico humano (como se describe en este documento).

50 Juntos, estos cuatro componentes (con o sin Smad7) pueden suprimir la actividad del promotor de TGF- $\beta$ ; aumentar la apoptosis en macrófagos; disminuir la proliferación, disminuir la migración y aumentar la apoptosis de las células

endoteliales vasculares humanas; disminuir la viabilidad de los fibroblastos humanos; disminuir la inflamación y prevenir la apoptosis de las células epiteliales expuestas al almacenamiento y lesiones.

El ácido hialurónico (HA) es un azúcar natural que se encuentra en el líquido de la articulación sinovial, el humor vítreo del ojo, el cartílago, los vasos sanguíneos, la matriz extracelular, la piel y el cordón umbilical. La reticulación de HA puede ser a través de un enlace covalente a otra molécula, tal como una proteína. Por ejemplo, la HA se puede unir covalentemente a la cadena pesada del inhibidor de la inter- $\alpha$ -tripsina. La proporción de proteína a HA en las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento puede ser menos desde aproximadamente 200:1, menos desde aproximadamente 100:1, menos desde aproximadamente 50:1, o menos desde aproximadamente 10:1.

La TSG-6 es una proteína de unión a hialuronano que desempeña un papel en la remodelación de la matriz extracelular, la proliferación celular y la migración de leucocitos. TSG-6 puede formar un complejo con el inhibidor de la serina proteasa inter- $\alpha$ -inhibidor. PTX-3 (Pentraxinas) son proteínas de unión a ligando dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que tienen una estructura discoide pentamérica y están presentes en el plasma. La TSP-1 (trombospondina I) es una glicoproteína homotrimérica que tiene una potente actividad antiangiogénica y otras actividades biológicas. La TSP-1 se secreta en la matriz extracelular por una variedad de tipos de células.

Estos componentes se pueden obtener de cualquier fuente apropiada. Por ejemplo, al menos uno de los componentes se puede obtener a partir de tejidos humanos, tales como membrana amniótica, gelatina amniótica, estroma amniótico o una combinación de los mismos. Al menos uno de los componentes se puede obtener de fuentes comerciales. Al menos uno de los componentes se puede aislar de un organismo transgénico. Las secuencias de proteínas pueden tener una similitud de al menos el 90%, el 93%, el 95%, el 97%, el 99% o el 99,5% de la secuencia de la proteína humana. Los componentes pueden ser purificados, sustancialmente purificados, parcialmente purificados, o también pueden estar presentes en extractos en bruto. Los componentes también se pueden preparar a partir de tejidos de membrana amniótica de mamíferos, ya que cada uno de los cuatro componentes está presente en los tejidos de membrana amniótica.

En aspectos adicionales, la proteína Smad7 también está presente en la composición. La Smad7 se puede obtener de cualquier fuente apropiada, tal como una membrana amniótica, de una fuente comercial, aislada de un organismo transgénico. La proteína Smad7 puede ser purificada, sustancialmente purificada, parcialmente purificada, o puede estar presente en un extracto en bruto.

Preparaciones de AM a partir de material placentario.

En algunos aspectos, al menos uno de los componentes HA, TSG-6, PTX-3, TSP-1, opcionalmente Smad7 se puede obtener a partir de preparaciones de membrana amniótica. Alternativamente, se pueden preparar preparaciones de membrana amniótica en bruto que contienen la combinación de HA, TSG-6, PTX-3, TSP-1 y opcionalmente Smad7. Los métodos de ejemplo para preparar diversas preparaciones de AM se describen en este documento.

El material de la placenta humana se puede obtener, por ejemplo, de fuentes tales como Bio-Tissue, Inc. (Miami, FL) y Baptist Hospital (Miami, FL) (bajo la aprobación del IRB). El tejido se obtiene por lo general en estado fresco o congelado. El tejido se puede lavar para eliminar el exceso de solución reguladora de almacenamiento, sangre o contaminantes. El exceso de líquido se puede eliminar, por ejemplo, usando una breve etapa de centrifugación, o por otros medios. El tejido se puede congelar, usando, por ejemplo, nitrógeno líquido u otros medios de enfriamiento, para facilitar la posterior homogeneización. La fuente del tejido AM puede ser un humano. Sin embargo, se pueden usar otras fuentes de tejido AM, tal como el tejido AM de bovino o porcino.

La AM se puede usar para preparar la composición. Las preparaciones de AM pueden incluir componentes o porciones purificadas a partir de AM intacta, matriz estromal de AM, HA, gelatina de AM e inhibidor de la tripsina inter-alfa (HA-ITI)). Si se desea, ciertos componentes de la preparación de AM se pueden aislar de la preparación en cualquier momento durante el procedimiento. Por ejemplo, un extracto enriquecido para una proteína específica o un conjunto de proteínas de AM se puede aislar de la preparación. Después de la homogeneización del tejido, las partículas más grandes se pueden separar o se pueden dejar en la preparación. La preparación se puede secar, si se desea. Un método de preparación de ejemplo se describe en el ejemplo 1.

Las composiciones también se pueden obtener a partir de gelatina de AM. La gelatina de AM se puede obtener del tejido de AM fresco, o se puede obtener antes o después del procedimiento de congelación. La gelatina de AM se puede congelar y también se puede liofilizar siguiendo el procedimiento para preparaciones de AM como se describe en este documento. La gelatina se puede centrifugar y también se puede liofilizar.

Adicionalmente, se puede preparar una composición hecha sustancialmente a partir de la capa estromal. Para preparar esta composición, la capa estromal se separa de la capa de membrana de AM fresca, congelada, descongelada o tratada de otro modo. La eliminación del estroma puede ocurrir, por ejemplo, por métodos enzimáticos, métodos mecánicos o por otros medios. El material de la capa estromal puede ser fresca o congelada. El material estromal se puede moler o liofilizar siguiendo el procedimiento para preparaciones de AM como se

describe en este documento. Si se desea, el material de la matriz estromal se puede centrifugar y también se puede liofilizar.

5 El tejido se puede congelar antes del procedimiento de molienda. La etapa de congelación puede ocurrir por cualquier procedimiento de enfriamiento apropiado. Por ejemplo, el tejido se puede congelar instantáneamente usando nitrógeno líquido. Alternativamente, el material se puede colocar en un baño de isopropanol/hielo seco o se puede congelar instantáneamente en otros refrigerantes. Se pueden usar procedimientos de congelación rápida disponibles comercialmente. Además, el material se puede colocar en un congelador y permitir que se equilibre a la temperatura de almacenamiento más lentamente, en lugar de congelarse instantáneamente. El tejido se puede almacenar a cualquier temperatura deseada. Por ejemplo, -20 °C o -80 °C u otras temperaturas se pueden usar para el almacenamiento.

10 La pulverización del tejido mientras está congelado, en lugar de triturar el tejido antes de la congelación, es un método opcional de preparación del tejido. Alternativamente, se puede usar tejido fresco, parcialmente descongelado o descongelado en la etapa de molienda. El tejido (fresco, congelado o descongelado) se puede rebanar en pedazos de un tamaño deseado con un dispositivo apropiado, tal como un bisturí, y luego se muele en partículas finas usando un BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) u otros dispositivos apropiados, y homogeneizados con un dispositivo de homogeneización tal como Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI), en una solución apropiada. Las soluciones de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, solución salina regulada con fosfato (PBS), DMEM, solución de NaCl y agua. El pH de la solución se puede ajustar según sea necesario. En algunas realizaciones, el intervalo de pH es desde aproximadamente 5.5 o 6.0 a aproximadamente 8.5. En algunas realizaciones, el tejido congelado se muele en una solución que tiene un pH de entre aproximadamente 6.3, aproximadamente 6.6, o aproximadamente 7.0 a aproximadamente 7.4, aproximadamente 7.6, o aproximadamente 7.8.

15 Se puede usar cualquier solución reguladora o líquido apropiado para preparar las formulaciones. El ejemplo 2 examina el uso de diversas soluciones reguladoras de extracción (alto contenido de sal, bajo contenido de sal, PBS, etc.) en el contenido de proteína total y HA en la preparación (Tabla X). El ejemplo 2 examina además los niveles de las proteínas específicas TSG-6 (figura 14), PTX-3 (figura 18), TSP-1 (figura 19) y Smad7 (figura 20) usando varios métodos de extracción.

20 El homogeneizado entonces se puede mezclar a cualquier velocidad, temperatura u otros parámetros apropiados. La mezcla puede ocurrir, por ejemplo, en un intervalo de temperatura desde aproximadamente 1 °C, o 3 °C, a aproximadamente 6 °C, 10 °C, 15 °C o 20 °C. En algunas realizaciones, la mezcla se produce a aproximadamente 4 °C. El homogeneizado se puede mezclar, por ejemplo, desde menos desde aproximadamente 1 minuto, 10 minutos o 20 minutos hasta aproximadamente 1, 2, 3 o más horas.

25 El homogeneizado puede entonces centrifugarse para eliminar cualquier partícula grande restante, si se desea. La centrifugación se puede realizar usando cualquier intervalo apropiado de tiempo, temperatura, concentración de proteínas, soluciones reguladoras y velocidad, según se desee. La centrifugación puede ocurrir, por ejemplo, en un intervalo desde aproximadamente 1,000, 5,000 o 10,000 x g a aproximadamente 20,000 x g. En algunas realizaciones, la centrifugación ocurre a aproximadamente 15,000 x g. La centrifugación puede ocurrir por una duración de menos de 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, a aproximadamente 40 minutos, 60 minutos, 1.5 horas o más. Luego, el sobrenadante se puede recolectar y almacenar en alícuotas a -80 °C. La proteína total se puede cuantificar, si se desea, usando cualquier kit de análisis de proteínas comercial apropiado, tal como un ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL). El ejemplo 2, la tabla X y la figura 13 describen el análisis de las preparaciones de AM después de la centrifugación a baja velocidad o alta velocidad.

30 Para la caracterización y purificación bioquímica, las soluciones anteriores se pueden complementar con inhibidores de proteasa. Una mezcla de ejemplo de inhibidores de proteasa es la siguiente: 1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina A y 1 mM de PMSF. Por lo general, sin embargo, un inhibidor de proteasa no se añade a la preparación si se añade a células o tejidos vivos.

35 La formulación se puede probar para confirmar la presencia de componentes o proteínas específicos. Por ejemplo, la formulación se puede probar para detectar la presencia de moléculas que incluyen, pero no se limitan a, HA, TSG-6, PTX-3, TSP-1, Smad7 y similares. La formulación también se puede probar para confirmar la ausencia de patógenos en cualquier momento durante el procedimiento de preparación.

40 Las preparaciones de AM pueden estar en forma líquida, en suspensión o en polvo liofilizado (por ejemplo, molido o pulverizado), u otras formas. Se pueden añadir agentes antimicrobianos tales como antibióticos o agentes antifúngicos. Se pueden añadir otras sustancias a las composiciones para estabilizar y/o conservar las composiciones. El material puede ser empaquetado y almacenado, por ejemplo, a temperatura ambiente, o por ejemplo, a -20 °C o -80 °C antes de su uso.

45 En algunas realizaciones, la preparación está presente como una formulación de polvo seco. Una formulación de polvo seco se puede almacenar en un volumen más pequeño y puede no necesitar los mismos requisitos de almacenamiento a baja temperatura para evitar que la formulación se degrade a lo largo del tiempo. Una formulación

de polvo seco se puede almacenar y reconstituir antes de su uso. La formulación de polvo seco se puede preparar, por ejemplo, preparando el tejido AM liofilizado como se describe en este documento, y luego eliminando al menos una porción del agua en la composición. El exceso de agua se puede eliminar de la preparación por cualquier medio apropiado. Un método de ejemplo para eliminar el agua es mediante el uso de liofilización usando un liofilizador o secador por congelación comercialmente disponible. Se puede encontrar equipo apropiado, por ejemplo, a través de Virtis, Gardiner, NY; FTS Systems, Stone Ridge, NY; y SpeedVac (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY). La cantidad de agua que se elimina puede ser desde aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30% a aproximadamente 60, 70, 80, 90, 95 o 99% o más. En algunas realizaciones, se elimina sustancialmente todo el exceso de agua. El polvo liofilizado entonces se puede almacenar. La temperatura de almacenamiento puede variar desde menos desde aproximadamente -196 °C -80 °C, -50 °C o -20 °C hasta más desde aproximadamente 23 °C. Si se desea, el polvo se puede caracterizar (peso, contenido de proteínas, etc.) antes del almacenamiento.

El polvo liofilizado se puede reconstituir en una solución o solución reguladora apropiada antes de su uso. Las soluciones de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, PBS, DMEM y BSS. El pH de la solución se puede ajustar según sea necesario. La concentración de la AM puede variar según sea necesario. En algunos procedimientos es útil una preparación más concentrada, mientras que en otros procedimientos, una solución con una baja concentración de AM es útil. Se pueden añadir compuestos adicionales a la composición. Los compuestos de ejemplo que se pueden añadir a la formulación reconstituida incluyen, pero no se limitan a, modificadores del pH, soluciones reguladoras, colágeno, HA, antibióticos, surfactantes, estabilizantes, proteínas y similares. El polvo liofilizado de AM también se puede añadir a una crema, ungüento o loción preparada para obtener la concentración deseada.

Se pueden añadir componentes adicionales a la composición según se desee. En algunas realizaciones, las preparaciones de AM solubles en agua o en polvo se pueden mezclar con un componente de ECM tal como colágeno, fibrina o HA.

El colágeno es una proteína estructural importante que se encuentra en el cuerpo. Proporciona soporte para los tejidos, conecta tejido con hueso y proporciona la estructura del cuerpo. Cuando el cuerpo está en el procedimiento de cicatrización, el colágeno juega un papel importante para ayudar a construir una estructura celular. El ácido hialurónico es un azúcar natural que se encuentra en el líquido de la articulación sinovial, el humor vítreo del ojo, el cartílago, los vasos sanguíneos, la matriz extracelular, la piel y el cordón umbilical. La fibrina es una proteína implicada en la coagulación de la sangre.

La preparación de AM soluble en agua se puede mezclar con colágeno, fibrina o con HA. De manera similar, la preparación de AM en polvo liofilizado se puede mezclar con colágeno, fibrina o HA. El colágeno, la fibrina y el HA pueden ser vehículos de administración apropiados, ya que se demostró que las preparaciones de AM mezcladas con colágeno o HA ejercen un efecto supresor sobre la actividad del promotor de TGF- $\beta$ . Aunque las preparaciones de AM se mezclaron con gel de colágeno y gel de HA en los experimentos descritos en este documento, se puede usar cualquier forma soluble (por ejemplo, líquido) de colágeno y HA u otros componentes de ECM (por ejemplo, fibrina). El colágeno, la fibrina o el HA se pueden derivar de cualquier organismo fuente apropiado. Cuando se añaden colágeno, fibrina o HA, la proporción de estos compuestos a AM se puede variar según se desee. Por ejemplo, una proporción de AM a colágeno (o fibrina o HA) de menos desde aproximadamente 0.001:1, 0.01:1, 0.05:1, o 0.1:1, a aproximadamente 1:1, 1.5:1, 2:1, 5:1, 10:1, 100:1 o 1000:1 o más.

El gel de colágeno se puede preparar, por ejemplo, diluyendo la solución madre (4 mg/ml) con ácido acético 0.1 N y mezclándolo con proporciones de volumen apropiados de 20X DMEM o solución reguladora apropiada, y NaOH 1 N, como se describe en el ejemplo 1. El colágeno en la preparación puede estar presente, por ejemplo, en un intervalo desde menos desde aproximadamente 2 mg/ml a más desde aproximadamente 4 mg/ml.

Se pueden preparar diversas diluciones de HA de alto MW, por ejemplo, diluyendo HA comercialmente preparado (Healon™ (10 mg de HA/ml) (Pharmacia, LaJolla, CA) en DMEM o una solución reguladora apropiada. Las formas en polvo liofilizado y soluble en agua de preparaciones de AM se pueden diluir en una solución tal como PBS, DMEM u otras soluciones en la concentración de colágeno deseada. El HA en la preparación puede estar presente, por ejemplo, en un intervalo desde menos desde aproximadamente 2  $\mu$ g/ml a más desde aproximadamente 129  $\mu$ g/ml.

Los siguientes procedimientos representan métodos ilustrativos para preparar las preparaciones amnióticas y las composiciones purificadas descritas y usadas en este documento.

#### Preparación de AM humana preservada:

La placenta humana se recogió en el parto por cesárea electiva (Heiligenhaus et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 42:1969-1974, 2001, Lee and Tseng, Am J Ophthalmol. 123:303-312, 1997, Prabhasawat et al., Ophthalmology, 104:974-985, 1997, Tseng et al., Arch Ophthalmol. 116:431-441, 1998). La AM se aplastó sobre papel de nitrocelulosa (Hybond N+, Amersham, Inglaterra), con la superficie del epitelio hacia arriba. Las muestras de AM se almacenaron a -80 °C en DMEM/glicerol 1: 2 (v/v) hasta su uso.

## Preparaciones de extracto de membrana amniótica

Se obtuvieron placentas humanas frescas y congeladas de Bio-Tissue, Bio-tissue, Inc. (Miami, FL). Todo el procedimiento para la preparación de extractos humanos totales de AM (AME) se llevó a cabo de forma aséptica para ser usado en experimentos posteriores basados en cultivos celulares. La AM se cortó en trozos pequeños para encajar en el barril de un BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK), se congeló en nitrógeno líquido, se pulverizó en un polvo fino y se pesó. Se añadió al polvo una solución reguladora de PBS fría 1X, pH 7.4, que contenía inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa, P8340, Sigma y suplementado con PMSF 1 mM) e inhibidores de fosfatasa (fluoruro de sodio 50 mM y vanadato de sodio 0.2 mM) a 1:1 (ml/g). La mezcla se mantuvo en hielo y se homogeneizó con un Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) 5 veces, 1 minuto cada una, con un intervalo de enfriamiento de 2 minutos. Estos extractos solubles en agua se designaron como extractos de AM "Total" (AME).

Los extractos totales de AM se dividieron en dos tubos de centrifuga cónicos de 50 ml. Uno se centrifugó a alta velocidad (HS, 48,000 x g) y el otro se centrifugó a baja velocidad (LS, 15,000 x g) a 4 °C. Las partes alícuotas del sobrenadante HS y LS se transfirieron a tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y se designaron como AM/HS, AM/LS respectivamente. Las muestras de AM/HS deseadas se congelaron a -20 °C, durante 1 h antes de la liofilización. Las muestras fueron colocadas luego en la cámara de FreeZone (Labconco, Kansas City, MO) con agujeros en la tapa. Las muestras se liofilizaron a -50 °C a un vacío de 0.85 mBar durante 5 horas. Antes del uso, las muestras se reconstituyeron con H<sub>2</sub>O destilada estéril en el mismo volumen. El mismo método también se usó para preparar extractos de gelatina de AM, que se raspó fácilmente del material adherente en el estroma de AM.

## Preparaciones de la membrana amniótica humana total soluble y extracto de gelatina de membrana amniótica

El material de placenta humana congelado se obtuvo de Bio-Tissue, Bio-tissue, Inc. (Miami, FL). Todo el procedimiento para la preparación de extractos humanos totales de AM (AME) se llevó a cabo de forma aséptica para ser usado en experimentos posteriores basados en cultivos celulares. La AM se cortó en trozos pequeños para encajar en el barril de un BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK), se congeló en nitrógeno líquido, se pulverizó en un polvo fino y se pesó. Se añadió al polvo una solución reguladora de PBS fría 1X, pH 7.4, que contenía inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa, P8340, Sigma y suplementado con PMSF 1 mM) e inhibidores de fosfatasa (fluoruro de sodio 50 mM y vanadato de sodio 0.2 mM) a 1:1 (ml/g). La mezcla se mantuvo en hielo y se homogeneizó con un Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) 5 veces, 1 minuto cada una, con un intervalo de enfriamiento de 2 minutos. Estos extractos solubles en agua se designaron como extractos de AM "total" (AME).

El extracto total soluble en agua se mezcló durante 1 hora a 4 °C, posteriormente se fraccionó a dos velocidades diferentes de centrifugación a 4 °C, durante 30 minutos, esto es, 15000 x g y 48000 x g, y el sobrenadante resultante se designó como L y H, respectivamente. Cada sobrenadante se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. Este método también se usó para preparar extractos de gelatina de AM, que se raspó fácilmente del material adherente en el estroma de AM.

## Membrana amniótica humana total soluble y extractos de gelatina de membrana amniótica mediante diferentes soluciones reguladoras y métodos de fraccionamiento

En el examen de las preparaciones en diferentes soluciones reguladoras de extracción, el polvo como se preparó anteriormente se pesó y se mezcló con solución reguladora A (isotónica con bajo contenido de sal): Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, NaCl 150 mM, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 1% en el peso húmedo (g) de AM a la solución reguladora (ml) en una proporción de 1: 1 agitando a 4 °C, durante 1 h. Después de la centrifugación a 48000 x g, la pella resultante se extrajo posteriormente con solución reguladora B (alto contenido de sal): Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, NaCl 1 M, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 1% agitando a 4 °C durante 1 hora. Nuevamente, después de la centrifugación a 48000 x g, la pella se extrajo finalmente con solución reguladora C (clorhidrato de guanidina 4 M): acetato de sodio 100 mM, pH 5,8, clorhidrato de guanidina 4 M, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 1% agitando a 4 °C, durante 24 h. Las tres soluciones reguladoras anteriores se suplementaron con los siguientes inhibidores de proteasa y fosfatasa: 1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptinas, 1 µg/ml de pepstatina A, PMSF 0.5 mM, fluoruro de sodio 50 µM y vanadato de sodio 0.2 µM. Los sobrenadantes resultantes, designados como Extracto A, B y C, respectivamente, se dializaron contra la solución reguladora de diálisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.15 M) suplementado con PMSF 0.5 mM a 4 °C, durante 6 horas y la solución reguladora de diálisis se cambió dos veces, cada uno con 500 x (la proporción de volumen - solución reguladora de diálisis: muestras). Después de la diálisis, el volumen de cada muestra se midió y se ajustó al mismo volumen con la solución reguladora de diálisis. El mismo método también se usó para preparar extractos de gelatina de AM, que era el material adherente en el estroma de AM que se podía raspar fácilmente.

## Preparación de extractos de membrana amniótica humana solubles totales en PBS

El procedimiento completo para la preparación de extractos de AM humana (T) solubles totales se llevó a cabo de forma aséptica para ser usado en experimentos posteriores basados en cultivos celulares. La placenta humana congelada se obtuvo de Bio-tissue, Inc. (Miami, FL), de la cual se recuperó AM. La AM se cortó en trozos pequeños



para encajar en el barril de un BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK), se congeló en nitrógeno líquido y luego se pulverizó en un polvo fino. El polvo se pesó y se mezcló con mantequilla fría de PBS (preparada mediante la adición de H<sub>2</sub>O destilada a 1 x PBS, pH 7.4, a partir de 10 x PBS, cat. No. 70011-044, Invitrogen, Carlsbad, CA) con inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa, P8340, Sigma, y suplementado con PMSF 1 mM) e inhibidores de la fosfatasa (fluoruro de sodio 50 mM y vanadato de sodio 0.2 mM) a 1: 1 (ml/g). La mezcla se mantuvo en el hielo y se homogeneizó con un Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) durante 5 veces, 1 minuto cada una con un intervalo de enfriamiento de 2 minutos. Este extracto soluble en agua se designó como "total" (T). El extracto total soluble en agua se mezcló durante 1 hora a 4 °C, se centrifugó a 4 °C, durante 30 min a 48000 x g. El sobrenadante se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80 °C.

#### 10 Preparación de extractos de estroma de AM solubles en agua

Usando técnicas asépticas, la AM humana congelada obtenida de Bio-Tissue, Inc. (Miami, FL) se lavó brevemente 2-3 veces con HBSS para eliminar el medio de almacenamiento original. El estroma de AM se raspó con una espátula, se congeló en la fase de aire de nitrógeno líquido y se molió a partículas finas con BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) seguido de homogeneización en hielo con Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) en PBS, pH 7.4, durante 1 min. El homogeneizado se mezcló por rotación durante 1 h y se centrifugó a 14,000 x g durante 30 min a 4 °C. Luego se recogió el sobrenadante en PBS y se almacenó en alícuotas a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de BCA. Este extracto de proteína soluble en agua, designado como extracto de estroma amniótico (ASE), se usó para los experimentos descritos en este documento.

#### Preparación de extracto de estroma de AM

20 El procedimiento completo para la preparación de extractos de proteínas se llevó a cabo de forma aséptica. La AM humana congelada obtenida de Bio-Tissue (Miami, FL) se lavó brevemente 2-3 veces con HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar el medio de almacenamiento. El estroma de AM se raspó del lado del estroma de la AM con una espátula para la preparación del extracto de estroma de AM. La placenta humana y el corion obtenidos en el Baptist Hospital (Miami, FL) se enjuagaron 3 veces con HBSS para extraer la sangre. Para preparar el extracto de proteína soluble en agua, la AM total, el estroma de AM raspado, la AM eliminada del estroma, la placenta y el corion se congelaron en la fase de aire de nitrógeno líquido y cada uno se molió en partículas finas usando un BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) seguido de la homogeneización en hielo con Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) en PBS (pH 7.4) durante 1 min. Cada homogeneizado se mezcló durante 1 hora y se centrifugó a 14,000 g durante 30 min a 40 °C. Luego, cada sobrenadante (en PBS) se recogió y se almacenó en alícuotas (0.5 ml) a -80 °C. Un ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL) se usó para cuantificar la proteína total en diferentes extractos.

#### Preparación de formas en polvo liofilizadas y solubles en agua de extractos de AM humana

35 En un procedimiento típico para preparar extractos de AM humana, todo el procedimiento se lleva a cabo de forma aséptica. A menos que se indique lo contrario, los extractos de AM se pueden manipular a temperatura ambiente durante las etapas del procedimiento. Primero, se obtiene AM humana fresca o congelada, preferiblemente de Bio-Tissue, Inc. (Miami, FL). La AM congelada se lava brevemente 2-3 veces con HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar el medio de almacenamiento. La placenta humana fresca o el corion se enjuaga 3 veces con HBSS para eliminar la sangre.

40 Para preparar la forma soluble en agua de los extractos de AM, la AM (por ejemplo, el estroma de AM, la AM eliminada del estroma, la placenta, el corion) se transfiere a un tubo de centrifuga estéril de 50 ml y se centrifuga a 4 °C, durante 5 min a 5000 x g para eliminar el exceso de fluido. La AM se pesa, se transfiere a una placa de Petri estéril de 100 mm o 150 mm y se congela en la fase de aire de un recipiente de nitrógeno líquido durante 20 minutos para facilitar la posterior homogeneización. Luego, la AM congelada se corta en trozos pequeños con un bisturí desechable o se muele hasta partículas finas usando un BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) u otro dispositivo apropiado, y se homogeneiza con Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI), u otro dispositivo apropiado, en solución salina regulada con fosfato (PBS) o DMEM sin rojo fenol (Invitrogen, Carlsbad, CA) a pH neutro. Para la caracterización y purificación bioquímica, las soluciones anteriores se suplementan con los siguientes inhibidores de proteinasas: 1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina A y 1 mM de PMSF. Sin embargo, si el extracto se añade directamente al cultivo celular, no se añade inhibidor de proteasa. El homogeneizado se mezcla a 4 °C, durante 30 min y se centrifuga a 15,000 x g durante 30 min. El sobrenadante (esto es, extracto de AM) se recoge y almacena en alícuotas (0.5 ml) a -80 °C. Se usa un ensayo de BCA (Pierce, Rockford, IL) para cuantificar la proteína total en cada extracto de AM.

55 Para preparar la forma de polvo liofilizado de extractos de AM, la AM congelada se muele hasta partículas finas usando un BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK), u otro dispositivo apropiado, y se homogeneiza además como se describe en este documento. Las partes alícuotas desde aproximadamente 0.5 ml se liofilizan con SpeedVac (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY) a 4 °C, durante 4 h para disminuir el peso desde 280 mg a 32 mg (reducción de ~ 89%). El polvo liofilizado se pesa y almacena a -80 °C. Antes de su uso, el polvo liofilizado se puede reconstituir en una solución reguladora apropiada.

Para preparar extractos de estroma de AM, el estroma de AM se raspa de la superficie estromal de la AM total intacta que sale de la membrana basal y el epitelio amniótico intacto, y el estroma de AM congelado se muele usando un BioPulverizer como se describe en este documento. El estroma se extrae con PBS (por ejemplo, 1.4 mg/ml) a un pH neutro a 4 °C, durante 30 min y se centrifuga a 15,000 x g durante 30 min. El sobrenadante se recoge y se almacena en alícuotas (0.5 ml) a -80 °C. Se usa un ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL) para cuantificar la proteína total en el extracto estromal de AM.

Los métodos que implican técnicas convencionales de biología molecular se describen en este documento. Tales técnicas son generalmente conocidas en la técnica y se describen en detalle en tratados metodológicos tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; y Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing y Wiley-Interscience, New York, 2003 (con actualizaciones periódicas). Se conocen diversas técnicas para cultivar células animales en la técnica y se describen en Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th ed., R. Ian Freshney, Wiley-Liss, Hoboken, NJ, 2000, y Animal Cell Culture Techniques (Springer Lab Manual), M. Clynos, Springer - Verlag, New York, NY, 1998. Los métodos que implican el análisis y la purificación de proteínas también se conocen en la técnica y se describen en Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques, 2nd ed., Ian M. Rosenberg, Birkhauser, New York, NY, 2004.

#### Composiciones farmacéuticas

Las preparaciones de AM se pueden formular para fines de administración como una forma de dosificación no sólida, por ejemplo, combinando con un vehículo de administración para crear composiciones tales como soluciones, gotas, suspensiones, pastas, atomizadores, ungüentos, aceites, emulsiones, aerosoles, un vendaje recubierto, un parche, cremas, lociones, geles y similares. La formulación usada dependerá de la aplicación particular. Los geles son útiles para administrar las composiciones porque permiten una mejor retención del ingrediente activo en el sitio de introducción, permitiendo que el ingrediente activo ejerza su efecto durante un período de tiempo más largo antes de la eliminación del ingrediente activo. Alternativamente, las preparaciones de AM se pueden formular como formas de dosificación sólidas de liberación prolongada (incluidas las formas de dosificación oral). En este documento se proporciona una descripción de portadores o vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como formulaciones farmacéuticas, y también se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto estándar en este campo, y en USP/NF.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de una manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables, que incluyen excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Cualquiera de las técnicas, portadores y excipientes bien conocidos se pueden usar según sea apropiado y como se entiende en la técnica. Un resumen de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se puede encontrar, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; and Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins; 1999).

En ciertas realizaciones, las composiciones incluyen un diluyente (s), excipiente (s) o portador (s) farmacéuticamente aceptable (s). Además, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden administrar como composiciones farmacéuticas en las que las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se mezclan con otros ingredientes activos, como en la terapia de combinación. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden incluir otros agentes medicinales o farmacéuticos, portadores, adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o soluciones reguladoras. Además, las composiciones farmacéuticas también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

Una composición farmacéutica, como se usa en este documento, se refiere a una mezcla de preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento con otros componentes químicos, tales como portadores, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. Al practicar los métodos de tratamiento o uso descritos en este documento, las cantidades terapéuticamente eficaces de preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se administran en una composición farmacéutica a un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección que se va a tratar. El mamífero puede ser un humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto usado y otros factores. Los compuestos se pueden usar individualmente o en combinación con uno o más agentes terapéuticos como componentes de mezclas.

#### Formulaciones tópicas

Las formulaciones de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento incluyen aquellas apropiadas para administración tópica. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente

en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingredientes activos que se pueden combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped que se va a tratar, el modo particular de administración.

- 5 Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

- 10 Las composiciones típicas descritas en este documento incluyen una amplia variedad de formas físicas. Estos incluyen, pero no se limitan a, soluciones, lociones, cremas, aceites, geles, barras, atomizadores, ungüentos, bálsamos, champú y pastas. En general, tales sistemas portadores se pueden describir como soluciones, emulsiones, geles, sólidos y aerosoles. Las composiciones se pueden aplicar por vía tópica a la piel, o se pueden aplicar en forma de un dispositivo de administración transdérmica, tal como una microaguja, un parche, un vendaje o una almohadilla de gasa conocida en la técnica.

- 15 Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

- 20 Los polvos y atomizadores pueden contener, además de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Además, los atomizadores pueden contener propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como el butano y el propano.

- 25 Los solventes se emplean generalmente en la preparación de composiciones tópicas apropiadas. Tales solventes pueden ser acuosos u orgánicos. El solvente debe ser capaz de dispersar o disolver en este los ingredientes activos sin ser irritante para el animal que se va a tratar. El agua forma la base de todos los solventes acuosos, mientras que los solventes orgánicos apropiados incluyen propilenglicol, butilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol, 1,2,4-butanotriol, ésteres de sorbitol, 1,2,6-hexanotriol, etanol, isopropanol, butanodiol, y mezclas de los mismos. Los solventes se pueden incluir en la composición general en cantidades que oscilan entre el 0.1% y el 99%, y preferiblemente entre el 2.0% y el 75%. En algunas realizaciones, las composiciones se producen en forma de una composición que contiene emolientes. Se conoce una amplia variedad de emolientes apropiados y se pueden usar en este documento.

- 35 En algunas realizaciones, las composiciones se formulan como lociones que contienen desde aproximadamente 0.01% al 10% de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento. En otras realizaciones, las composiciones se formulan en un sistema portador de solución como una crema. Una composición de crema comprendería preferiblemente desde aproximadamente 0.1% a 15% y preferiblemente desde 1% a 5% de las preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento. Las lociones y cremas se pueden formular como emulsiones así como soluciones. Las composiciones también se pueden administrar en forma líquida, incluso en forma de liposomas suspendidos en líquido, como en los diferentes tipos de atomizadores disponibles en esta industria.

- 40 En otras realizaciones, los ingredientes activos se formulan como ungüentos. Los ungüentos apropiados pueden comprender bases simples de aceites animales o vegetales, o hidrocarburos semisólidos (oleaginosos). Los ungüentos apropiados también pueden comprender bases de ungüentos de absorción que absorben agua para formar emulsiones. Los portadores de ungüento también pueden ser solubles en agua. Un ungüento puede comprender desde 1% a 99% de un emoliente más a aproximadamente 0.1% a 99% de un agente espesante.

- 45 La proporción de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento en las composiciones puede variar entre aproximadamente 0.01 % en peso a aproximadamente 100 % en peso, más preferiblemente desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 99.9 % en peso, y especialmente desde aproximadamente 1.0 % en peso a aproximadamente 99.0 % en peso.

- 50 Los "portadores" o "vehículos" se refieren preferiblemente a materiales portadores apropiados para administración tópica e incluyen cualquiera de los materiales conocidos en la técnica, tales como cualquier líquido, solvente de gel, diluyente líquido, solubilizante o similares, que no sea tóxico, y que no interactúa con otros componentes de la composición de manera perjudicial. Los ejemplos de portadores apropiados para su uso en este documento incluyen agua, silicona, azúcares líquidos, ceras, aceites, vaselina y una variedad de otros materiales.

- 55 En algunas realizaciones, el portador o vehículo incluye uno o más solventes, aceites, surfactantes, humectantes, agentes espesantes, antioxidantes, agentes quelantes, soluciones reguladoras y conservantes.

Los ejemplos de solventes incluyen alcoholes C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, tales como hexanol, ciclohexanol, alcohol bencílico, 1,2-butanodiol, glicerol y alcohol amílico; hidrocarburos C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> tales como n-hexano, ciclohexano y etilbenceno; aldehídos C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> y cetonas, tales como heptilaldehído, ciclohexanona y bencilaldehído; ésteres C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>, tales como acetato de amilo y propionato de bencilo; aceites etéreos, tales como aceite de eucalipto, aceite de ruda, aceite de comino, limoneno, timol y 1-pineno; hidrocarburos halogenados que tienen 2-8 átomos de carbono, tales como 1-clorohexano, 1-bromohexano y clorociclohexano.

Los ejemplos de aceites comprenden grasas y aceites tales como aceite de oliva y aceites hidrogenados; ceras tales como cera de abejas y lanolina; hidrocarburos tales como parafina líquida, ceresina y escualano; ácidos grasos tales como ácido esteárico y ácido oleico; alcoholes tales como alcohol cetílico, alcohol estearílico, alcohol lanolínico y hexadecanol; y ésteres tales como miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo y estearato de butilo.

Los ejemplos de surfactantes incluyen surfactantes aniónicos tales como estearato de sodio, cetilsulfato de sodio, polioxietileno lauriléter fosfato, N-acil glutamato de sodio; surfactantes catiónicos tales como cloruro de estearildimetilbencilamonio y cloruro de esteariltrimetilamonio; surfactantes anfóteros tales como soluciones de clorhidrato de alquilaminoetilglicina y lecitina; y surfactantes no iónicos tales como el monoestearato de glicerina, el monoestearato de sorbitán, los ésteres de ácidos grasos de sacarosa, el monoestearato de propilenglicol, el polioxietileno oleiléter, el monoestearato de polietilenglicol, el polioxietileno sorbitán monopalmitato, polioxietileno ácido graso de coco monoetanolamida, polioxipropilenglicol (por ejemplo, los materiales vendidos bajo la marca registrada "Pluronic"), aceite de castor polioxietileno y polioxietileno lanolina.

Los ejemplos de humectantes incluyen glicerina, 1,3-butilenglicol y propilenglicol; ejemplos de agentes espesantes incluyen goma de xantano, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polietilenglicol y carboximetilcelulosa de sodio; los ejemplos de antioxidantes comprenden hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, galato de propilo, ácido cítrico y etoxiquina; ejemplos de agentes quelantes incluyen edetato de disodio y etanohidroxi difosfato; los ejemplos de soluciones reguladoras comprenden ácido cítrico, citrato de sodio, ácido bórico, bórax y fosfato de hidrógeno disódico; y ejemplos de conservantes son parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, ácido deshidroacético, ácido salicílico y ácido benzoico.

En ciertas realizaciones, el portador/vehículo está compuesto de los materiales anteriores para lograr una oclusión controlada de la piel, lo que resulta en un mejoramiento óptimo de la penetración de unidades estructurales biológicamente activos a través de la piel con una irritación mínima de la piel. En ciertas realizaciones, el portador/vehículo puede incluir un agente dispersante que ayuda a mantener una fase particulada de los ingredientes activos dispersos en la fase continua. En otras realizaciones, los excipientes no iónicos, tales como el alcohol láurico, el monolaurato de propilenglicol, el lactato de miristilo, el lactato de laurilo o similares, facilitan la dispersión.

La velocidad de suministro de unidades estructurales biológicamente activos a través de una superficie dérmica se puede aumentar mediante potenciadores de suministro transdérmico. Los potenciadores de la administración transdérmica apropiados incluyen solventes que aceptan protones, tales como dimetilsulfóxido y dimetilacetamida. Otros potenciadores transdérmicos apropiados incluyen 2-pirrolidina, N, N-dietil-m-toluamida, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, N, N-dimetilformamida, N-metil-2-pirrolidina, terpenos, surfactantes y tioglicolato de calcio.

Los potenciadores de penetración dérmica apropiados incluyen ésteres de ácidos grasos de 1 a 5 carbonos de ácido paraaminobenzoico, palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo, etanol, alcohol isobutílico, alcohol isobutílico, alcohol estearílico, glicerol, 2-pirrolidona, urea, propilenglicol, ácido oleico, ácido palmítico, dimetilsulfóxido, N, N-dimetil acetamida, N, N-dimetilformamida, 2-pirrolidona, 1-metil-2-pirrolidona, 5-metil-2-pirrolidona, 1,5-dimetil-2-pirrolidona, 1-etil-2-pirrolidona, ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico, N, N-dimetil-m-toluamida, urea, acetato de etilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, ácido oleico, imidazolina, butilurea y ésteres del ácido pirrolidona carboxílico.

Los agentes humectantes, emulsionantes, surfactantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, etilendiamina, ácido tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Como composiciones apropiadas para la aplicación tópica, se pueden citar todas las composiciones empleadas habitualmente para administrar agentes terapéuticos por vía tópica, por ejemplo, cremas, jaleas, aderezos, champús, tinturas, pastas, ungüentos, bálsamos, polvos, formulaciones líquidas o semilíquidas, y similares. La aplicación de dichas composiciones puede ser por aerosol, por ejemplo, con un propelente tal como el dióxido de carbono y nitrógeno, un freón, o sin un propelente tal como un atomizador de bombeo, gotas, lociones o un semisólido tal como una composición espesa que se puede aplicar mediante un hisopo. En composiciones

particulares, se usarán convenientemente composiciones semisólidas tales como bálsamos, cremas, pastas, jaleas, ungüentos y similares.

#### Formulaciones oftálmicas

5 Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden administrar de diversas formas, incluidas todas las formas de administración local en el ojo. Adicionalmente, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden administrar sistémicamente, tal como por vía oral o intravenosa. Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden administrar por vía tópica al ojo y se pueden formular en una variedad de composiciones oftálmicas administrables por vía tópica, tales como soluciones, suspensiones, geles o ungüentos. De este modo, la "administración oftálmica" abarca, pero no se limita a, inyección intraocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, administración periocular, inyecciones subconjuntivales, inyecciones retrobulbares, inyecciones intracamerales (incluso en la cámara anterior o vítrea), inyecciones sub-Tenon o implantes, soluciones oftálmicas, suspensiones oftálmicas, ungüentos oftálmicos, implantes oculares e inserciones oculares, soluciones intraoculares, uso de iontoforesis, incorporación en soluciones de irrigación quirúrgica y paquetes (solo a modo de ejemplo, una compresa de algodón saturado insertada en el fornix).

20 Una composición que comprende las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento puede tomar la forma ilustrativa de un líquido en el que los agentes están presentes en solución, en suspensión o en ambos. Por lo general, cuando la composición se administra como una solución o suspensión, una primera porción del agente está presente en la solución y una segunda porción del agente está presente en forma de partículas, en suspensión en una matriz líquida. En algunas realizaciones, una composición líquida puede incluir una formulación de gel. En otras realizaciones, la composición líquida es acuosa. Alternativamente, la composición puede tomar la forma de un ungüento.

25 Las composiciones útiles pueden ser una solución acuosa, suspensión o solución/suspensión, que puede presentarse en forma de gotas para los ojos. Se puede administrar una dosis deseada a través de un número conocido de gotas en el ojo. Por ejemplo, para un volumen de gota de 25  $\mu\text{l}$ , la administración de 1-6 gotas administrará 25-150  $\mu\text{l}$  de la composición. Las composiciones acuosas contienen por lo general desde aproximadamente el 0.01% a aproximadamente el 50%, por lo general más aproximadamente del 0.1% a aproximadamente el 20%, todavía por lo general más aproximadamente del 0.2% a aproximadamente el 10%, y por lo general más aproximadamente del 0.5% a aproximadamente el 5%, peso/volumen de preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento.

30 Por lo general, las composiciones acuosas tienen un pH y una osmolalidad aceptables oftálmicamente. "Oftálmicamente aceptable" con respecto a una formulación, composición o ingrediente significa por lo general que no tiene un efecto perjudicial persistente sobre el ojo tratado o el funcionamiento del mismo, o sobre la salud general del sujeto que se va a tratar. Los efectos transitorios, tales como una irritación menor o una sensación de "picadura" son comunes con la administración oftálmica tópica de agentes y son consistentes con que la formulación, composición o ingrediente en cuestión sea "oftálmicamente aceptable".

35 La suspensión acuosa útil también puede contener uno o más polímeros como agentes de suspensión. Los polímeros útiles incluyen polímeros solubles en agua tales como polímeros celulósicos, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, y polímeros insolubles en agua tales como polímeros reticulados que contienen carboxilo. Las composiciones útiles también pueden comprender un polímero mucoadhesivo oftálmicamente aceptable, seleccionado, por ejemplo, desde carboximetilcelulosa, carbómero (polímero de ácido acrílico), poli (metilmetacrilato), poliacrilamida, policarbofilo, copolímero ácido acrílico/butil acrilato, alginato de sodio y dextrano.

40 Las composiciones útiles también pueden incluir agentes solubilizantes oftálmicamente aceptables para ayudar en la solubilidad de los componentes de las preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento. El término "agente solubilizante" generalmente incluye agentes que dan como resultado la formación de una solución micelar o una verdadera solución del agente. Ciertos surfactantes no iónicos aceptables oftálmicamente, por ejemplo, polisorbato 80, pueden ser útiles como agentes solubilizantes, como pueden ser glicoles oftálmicamente aceptables, poliglicoles, por ejemplo, polietilenglicol 400, y glicol éteres.

45 Las composiciones útiles también pueden incluir uno o más agentes de ajuste o agentes reguladores del pH oftálmicamente aceptables, incluyendo ácidos tales como ácidos acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico y clorhídrico; bases tales como hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio y tris-hidroximetilaminometano; y soluciones reguladoras tales como citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio y cloruro de amonio. Tales ácidos, bases y soluciones reguladoras se incluyen en una cantidad requerida para mantener el pH de la composición en un intervalo oftálmicamente aceptable.

50 Las composiciones útiles también pueden incluir una o más sales oftálmicamente aceptables en una cantidad requerida para llevar la osmolalidad de la composición a un intervalo oftálmicamente aceptable. Tales sales incluyen las que tienen cationes de sodio, potasio o amonio y aniones de cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato,

bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito; las sales apropiados incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, tiosulfato de sodio, bisulfito de sodio y sulfato de amonio.

5 Otras composiciones útiles también pueden incluir uno o más conservantes oftálmicamente aceptables para inhibir la actividad microbiana. Los conservantes apropiados incluyen sustancias que contienen mercurio, tales como merfen y tiomersal; dióxido de cloro estabilizado; y compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de cetilpiridinio.

10 Además otras composiciones útiles pueden incluir uno o más surfactantes oftálmicamente aceptables para mejorar la estabilidad física o para otros fines. Los surfactantes no iónicos apropiados incluyen polioxietileno glicéridos de ácidos grasos y aceites vegetales, por ejemplo, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno (60); y alquiléteres de polioxietileno y alquilfenil éteres, por ejemplo, octoxinol 10, octoxinol 40.

Además otras composiciones útiles pueden incluir uno o más antioxidantes para mejorar la estabilidad química cuando sea necesario. Los antioxidantes apropiados incluyen, solo a modo de ejemplo, ácido ascórbico y metabisulfito de sodio.

15 Las composiciones de suspensión acuosa se pueden envasar en recipientes de una sola dosis que no se pueden volver a cerrar. Alternativamente, se pueden usar recipientes que pueden volver a cerrarse en dosis múltiples, en cuyo caso es típico incluir un conservante en la composición.

20 La composición oftálmica también puede tomar la forma de un artículo sólido que se puede insertar entre el ojo y el párpado o en el saco conjuntival, donde libera las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento. La liberación se produce en el líquido lagrimal que baña la superficie de la córnea, o directamente en la propia córnea, con la que el artículo sólido está generalmente en contacto íntimo. Los artículos sólidos apropiados para la implantación en el ojo de esta manera generalmente están compuestos principalmente de polímeros y pueden ser biodegradables o no biodegradables.

#### Formulaciones inyectables

25 Las formulaciones apropiadas para inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa pueden incluir soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de portadores, diluyentes, solventes o vehículos acuosos y no acuosos apropiados que incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, cremofor y similares), mezclas apropiadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de surfactantes. Las formulaciones apropiadas para inyección subcutánea también pueden contener aditivos tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispensadores. La prevención del crecimiento de microorganismos se puede garantizar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, tal como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

40 Para las inyecciones intravenosas, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden formular en soluciones acuosas, en soluciones reguladoras fisiológicamente compatibles, como la solución de Hank, la solución de Ringer, la solución reguladora salina fisiológica u otras soluciones apropiadas. Para la administración transmucosa, los penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear se usan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Para otras inyecciones parenterales, las formulaciones apropiadas pueden incluir soluciones acuosas o no acuosas, preferiblemente con soluciones reguladoras o excipientes fisiológicamente compatibles. Tales excipientes son generalmente conocidos en la técnica.

45 Las inyecciones parenterales pueden implicar inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. La composición farmacéutica descrita en este documento puede estar en una forma apropiada para inyección parenteral como suspensiones, soluciones o emulsiones estériles en vehículos aceitosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los solventes o vehículos lipófilos apropiados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como la carboximetilcelulosa de sodio, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes apropiados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Alternativamente,

el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo apropiado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

#### Formulaciones transdérmicas

5 Las formulaciones transdérmicas descritas en este documento se pueden administrar usando una variedad de dispositivos que se han descrito en la técnica. Por ejemplo, tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 3,598,122, 3,598,123, 3,710,795, 3,731,683, 3,742,951, 3,814,097, 3,921,636, 3,972,995, 3,993,072, 3,993,073, 3,996,934, 4,031,894, 4,060,084, 4,069,307, 4,077,407, 4,201,211, 4,230,105, 4,292,299, 4,292,303, 5,336,168, 5,665,378, 5,837,280, 5,869,090, 6,923,983, 6,929,801 y 6,946,144.

10 Las formas de dosificación transdérmica descritas en este documento pueden incorporar ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables que son convencionales en la técnica. En una realización, las formulaciones transdérmicas descritas en este documento incluyen al menos tres componentes: (1) una formulación como se describe en este documento; (2) un potenciador de penetración; y (3) un adyuvante acuoso. Además, las formulaciones transdérmicas pueden incluir componentes adicionales tales como, pero no se limitan a, agentes gelificantes, cremas y bases para ungüentos, y similares. En algunas realizaciones, la formulación transdérmica puede incluir además un material de soporte tejido o no tejido para mejorar la absorción y evitar la eliminación de la formulación transdérmica de la piel. En otras realizaciones, las formulaciones transdérmicas descritas en este documento pueden mantener un estado saturado o sobresaturado para promover la difusión en la piel.

20 Las formulaciones apropiadas para la administración transdérmica de preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento pueden emplear dispositivos de administración transdérmica y parches de administración transdérmica y pueden ser emulsiones lipófilas o soluciones reguladas, acuosas, disueltas y/o dispersas en un polímero o un adhesivo. Tales parches se pueden construir para la administración continua, pulsátil o bajo demanda de agentes farmacéuticos. Aún más, el suministro transdérmico de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se puede realizar por medio de parches iontoforéticos y similares. Además, los parches transdérmicos pueden proporcionar un suministro controlado de la composición. La velocidad de absorción se puede reducir mediante el uso de membranas que controlan la velocidad o atrapando el compuesto dentro de una matriz polimérica o gel. A la inversa, los potenciadores de la absorción se pueden usar para aumentar la absorción. Un potenciador o portador de la absorción puede incluir solventes farmacéuticamente aceptables absorbibles para ayudar al paso a través de la piel. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos tienen la forma de un vendaje que comprende un miembro de respaldo, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con portadores, opcionalmente una barrera que controla la velocidad para administrar el compuesto a la piel del huésped a una velocidad controlada y predeterminada durante un período de tiempo prolongado y medios para asegurar el dispositivo a la piel.

#### Formas de dosificación oral sólida

35 Las formas farmacéuticas sólidas descritas en este documento pueden incluir uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como un portador compatible, aglutinante, agente de relleno, agente de suspensión, agente saborizante, agente edulcorante, agente de desintegración, agente dispersante, surfactante, lubricante, colorante diluyente, solubilizante, agente humectante, plastificante, estabilizante, mejorador de la penetración, agente humectante, agente antiespumante, antioxidante, conservante o una o más combinaciones de los mismos. En otros aspectos, se usan procedimientos de recubrimiento estándar, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition (2000).

45 Los comprimidos preparados por compresión son formas de dosificación sólidas preparadas compactando la mezcla en masa de las formulaciones descritas en este documento. En diversas realizaciones, los comprimidos que están diseñados para disolverse en la boca incluirán uno o más agentes saborizantes. En otras realizaciones, los comprimidos incluirán una película que rodea el comprimido final. En algunas realizaciones, el recubrimiento de película puede proporcionar una liberación retardada de la composición de la formulación. En otras realizaciones, el recubrimiento de película ayuda a la conformidad del paciente (por ejemplo, los recubrimientos Opadry® o el recubrimiento de azúcar). Los recubrimientos de película, incluido Opadry®, suelen oscilar entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 3% del peso del comprimido. En otras realizaciones, los comprimidos incluyen uno o más excipientes.

55 Se puede preparar una cápsula, por ejemplo, colocando la mezcla en masa de la formulación de la composición descrita en este documento, dentro de una cápsula. En algunas realizaciones, las formulaciones (suspensiones y soluciones no acuosas) se colocan en una cápsula de gelatina blanda. En otras realizaciones, las formulaciones se colocan en cápsulas de gelatina estándar o cápsulas que no son de gelatina, tales como cápsulas que comprenden HPMC. En otras realizaciones, la formulación se coloca en una cápsula espolvoreada, en la que la cápsula se puede tragar entera o la cápsula se puede abrir y el contenido se espolvorea sobre los alimentos antes de comerlos. En algunas realizaciones, la dosis terapéutica se divide en cápsulas múltiples (por ejemplo, dos, tres o cuatro). En algunas realizaciones, la dosis completa de la formulación se administra en forma de cápsula.

5 En diversas realizaciones, las partículas de la composición y uno o más excipientes se mezclan en seco y se comprimen en una masa, tal como un comprimido, que tiene una dureza suficiente para proporcionar una composición farmacéutica que se desintegra sustancialmente en menos desde aproximadamente 30 minutos, menos desde aproximadamente 35 minutos, menos desde aproximadamente 40 minutos, menos desde aproximadamente 45 minutos, menos desde aproximadamente 50 minutos, menos desde aproximadamente 55 minutos, o menos desde aproximadamente 60 minutos, después de la administración oral, liberando así la formulación en el fluido gastrointestinal.

10 En otro aspecto, las formas de dosificación pueden incluir formulaciones microencapsuladas. En algunas realizaciones, uno o más materiales compatibles están presentes en el material de microencapsulación. Los materiales de ejemplo incluyen, pero no se limitan a modificadores de pH, facilitadores de la erosión, agentes antiespumantes, antioxidantes, agentes aromatizantes y materiales portadores tales como aglutinantes, agentes de suspensión, agentes de desintegración, agentes de relleno, surfactantes, solubilizantes, estabilizantes, lubricantes, agentes humectantes y diluyentes.

15 Las formas de dosificación farmacéuticas sólidas que incluyen preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento se pueden formular adicionalmente para proporcionar una liberación controlada de la composición. La liberación controlada se refiere a la liberación de la composición de una forma de dosificación en la que se incorpora según un perfil deseado durante un período de tiempo prolongado. Los perfiles de liberación controlada incluyen, por ejemplo, los perfiles de liberación sostenida, liberación prolongada, liberación pulsátil y liberación retardada. En contraste con las composiciones de liberación inmediata, las composiciones de liberación controlada permiten la administración de un agente a un sujeto durante un período prolongado de tiempo según un perfil predeterminado. Tales velocidades de liberación pueden proporcionar niveles terapéuticamente eficaces de agente durante un período de tiempo prolongado y, proporcionar así un período más largo de respuesta farmacológica mientras se minimizan los efectos secundarios en comparación con las formas de dosificación de liberación rápida convencionales. Tales períodos de respuesta más prolongados proporcionan muchos beneficios inherentes que no se logran con las correspondientes preparaciones de liberación inmediata, de acción corta.

30 En algunas realizaciones, las formas de dosificación sólidas descritas en este documento se pueden formular como formas de dosificación oral de liberación retardada con recubrimiento entérico, esto es, como una forma de dosificación oral de una composición farmacéutica como se describe en este documento que usa un recubrimiento entérico para afectar la liberación en el intestino delgado del tracto gastrointestinal. La forma de dosificación con recubrimiento entérico puede ser un comprimido comprimido o moldeado o extruido/molde (recubierto o no recubierto) que contiene gránulos, polvo, pellas, perlas o partículas del ingrediente activo y/u otros componentes de la composición, que están recubiertos o no recubiertos. La forma de dosificación oral con recubrimiento entérico también puede ser una cápsula (recubierta o no recubierta) que contiene pellas, perlas o gránulos del portador sólido o la composición, que están recubiertos o no recubiertos.

35 En otras realizaciones, las formulaciones descritas en este documento se administran usando una forma de dosificación pulsátil. Una forma de dosificación pulsátil es capaz de proporcionar uno o más pulsos de liberación inmediata en puntos de tiempo predeterminados después de un tiempo de retraso controlado o en sitios específicos. Las formas de dosificación pulsátiles se pueden administrar usando una variedad de formulaciones pulsátiles conocidas en la técnica. Por ejemplo, tales formulaciones incluyen, pero no se limitan a, las descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,011,692, 5,017,381, 5,229,135, y 5,840,329.

40 Otras formas de dosificación de liberación pulsátil apropiadas para uso con las presentes formulaciones incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,871,549, 5,260,068, 5,260,069, 5,508,040, 5,567,441 y 5,837,284.

45 Muchos otros tipos de sistemas de liberación controlada conocidos para los expertos en el arte y son apropiados para su uso con las formulaciones descritas en este documento. Los ejemplos de tales sistemas de administración incluyen, por ejemplo, sistemas basados en polímeros, tales como ácido poliláctico y poliglicólico, polianhídridos y policaprolactona; matrices porosas, sistemas no basados en polímeros que son lípidos, incluidos los esteroides, tales como el colesterol, los ésteres de colesterol y los ácidos grasos, o las grasas neutras, tales como los mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas de silastic; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera, formas de dosificación bioerosionables, comprimidos que usan aglutinantes convencionales y similares. Véase, por ejemplo, Liberman et al., *Pharmaceutical Dosage Forms*, 2 Ed., Vol. 1, pp. 209-214 (1990); Singh et al., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2nd Ed., pp. 751-753 (2002); las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,327,725, 4,624,848, 4,968,509, 5,461,140, 5,456,923, 5,516,527, 5,622,721, 5,686,105, 5,700,410, 5,977,175, 6,465,014 y 6,932,983.

55 En algunas realizaciones, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que incluyen partículas de las composiciones descritas en este documento y al menos un agente dispersante o agente de suspensión para la administración a un sujeto. Las formulaciones pueden ser un polvo y/o gránulos para suspensión, y al mezclarlos con agua, se obtiene una suspensión sustancialmente uniforme.



Las suspensiones y dispersiones acuosas descritas en este documento pueden permanecer en un estado homogéneo, tal como se define en The USP Pharmacists' Pharmacopeia (2005 edition, chapter 905), durante al menos 4 horas. La homogeneidad se debe determinar mediante un método de muestreo consistente con respecto a la determinación de la homogeneidad de toda la composición. En una realización, una suspensión acuosa se puede resuspender en una suspensión homogénea por agitación física que dura menos de 1 minuto. En otra realización, una suspensión acuosa se puede resuspender en una suspensión homogénea por agitación física que dura menos de 45 segundos. En otra realización más, una suspensión acuosa se puede resuspender en una suspensión homogénea por agitación física que dura menos de 30 segundos. En otra realización más, no es necesaria ninguna agitación para mantener una dispersión acuosa homogénea.

Los agentes potenciadores de la viscosidad apropiados para las suspensiones o dispersiones acuosas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa, goma de xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, Plasdon® S-630, carbómero, alcohol de polivinilo, alginatos., acacia, quitosanos y combinaciones de los mismos. La concentración del agente potenciador de la viscosidad dependerá del agente seleccionado y de la viscosidad deseada.

Además de los aditivos enumerados anteriormente, las formulaciones líquidas también pueden incluir diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes. Emulsionantes de ejemplo son alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3 butilenglicol, dimetilformamida, laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, colesterol, ésteres de colesterol, ácido taurocólico, fosfotidilcolina, aceites, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de maní, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles, ésteres de ácidos grasos de sorbitán o mezclas de estas sustancias, y similares.

Se debe apreciar que existe un solapamiento entre los aditivos enumerados anteriormente usados en las dispersiones o suspensiones acuosas descritas en este documento, ya que un aditivo dado a menudo se clasifica de manera diferente por diferentes profesionales en el campo, o se usa comúnmente para cualquiera de varias funciones diferentes. De este modo, los aditivos enumerados antes deben tomarse solamente a modo de ejemplo, y no limitantes, de los tipos de aditivos que se pueden incluir en las formulaciones descritas en este documento. Las cantidades de tales aditivos pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica, según las propiedades particulares deseadas.

#### Formulaciones intranasales

Las formulaciones intranasales son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,476,116, 5,116,817 y 6,391.452. Las formulaciones se pueden preparar según estas y otras técnicas bien conocidas en la técnica se preparan como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes apropiados, fluorocarburos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ansel, H. C. et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Sixth Ed. (1995). Estas composiciones y formulaciones se pueden preparar con ingredientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos apropiados. Estos ingredientes son conocidos para los expertos en la preparación de formas de dosificación nasal y algunos de ellos se pueden encontrar en REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21st edition, 2005, una referencia estándar en este campo. La elección de portadores apropiados depende en gran medida de la naturaleza exacta de la forma de dosificación nasal deseada, por ejemplo, soluciones, suspensiones, ungüentos o geles. Las formas de dosificación nasal generalmente contienen grandes cantidades de agua además del ingrediente activo. También pueden estar presentes cantidades menores de otros ingredientes tales como ajustadores de pH, emulsionantes o agentes dispersantes, conservantes, surfactantes, agentes gelificantes o soluciones reguladoras y otros agentes estabilizantes y solubilizantes.

Para la administración por inhalación, las composiciones descritas en este documento pueden estar en forma de un aerosol, una neblina o un polvo. Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se entregan convenientemente en forma de una presentación de atomizador en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos, tal como, solo a modo de ejemplo, de gelatina para uso en un inhalador o insuflador, que contiene una mezcla en polvo de las preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento y una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón.

#### Otras formulaciones

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento también se pueden formular en composiciones rectales tales como enemas, geles rectales, espumas rectales, aerosoles rectales, supositorios, supositorios de gelatina o enemas de retención, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos, así como polímeros sintéticos tales como polivinilpirrolidona, PEG y similares. En las formas de supositorio de las composiciones, primero se funde una cera de bajo punto de fusión tal como,

pero no se limitan a, una mezcla de glicéridos de ácidos grasos, opcionalmente en combinación con manteca de cacao.

Métodos de dosificación y regímenes de tratamiento.

5 Las composiciones se pueden administrar mediante cualquier técnica apropiada. Por lo general, las composiciones se administrarán directamente a un sitio diana (por ejemplo, superficie ocular, piel). La administración de formulaciones a la superficie ocular es bien conocida en la técnica. Si se desea la administración de preparaciones de AM a la piel, se puede usar la administración tópica. También se contempla una composición inyectable. La administración también puede ser parenteral (por ejemplo, subcutánea). Otros métodos de administración, por ejemplo, administración liposomal, difusión desde un dispositivo impregnado con la composición y administración transdérmica basada en microemulsión en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas, son conocidos en la técnica.

15 Las composiciones que contienen las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad o afección, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad o afección. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y el curso de la enfermedad o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente, el peso y la respuesta a los fármacos, y el criterio del médico tratante. Se considera bien dentro de la experiencia de la técnica que uno determine tales cantidades terapéuticamente eficaces mediante experimentación de rutina (que incluye, pero no se limitan a, un ensayo clínico de aumento de la dosis).

20 En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se administran a un paciente susceptible o, de lo contrario, con riesgo de una enfermedad, trastorno o afección particular. Dicha cantidad se define como una "cantidad o dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas también dependen del estado de salud, peso y similares del paciente. Se considera bien dentro de la experiencia de la técnica que uno determine tales cantidades profilácticamente eficaces mediante experimentación rutinaria (por ejemplo, un ensayo clínico de aumento de la dosis). Cuando se usa en un paciente, las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el criterio del médico tratante.

30 En el caso en el que la condición del paciente no mejora, a criterio del médico, la administración de los compuestos se puede administrar de forma crónica, es decir, durante un período prolongado de tiempo, incluso durante toda la vida del paciente para mejorar o de otra manera controlar o limitar los síntomas de la enfermedad o condición del paciente.

35 En el caso en el que el estado del paciente mejora, a criterio del médico, la administración de los compuestos se puede administrar de forma continua; alternatively, la dosis del fármaco que se administra se puede reducir temporalmente o suspenderse temporalmente durante un cierto período de tiempo (esto es, una "día libre del fármaco"). La duración del día libre del fármaco puede variar entre 2 días y 1 año, incluyendo solo a modo de ejemplo, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 15 días, 20 días, 28 días, 35 días, 50 días, 70 días, 100 días, 120 días, 150 días, 180 días, 200 días, 250 días, 280 días, 300 días, 320 días, 350 días, o 365 días. La reducción de la dosis durante un día libre del fármaco puede ser del 10%-100%, incluyendo, solo a modo de ejemplo, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%.

45 Una vez que ha ocurrido la mejora de las condiciones del paciente, se administra una dosis de mantenimiento si es necesario. Posteriormente, la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, se pueden reducir, en función de los síntomas, a un nivel en el que se conserve la enfermedad, trastorno o afección mejorada. Sin embargo, los pacientes pueden requerir tratamiento intermitente a largo plazo ante cualquier recurrencia de los síntomas.

50 La cantidad de un agente dado que corresponderá a dicha cantidad variará dependiendo de factores tales como el compuesto, enfermedad o condición particular y su gravedad, la identidad (por ejemplo, el peso) del sujeto o huésped que necesita tratamiento, pero no obstante, puede determinarse rutinariamente de una manera conocida en la técnica según las circunstancias particulares que rodean el caso, incluyendo, por ejemplo, el agente específico que se administra, la vía de administración, la afección que se va a tratar, y el sujeto o el huésped que se va a tratar. En general, sin embargo, las dosis empleadas para el tratamiento en adultos en humanos por lo general estarán en el intervalo de 0.02-5000 mg por día, preferiblemente 1-1500 mg por día. La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o en dosis divididas administradas simultáneamente (o durante un período corto de tiempo) o en intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

55 La composición farmacéutica descrita en este documento puede estar en formas de dosificación unitaria apropiadas para la administración única de dosis precisas. En la forma de dosificación unitaria, la formulación se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas de uno o más compuestos. La dosis unitaria puede estar en forma de un paquete que contiene cantidades discretas de la formulación. Los ejemplos no limitantes son comprimidos o

5 cápsulas envasadas, y polvos en viales o ampollas. Las composiciones de suspensión acuosa se pueden envasar en recipientes de una sola dosis que no se pueden volver a cerrar. Alternativamente, se pueden usar recipientes que pueden volver a cerrarse en dosis múltiples, en cuyo caso es típico incluir un conservante en la composición. Solo a modo de ejemplo, las formulaciones para inyección parenteral pueden presentarse en forma de dosis unitaria, que incluye, pero no se limita a ampollas, o en recipientes multidosis, con un conservante añadido.

10 Las dosis diarias apropiadas para las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento son desde aproximadamente 0.01 a 2.5 mg/kg por peso corporal. Una dosis diaria indicada en mamíferos más grandes, incluyendo, pero no se limitan a, humanos, está en el intervalo desde aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 100 mg, administrada convenientemente en dosis divididas, que incluyen, pero no se limitan a, hasta cuatro veces al día o en forma de liberación extendida. Las formas de dosificación unitaria apropiadas para administración oral incluyen desde aproximadamente 1 a 50 mg del ingrediente activo. Los intervalos anteriores son meramente sugerentes, ya que el número de variables con respecto a un régimen de tratamiento individual es grande, y no son infrecuentes las excursiones considerables de estos valores recomendados. Tales dosis se pueden alterar dependiendo de una serie de variables, no limitadas a la actividad del compuesto usado, la enfermedad o afección que se va a tratar, el modo de administración, los requisitos del sujeto individual, la gravedad de la enfermedad o afección que se va a tratar, y el juicio del médico.

15 La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales regímenes terapéuticos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, que incluyen, pero no se limitan a, la determinación de la LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción entre LD<sub>50</sub> y ED<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED<sub>50</sub> con una toxicidad mínima. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada.

#### Tratamientos combinados

20 Las composiciones y métodos descritos en este documento también se pueden usar junto con otros reactivos terapéuticos bien conocidos que se seleccionan por su utilidad particular frente a la afección que se va a tratar. En general, las composiciones descritas en este documento y, en realizaciones donde se emplea terapia combinada, otros agentes no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica y, debido a diferentes características físicas y químicas, tienen que administrarse por diferentes vías. La determinación del modo de administración y la conveniencia de la administración, cuando sea posible, en la misma composición farmacéutica, está dentro del conocimiento del clínico experto. La administración inicial se puede realizar según los protocolos establecidos conocidos en la técnica, y luego, en función de los efectos observados, el médico experto puede modificar la dosis, los modos de administración y los tiempos de administración.

30 La elección particular de los compuestos usados dependerá del diagnóstico de los médicos a cargo y de su juicio sobre el estado del paciente y del protocolo de tratamiento apropiado. Los compuestos se pueden administrar simultáneamente (por ejemplo, simultáneamente, esencialmente simultáneamente o dentro del mismo protocolo de tratamiento) o secuencialmente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, trastorno o afección, la condición del paciente y la elección real de los compuestos usados. La determinación del orden de administración, y el número de repeticiones de administración de cada agente terapéutico durante un protocolo de tratamiento, está bien dentro del conocimiento del médico experto después de la evaluación de la enfermedad que se va a tratar y la condición del paciente.

35 Los expertos en la técnica saben que las dosis terapéuticamente eficaces pueden variar cuando los fármacos se usan en combinaciones de tratamiento. Los métodos para determinar experimentalmente las dosis terapéuticamente eficaces de fármacos y otros agentes para uso en regímenes de tratamiento de combinación se describen en la literatura. Por ejemplo, el uso de la dosis metronómica, esto es, el suministro de dosis más frecuentes, más bajas para minimizar los efectos secundarios tóxicos, se ha descrito ampliamente en la literatura. El tratamiento combinado incluye además tratamientos periódicos que comienzan y terminan en diversos momentos para ayudar con el manejo clínico del paciente.

40 Para las terapias de combinación descritas en este documento, las dosis de los compuestos coadministrados, por supuesto, variarán dependiendo del tipo de cofármaco empleado, del fármaco específico empleado, de la enfermedad o afección que se va a tratar, etc. Además, cuando se coadministra con uno o más agentes biológicamente activos, el compuesto proporcionado en este documento se puede administrar ya sea simultáneamente con el (los) agente (s) biológicamente activo (s) o secuencialmente. Si se administra de forma secuencial, el médico encargado decidirá la secuencia apropiada de administración de proteínas en combinación con el (los) agente (s) biológicamente activo (s).

En cualquier caso, los múltiples agentes terapéuticos se pueden administrar en cualquier orden o incluso simultáneamente. Si simultáneamente, los múltiples agentes terapéuticos pueden proporcionarse en una sola forma unificada o en múltiples formas (solo a modo de ejemplo, ya sea como una sola píldora o como dos píldoras separadas). Uno de los agentes terapéuticos se puede administrar en dosis múltiples, o ambos se pueden administrar en dosis múltiples. Si no es simultáneo, el tiempo entre las dosis múltiples puede variar de más de cero semanas a menos de cuatro semanas. Además, los métodos de combinación, las composiciones y las formulaciones no se deben limitar al uso de solo dos agentes; también se contempla el uso de múltiples combinaciones terapéuticas.

Se entiende que el régimen de dosificación para tratar, prevenir o mejorar la (s) afección (es) para la cual se busca el alivio, se puede modificar de acuerdo con una variedad de factores. Estos factores incluyen el trastorno que sufre el sujeto, así como la edad, el peso, el sexo, la dieta y la afección médica del sujeto. De este modo, el régimen de dosificación realmente empleado puede variar ampliamente y, por lo tanto, se puede desviar de los regímenes de dosificación establecidos en este documento.

Los agentes farmacéuticos que constituyen la terapia de combinación descrita en este documento pueden ser una forma de dosificación combinada o en formas de dosificación separadas destinadas a la administración sustancialmente simultánea. Los agentes farmacéuticos que conforman la terapia de combinación también se pueden administrar secuencialmente, ya sea con cualquiera de los compuestos terapéuticos administrados por un régimen que requiere la administración en dos etapas. El régimen de administración de dos etapas puede requerir la administración secuencial de los agentes activos o la administración separada de los agentes activos separados. El período de tiempo entre las etapas de administración múltiple puede variar desde unos pocos minutos hasta varias horas, dependiendo de las propiedades de cada agente farmacéutico, tal como la potencia, solubilidad, biodisponibilidad, vida media en plasma y perfil cinético del agente farmacéutico. La variación circadiana de la concentración de la molécula diana también puede determinar el intervalo de dosis óptimo.

Además, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento también se pueden usar en combinación con procedimientos que pueden proporcionar un beneficio adicional o sinérgico al paciente. Solo a modo de ejemplo, se espera que los pacientes encuentren un beneficio terapéutico y/o profiláctico en los métodos descritos en este documento, en los que la composición farmacéutica de un compuesto descrito en este documento y/o las combinaciones con otros agentes terapéuticos se combinan con pruebas genéticas para determinar si ese individuo es un portador de un gen mutante que se sabe que está relacionado con ciertas enfermedades o afecciones.

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento y las terapias de combinación se pueden administrar antes, durante o después de la aparición de una enfermedad o afección, y el momento de administración de la composición que contiene un compuesto puede variar. Así, por ejemplo, los compuestos se pueden usar como un profiláctico y se pueden administrar continuamente a sujetos con una propensión a desarrollar afecciones o enfermedades para prevenir la aparición de la enfermedad o afección. Los compuestos y composiciones se pueden administrar a un sujeto durante o tan pronto como sea posible después del inicio de los síntomas. La administración de los compuestos se puede iniciar dentro de las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas, preferiblemente dentro de las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas, más preferiblemente dentro de las primeras 6 horas desde el inicio de los síntomas, y más preferiblemente dentro de las 3 horas siguientes al inicio de los síntomas. La administración inicial puede ser por cualquier vía práctica, tal como, por ejemplo, una inyección intravenosa, una inyección en bolo, una infusión durante 5 minutos a aproximadamente 5 horas, una píldora, una cápsula, un parche transdérmico, administración bucal, y similares, o combinación de los mismos. Un compuesto se administra preferiblemente tan pronto como sea posible después de que se detecte o se sospeche la aparición de una enfermedad o condición, y durante un período de tiempo necesario para el tratamiento de la enfermedad, tal como, por ejemplo, desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 3 meses. La duración del tratamiento puede variar para cada sujeto, y la duración puede determinarse usando los criterios conocidos. Por ejemplo, el compuesto o una formulación que contiene el compuesto se puede administrar durante al menos 2 semanas, preferiblemente desde aproximadamente 1 mes a aproximadamente 5 años, y más preferiblemente desde aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 años.

Kits/artículos de fabricación

Para su uso en las aplicaciones terapéuticas descritas en este documento, los kits y artículos de fabricación también se describen en este documento. Tales kits pueden incluir un portador, paquete o recipiente que está compartimentado para recibir uno o más recipientes, tales como viales, tubos y similares, cada uno de los recipientes que incluye uno de los elementos separados que se usarán en el método descrito en este documento. Los recipientes apropiados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

Los artículos de fabricación descritos en este documento contienen materiales de embalaje. Los materiales de embalaje para uso en embalaje de productos farmacéuticos son bien conocidos para los expertos en el arte. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,323,907, 5,052,558 y 5,033,252. Los ejemplos de materiales de embalaje farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, envases tipo blíster, botellas, tubos,

inhaladores, bombas, bolsas, viales, envases, jeringas, botellas y cualquier material de embalaje apropiado para una formulación seleccionada y el modo de administración y tratamiento previsto. Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionadas en este documento, así como una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad, trastorno o afección.

- 5 Por ejemplo, el o los recipientes pueden incluir una o más preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento, opcionalmente en una composición o en combinación con otro agente como se describe en este documento. El o los recipientes tienen opcionalmente un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Tales kits comprenden opcionalmente un compuesto con una descripción o etiqueta de  
10 identificación o instrucciones relacionadas con su uso en los métodos descritos en este documento.

- Un kit por lo general puede incluir uno o más recipientes adicionales, cada uno con uno o más de diversos materiales (tal como reactivos, opcionalmente en forma concentrada y/o dispositivos) deseables desde un punto de vista comercial y del usuario para el uso de las preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento. Los ejemplos no limitantes de tales materiales incluyen, pero no se limitan a, soluciones reguladoras,  
15 diluyentes, filtros, agujas, jeringas; portador, paquete, envase, vial y/o tubo, etiquetas con el contenido y/o las instrucciones de uso, y los prospecto con las instrucciones de uso. Por lo general también se incluirá un conjunto de instrucciones.

- Una etiqueta puede estar en o asociada con el recipiente. Una etiqueta puede estar en un recipiente cuando las letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta se adjuntan, moldean o graban en el recipiente; una  
20 etiqueta se puede asociar con un recipiente cuando está presente dentro de un receptáculo o portador que también contiene el recipiente, por ejemplo, como un prospecto. Se puede usar una etiqueta para indicar que los contenidos se usarán para una aplicación terapéutica específica. La etiqueta también puede indicar las instrucciones de uso de los contenidos, tal como en los métodos descritos en este documento.

- En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen un compuesto proporcionado en este documento. El paquete puede contener, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El  
25 paquete o dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado con el recipiente en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma del fármaco para la administración en humanos o la administración veterinaria. Tal notificación, por ejemplo, puede ser la etiqueta aprobada por the U.S. Food and Drug Administration para fármacos recetados, o el prospecto del producto aprobado. Las composiciones que contienen un compuesto proporcionado en este documento formulado en un portador farmacéutico compatible también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.  
30

### 35 Métodos de tratamiento

- Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento tienen muchos usos que incluyen investigación y aplicaciones clínicas. Basándose en los resultados descritos en este documento, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden aplicar a tejidos o células para lograr una modulación deseada de la fisiología. Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden añadir a los cultivos celulares o cultivos de tejidos para lograr un efecto deseado (como se describe en este documento).  
40

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento suprimen la actividad del promotor de TGF

- 45 Las actividades anticicatrización, antiinflamatorias y antiangiogénicas de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se demuestran mediante la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 como se muestra en este documento. La porción fetal de la membrana amniótica congelada tiene un efecto anticicatrización significativamente mayor que el de la membrana amniótica fresca; la porción placentaria de la membrana amniótica congelada también tiene un efecto anticicatrización significativamente mayor que la membrana amniótica fresca (Ejemplo 1). Por lo tanto, la AM congelada, ya sea la porción placentaria o fetal,  
50 mostró efectos supresores más potentes en TGF- $\beta$  que la AM fresca. Este efecto supresor mediado por el extracto de AM total obtenido a partir de la AM congelada fue dependiente de la dosis en un intervalo de 0.4 a 125  $\mu$ g/ml. Además, dicho efecto supresor no pudo ser sustituido por un HA de alto MW solo (que exceda 100X de extracto de AM equivalente), y se perdió después de la digestión con hialuronidasa, lo que sugiere que fue mediado por un complejo entre HA- $\alpha$ 1. La centrifugación a baja o alta velocidad no afectó significativamente el efecto supresor. Sin embargo, la posterior liofilización y reconstitución produjo un efecto supresor más potente. Además, el efecto supresor general de la AM fue más potente que el de la gelatina de AM.  
55

TGF- $\beta$  es la citoquina prototípica que está implicada en la inflamación del tejido, además de la cicatrización de heridas y la formación de cicatrices. Véase Border, et al., J. Clin. Invest., 90:1-7 (1992); Grande, Proc. Soc. Exp.

- Biol. Med., 214:27-40 (1997); Jester, et al., Prog. Retin. Eye Res., 18(3):311-356 (1999); y Marek, et al., Med. Sci. Monit., 8(7):RA145-151 (2002). Las células de mamífero expresan tres TGF- $\beta$  diferentes: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$  es la citoquina más potente que promueve la diferenciación de miofibroblastos al favorecer la expresión de  $\alpha$ -SMA, integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 y fibronectina que contiene el dominio EDA (Fn) en una serie de tipos de células, incluidos los fibroblastos. Véase Tseng, et al., Ocular Surface J., 2(3):177-187 (2004); Ronnov-Jessen, et al., Lab. Invest., 68:696-707 (1993); Verbeek, et al., Am. J. Pathol., 144:372-82 (1994); Hales, et al., Curr. Eye Res., 13:885-90 (1994); Jester, et al., Cornea, 15:505-16 (1996); Serini, et al., J. Cell. Biol., 142:873-81 (1998); Grande, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 214(1):27-40 (1997); y Jester, et al., Prog. Retin. Eye Res., 18:311-56 (1999). TGF- $\beta$  también favorece la expresión de componentes de la matriz como los colágenos y proteoglicanos, inhibe la expresión de las proteinasas y las metaloproteinases de la matriz, y favorece la expresión de sus inhibidores. En conjunto, estas acciones dan como resultado un aumento de las interacciones entre la matriz celular y la adhesividad, así como la deposición y la formación de tejido cicatricial. Véase Tseng, et al., Ocular Surface J., 2(3):177-187 (2004); Grande, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 214(1):27-40 (1997); Jester, et al., Prog. Retin. Eye Res., 18:311-56 (1999); y Lawrence, Eur. Cytokine Netw., 7:363-74 (1996).
- 15 Los TGF- $\beta$  ejercen sus acciones a través de la unión con los receptores TGF-beta (TGF- $\beta$ R) en la membrana celular. En las células humanas, hay tres TGF- $\beta$ R, a saber, TGF- $\beta$ R tipo I (TGF- $\beta$ RI), tipo II (TGF- $\beta$ RII) y tipo III (TGF- $\beta$ RIII). Los TGF- $\beta$ , que sirven como ligandos, se unen a un complejo receptor de serina, treonina quinasa hecho de TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII; dicha unión es facilitada por TGF- $\beta$ RIII, que no es un receptor de serina, treonina quinasa. Véase Tseng, et al., Ocular Surface J., 2 (3): 177-187 (2004); y Massague, et al., Genes and Development., 14: 627-44 (2000). La unión con TGF- $\beta$ RII activa TGF- $\beta$ RI, que es responsable de la fosforilación directa de una familia de proteínas efectoras conocidas como Smads, que modula la transcripción de una serie de genes diana, incluidos los descritos en este documento, que participan en la formación de cicatrices. Véase Tseng, et al., Ocular Surface J., 2(3):177-187 (2004); Massague, et al., Genes and Development., 14:627-44 (2000); y Derynck, et al., Biochem. Biophys. Acta., 1333:F105-F150 (1997).
- 25 La supresión de TGF- $\beta$  se puede lograr neutralizando los anticuerpos contra TGF- $\beta$  y los agentes que interceden la señalización mediada por TGF- $\beta$  tal como la decorina. Véase Shahi, et al., Lancet, 339:213-214 (1992); Petroll, et al., Curr. Eye Res., 1739:736-747 (1998); Yamaguchi, et al., Nature, 346(6281):281-284 (1990); y Logan, et al., Exp. Neurol., 159:504-510 (1999). La mayor parte de la literatura ha demostrado que la supresión de TGF- $\beta$  se logra al nivel de la modulación de la activación de TGF- $\beta$ , la unión con su receptor o su transducción de señal. Se ha demostrado que la membrana amniótica puede lograr dicha inhibición a nivel de transcripción, esto es, para desactivar la transcripción de los genes TGF- $\beta$ . En particular, se ha demostrado que la membrana amniótica suprime la señalización de TGF- $\beta$  en fibroblastos de córnea y limbo humanos, y fibroblastos de cuerpo conjuntival y pterigio humanos. Véase Tseng, et al., J Cell Physiol., 179:325-335 (1999); y Lee, et al., Curr. Eye Res., 20(4):325-334 (2000).
- 35 La aplicación de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se puede usar para disminuir la producción o actividad de TGF- $\beta$ . Se prepararon varios tipos de composiciones de AM, tal como AME (extracto humano total de AM), el sobrenadante de AME después de la centrifugación, la gelatina de AM y el estroma de AM como se detalla en el ejemplo 1. Se examinó el efecto de diversas soluciones reguladoras, tal como PBS, solución reguladora con bajo contenido de sal, solución reguladora con alto contenido de sal y guanidina HCl en la actividad de TGF- $\beta$ . Además, se examinó el efecto de diversos procedimientos de molienda por congelación en la actividad de TGF- $\beta$ .
- 45 La supresión de la actividad de TGF- $\beta$  se perdió después de la digestión con hialuronidasa, lo que demuestra que el efecto supresor puede estar mediado por un complejo relacionado con HA (figura 3). El efecto supresor no se recuperó mediante la adición de HA. La etapa de centrifugación no alteró la supresión de la actividad de TGF- $\beta$  en los extractos de AME o gelatina de AM (figura 5). La liofilización mejoró la supresión de la actividad de TGF- $\beta$  de tanto el extracto de AME como de gelatina de AM (figura 6). La figura 8 y la figura 9 demuestran que el colágeno y el HA, cuando se añaden al AME, pueden mejorar la supresión de la actividad del TGF- $\beta$ . De acuerdo con lo anterior, la adición de colágeno y HA a las composiciones basadas en AM puede ser útil para tratar diversas enfermedades que implican TGF- $\beta$ .
- 50 Como se muestra en este documento, mediante las composiciones descritas se inhibe la expresión del TGF- $\beta$ . De acuerdo con lo anterior, las composiciones descritas en este documento se pueden usar para tratar enfermedades relacionadas con inhibición de la expresión de TGF- $\beta$ , tales como angiogénesis, cicatrización de heridas e inflamación de tejidos.
- 55 Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden prevenir la apoptosis.
- Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden usar para prevenir, disminuir o tratar la apoptosis en tejidos. En algunas realizaciones, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden disminuir o prevenir la apoptosis en tejidos que han

sido lesionados. Este efecto antiapoptótico demuestra que las composiciones se pueden usar para prolongar la vida de los órganos almacenados antes del trasplante. Las composiciones también se pueden usar para tratar o prevenir daños durante y después de procedimientos quirúrgicos. El ejemplo 3 demuestra el efecto antiapoptótico del extracto de AM usando un modelo murino de daño ocular. Los ojos de los ratones fueron recolectados y dañados ya sea por tratamiento enzimático o por lesión mecánica; Se administró extracto de AM y se determinó el efecto sobre el daño celular, usando un ensayo que mide el daño apoptótico en el núcleo. Se encontró que la incubación con extracto de AM disminuye los niveles de apoptosis.

Debido a los efectos antiapoptóticos ejercidos por la preparación de AM, se espera que las preparaciones y composiciones de AM sean útiles para preservar tejidos (por ejemplo, córnea) antes del trasplante. La adición de preparaciones de AM a los tejidos que se almacenan puede ser útil para disminuir el daño celular debido al procedimiento de almacenamiento. Por ejemplo, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden usar para disminuir la cantidad de degradación que se produce en un tejido que se almacena antes del trasplante o los procedimientos quirúrgicos. Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden añadir al medio de almacenamiento, con o sin colágeno y/o HA. Los tejidos almacenados tales como los ojos, órganos, piel y similares se pueden beneficiar de la disminución de la apoptosis celular que se produce cuando se añade una composición de AM.

Una vez que se recolecta un tejido donante, por lo general se almacena en un medio de almacenamiento hasta el trasplante. Las composiciones se pueden añadir al medio de almacenamiento para prevenir la apoptosis celular. Por ejemplo, las composiciones se pueden añadir a los medios de almacenamiento para preservar las células madre epiteliales del limbo. De manera similar, las composiciones que contienen la preparación de AM se pueden añadir al medio de cultivo celular o al medio de digestión para prevenir la apoptosis celular (por ejemplo, queratocito). Debido a que los estudios descritos en este documento muestran que la incubación de la preparación de AM durante la digestión con dispasa (un tratamiento que imita los traumatismos quirúrgicos y patológicos, tal como la ablación de excímeros en PRK y la erosión de la córnea recurrente, respectivamente) redujo significativamente la apoptosis tanto de las células epiteliales como de los queratocitos, las composiciones también se pueden administrar a un ojo que recibe un raspado mecánico o una fotoablación con láser de excímero para intentar reducir la apoptosis del queratocito y, por consiguiente, reducir la neblina de la córnea. Como otro ejemplo, las formulaciones que contienen la preparación de AM también se pueden usar en afecciones quirúrgicas o enfermedades tales como la erosión de la córnea recurrente o el queratocono, donde la membrana basal se disuelve para reducir la apoptosis del queratocito.

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden prevenir o revertir la formación de cicatrices y se pueden usar para ayudar en la cicatrización de heridas.

En seres humanos adultos y otros vertebrados de mamíferos, la cicatrización de heridas en tejidos tal como la piel es generalmente un procedimiento reparador, en contraste con un procedimiento regenerativo que parece tener lugar en la cicatrización del tejido fetal y embrionario. El resultado de un procedimiento de reparación de la herida parece estar influenciado por una serie de factores diferentes, que incluyen ambos parámetros intrínsecos, por ejemplo, oxigenación tisular; y parámetros extrínsecos, por ejemplo, vendajes de heridas. Sin embargo, existe evidencia considerable que indica que el procedimiento general de cicatrización y reparación del tejido dañado por la herida, incluida la comunicación celular necesaria, está regulado de manera coordinada en humanos adultos y otros mamíferos por una serie de factores de crecimiento solubles específicos que se liberan. dentro del entorno de la herida y que, entre otras cosas, parecen inducir la neovascularización, la quimiotaxis de los leucocitos, la proliferación de fibroblastos, la migración y la deposición de colágeno y otras moléculas de la matriz extracelular dentro de las heridas. Tales factores de crecimiento que se han identificado y aislado son generalmente proteínas o polipéptidos solubles especializados e incluyen el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, etc.), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento tipo insulina I y II (IGFI e IGFI) y factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos (FGF ácido y FGF básico).

Los miofibroblastos son fenotípicamente intermedios entre células de músculo liso y fibroblastos. Los miofibroblastos desempeñan un papel importante en la morfogénesis y la oncogénesis, la inflamación, la cicatrización de heridas y la fibrosis en la mayoría de los órganos y tejidos. Durante la cicatrización normal de la herida, los fibroblastos migran hacia el área de la herida y se diferencian en miofibroblastos bajo la influencia de factores de crecimiento tal como el TGF- $\beta$ 1 y el estrés mecánico desarrollado dentro de un tejido determinado. Normalmente, los miofibroblastos desaparecen gradualmente por apoptosis en la fase de resolución. Sin embargo, bajo ciertas situaciones patológicas, los miofibroblastos persisten y continúan remodelando la matriz extracelular, dando como resultado la formación de cicatrices. De este modo, la capacidad de controlar la diferenciación de miofibroblastos puede ser útil para prevenir la formación de cicatrices en diversos tejidos durante la cicatrización de heridas. Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden prevenir y revertir la formación de cicatrices y, de este modo, pueden ser útiles para el tratamiento de cualquier enfermedad en la que pueda ocurrir la formación de cicatrices.

En algunas realizaciones, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden disminuir o prevenir la formación de tejido cicatricial. Este efecto se demuestra en el ejemplo 4. Las AMSC

se cultivaron en plástico, colágeno o material de superficie de tejido de AM. Las AMSC cultivadas en plástico se diferenciaron rápidamente a miofibroblastos in vitro. Sin embargo, estos miofibroblastos diferenciados podrían revertirse a AMSC cuando se subcultivaron en matriz de estroma de AM (figura 23). La reversión de la diferenciación de los miofibroblastos también se puede obtener cuando se añade extracto de estroma amniótico a los miofibroblastos diferenciados (figura 25). Además, también se encontró que el extracto estromal de AM previene la diferenciación de miofibroblastos de AMSC (figura 26).

De acuerdo con lo anterior, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden usar para prevenir o revertir la formación de cicatrices causada por cualquier medio. Las composiciones se pueden administrar para tratar arrugas, estrías, cicatrices quirúrgicas, cicatrices de heridas, cicatrices por quemaduras o lesiones mecánicas, y similares.

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden usar para tratar o prevenir la formación de cicatrices debidas a heridas. Las heridas son lesiones corporales internas y externas o lesiones causadas por medios físicos, como mecánicos, químicos, virales, bacterianos, fúngicos y otros organismos patógenos, o medios térmicos, que interrumpen la continuidad normal de las estructuras tisulares. Las heridas pueden ser causadas por accidente, cirugía, organismos patológicos o por procedimientos quirúrgicos.

Además, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden suprimir la migración de fibroblastos. Como se muestra en el ejemplo 5 y en las figuras 27 a 29, se encontró que la AME suprime la migración de los fibroblastos. Explantes de limbo humano (HLE) se cultivaron en SHEM o SHEM suplementado con AME para estudiar la actividad biológica de AME. La AME (a 25 µg/ml) retrasó el inicio del crecimiento epitelial del explante de limbo. La AME suprimió la migración de los fibroblastos de explante del estroma, lo que resultó en una lámina epitelial en crecimiento con mucho menos fibroblastos. Además, la lámina epitelial expandida en SHEM que contiene AME tenía un borde liso, un fenómeno que se asemeja cuando HLE se cultivó en SHEM con SB203580 10 µM - un inhibidor de MAPK p38. Las secciones histológicas del explante restante después del crecimiento revelaron que sin AME, era evidente un aumento en la disolución de la matriz estromal. De este modo, la AME puede inhibir la migración de los fibroblastos al prevenir la lisis de la matriz estromal. Estos descubrimientos indican que la AME se puede usar para desarrollar nuevos productos para modificar la cicatrización de heridas en la dirección que promueve la expansión de las células madre de la córnea humanas y contra la inflamación, cicatrización y angiogénesis.

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden usar durante o después de la cirugía, para mejorar la cicatrización y para disminuir la cantidad de daño tisular por traumatismos mecánicos en el tejido. El uso aplicable de las composiciones y métodos descritos en este documento es generalizado e incluye, pero no se limita a todos los tipos de cirugía, tal como plástico, médula espinal o sección de la cesárea; enfermedades, tales como el cáncer, la insuficiencia cardíaca congestiva y la enfermedad renal; y condiciones como resultado de quemaduras, acné u otras lesiones. Los métodos descritos en este documento pueden ser usados por médicos en cirugías plásticas o reconstructivas. Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento también se pueden aplicar por vía tópica en la superficie del cuerpo o en los tejidos para lograr efectos terapéuticos a corto y largo plazo.

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden usar para tratar o prevenir el daño debido a una enfermedad ocular. Los tipos de enfermedades oculares que se pueden tratar administrando las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, ojo seco, lesión de la córnea, úlcera de la córnea, síndrome de Sjogren, daño por lentes de contacto, infección micótica, infección viral o infección bacteriana, lesión mecánica, daño quirúrgico, daño por quemadura, inflamación de la conjuntiva, penfigoide ocular, síndrome de Stevens-Johnson, lesión química y similares.

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento también se pueden usar para tratar enfermedades epidérmicas. Los tipos de enfermedades de la capa epidérmica que pueden tratarse administrando las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, enfermedades fúngicas, virales, bacterianas, erupciones cutáneas, eczema, psoriasis, ictiosis, hiperqueratosis epidermolítica y similares.

Tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

Como se describe en este documento, la actividad antiangiogénica de las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se demostró usando extractos de proteínas solubles preparados a partir del estroma avascular de AM criopreservado. Se encontró que el extracto estromal de AM (ASE) tiene una potente acción antiangiogénica sobre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) cultivadas al inhibir la proliferación, inducir la apoptosis, atenuar la migración e inhibir la formación de tubos. El ejemplo 8 demuestra que un extracto estromal de membrana amniótica (ASE) tiene propiedades antiangiogénicas. Se encontró que el ASE inhibe la proliferación de células HUVEC (figura 34). También se encontró que el ASE induce apoptosis en células HUVEC (figura 35). El efecto inhibitorio de ASE sobre la migración celular inducida por VEGF se demostró usando un ensayo de Transwell (figura 37). Se descubrió además que el ASE inhibía la formación de tubos de células HUVEC (figura 38).



En conjunto, estos resultados demuestran que las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis. Las enfermedades relacionadas con la angiogénesis que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, crecimiento tumoral, cáncer y de afecciones oftalmológicas, tal como rechazo del injerto de córnea, neovascularización ocular, neovascularización retiniana, incluida neovascularización después de una lesión o infección, retinopatía diabética, degeneración macular, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, isquemia retiniana, hemorragia vítrea y similares.

Los tipos de cáncer de ejemplo que pueden tratarse usando las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, carcinoma, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebelar, cáncer del útero, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, tumor de células germinales extragonadales, cáncer de ojo, melanoma intraocular, cáncer de ojo, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales (Extracraneal), tumor de células germinales (Extragonadal), tumor de células germinales (ovario), tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, Glioma hipotalámico y de visual, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (células renales), cáncer de la laringe, leucemia (linfoblástica aguda), leucemia (mieloide aguda), leucemia (linfocítica crónica), leucemia (mielógena crónica), cáncer de cavidad oral y de labio, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (células no pequeñas), cáncer de pulmón (células pequeñas), linfoma (células T cutáneas), linfoma (no de Hodgkin), histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello con tumor primario oculto, síndrome de neoplasia de endocrina múltiple, neoplasma de mieloma múltiple/células plasmáticas, micosis fungoides, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer de la nasofaringe, Neuroblastoma, cáncer bucal, cáncer de la orofaringe, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de potencial maligno de ovario bajo, cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasma de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer de recto, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándula salival, sarcoma (Kaposi), sarcoma (uterino), síndrome de Sezary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel (células de Merkel), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), linfoma de células T, cáncer de testículo, timoma, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico, cáncer gestacional, uretral, cáncer de útero, endometrio, sarcoma uterino, cáncer de vagina, vía visual y glioma hipotalámico, cáncer de la vulva, tumor de Waidenström, Macroglobulinemia, Wilms, y similares.

#### Tratamiento de la inflamación

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden usar para disminuir la inflamación. La AM contiene muchos factores que pueden contribuir/mediar en su capacidad antiinflamatoria, tal como la interleucina-10 (IL-10), los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), los inhibidores de la proteasa y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA). Se sabe que la IL-10 suprime y contrarresta las citocinas proinflamatorias, tal como la IL-6, el TNF $\alpha$  y la IL-8. Véase Foutunato, et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 175:1057-65 (1996); Foutunato, et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 177:803-9 (1997); y Foutunato, et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 179:794-9 (1998). La activina e inhibina, que son miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ , son producidas por la AM. Las diferentes dosis de activina dan lugar a diferentes resultados. A dosis bajas de activina, se estimula la producción de IL-6, IL-8 y prostaglandina E2 (PGE2), pero a dosis altas, inhibe la producción. Véase Petraglia, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77:542-8 (1993); Riley, et al., *Hum. Reprod.* 15:578-83 (2000); y Keelan, et al., *Placenta*, 31:38-43 (2000). La AM también contiene inhibidores de la proteasa, tal como la antitripsina  $\alpha$ 1, que puede ejercer un efecto antiinflamatorio. Véase Na, et al., *Trophoblast Res.*, 13:459-66 (1999). IL-1RA es un inhibidor de IL-1 y, por lo tanto, suprime la inflamación mediada por IL-1. Véase Romero, et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 171:912-21 (1994). Los inventores han demostrado que AM inhibe la expresión y producción de IL-1 y favorece la expresión de IL-1RA. Véase Tseng, et al., *Ocular Surface J.*, 2(3):177-187 (2004).

Los macrófagos activados desempeñan un papel importante en el inicio, mantenimiento y resolución de las respuestas inflamatorias del huésped. Además de matar virus, bacterias y parásitos, y para actuar como células secuestrantes, los macrófagos también ejercen efectos perjudiciales sobre el huésped al producir excesivos radicales libres, enzimas líticas y citoquinas inflamatorias, que agravan colectivamente el daño tisular y son responsables de muchos de los síntomas sistémicos asociados a la inflamación aguda y crónica.

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden suprimir los macrófagos que conducen a efectos inflamatorios, como se muestra en el ejemplo 6 y las figuras 30-33. La línea celular de macrófagos de ratón, Raw 264.7, se usó como modelo para probar la acción antiinflamatoria con o sin activación de IFN $\gamma$ . La membrana amniótica (AM) crioconservada suprimió la producción de NO por las células Raw264.7, especialmente bajo la estimulación de IFN $\gamma$ . Además, la producción de PGD2 se favoreció más que la PGE2 cuando las células se cultivaron en AM en comparación con las células cultivadas en plástico. La proporción entre PGD2 y PGE2, un índice de acción antiinflamatoria, fue significativamente mayor en las células cultivadas en AM en comparación con las que se cultivaron en plástico.

La acción antiinflamatoria anterior se correlacionó con la supresión de la señalización de TGF- $\beta$  ya que la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 en Raw264.7 fue significativamente mayor cuando se cultivó en AM que en cultivo sobre plástico. Además, la adición de 125  $\mu$ g/ml de AME indujo la muerte celular de las células Raw264.7. Juntos, estos resultados demuestran que las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento pueden suprimir los macrófagos que conducen a acciones antiinflamatorias.

De acuerdo con lo anterior, las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento se pueden usar para tratar enfermedades relacionadas con la inflamación de tejidos. Los trastornos inflamatorios se caracterizan por lo general por uno o más de los signos de dolor, (dolor, de la generación de sustancias nocivas y la estimulación de los nervios), calor (calor, de vasodilatación), enrojecimiento (rubor, de vasodilatación y aumento del flujo sanguíneo), hinchazón (tumor, por flujo excesivo o flujo restringido de salida de líquido) y pérdida de función (función laesa, que puede ser parcial o completa, temporal o permanente). La inflamación toma muchas formas e incluye, pero no se limitan a, una inflamación que es una o más de las siguientes: aguda, adhesiva, atrófica, catarral, crónica, cirrótica, difusa, diseminada, exudativa, fibrinosa, fibrosa, focal, granulomatosa, hiperplásica hipertrófica, intersticial, metastásico, necrótico, obliterante, parenquimatosa, plástico, productivo, prolífero, pseudomembranoso, purulento, esclerosante, seroplástico seroso, simple, específico, subagudo, supurativo, tóxico, traumático, ulcerativo y similares.

Los trastornos inflamatorios de ejemplo que pueden tratarse con las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, artritis (incluida la artritis reumatoide, espondiloartropatías, artritis gotosa, enfermedades articulares degenerativas (esto es, osteoartritis), lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, espondilitis anquilosante, espondilitis indiferenciada, enfermedad de Behcet, anemias hemolíticas autoinmunes, esclerosis múltiple, esclerosis amiotrófica lateral, amilosis, hombro doloroso agudo, psoriásica y artritis juvenil), asma, aterosclerosis, osteoporosis, bronquitis, tendinitis, bursitis, trastornos de la inflamación de la piel (es decir, psoriasis, eczema, quemaduras, dermatitis), enuresis, enfermedad eosinofílica, trastornos gastrointestinales (incluida enfermedad inflamatoria del intestino, úlceras pépticas, enteritis regional, diverticulitis, hemorragia gastrointestinal, enfermedad de Crohn, gastritis, diarrea, síndrome del intestino irritable y colitis ulcerosa), enfermedad por reflujo gastroesofágico, esofagitis eosinofílica, gastroparesia tal como la gastroparesia diabética; intolerancias alimentarias y alergias alimentarias y otros trastornos funcionales del intestino, tales como dispepsia no ulcerativa, dolor torácico no cardíaco y similares.

Las preparaciones de AM y las composiciones purificadas descritas en este documento también se pueden usar para tratar, por ejemplo, la inflamación asociada con: enfermedades vasculares, migrañas, cefaleas tensionales, periarteritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, esclerodermia, fiebre reumática, diabetes tipo I, miastenia gravis, sarcoidosis, síndrome nefrótico, síndrome de Behcet, polimiositis, gingivitis, hipersensibilidad, conjuntivitis, esclerosis múltiple e isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio) y similares. Los compuestos pueden ser útiles para tratar la neuroinflamación asociada con trastornos cerebrales (por ejemplo, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer) y la inflamación crónica asociada con la lesión por radiación craneal. Los compuestos pueden ser útiles para tratar afecciones inflamatorias agudas (tales como las que resultan de una infección) y afecciones inflamatorias crónicas (tales como las que resultan de asma, artritis y enfermedad inflamatoria intestinal). Los compuestos también pueden ser útiles en el tratamiento de la inflamación asociada con traumas y mialgias no inflamatorias.

Las composiciones y métodos descritos en este documento se proporcionan con más detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Actividades supresoras de diversas preparaciones de membrana amniótica

##### Digestión de hialuronidasa

Los extractos solubles en agua (AME) totales de AM preparados a partir de AM congelada se mezclaron con o sin 10 unidades/ml de hialuronidasa (Sigma #H1136) en la solución reguladora de reacción (HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.1 M, Triton X-100 al 1%, BSA al 0.1%, suplementado con la proteasa y los inhibidores de fosfatasa anteriores durante 2 horas a 37 °C usando un control positivo de HA de alto MW (cat. No. H1876, Sigma) purificado a partir de cordones umbilicales humanos.

Cultivo celular y supresión del promotor de TGF- $\beta$ 1

5 Cuando los fibroblastos de la córnea humanos cultivados en una placa de plástico de 100 mm en DMEM/FBS al 10% alcanzaron una confluencia del 80% ( $\sim 1.0 \times 10^6$  células), las células se lavaron dos veces con DMEM/FBS al 10%. Adenovirus-TGF- $\beta$ 1 promotor-luciferasa (MOI = 37.5) y Adeno-CMV-beta-gal (MOI = 30) se añadieron a las placas de cultivo con 10 ml de DMEM fresco/FBS al 10% y las células se incubaron a 37°C. °C, durante 4 horas, y se tripsinizó durante 5 minutos usando 4 ml de tripsina precalentada/EDTA. Después de neutralizar la actividad de la tripsina/EDTA con 8 ml de DMEM/FBS al 10%, las células se recogieron en un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 1,500 rpm ( $\sim 600 \times g$ ) durante 5 min. Después de decantar el medio, las células se resuspendieron en 15 ml de DMEM/FBS al 10%, y se midió la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripano. Se sembraron células viables  $3 \times 10^4$  en 24 pocillos de plástico o en la superficie estromal de los insertos de AM. Se prepararon un total de 4 pocillos o insertos. Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

10 Después de eliminar cuidadosamente el medio de crecimiento de cada pocillo, las células se enjuagaron con 0.5 ml de PBS al menos dos veces, teniendo cuidado de no desalojar las células unidas. Después de retirar tanto como PBS en el pozo, se añadieron 100  $\mu$ l de solución reguladora de lisis 1x para cubrir las células, y las células se rasparon mecánicamente y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga colocado en hielo. Los lisados celulares se recogieron mediante agitación con vórtex durante 10-15 segundos y se centrifugaron a 12,000  $\times g$  durante 15 segundos a temperatura ambiente. El sobrenadante designado como lisado celular se almacenó a -80 °C antes de analizar las actividades de luciferasa.

Supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 por diferentes extractos de AM

20 En la figura 1, en comparación con el control plástico (PL), tanto la porción placentaria como la porción fetal de la membrana amniótica congelada (FRO/P y FRO/F, respectivamente) mostraron una supresión significativa de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 (cada  $P < 0.01$ ). Para la placenta fresca, la porción placentaria de la membrana amniótica (FRE/P) también mostró una supresión significativa de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, la porción fetal de la membrana amniótica fresca (FRE/F) no mostró ningún efecto supresor ( $P = 0.5$ ).

25 Estos resultados indicaron que la porción fetal de la membrana amniótica fresca no tiene el mismo efecto anticatrazación que la contraparte congelada. Para la membrana amniótica congelada, el efecto supresor de la porción placentaria (FRO/P) no fue significativamente diferente del efecto de la porción fetal ( $P = 0.3$ ). Para la membrana amniótica fresca, el efecto supresor de la porción fetal (FRE/F) no fue significativamente de la porción placentaria (FRE/P) ( $P = 0.1$ ). Para la porción placentaria, el efecto supresor de la membrana amniótica congelada (FRO/P) fue significativamente mejor que la membrana amniótica fresca (FRE/P) ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, en la porción fetal, el efecto supresor de la membrana amniótica congelada (FRO/F) no fue significativamente diferente del efecto supresor de la membrana amniótica fresca (FRE/F) ( $P = 0.1$ ).

La supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 depende de la dosis y se pierde después de la digestión con hialuronidasa

35 La supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 por los extractos de AM solubles en agua totales preparados a partir de AM congelada obedeció a una curva de respuesta a la dosis de 0.04 a 125  $\mu$ g/ml (figura 2). Como lo demuestra la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ RII, el efecto supresor de 25  $\mu$ g/ml del total de extractos de AM solubles en agua preparados a partir de AM congelada se perdió cuando se trató previamente con hialuronidasa, lo que indica que dicho efecto supresor mediada por un complejo relacionado con HA (figura 3). Cabe señalar que los extractos de 25  $\mu$ g/ml de AM contenían menos de 0.78  $\mu$ g/ml de HA.

El efecto supresor perdido de la hialuronidasa no se puede recuperar mediante la adición de HA

Aunque 100  $\mu$ g/ml de HA de alto MW solo mostró una actividad supresora leve, su magnitud todavía era significativamente menor que 25  $\mu$ g/ml de extractos de AM. En conjunto, estos datos sugieren que el efecto supresor de los extractos de AM estuvo mediado por el complejo unido a HA, esto es, el complejo HA- $\alpha$ 1.

45 Extractos de AME soluble y gelatina derivados después de la centrifugación no cambian el efecto supresor en las actividades del promotor de TGF- $\alpha$ 1

En comparación con el control de PBS, HA, AM (total, baja velocidad, alta velocidad) y gelatina (total, baja velocidad, alta velocidad) mostraron la supresión de la activación del promotor de TGF- $\alpha$ 1 cuando se normalizó con la actividad betagalatosidasa. El valor de P indicó que no fue estadísticamente significativo debido a la variación entre el grupo de control (datos no mostrados). Al comparar la AME total y las dos condiciones de la AME soluble centrifugada, los resultados sugirieron que no hubo diferencias significativas. Sin embargo, sin la centrifugación de la AME se observó una menor supresión en comparación con la AME baja o alta soluble. Del mismo modo, gelatina/T indicó menos actividades de supresión de TGF- $\alpha$  en comparación con gelatina/HS (figura 5).

La liofilización mejoró el efecto supresor de AME y extracto de gelatina

Los fibroblastos de la córnea humanos no mostraron cambios en la morfología celular en el control, HA solo y bajas concentraciones de AME o extractos de gelatina (datos no mostrados). Sin embargo, las células mostraron un marcado cambio a células delgadas y pequeñas después del tratamiento con alta concentración de AME y L/AME, tan pronto como 18 horas después de la siembra (figura 6). Adicionalmente, la densidad celular también disminuyó.

5 Los cambios anteriores fueron incluso más dramáticos en AME liofilizado o L/AME que sus homólogos no liofilizados en extractos de AME o gelatina, respectivamente (figura 6).

Para examinar si el promotor de TGF-beta se suprimió durante el tratamiento con AME, se realizaron ensayos de luciferasa. Se usó el ensayo de beta-galactosidasa como el control de transfección. El resultado indicó que AME-125, L-AME-25, L-AME-125, L-gelatina-125 mostraron diferencias significativas en la inhibición de las actividades del promotor de TGF-beta 1, el porcentaje de inhibiciones fue del 86% (P <0.01), 55% (P <0.1), 95% (P <0.01) y 46% (P <0.1), respectivamente (figura 7). Los datos sugieren que la forma liofilizada de AME o gelatina a una alta concentración de 125 µg/ml fue más eficaz que la forma de AME no liofilizada. Aunque la concentración más baja de HA comercial (4 µg/ml) fue cercana a la concentración de HA (3.8 µg/ml) en AME/125, la eficacia de la supresión en AME/125 es mucho más potente que HA. (Datos no mostrados) Adicionalmente, la forma AME en general ilustró una mejor supresión de TGF-beta que la forma de gelatina.

10  
15

Supresión de la actividad del promotor de TGF-β1 por extractos de AM mezclados con gel de colágeno o HA

Luego se preparó una mezcla de gel de colágeno tipo 1 nativo y extracto de AM soluble en agua. Para preparar esta mezcla, primero se preparó gel de colágeno diluyendo una solución madre de colágeno de 4 mg/ml preparada a partir del tendón de cola de rata (BD Biosciences, San Jose, CA) con ácido acético 0.1 N y mezclándolo con una proporción de volumen 1/20 de 20X DMEM y NaOH 1N. Después de la incubación a 37 °C, se formó un gel de colágeno. A continuación, el extracto de AM soluble en agua (preparado como se describe en este documento) se diluyó en DMEM a una concentración de 25 µg/ml y luego se mezcló con el gel de colágeno. El efecto supresor del extracto de AM mezclado en el gel de colágeno tipo 1 fue similar al de los extractos de AM (AME) usados solos, en comparación con el control que se añadió con BSA solo (figura 8, p <0.01). Aunque el gel de colágeno solo (Col) también mostró una actividad supresora similar en comparación con el control de plástico (figura 8, p <0.01), la adición de AME en el gel de colágeno (Col + AME) resultó en una supresión adicional (figura 8, p <0.01). Cuando los extractos de AM solubles en agua (AME) se mezclaron en gel de HA, el efecto supresor sobre la actividad del promotor de TGF-β1 se conservó mejor en comparación con el HA solo (mezclado con BSA como control) (figura 5, p <0.01) similar al que ejerce AME solo (figura 9). De acuerdo con lo anterior, una composición de extracto de AM, o su combinación con colágeno, puede ser útil para suprimir la actividad de TGF-β en el tejido ocular.

20  
25  
30

Ejemplo 2: Caracterización de componentes de membrana amniótica

Material y métodos

La concentración de proteínas en cada extracto se cuantificó mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL). La concentración de ácido hialurónico (HA) en cada extracto se analizó con el kit de prueba cuantitativa de ácido hialurónico (HA) (Corgenix, Westminster, CO) basado en ELISA usando una curva estándar proporcionada por el fabricante preparada por dilución en serie de HA.

35

Análisis de intervalo de peso molecular de HA por digestión con hialuronidasa

Los intervalos de peso molecular de HA de los extractos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa según el método descrito por Lee and Cowman (Lee H.G. and Cowman, M. K. An Agarose Gel Electrophoretic Method for Analysis of Hyaluronan Molecular Weight Distribution. Analytical Biochemistry, 1994, 219,278-287). Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.5%, seguido de tinción usando 0.005% de Stains-All (Sigma, cat. No. 23096-0) en etanol al 50%. El gel se tiñó durante la noche bajo una cubierta protectora de la luz a temperatura ambiente (períodos de tinción más cortos de 3-4 horas también pueden dar resultados aceptables). La HA se visualizó como bandas azules después de destañir transfiriendo el gel a H<sub>2</sub>O y se expuso a la luz de la habitación durante aproximadamente 6 horas. Los estándares de peso molecular incluían fragmentos de restricción lambda digeridos con ADN-BstE II (cat. No. D9793, Sigma) con un intervalo de MW desde 0.9 a 5.7 x 10<sup>6</sup>. La autenticidad de HA se verificó además mediante incubación del extracto con o sin 10 unidades/ml de hialuronidasa. (Sigma # H1136) en la solución reguladora de reacción (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.1 M, Triton X-100 al 1%, BSA al 0.1% suplementado con los inhibidores de la proteasa y la fosfatasa anteriores) durante 2 horas a 37 °C usando un control positivo de HA de alto MW (cat. No. H1876, Sigma) purificado a partir de cordones umbilicales humanos.

40  
45  
50

Análisis de Transferencia Western

Los extractos anteriores se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida desnaturalizados al 4-15% y se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa, y luego se inmunotransferieron con un inhibidor de la inter-α-tripsina antihumano de conejo (anticuerpo policlonal de conejo (cat. No. A0301, DAKO en 1:1000), un anticuerpo policlonal TSG-6 antihumano de conejo (proporcionado por el Dr. Tony Day a una dilución 1:1000), un anticuerpo monoclonal antiPTX3 de rata (Alexis Biochemicals, ALX-804-464, 1 µg/ml), un anticuerpo antitrombospondina-1 obtenido de

55

Calbiochem (cat. No. BA24), y un anticuerpo de Smad7 antihumano de cabra (AF2029, 1:1000, R & D Systems). Las bandas de proteínas inmunorreactivas fueron detectadas por reactivo Western Lighting™ Chemiluminescence (PerkinElmer).

#### Resultados

- 5 Los experimentos mostraron que el efecto supresor observado en la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 se suprimió cuando los extractos de AM solubles en agua se precalentaron a 90 °C, durante 10 minutos, lo que sugiere que el componente o componentes responsables probablemente contiene (n) proteína (s), de los cuales la conformación es importante.

#### Cuantificación de HA y proteínas en extractos de AM

- 10 Los resultados resumidos en la tabla a continuación mostraron que todos los extractos de AM y gelatina contenían tanto HA como proteínas. En general, la proporción en peso entre proteínas y HA fue alta en el extracto total que en el sobrenadante (por ejemplo, L y H para PBS y A para solución reguladora A) después de la centrifugación para AM, lo que sugiere que la mayoría de los materiales que contienen proteínas se eliminaron mediante centrifugación.
- 15 Sin embargo, esta tendencia no se observó en gelatina de AM, lo que sugiere que los extractos de AM contenían más proteínas que gelatina (véase T en PBS y T en A/B/C). La proporción entre proteínas y HA también se aumentó desde el extracto A hasta los extractos B y C tanto para la gelatina de AM como para AM, lo que apoya aún más que el HA estaba presente principalmente en la forma soluble, y viceversa que las proteínas se encontraron más en los componentes insolubles en agua. Adicionalmente, el HA se eliminó en gran parte de gelatina de AM después de la centrifugación en A/B/C.

Tejido	AM												Gelatina									
	PBS						A/B/C						PBS			A/B/C						
	T	L	H	T	A	B	C	T	L	H	T	A	B	C	T	L	H	T	A	B	C	
solución reguladora																						
Fracción																						
Proteína (µg/ml)	8645	1370	1467	8645	2731	930	2698	3836	3645	3589	3836	3893	527	1364								
HA (µg/ml)	75	62	44	60	74	7	35	80	90	96	129	94	2	7								
Proteína/HA	115	22	33	144	37	133	77	48	41	37	48	41	264	195								

[Nota]: T: total, L: el sobrenadante después de la centrifugación a baja velocidad del extracto total, H: el sobrenadante después de la centrifugación a baja velocidad del extracto total, A, B, C: Extractos, véase el texto.

El HA en diferentes extractos de AM tienen pesos moleculares superiores a un millón de Dalton

5 El alto peso molecular ( $> 10^6$  dalton) de HA estuvo presente en los extractos totales y el extracto A (figura 10). Sin embargo, incluso un MW mayor de HA estaba presente en el extracto B, mientras que el HA se encontró en una banda estrecha con un MW aún mayor en el extracto C (figura 10). Todos los componentes que contienen HA desaparecieron después de la digestión con hialuronidasa, lo que confirma que efectivamente contenían HA. En comparación con el control positivo de HA obtenido de Sigma (cat. No. H1136), también se encontró un alto peso molecular similar ( $> 10^6$  dalton) de HA en ambos sobrenadantes obtenidos después de bajas y altas velocidades de centrifugación (figura 11). Nuevamente, estas bandas que contienen HA desaparecieron después de la digestión con hialuronidasa. Se obtuvo un resultado similar para la gelatina de AM (no se muestra).

10 El inhibidor de la tripsina inter- $\alpha$  ( $I\alpha I$ ) está presente en diferentes extractos de AM y sus cadenas pesadas (HC) están unidas de manera covalente con el HA

15 La figura 12 mostró que antes de la digestión con hialuronidasa, las cadenas pesadas libres estaban presentes en diferentes complejos, y también estaba presente una pequeña cantidad de cadena ligera (UTI o bikunin). Sin embargo, en todos los extractos, esto es, el total y los extractos A, B y C, también hubo un complejo unido covalentemente entre el HA y las cadenas pesadas de  $I\alpha I$ , ya que este último se liberó solo después de la digestión con hialuronidasa. El mismo resultado se obtuvo en los extractos H y L obtenidos por dos velocidades diferentes de centrifugación (figura 13).

El gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TSG-6) también está presente en los extractos de AM

20 La figura 14 mostró que TSG-6 (~38 kDa) estaba presente en total, extracto A y extracto C. En el extracto A, había una banda de ~38 kDa migrada cerca de la del TSG-6 purificado (35kD). La identidad de otras bandas de ~45 y 55kDa era desconocida. El extracto de AM total (sin centrifugación) "T" mostró dos bandas (ambas por encima de 35 kD), y la más alta (55 kD) que se encontró en el extracto A (después de la centrifugación), mientras que la inferior (45 kD) se encontró en el extracto C. Todas estas bandas no se alteraron significativamente cuando las muestras se trataron con hialuronidasa (figura 14) o con F-glicosidasa (figura 15). Sin embargo, la digestión con condroitina sulfato ABC liasa dio como resultado una banda de 38 kD más notable usando el anticuerpo RAH-1 (figura 16) pero no usando el anticuerpo MAB2104 (figura 17).

25 La pentraxina (PTX-3) está presente exclusivamente en extractos de AM solubles en agua y forma un complejo con HA

La figura 18 mostró que PTX3 también podría estar presente en extractos de AM y forma un complejo con HA en el extracto A soluble en agua solamente.

30 Trombospondina (TSP-1) está presente en diferentes extractos de AM

La figura 19 mostró que todos los extractos de AM tenían una banda de alto peso molecular de TSP-1, mientras que el extracto total (T) y el extracto C también tenían algunas bandas entre 35-120 kDa. La digestión con hialuronidasa no cambió el patrón reactivo, excepto que algunas bandas se volvieron un poco más fuertes o más débiles.

Smad7 está presente principalmente en extractos de AM insolubles en agua

35 Se encontró Smad 7 tanto en extractos de PBS como en extractos de urea de AM (figura 20).

Ejemplo 3: Los extractos de AM solubles en agua previenen la muerte celular de las células epiteliales de la córnea (células basales y queratocitos) inducidos por el almacenamiento y por las lesiones causadas por medios mecánicos y enzimáticos

#### Resultados

40 Para demostrar que los extractos de AM pueden prevenir la apoptosis en tejidos lesionados, el siguiente experimento se realizó usando un modelo murino. Se enuclearon un total de 22 globos oculares de ratón, dos de los cuales se incluyeron inmediatamente en OCT para las secciones congeladas como control de pretratamiento. Los restantes 20 globos oculares se subdividieron en tres subgrupos, a saber: 1) raspado mecánico (n = 8), 2) digestión (enzimática) (n = 6) y 3) sin control de tratamiento (n = 6). Para cada grupo, se preincubaron números iguales de globos oculares a 4 °C, durante 24 h en presencia (+) o ausencia (-) de 125 µg/ml de extractos de AM en medio sin suero de queratinocitos (KSFM) con suplemento definido (Gibco, Carlsbad, CA) antes de los tratamientos. Al final de las primeras 24 h de incubación en KSFM +/- extracto de AM (preparado como se describe en este documento), 8 globos oculares en el subgrupo 1 se sometieron luego a raspado mecánico con una cuchilla quirúrgica y se dividieron en dos grupos (n = 4 cada uno) e incubaron a 37 °C en extracto de KSFM +/- AM. Seis globos oculares en el subgrupo 2 se sometieron a digestión enzimática con 10 mg/ml de dispasa II en extracto de KSFM +/- AM (n = 3 cada uno) durante 18 horas a 4 °C. Una bola ocular de cada grupo se incluyó en OCT para secciones congeladas. Los dos globos oculares restantes de cada grupo se incubaron en KSFM +/- extracto de AM durante otras 24 h antes del análisis. Para el control sin tratamiento (n = 6), se incubaron 3 globos oculares cada uno en KSFM +/- extracto de AM a 37 °C continuamente durante dos días; una bola ocular se retiró al final del primer día, mientras que dos globos oculares se retiraron al final de 2 días.

Las secciones congeladas de estos globos oculares se sometieron a tinción TUNEL. En resumen, se realizó un ensayo de marcaje de ADN de extremo libre dUTP unido a FITC mediado por desoxirribonucleotidil transferasa terminal (TUNEL) usando el sistema TUNEL fluorométrico DeadEnd™ obtenido de Promega (Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Las secciones se fijaron en formaldehído al 4%, durante 20 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Triton X-100 al 1%. Las muestras se incubaron luego durante 60 minutos a 37 °C con TdT exógena y dUTP conjugado con fluoresceína para la reparación de los extremos de ADN 3'-hidroxilo libres. Las células se trataron con DNasa I como control positivo, mientras que el control negativo se incubó con una solución reguladora que carecía de la enzima rTdT. Los núcleos apoptóticos se marcaron con fluorescencia verde y los núcleos se contratiñieron con DAPI como fluorescencia roja.

La forma soluble en agua del extracto de AM se preparó mediante el método para preparar extracto de AM soluble en agua. Se usó un ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL) para cuantificar la proteína total en el extracto de AM.

La bola de ojo de ratón normal mostró una cantidad mínima de apoptosis solo en la capa superficial del epitelio de la córnea del control no lesionado antes de la incubación en KSFM; no se observó apoptosis en los queratocitos estromales. Sin embargo, después de 24 h de incubación a 4 °C en KSFM, hubo un leve aumento de la apoptosis en los queratocitos del estroma superficial. Dicho aumento de la apoptosis de los queratocitos fue suprimido por el extracto de AM.

También se demostró que el extracto de AM reduce la apoptosis después del daño mecánico a las células. Después del raspado mecánico, la bola del ojo del ratón mostró un aumento significativo de la apoptosis del queratocito. Sin embargo, la incubación con extracto de AM después de raspado mecánico dio lugar a una disminución de la apoptosis de queratocitos.

Los ojos del ratón también se trataron enzimáticamente para dañar las células. La digestión con dispasa a 4 °C, durante 18 h en KSFM produjo una cantidad significativa de apoptosis no solo en los queratocitos sino también en las células epiteliales; para la última apoptosis se encontró que estaba presente no solo en las células epiteliales superficiales, sino también en las células epiteliales basales. La extensión de la apoptosis epitelial y queratocítica fue mucho mayor que la observada después del raspado mecánico. La incubación del extracto de AM durante la digestión con dispasa redujo significativamente la apoptosis de las células epiteliales y los queratocitos. Esto es importante porque el tratamiento con dispasa imita la cirugía (por ejemplo, la ablación de excímero en PRK) y los traumatismos patológicos (por ejemplo, erosión de la córnea recurrente) que se pueden dirigir a la membrana basal. Los resultados de este experimento demuestran que la aplicación de extracto de AM a tejidos con células dañadas se puede usar para reducir o prevenir el daño celular.

Ejemplo 4: Extracto estromal de membrana amniótica desdiferencia los miofibroblastos

#### Materiales

El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), la solución salina equilibrada de Hank (HBSS), la anfotericina B, la gentamicina, el suero fetal bovino (FBS), tripsina al 0.25% /EDTA 0.53 mM, reactivo de ensayo de viabilidad de células vivas y muertas, y faloidina conjugada con FITC se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Albúmina de suero bovino (BSA), suplemento de medio de selenito de insulina-transferrina-sodio, formaldehído, cóctel inhibidor de proteasa, anticuerpo antidesmina de ratón, antiratón conjugado con FITC, cabra, e IgG de rata, yoduro de propidio, y colorante Hoechst-33342 fueron de Sigma (St. Louis, MO). Los insertos Transwell fueron de Corning Incorporated (Corning, NY). El colágeno tipo I fue de BD Biosciences (Bedford, MA). El kit de ensayo de proteínas BCA™ fue de Pierce (Rockford, IL). La dispasa II y la colagenasa fueron de Roche (Penzberg, Alemania). Los anticuerpos anti- $\alpha$ SMA y Ki67 de ratón fueron de DakoCytomation (Carpinteria, CA). El anticuerpo antivimentina de conejo fue de Abcam (Cambridge, MA). El anticuerpo de ratón antiEDA fibronectina fue de Chemicon (Temecula, CA). La IgG antiratón conjugada con HRP fue de BioRad (Hercules, CA). La solución de montaje antidesvanecimiento fue de Vector Laboratories (Burlingame, CA). La AM humana crioconservada se obtuvo de Bio-Tissue (Miami, FL).

#### Cultivos celulares

El tejido humano se manipuló según the Declaration of Helsinki. La placenta humana fresca se obtuvo del Baptist Hospital (Miami, FL) después de una operación de cesárea luego de obtener un consentimiento informado bajo un protocolo aprobado por el IRB. Después de enjuagar dos veces con PBS, incluyendo gentamicina y anfotericina B, la AM se desprendió mecánicamente del corion, se cortó en trozos (-30 mm de diámetro) y se digirió con 10 mg/mL de dispasa II en DMEM con FBS al 10% a 37 °C, durante 20 min. Después de eso, el epitelio amniótico se eliminó mediante desprendimiento quirúrgico en un microscopio de disección, y el estroma restante se digirió más con 2 mg/mL de colagenasa en DMEM con FBS al 10% a 37 °C, durante 14 h. Las células se recogieron por centrifugación a 800 x g durante 5 min, y se resuspendieron y se cultivaron en DMEM con FBS al 10% en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% en aire a 37 °C, el medio de cultivo se cambió cada dos días. La AM antes de la digestión enzimática también se incluyó en O.C.T para la crio-sección. Los tejidos corneoesclerales humanos se obtuvieron del Florida Lions Eye Bank (Miami, FL), de donde se recolectaron los fibroblastos de la córnea (HCF), y se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10%, se usaron células de pasaje secundario (P1) en todos los experimentos.



Preparación de extracto de estroma de AM soluble en agua e insertos de AM

Usando técnicas asépticas, la AM humana crioconservada se lavó brevemente 2-3 veces con HBSS para eliminar el medio de almacenamiento. El estroma de AM se raspó con una espátula, se congeló en la fase de aire de nitrógeno líquido y se molió en partículas finas con BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) seguido de homogeneización en hielo con Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) en PBS, pH 7.4, durante 1 min. El homogeneizado se mezcló por rotación durante 1 h y se centrifugó a 14,000 x g durante 30 min a 4 °C. Luego se recogió el sobrenadante en PBS y se almacenó en alícuotas a -80 °C. Se usó el ensayo de BCA para cuantificar la concentración de proteína. Este extracto de proteína soluble en agua fue designado como extracto de estroma amniótico (ASE). Para la preparación de los insertos de AM, el AM se descongeló inmediatamente antes de su uso, se lavó tres veces con HBSS, se cortó en trozos desde aproximadamente 2.5 x 2.5 cm de tamaño y se fijó a un inserto de cultivo con el lado de la matriz estromal hacia arriba.

Inmunotinción

Las secciones de criostato (4-µm) de AM se fijaron en acetona durante 10 min a -20 °C; las AMSC cultivados y el montaje completo de AM con AMSC se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a 4 °C. Las secciones o las células cultivadas se enjuagaron tres veces durante 5 min cada una con PBS, y luego se incubaron en Triton X-100 al 0.2% durante 10 min. Después de tres enjuagues con PBS durante 5 min cada uno y preincubación con BSA al 2% para bloquear la tinción no específica, las secciones o las células se incubaron con anticuerpos anti-αSMA (1:200), anti-desmina (1: 200) y antivimentina (1:200) durante 1 h. Después de tres lavados con PBS durante 15 min, se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con FITC o Texas Red durante 45 min. Para la marcación de la actina F, las células se tiñeron más con faloidina conjugada con FITC a una concentración de 200 unidades/mL, durante 15 min. Después de tres lavados adicionales de PBS durante 15 min cada uno, los núcleos se tiñeron con PI (1: 2000) durante 1 min o Hoechst-33342 durante 15 min, luego se analizaron con un microscopio de fluorescencia. Para la tinción inmunohistoquímica de Ki67, la actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con un 0.6% de peróxido de hidrógeno durante 10 min. La tinción no específica se bloqueó con suero de cabra normal al 1% durante 30 min. Las células se incubaron luego con anticuerpo antiKi67 (1:50) durante 1 h. Después de tres lavados con PBS durante 15 min cada uno, las células se incubaron con IgG antiratón de conejo biotinilado (1: 100) durante 30 min, seguido de incubación con reactivo ABC, durante 30 min. El producto de reacción se desarrolló con DAB durante 5 minutos y se examinó bajo un microscopio de luz.

Análisis de Transferencia Western

Se recogieron AMSC o miofibroblastos cultivados de plástico, colágeno o superficie de AM y se extrajeron en solución reguladora RIPA frío [Tris · Cl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1 %, y cóctel inhibidor de proteasa]. Cantidades iguales de proteínas extraídas de los lisados se separaron en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio al 4% -15% (SDS-PAGE) y luego se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. Después de 1 h de bloqueo en leche desnatada al 5%, las transferencias se incubaron con anticuerpos primarios para la αSMA y la fibronectina ED-A usando α-actina como control de carga. La unión específica se detectó mediante anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) antiratón o anticonejo, y se visualizó mediante un método de quimioluminiscencia mejorado.

Análisis estadístico

Todos los experimentos descritos anteriormente se repitieron tres veces, cada uno por triplicado o más. Se compararon los promedios de grupo usando la versión apropiada de la prueba t no pareada de Student. Los resultados de las pruebas se informaron como valores de p de dos colas, donde p <0.05 se consideró estadísticamente significativo. Los datos resumidos se presentan como media ± S.D.

Resultados

El fenotipo in vivo de las AMSC

Después de la eliminación de células epiteliales amnióticas por la dispasa II, se pudieron observar las AMSC en AM in situ. A través de un microscopio de contraste de fase, mostraron una morfología dendrítica y mantuvieron contactos intercelulares mediante procedimientos delgados (figura 21A). La viabilidad celular, la morfología dendrítica y los contactos intercelulares se visualizaron mejor mediante tinción con el de vivo y muerto (figura 21B). La inmunotinción de las secciones transversales de AM mostró que las AMSC no expresaban α-SMA (figura 21C) y desmina (figura 21D). En contraste, como control positivo, las células mesenquimales del cordón umbilical mostraron una fuerte tinción tanto para la α-SMA como para la desmina (véase el recuadro de Fig.21C y 21D, respectivamente). Sin embargo, todos las AMSC expresaron vimentina (figura 21E). Estos datos indicaron colectivamente que las AMSC son de un fenotipo de fibroblastos in vivo.

Rápida diferenciación de miofibroblastos de AMSC in vitro

Para investigar la diferenciación de las AMSC in vitro, las AMSC aisladas con colagenasa se sembraron en placas de plástico y se cultivaron en DMEM con FBS al 10% a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup>. En un plazo de 4 a 5 días, las células adoptaron una forma de célula de fibroblasto típica (figura 22A) y se mantuvieron negativas para  $\alpha$ -SMA (figura 22E). Sin embargo, algunas células comenzaron a aumentar el tamaño de la célula, cambiar la forma (figura 22B) y expresar  $\alpha$ -SMA (figura 22F) al final de 1 semana de cultivo. Después de subcultivar a otros platos de plástico en el mismo medio, la mayoría de las células presentaron una forma celular miofibroblástica típica al final de una semana del pasaje uno (figura 22C) y, finalmente, casi todas las células se convirtieron en una forma miofibroblástica y tuvieron microfilamentos prominentes al final de una semana del segundo pasaje (figura 22D). De acuerdo con lo anterior, los miofibroblastos con  $\alpha$ -SMA positivos aumentaron dramáticamente de 71.9  $\pm$  3.7% en el cultivo primario de 1 semana a 93.9  $\pm$  4.1% en el cultivo del pasaje uno y 98.5  $\pm$  1.7% en el cultivo del pasaje dos (figura 22I). Sin embargo, la expresión de desmina todavía era negativa en el pasaje dos cultivos (datos no mostrados). El análisis de transferencia Western reveló que las AMSC in vivo expresaban débilmente fibronectina ED-A pero no expresaban  $\alpha$ -SMA. Sin embargo, la expresión de fibronectina  $\alpha$ -SMA y ED-A aumentó dramáticamente al final del cultivo primario y se mantuvo en el pasaje 2 (figura 22J). Estos resultados indicaron que las AMSC se diferenciaron rápidamente en miofibroblastos en plástico en este medio que contiene suero.

Los miofibroblastos diferenciados de AMSC podrían revertirse si se subcultivan en la matriz estromal de AM

En nuestros estudios previos, hemos demostrado que la AM puede inhibir la diferenciación de miofibroblastos de los queratocitos humanos o de ratón cuando se cultivan en la matriz estromal de AM del cultivo primario. Para investigar más a fondo si la matriz estromal de AM también fue potente en la modulación del fenotipo de miofibroblastos diferenciados o no, los miofibroblastos diferenciados de AMSC en el pasaje 2 se subcultivaron en la matriz estromal de AM, y se compararon con los subcultivados en una placa recubierta con colágeno I como control. Después de 7 días de cultivo en DMEM con FBS al 10%, las AMSC en colágeno I mantenían una forma miofibroblástica (figura 23A). En contraste, las células sembradas en matriz de estroma de AM presentaron una mezcla de formas redondas, de huso, alargadas y dendríticas (figura 23B). El ensayo de vivo y muerto confirmó que las células tanto en el colágeno I (figura 23C) como en la matriz de AM (figura 23D) permanecieron al 100% de viabilidad, pero revelaron una diferencia significativa en la forma de la célula. La inmunotinción a faloidina mostró fibras de estrés vívidas (figura 23E), que también contenían una fuerte expresión de  $\alpha$ -SMA (figura 23G) en miofibroblastos sembrados con colágeno I. En contraste, la tinción con faloidina se volvió débil y con manchas (figura 23F), y la tinción con  $\alpha$ -SMA se oscureció mientras las células se sembraron en una matriz estromal de AM (figura 23H). El análisis de transferencia Western confirmó que los miofibroblastos derivados de AMSC expresaron continuamente cantidades abundantes de fibronectina ED-A y  $\alpha$ -SMA cuando se sembraron en colágeno de tipo I (figura 23I). En contraste, la expresión de la fibronectina ED-A se disminuyó y la de la  $\alpha$ -SMA se hizo indetectable cuando se sembró en matriz de estroma de AM (figura 23I). Estos resultados indicaron colectivamente que los miofibroblastos diferenciados de AMSC aún podrían revertirse a un fenotipo de fibroblasto cuando se subcultivaron en la matriz estromal de AM.

Extracto de estroma amniótico previno la diferenciación de miofibroblastos de AMSC y miofibroblastos diferenciados inversos

Para investigar más a fondo si la actividad de reversión antes mencionada por la matriz estromal de AM se mantuvo en los extractos de estroma de AM solubles en agua, se cultivaron AMSC primarias (P0) sobre plástico en DMEM que contenía FBS al 10% con o sin 100  $\mu$ g/ml de ASE. Los resultados mostraron que las AMSC mantuvieron una forma fibroblástica del huso después de 4 días de cultivo con o sin ASE (figura 24A y 24B, respectivamente). Sin embargo, en ese momento, las células ya expresaban  $\alpha$ -SMA sin ASE (figura 24E), pero permanecían desprovistas de la expresión de  $\alpha$ -SMA cuando se añadió ASE (figura 24F). Cuando los cultivos se extendieron a 10 días, como se muestra en la figura 2, las AMSC mostraron una forma celular ampliada y expresaron vívidamente las fibras de estrés positivo a los faloidina (figura 24C) que contenían una expresión positiva de  $\alpha$ -SMA (figura 24G). Sorprendentemente, las AMSC se agreraron en esferas de diferentes tamaños con un núcleo más pequeño en presencia de ASE (figura 24D). Estas células en la esfera se mantuvieron viables según el de vivo y muerto (datos no mostrados). Algunas esferas se desprendieron de la placa de plástico, pero se podían volver a unir a una nueva placa de plástico para generar un nuevo crecimiento de miofibroblastos cuando se cambiaran de nuevo a DMEM/FBS al 10% (datos no mostrados). La tinción con faloidina no mostró ninguna fibra de estrés (figura 24D), mientras que la expresión de  $\alpha$ -SMA en la esfera fue débil (figura 24H). Estos resultados indicaron que el ASE sí podría prevenir la diferenciación miofibroblasto de AMSC.

Para examinar si la actividad de reversión antes mencionada de la matriz estromal de AM se mantuvo en ASE, se añadieron 100  $\mu$ g/ml de ASE durante 1 semana a los cultivos de AMSC del pasaje 2 en plástico que contiene DMEM con FBS al 10%. Como se describió anteriormente (figura 22), en este momento casi todas las células se convirtieron en miofibroblastos con una morfología escamosa, fibras de estrés prominentes y una fuerte expresión de  $\alpha$ -SMA. La adición de ASE permitió que las células se revirtieran a una forma alargada o de huso (figura 25A) con una disminución significativa de la expresión de  $\alpha$ -SMA (figura 25B). El análisis de transferencia Western confirmó además la disminución de la expresión de la fibronectina EDA y de  $\alpha$ -SMA después de la adición de ASE (figura 25C). Estos resultados indicaron que el estroma de AM contenía factor (es) soluble (s) que podrían suprimir la

diferenciación de los miofibroblastos de AMSC si se añadieron antes, pero podrían revertir los miofibroblastos diferenciados a los fibroblastos si se añaden más adelante.

La reversión de los miofibroblastos no se asoció con la proliferación celular

5 Para determinar adicionalmente si la reversión fenotípica mencionada anteriormente de las AMSC de miofibroblastos a fibroblastos por ASE fue acompañada o no por la proliferación celular, se cambió el medio de DMEM más FBS al 10% a DMEM/ITS sin suero en cultivos del pasaje 3, en los que como se describe en la figura 2, casi todas las células se convirtieron en miofibroblastos. Durante un curso de 6 días de observación, las células en el cultivo de control mantuvieron la misma morfología de miofibroblastos con fibras de estrés prominentes en el citoplasma (figura 26A a 26D). Sin embargo, las células en los cultivos experimentales con la adición de ASE cambiaron gradualmente la forma de ser grandes y aplanadas en el día 0 (figura 24E) a huso y se alargaron en los días 2 y 4 (figura 26F y 26G, respectivamente), y finalmente algunas células se redujeron a un tamaño pequeño en el día 6 (figura 26H). Dicho cambio morfológico dramático causado por la adición de ASE estuvo acompañado por la pérdida de fibras de estrés que expresan  $\alpha$ -SMA (figura 26I a 26L). La tinción con Ki67 confirmó que los miofibroblastos en los cultivos DMEM/ITS de P3 no presentaron ninguna proliferación celular, sin importar si se añadió o no ASE (figura 26M y 26N, respectivamente). Como control, las AMSC en cultivos de PI mostraron ocasionalmente núcleos positivos para Ki67 cuando se cultivaron en plástico en DMEM/FBS al 10% (figura 26O), mientras que muchos fibroblastos de la córnea humanos cultivados en plástico en DMEM/FBS al 10% mostraron núcleos positivos para Ki67 (figura 26P). Estos resultados apoyaron firmemente la idea de que el ASE no sólo previno la diferenciación de miofibroblastos de AMSC, sino que también revirtió los miofibroblastos diferenciados de AMSC a fibroblastos sin afectar su proliferación celular.

Diferencias entre la morfología y la señalización de Smad y la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$  por la matriz estromal de AM

25 Las células estromales de ratón recién aisladas por colagenasa mostraron una morfología fibroblástica cuando se cultivaron en plástico en DMEM con FBS al 10%, pero una morfología dendrítica cuando se cultivaron en matriz de estroma de AM en el mismo medio. La inmunotinción mostró la exclusión nuclear de Smad4 para los queratocitos dendríticos cultivados en AM en DMEM con ITS incluso después de haber sido desafiado con 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1. En contraste, se añadió un porcentaje creciente de células de 13% cuando se cultivaron sobre plástico a 67% y 85% después de 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 durante 3 horas y 5 días, respectivamente. Estos resultados sugieren que la matriz estromal de AM suprime la señalización de T-TGF $\beta$  mediada por Smad, lo que ayuda a mantener el fenotipo de los queratocitos.

30 Se cotransfectaron fibroblastos de córnea de ratón cultivados en plástico e AM criopreservado intacto (preparado como se describe en este documento para preparar AM intacta criopreservada) con TGF- $\beta$ 2 promotor-luciferasa más CMV- $\beta$ -galactosidasa o TGF- $\beta$ RII promotor-luciferasa más CMV - $\beta$ -galactosidasa durante 48 horas. Los extractos celulares se analizaron para ambas actividades de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa. La unidad de luciferasa relativa de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ RII se suprimió en células cultivadas en AM.

Ejemplo 5: Los extractos de AM suprimen la migración de fibroblastos de los explantes humanos de limbo

Materiales y métodos

Preparación de extractos de membrana amniótica humana solubles totales en PBS

40 El procedimiento completo para la preparación de extractos AM humanos solubles totales (T) se llevó a cabo de forma aséptica para ser usado en experimentos posteriores basados en cultivos celulares. La placenta humana congelada se obtuvo de Bio-tissue, Inc. (Miami, FL), de la cual se recuperó AM. La AM se cortó en trozos pequeños para encajar en el barril de un BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK), se congeló en nitrógeno líquido y luego se pulverizó en un polvo fino. El polvo se pesó y se mezcló con solución reguladora de PBS fría (preparada mediante la adición de H<sub>2</sub>O destilada a 1 x PBS, pH 7.4, a partir de 10 x PBS, No. de catálogo 70011-044, Invitrogen, Carlsbad, CA) con inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa, P8340, Sigma, y suplementado con PMSF 1 mM) e inhibidores de la fosfatasa (fluoruro de sodio 50 mM y vanadato de sodio 0.2 mM) a 1:1 (ml/g). La mezcla se mantuvo en el hielo y se homogeneizó con un Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) durante 5 veces, 1 minuto cada una con un intervalo de enfriamiento de 2 minutos. Este extracto soluble en agua se designó como "total" (T). El extracto total soluble en agua se mezcló durante 1 hora a 4 °C, se centrifugó a 4 °C, durante 30 min a 48000 x g. El sobrenadante se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80 °C

Cultivos de explantes de CorneolimBal humanos

55 El tejido humano se manejó según the Tenets of the Declaration of Helsinki. Los anillos limbares se obtuvieron de las córneas donantes (Medical Eye Bank of Florida, Orlando, FL) o después del trasplante de córneas donantes (Florida Lions Eye Bank, Miami, FL). Se retiraron el exceso de esclerótica, el iris, el endotelio de la córnea, la conjuntiva y la cápsula de Tenon, y los anillos restantes se enjuagaron brevemente 3 veces con medio SHEM hecho de una mezcla de igual volumen de DMEM regulado con HEPES y F12 de Ham suplementado con FBS al 5%,

5 DMSO al 0.5 %, 2 ng/ml de ratón EGF, 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 5 ng/ml de selenio, 0.5 µg/ml de hidrocortisona, 10 nM de toxina del cólera, 50 µg/ml de gentamicina, 1.25 µg/ml de anfotericina B. Cada anillo limbal se dividió por igual en dos mitades y cada mitad se subdividió además en 6 explantes, esto es, para hacer 12 explantes por el anillo limbal. Para eliminar las variaciones de edad, sexo y raza, se seleccionaron los explantes de la posición correspondiente de la córnea del mismo donante para el control y el grupo experimental, respectivamente. Se colocó un explante en el centro de cada pocillo 6 con el lado epitelial hacia arriba y se cultivó en SHEM o SHEM con 25 µg/ml del extracto AM total anterior. El cultivo se mantuvo a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, el medio se cambió cada dos días y su crecimiento se controló diariamente durante 14 días usando un microscopio de fase invertida (Nikon, Japón). El área de crecimiento se digitalizó cada dos días por Adobe Photoshop 5.5 y se analizó por NIH ImageJ 1.30v (NIH, Bethesda, MD)

Ensayo de MTT

15 El ensayo de MTT (kit de proliferación celular I, cat. No. 11465007001, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) es un ensayo colorimétrico basado en la escisión de la sal de tetrazolio amarillo MTT a cristales de formazán de color púrpura por células metabólicamente activas. Las células en crecimiento de explantes de limbo humano cultivadas en SHEM (el grupo Control) o SHEM con 25 µg/ml de AME (el grupo AME) durante 14 días se recogieron por separado mediante digestión con tripsina/EDTA y se resuspendieron en medio SHEM. Las células se contaron con un hemocitómetro y se sembraron a 2000 células/por 96 pocillos con 100 µl de medio. Cada grupo se dividió además en 3 subgrupos (Control, PBS, AME) en los que ningún suplemento, 2 µl de PBS, o 2 µl de 1250 µg/ml de AME (para obtener una concentración final de 25 µg/ml de AME) se añadió inmediatamente después de la siembra de las células. Cada subgrupo tenía un total de 16 pocillos (del duplicado). Las células se incubaron a 37 °C con una humedad del 95% y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 días, cambiando el medio cada dos días. Cuando se realizó el ensayo MTT, se añadieron 10 µl del reactivo de marcaje MTT (concentración final 0.5 mg/ml) a cada 96 pocillos. Las placas de 96 pocillos se incubaron durante 4 horas en las mismas condiciones de cultivo. Luego se añadieron 100 µl de la solución de solubilización a cada pocillo y la placa se incubó adicionalmente en las mismas condiciones durante 20 horas. La absorbancia espectrofotométrica de las muestras se midió usando un lector de microplacas (Fusion™, Meriden, CT) con una longitud de onda de 550 nm menos la absorbancia de una longitud de onda de referencia a 650 nm.

Tinción de hematoxilina y eosina (H & E)

30 Después de cultivar durante 14 días, los explantes se retiraron de los pocillos y se embebieron con OCT (Tissue-Tek), se congelaron en poco tiempo en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Los tejidos se dividieron en trozos con Microtome Plus (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) a 6 µm en los microslides snowcoat X-Tra™ (Surgipath, Richmond, IL), se fijaron en formalina al 10% durante 10 min y se tiñeron secuencialmente con hematoxilina Harris durante 5 min, eosina al 1% de color amarillento durante 1 min a 25 °C. Los tejidos se deshidrataron con una serie de alcohol al 70%, 95% y 100%, cada uno durante al menos 5 minutos, y finalmente se trataron en xileno (sustituto de xileno SUBX™, Surgipath) y se montaron con un cubreobjetos. Los portaobjetos se observaron bajo microscopía invertida (ECLIPSE, TE 2000-U, Nikon).

Resultados

El extracto de AM ralentizó la migración epitelial de los explantes de limbo humano y produjo menos células epiteliales en el crecimiento, pero con más células progenitoras

40 La tabla que se muestra a continuación indica que el inicio del crecimiento epitelial del explante del limbo se retrasó y el crecimiento epitelial resultante contenía menos células en cultivos añadidos con extractos de AM.

Tabla: crecimiento del explante

Crecimiento	Explante de (6) SHEM/PL	Explante (6) SHEM/AME/PL 25 µg/ml
Día 3	2	0
Día 4	6	1
Día 5	6	6
Día 14 (células de 4 explantes)	7.35 x 10 <sup>6</sup> (3.6)	2.05 x 10 <sup>6</sup> (1.0)

45 El extracto de AM suprimió la migración de fibroblastos de los explantes de limbo humano y produjo menos fibroblastos en el crecimiento

En la figura 27A, el crecimiento de los explantes de limbo humano cultivados tanto en SHEM (Control) como en SHEM/AME (AME) formó una lámina epitelial similar. Sin embargo, algunas células similares a los fibroblastos solo aparecieron en control pero no en el cultivo de AME, lo que indica que la AME puede suprimir la migración de los fibroblastos. En la figura 27B, después de 14 días de cultivo, los explantes de limbo humano se extrajeron de los pocillos de cultivo, se embebieron, se dividieron en trozos y se tiñeron con H&E. Hubo muchas más células estromales en la AME que en la Control. Esto es posiblemente causado por la AME que suprime la migración de los fibroblastos.

Supresión del crecimiento de fibroblastos por AME

El crecimiento de los explantes de limbo humano cultivados tanto en SHEM (Control) como en SHEM/AME (AME) durante 14 días se recogió por separado y se sembró en cada pocillo de 96 a 2000 células/pocillo como se describe en el ensayo MTT. Las células de Control se sembraron en las columnas 1-3 (1: Control; 2: PBS; 3: AME; n = 8 para una placa que se muestra en este documento, pero n = 16 para el duplicado con el resultado similar) y las de AME fueron en las columnas 4-6 (1: Control; 2: PBS; 3: AME). Después de cultivar 10 días, se usaron células para el ensayo MTT. No hubo diferencias significativas en el crecimiento de fibroblastos entre los subgrupos (Control, PBS y AME), pero sí hubo diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de fibroblastos entre células derivadas de crecimiento en SHEM y en SHEM/AME (figura 28A). Debido a que los fibroblastos crecieron mucho más rápido que las células epiteliales, los pocillos se volvieron rosados después de añadir los fibroblastos contenidos en los reactivos MT. El análisis estadístico del crecimiento de fibroblastos en Control y AME mostró que AME suprimió significativamente el crecimiento de fibroblastos ( $p = 0.01$ ) (figura 28B).

Más crecimiento clonal de células epiteliales de crecimiento cultivadas en SHEM/AME que aquellas cultivadas solo con SHEM

Los explantes de limbo humano se cultivaron solo en ya sea SHEM (Control) o en SHEM/AME (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Después de cultivar durante 10 días, las células epiteliales en crecimiento se recogieron con tripsina/EDTA y se contaron de nuevo, el crecimiento de células epiteliales se suprimió significativamente por AME. Es decir, el total de células de 3 explantes cultivados en SHEM es  $9 \times 10^5$ , mientras que el total de células de 3 explantes cultivados en SHEM/AME es de  $2.3 \times 10^5$ , la proporción es Control/AME = 3.9. Cuando estas células se sembraron a 500 o 1000 células en cada placa de 60 mm (~18 o 36 células/ $\text{cm}^2$ ) en una capa suiza de 3T3 con tratamiento previo MMC (4  $\mu\text{g/ml}$  durante 2 horas a 37 °C) en medio SHEM. Después de la siembra durante 4-5 días, los clones epiteliales comenzaron a formarse. Los clones de células cultivadas previamente con SHEM/AME fueron más grandes y más grandes que los cultivados previamente con SHEM solamente ( $P < 0.05$ ). Los clones se dejaron crecer hasta el día 10 y luego los clones se tiñeron con el colorante cristal violeta para mostrar el número y tamaño de los clones.

AME inhibió MAPKp38 del crecimiento

El crecimiento de los explantes de limbo humano cultivados tanto en SHEM (Control) como en SHEM/AME (AME) durante 14 días formó una lámina epitelial similar. Sin embargo, los bordes de las láminas epiteliales eran diferentes: el borde de la lámina epitelial Control aparecía áspero mientras que el de la AME era suave (figura 29, panel izquierdo Control; panel derecho AME). Este fenómeno se asemejó al efecto del inhibidor de MAPK p38 (SB203580 10  $\mu\text{M}$  en SHEM) sobre el crecimiento de explantes de limbo humano (datos no mostrados). Proporcionó otra evidencia de que AME contenía el (los) componente(s) que puede(n) inhibir MAPK p38.

Ejemplo 6: Las preparaciones de membrana amniótica suprimen la función de los macrófagos

Materiales y métodos

Cultivo celular y estimulación de IFN- $\gamma$

Se obtuvieron 264.7 células en bruto, una línea celular de macrófagos de ratón de la ATCC y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) libre de rojo fenol suplementado con 10% de suero bovino fetal, 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina y 1.25  $\mu\text{g/ml}$  de fungizona en placas de cultivo de 100 mm. Cuando las células se convirtieron en un 70% -80% de confluencia, el medio se eliminó y las células se trataron con tripsina/EDTA durante 10 minutos a 25 °C. Después de la digestión, las células aún estaban firmemente unidas a la placa, por lo que se eliminó la solución de tripsina/EDTA. Luego se añadieron 5 ml de DMEM con insulina-transferrina-selenito de sodio (ITS; incluyendo 5 mg de insulina, 5 mg de transferrina humana y 5  $\mu\text{g}$  de selenito de sodio en 1000 ml. Sigma, St. Louis, MO) a la placa y las células se recogieron con pipeta. Después de la centrifugación a 500 x g durante 5 min, se eliminó el medio, la pella celular se resuspendió en el medio DMEM/ITS, se contaron las células y la densidad celular se ajustó a  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ .

A las células de siembra, se le añadieron 0.5 ml ( $0.25 \times 10^6$ ) de la suspensión celular a cada uno de los 24 pocillos. Después de una hora para dejar que las células se unieran, se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de IFN- $\gamma$  ( $2 \times 10^4 \text{U}$ ) a cada pocillo para alcanzar una concentración final de IFN- $\gamma$ : 200U/ml. 48 horas más tarde, el medio de cultivo celular se recogió para los ensayos de NO y PGD<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub>. Las células se usaron para el ensayo Live & Dead o se recolectaron para Transferencia Westerns.

## Ensayo Live &amp; Dead

Se eliminó el medio y se añadieron a cada pocillo 200  $\mu$ l de los reactivos de ensayo LIVE/DEAD combinados (Molecular Probes, Eugene, OR). Después de la incubación con células durante 15 minutos a temperatura ambiente, se observaron células bajo un microscopio de luz fluorescente. Las células vivas producen una fluorescencia verde uniforme intensa en el citoplasma y las células muertas producen una fluorescencia roja brillante en el núcleo.

## Ensayo de NO

Al final del cultivo, el medio de cultivo celular en cada pocillo se recogió individualmente y se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C. El medio eliminado se transfirió a un nuevo tubo y se sometió a ensayos directamente o se almacenó a -80 °C antes de los ensayos posteriores. La producción de NO se evaluó midiendo el nitrito, su producto de degradación estable, usando el reactivo de Griess según el protocolo del fabricante. En resumen, 50  $\mu$ l del medio aclarado se mezclaron con 100  $\mu$ l de los reactivos de Griess (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio); después de 15 minutos, se midió la absorbancia a 550 nm usando el analizador de microplacas universal Fusion™ (Packard, Meriden, CT). La cantidad de nitrito se calculó a partir de una curva estándar de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>; Sigma, St. Louis, MO).

15 Ensayo de prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) y de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

Los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron 48 h más tarde con o sin estimulación con IFN- $\gamma$ . Las concentraciones de PGD<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> se midieron usando un kit de EIA (cat. No. 512021 y 514010, respectivamente, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), con los ensayos realizados según las instrucciones del proveedor.

Ensayo del promotor de TGF- $\beta$ 1

El ensayo de la actividad del promotor de TGF- $\beta$  implica plásmidos que contienen el promotor de TGF- $\beta$ 1 humano (-1362 a +11)-luciferasa, el promotor de TGF- $\beta$ 2 (-1729 a +63, Noma et al., Factores de crecimiento, 4:247-255, 1991) y el promotor de TGF- $\beta$ 3 (-1387 a +110). Tanto el promotor de TGF- $\beta$ 2 como el promotor de TGF- $\beta$ 3 se insertaron en Kpn I y Hind III de pGL3-básico. El promotor de TGF- $\beta$ RII humano (-1883 a +50, Bae et al., J Biol Chem., 270:29460-29468, 1995) se amplificó por PCR usando ADN genómico de fibroblastos de córnea humana como plantilla, el cebador directo de 5'-GTACGGTACCCATCAAAGAAGTTATGGTTC-3' y el cebador inverso de 5'-GTACAAGCTTACTCAACTTCAACTCAGCGC-3'. El fragmento del promotor de TGF- $\beta$ RII amplificado se digirió luego con Kpn I y Hind III, se purificó en gel (Qiagen, Valencia, CA) y se insertó en los mismos sitios de pGL3-básico. Los virus adenovirales defectuosos en la replicación se generaron para cada construcción promotora por Core Lab of University of Michigan según un método previamente publicado (Chen et al., J Immunol. 167:1297-1305, 2001; He et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:2509-2514, 1998).

En placas de plástico de 2 x 100 mm, se cultivaron fibroblastos de la córnea humanos (pasaje 1-4) en DMEM/FBS al 10%. Cuando las células alcanzaron un ~80% de confluencia (~8 x 10<sup>5</sup> células/placa), se eliminó el medio y las células se lavaron dos veces con el medio respectivo. El medio fresco que contiene adenovirus defectuosos en la replicación que contiene promotores de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 o TGF- $\beta$ RII, cada uno vinculado a la luciferasa (cada uno en una multiplicidad de infección (MOI) de 100) y un adenovirus control que contiene CMV- $\beta$ -galactosidasa (a una MOI de 30), se incubó con células durante 4 h. Luego se eliminó el medio que contenía adenovirus y las células se tripsinizaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con tripsina precalentada/EDTA. Las células se recogieron en tubos estériles de 15 ml y se centrifugaron a 1000 rpm (-600 x g) durante 5 min. El medio se retiró cuidadosamente y las células se lavaron una vez con el medio respectivo. La pella celular se resuspendió en el medio a la densidad deseada. Un volumen total de 100  $\mu$ l de suspensión celular (5000 células) con o sin cantidades diferentes (por ejemplo, 25  $\mu$ g/ml) de extracto de AM soluble en agua (preparado por el método descrito en este documento para preparar extracto de AM soluble en agua) u otros reactivos se transfirieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

Las células se cultivaron adicionalmente durante 44 h (un tiempo total de 48 h para la transducción de adenovirus). Después de eso, el medio se eliminó y las células se enjuagaron con PBS una vez. Se lisaron células de cada pocillo de 96 en 50  $\mu$ l de reactivo de lisis de cultivo celular (Promega, Madison, WI). El lisado celular se agitó en vórtex durante 15 segundos y se aclaró mediante centrifugación a 4 °C, durante 2 minutos a 12,000 x g. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se utilizaron 20  $\mu$ l del sobrenadante para un ensayo de luciferasa o un ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. Para un ensayo de luciferasa, se dispensaron 100  $\mu$ l del reactivo de ensayo de luciferasa (Promega, Madison, WI) en cada pocillo y se añadieron 20  $\mu$ l de lisado celular y se mezclaron pipeteando 3 veces. El analizador de luciferasa (Fusion™, Packard Instrument Company, Boston, MA) se programó para realizar una medición de 10 segundos. Para un ensayo de  $\beta$ -galactosidasa de alta sensibilidad (Stratagene, LaJolla, CA), se mezclaron 20  $\mu$ l de lisado celular con 130  $\mu$ l de sustrato de clorofenol rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido (CPRG) en cada pocillo y se incubaron durante 30 min a 2 h a 37 °C hasta que la muestra se puso roja. Se detuvo la reacción y se leyó la absorbancia de cada muestra a 570 nm. La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de cada muestra se calculó y se usó para normalizar la actividad de la luciferasa como actividad relativa de la luciferasa.

## Resultados

AM disminuyó la producción de NO por las células Raw264.7 de macrófagos

5 Se sembraron células Raw264.7 en cada pocillo de 24 a  $2.5 \times 10^5$  en DMEM/ITS ( $n = 3$  para cada grupo). Después de estimular las células con o sin 200 u/ml de IFN- $\gamma$ , el medio de cultivo se recogió para el ensayo de NO como se describe en los métodos. Sin la estimulación con IFN- $\gamma$ , los macrófagos apenas produjeron NO detectable cuando se cultivaron ya sea en plástico o en la superficie estromal de la membrana amniótica intacta (iAM) (figura 30). Después de la estimulación con IFN- $\gamma$ , los macrófagos produjeron mucho más NO en ambos cultivos, pero significativamente menos cuando los macrófagos se cultivaron en la superficie estromal de iAM en comparación con los cultivados en plástico ( $p = 0.048$ ) (figura 30).

10 AM favoreció la síntesis de PGD<sub>2</sub> mientras inhibía la expresión de la producción de PGE<sub>2</sub>

15 Sin la estimulación con IFN- $\gamma$ , las células Raw264.7 produjeron muy poca PGD<sub>2</sub> cuando se cultivaron en el plástico, pero mucho más cuando se cultivaron en iAM, probablemente debido a la PGD<sub>2</sub> liberada por las células epiteliales AM (figura 31A). Con la estimulación de IFN- $\gamma$ , la producción de PGD<sub>2</sub> en células Raw264.7 cultivadas tanto en el plástico como en iAM aumentó (figura 31A). Sin la estimulación con IFN- $\gamma$ , las células Raw264.7 producían muy poca PGE<sub>2</sub> cuando se cultivaban en el plástico, pero mucho más cuando se cultivaban en iAM, probablemente debido a la liberación de PGE<sub>2</sub> de las células epiteliales AM (figura 31B). Con la estimulación IFN- $\gamma$ , la producción de PGE<sub>2</sub> en células Raw264.7 cultivadas en el plástico aumentó dramáticamente, pero la producción de PGE<sub>2</sub> en iAM apenas cambió (figura 31B). La proporción de PGD<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub>, como índice de acción antiinflamatoria, fue mucho mayor en Rraw264.7 cuando se cultivó en iAM con o sin estimulación con IFN- $\gamma$  (figura 31C).

20 AM suprimió la activación del promotor de TGF- $\beta$ 1 en macrófagos

25 Sin la estimulación de IFN- $\gamma$ , la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 en células Raw264.7 se suprimió en iAM en comparación con la del plástico, pero no es estadísticamente significativa ( $p = 0.4$ ) (figura 32). Con la estimulación de IFN- $\gamma$ , la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 en Raw264.7 disminuyó tanto en el plástico como en iAM. Sin embargo, la supresión de la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1 fue mucho más y fue estadísticamente significativa cuando se comparó con la cultivada en plástico ( $p < 0.01$ ) (figura 32).

Muerte de células macrófagas inducida por AME

30 Se sembraron células Raw264.7 a  $2 \times 10^5$  en cada pocillo de 24 en DMEM/suero bovino fetal al 10%. Después de 1 hora, se añadieron 125  $\mu$ g/ml de AME (en PBS) al medio de cultivo, mientras que se añadió el mismo volumen de PBS al control. Después de 24 horas de cultivo, las células Raw264.7 se unieron bien en el control, pero una gran cantidad de células flotaron y parecieron estar muertas cuando se añadió AME (figura 33).

Ensayo in vitro que mide la apoptosis de macrófagos

35 Se usó un ensayo de apoptosis de macrófagos in vitro para medir cómo AM ejerce una acción antiinflamatoria basada en facilitar la apoptosis de una línea celular de macrófagos de ratón activada con IFN- $\gamma$  (células Raw 264.7). El kit ELISAPLUS de Detección de muerte celular se obtuvo de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). Los lisados celulares equivalentes a  $10^4$  células y los medios acondicionados después del cultivo se sometieron a un ensayo ELISAPLUS de detección de muerte celular según las instrucciones del fabricante. Este ELISA es un inmunoensayo fotométrico de enzimas para la determinación cualitativa y cuantitativa in vitro de fragmentos de ADN asociados a histonas citoplásmicas (mono- y oligonucleosomas) generados por la muerte celular apoptótica usando un anticuerpo antihistona monoclonal de ratón y un anticuerpo antiADN. Se incluyeron controles positivos y negativos provistos por el fabricante, y la absorbancia se midió a 405 nm con el analizador universal de microplacas FusionTM. Los macrófagos se cultivaron en el lado estromal de la AM intacta crioconservada que se preparó recolectando placenta humana, recogiendo AM de la placenta, aplanando la AM sobre papel de nitrocelulosa (Hybond N+, Amersham, Inglaterra) con el lado del epitelio hacia arriba, y almacenando el AM a -80 °C en DMEM/glicerol (1:2 v/v) hasta su uso. Para cultivar macrófagos en matriz de estroma de AM, los macrófagos se sembraron en el lado estromal de la AM crioconservada intacta.

45 Los resultados mostraron que se detectó una pequeña cantidad de apoptosis en cultivos de plástico después de 48 h en DMEM + ITS, y la apoptosis disminuyó cuando los macrófagos se activaron por IFN- $\gamma$ . Los macrófagos cultivados en AM intacta crioconservada también mostraron algo de apoptosis, pero no hubo diferencias significativas entre la AM y el plástico. En contraste, los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  mostraron un aumento significativo de la apoptosis cuando se cultivaron en AM. Los resultados de este ensayo se correlacionaron con los obtenidos mediante la tinción del ensayo LIVE/DEAD (Molecular Probes, Carlsbad, CA), la tinción nuclear de Hoechst-33342 y el método (TUNEL) de marcado del extremo libre de digoxigenina -dUTP mediada por desoxirribonucleotidil transferasa terminal fluorométrica DeadEnd™ (Promega, Madison, WI) como se describe en este documento.

- Los macrófagos cultivados en plástico (PL) se distribuyeron uniformemente, y la mayoría eran ovales, pero después de la activación con 200 U/ml de células IFN- $\gamma$  (PL/IFN- $\gamma$ ) se hicieron más grandes y el huso. En contraste, los macrófagos cultivados en la matriz estromal de AM se agreraron en grupo y se mantuvieron redondos, y tras la activación de las células IFN- $\gamma$  (AM/IFN- $\gamma$ ) se redujeron y degeneraron en residuos. Estos dramáticos cambios morfológicos causados por la AM se correlacionaron con una marcada promoción de la apoptosis de macrófagos medida por ELISA de detección de muerte celular con o sin activación con IFN- $\gamma$  durante 48 h. (figura 1,  $p > 0.05$  para PL vs. AM,  $p < 0.05$  para PL vs. PL/IFN- $\gamma$  y AM vs. AM/IFN- $\gamma$ ,  $p < 0.01$  para PL/IFN- $\gamma$  vs. AM/LFN- $\gamma$ ). Este resultado indicó que los macrófagos cultivados en el estroma de AM modificaron su morfología sugestiva de muerte celular después de ser activados por IFN- $\gamma$ .
- Para determinar si los cambios morfológicos mencionados anteriormente en los cultivos de AM representaban la muerte celular, las células en experimentos paralelos se sometieron a un ensayo LIVE/DEAD. Las células cultivadas en plástico con o sin activación por IFN- $\gamma$  y las células en AM sin IFN- $\gamma$  durante 48 h estaban predominantemente vivas (esto es, produciendo fluorescencia verde). En contraste, un gran número de células en AM después de la activación con IFN- $\gamma$  estaban muertas (esto es, produciendo fluorescencia roja).
- Para determinar si la muerte celular mencionada anteriormente estaba mediada por apoptosis, las células en experimentos paralelos se sometieron a tinción de Hoechst-33342. Los núcleos fragmentados con fuerte tinción de Hoechst se encontraron más en AM/IFN- $\gamma$  en comparación con AM sin IFN- $\gamma$  y en sus controles plásticos. Los porcentajes de núcleos apoptóticos positivos para Hoechst-33342 fueron  $12.4 \pm 2.7\%$  (PL),  $16.5 \pm 3.1\%$  (PL/IFN- $\gamma$ ),  $14.7 \pm 1.1\%$  (AM) y  $63.8 \pm 7.9\%$  (AM/IFN- $\gamma$ ). No hubo diferencia estadística entre PL y PL/IFN- $\gamma$  y entre PL y AM (todo  $p > 0.05$ ), mientras que hubo una diferencia estadística entre AM y AM/IFN- $\gamma$  y entre PL/IFN- $\gamma$  AM/IFN- $\gamma$  (todos  $p < 0.001$ ). Además, la tinción de Hoechst-33342 también reveló células gigantes multinucleadas en cultivos de plástico cuando se activaron con IFN- $\gamma$ . En contraste, no había tal célula gigante en los cultivos de AM/IFN- $\gamma$ .
- Para verificar que tales núcleos fragmentados fueron efectivamente causados por la fragmentación del ADN, las células en experimentos paralelos se sometieron a tinción de ensayo TUNEL. Los núcleos fragmentados positivos para TUNEL fueron esporádicos en PL, PL/IFN- $\gamma$  y AM sin cultivos de IFN- $\gamma$ , pero aumentaron notablemente en los cultivos de AM/IFN- $\gamma$ . Este resultado fue consistente con el mostrado por la tinción de Hoechst-33342.
- AM induce apoptosis de macrófagos activados por IFN- $\gamma$  in vitro mediante la interrupción de vías de supervivencia mediadas por NF- $\kappa$ B y Akt
- Se ha informado de que el NO generado endógenamente o aplicado de forma exógena puede inducir la muerte celular apoptótica en macrófagos. Para determinar si el NO fue responsable de la apoptosis mencionada anteriormente de macrófagos cultivados en matriz estromal de AM, las concentraciones de nitrito se midieron en el medio acondicionado recolectado al final de diferentes duraciones de cultivo de 24 horas a 72 horas, mientras que también se detectó la producción de TNF- $\alpha$ . Los resultados mostraron que los macrófagos cultivados en PL o AM sin activación con IFN- $\gamma$  produjeron niveles bajos de NO y TNF- $\alpha$ , y no hubo diferencia en la producción de NO entre el plástico y la AM a lo largo de la duración del cultivo (todos  $p > 0.05$ ), mientras que la concentración de TNF- $\alpha$  fue mayor en AM que en plástico en todos los puntos de tiempo (todos  $p < 0.05$ ). Sin embargo, cuando se activan con IFN- $\gamma$ , los macrófagos cultivados en plástico producen continuamente niveles crecientes de NO y TNF- $\alpha$  de 24 a 72 h. En contraste, aunque los macrófagos cultivados en AM también aumentaron la producción de NO y TNF- $\alpha$  de 24 a 48 h, no hubo un aumento en sus niveles entre 48 y 72 h ( $p > 0.05$ ), lo que indica que la producción de NO y el TNF- $\alpha$  había cesado después de 48 h. La concentración de NO fue mayor en AM que la de plástico a las 24 h y 48 h ( $p < 0.01$ ), mientras que la concentración de TNF- $\alpha$  fue mayor en AM solo a las 24 h ( $p < 0.01$ ). El control de la incubación de AM solo en el medio de cultivo con o sin IFN- $\gamma$  durante 48 h no reveló ningún nivel detectable de NO o TNF- $\alpha$  en el sobrenadante, lo que indica que la propia AM no produjo NO y TNF- $\alpha$ . En conjunto, estos datos también indicaron que AM actuó de forma sinérgica con IFN- $\gamma$  para producir más NO, y la propia AM indujo débilmente la producción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos. El nivel de nitrito promovido por IFN- $\gamma$  fue más pronunciado cuando las células se cultivaron en AM en comparación con el plástico a las 48 h ( $p < 0.01$ ), un hallazgo que se correlaciona bien con el de la apoptosis.
- Para determinar si un nivel mayor de NO y apoptosis estaban relacionados causalmente, la producción de NO se bloqueó añadiendo acetato de NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) o clorhidrato de L-N6-(1-iminoetil) lisina (L-NIL), que son inhibidores de la NO sintasa. Los resultados mostraron que L-NMMA 500  $\mu$ M o L-NIL atenuaron significativamente los niveles de nitrito inducidos por IFN- $\gamma$  en más del 50% para las células cultivadas en AM, esto es, desde la línea de base de  $46.2 \pm 4.3 \mu$ M hasta  $19.8 \pm 4.9 \mu$ M y  $14.0 \pm 9.8 \mu$ M para L-NMMA y L-NIL, respectivamente (ambos  $p < 0.01$ ). No obstante, la extensión de la apoptosis de macrófagos determinada por la tinción de Hoechst 33342 no se atenuó significativamente de acuerdo con lo anterior. Estos resultados indicaron colectivamente que la apoptosis de macrófagos en AM bajo la activación de IFN- $\gamma$  no fue mediada por la sobreproducción de NO.

Para investigar más a fondo el mecanismo de la apoptosis de macrófagos en AM, se estudiaron dos vías principales de señalización de supervivencia celular, NF- $\kappa$ B y Akt-FKHR vías de señalización. Estas vías se estudiaron



mediante la determinación de la expresión de la subunidad total IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , p65 (RelA) de NF- $\kappa$ B, Akt, phospho-Akt (Ser473) y phospho-FKHR (Thr24)/FKHRL1 (Thr32) de macrófagos cultivados en plástico o AM con o sin IFN- $\gamma$  durante 24 h, cuando el ELISA cuantitativo para la apoptosis no fue aparente. Los análisis de transferencia Western mostraron que las subunidades p65 (RelA) de NF- $\kappa$ B y Akt total estaban ligeramente inducida la expresión en macrófagos cultivados en plástico con activación con IFN- $\gamma$ . Los niveles de IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  total Akt y phosphor-Akt (Ser473) solo se inhibió la expresión en macrófagos cultivados en AM con activación de IFN- $\gamma$ , mientras que las subunidades p65 (RelA) de NF- $\kappa$ B y phospho-FKHR (Thr24)/FKHRL1 (Thr32) se inhibió la expresión en macrófagos cultivados en AM sin activación con IFN- $\gamma$ , y se inhibió la expresión además cuando se activaron con IFN- $\gamma$ . Estos resultados indicaron que estas dos vías de señalización estaban implicadas en la apoptosis de macrófagos cultivados en AM.

Ejemplo 7: Comparación de la potencia relativa del uso de colágeno o HA como vehículo para entregar dos extractos de AM diferentes

Para determinar la concentración óptima de las formas solubles en agua y liofilizadas de extractos de AM (preparados por los métodos descritos en este documento para preparar formas solubles en agua y liofilizadas de extractos de AM, respectivamente) y comparar la potencia relativa entre los dos vehículos diferentes que contienen una concentración apropiada de cada forma de extractos de AM para suprimir la actividad del promotor de TGF- $\beta$  y para promover la apoptosis de macrófagos, respectivamente, estas dos formas de extractos de AM se comparan mediante dilución en serie en ya sea gel de colágeno de tipo I o HA y sus concentraciones de proteína se controlaron de acuerdo con lo anterior. Para el gel de colágeno tipo I, la concentración de proteína varía desde 0.05 a 2 mg/ml; para el gel de HA, la concentración varía desde 0.05 a 10 mg/ml. Estas soluciones o geles diluidos en serie de estas dos formas de extractos de AM se recubren previamente en platos de plástico antes de siembran o añaden directamente fibroblastos de la córnea humanos en DMEM con FBS al 10%, mientras que las células se siembran en el plástico. El efecto anticatización se mide analizando la actividad del promotor de TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 y RII y comparando la actividad del promotor con los controles positivos o negativos donde las células se siembran en plástico con o sin una forma determinada de extractos de AM (sin el vehículo), respectivamente. El control positivo, en el que las células se sembraron en plástico con DMEM más un FBS al 10%, mostró una alta actividad del promotor. Por el contrario, el control negativo, en el que las células se sembraron en plástico con DMEM más un FBS al 10% pero se añadieron con 25  $\mu$ g/ml de extractos de AM, mostró al menos un 50% de reducción de la actividad del promotor. Sobre la base de estos valores de control, se pueden medir los grupos experimentales que usan diferentes concentraciones de extractos de AM mezclados en ya sea gel de colágeno o HA.

Una vez que se determina la concentración más eficaz de estas dos formas de extractos de AM en ya sea colágeno o HA, los resultados se verifican repitiendo el experimento en DMEM sin suero con ITS añadido con 10 pg/ml a 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1. El efecto anticatización se correlaciona además con la supresión de la señalización mediada por Smad por inmunocitocalización de Smads 2, 3 y 4 y actina del músculo  $\alpha$ -liso ( $\alpha$ -SMA), un marcador de miofibroblastos (Gabbiani G., J Pathol. 200:500-503, 2003; Jester and Petroll, Prog Retin Eye Res. 18:311-356, 1999). Otro control positivo se realiza al añadir 10  $\mu$ g/ml de anticuerpo neutralizante a las tres isoformas de TGF- $\beta$ . El efecto antiinflamatorio se prueba de forma similar en macrófagos murinos con o sin activación por 200 U/ml de IFN- $\gamma$  en DMEM con ITS mediante la medición de la extensión de la apoptosis usando el kit de detección de muerte celular ELISAPLUS (Roche, Mannheim, Alemania), y la correlación los datos con los obtenidos por morfología celular, ensayo LIVE/DEAD (Molecular Probes, Carlsbad, CA), tinción nuclear de Hoechst-33342 y ensayo TUNEL (Promega, Madison, WI) como se informó recientemente (Li et al., Exp Eye Res. 2005, In Press).

Ejemplo 8: Extracto de estroma de membrana amniótica tiene propiedades antiangiogénicas

#### Materiales y métodos

##### Materiales

Las HUVEC y el medio de crecimiento de células endoteliales procedían de PromoCell GmbH (Heidelberg, Alemania). El kit de proliferación celular I (MTT) fue de Roche (Penzberg, Alemania). El kit de ensayo de proteínas BCA™ fue de Pierce (Rockford, IL). Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio de Ham/F12, solución reguladora HEPES, solución salina equilibrada de Hank (HBSS), solución salina regulada con fosfato (PBS), anfotericina B, gentamicina, suero bovino fetal (FBS), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), tripsina al 0.25%/EDTA 0.53 mM, el reactivo de ensayo LIVE/DEAD se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). El yoduro de propidio, colorante Hoechst-33342, triton X-100, albúmina de suero bovino (BSA), insulina, hidrocortisona, formaldehído, cristal violeta, antiradón conjugado con FITC, cabra y IgG de rata fueron de Sigma (St. Louis, MO). Los insertos Transwell fueron de Corning Incorporated (Corning, NY). El matrigel fue de BD Biosciences (Bedford, MA).

##### Cultivo celular

Se cultivaron HUVEC en el medio de crecimiento de células endoteliales suplementado con suero de ternera fetal al 2%, 0.1 ng/mL de EGF, 1 µg/mL de hidrocortisona y 1 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Los tejidos corneoesclerales humanos se obtuvieron del Florida Lions Eye Bank (Miami, FL), de los cuales se extrajeron los fibroblastos de la córnea (HCF) y se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10%. Se usaron células del pasaje 2 para los experimentos. Las células epiteliales de la córnea de conejo inmortalizadas con SV40 (RCE), proporcionadas amablemente por el Dr. Peter Reinach (Department of Biological Science, College of Optometry, State University of New York, New York), se cultivaron en DMEM/F12 con FBS al 10%, 5 ng/mL de insulina y 5 ng/mL de EGF.

5

#### Preparación de extractos de estroma solubles en agua

Usando técnicas asépticas, la AM humana congelada obtenida de Bio-Tissue, Inc. (Miami, FL) se lavó brevemente 2-3 veces con HBSS para eliminar el medio de almacenamiento original. El estroma de AM se raspó con una espátula, se congeló en la fase de aire de nitrógeno líquido y se molió a partículas finas con BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) seguido de homogeneización en hielo con Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI) en PBS, pH 7.4, durante 1 min. El homogeneizado se mezcló por rotación durante 1 h y se centrifugó a 14,000 x g durante 30 min a 4 °C. Luego se recogió el sobrenadante en PBS y se almacenó en alícuotas a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de BCA. Este extracto de proteína soluble en agua, designado como extracto de estroma amniótico (ASE), se usó para los experimentos descritos en este documento.

15

#### Ensayo de proliferación celular

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (n = 6) en el medio de crecimiento respectivo mencionado con anterioridad a la densidad de 2,000 células por pocillo con concentraciones crecientes de ASE y se cultivaron durante 48 h. El crecimiento celular se determinó mediante el ensayo de proliferación celular basado en el (bromuro de 3 [4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-defenil tetrazolio) MTT según un protocolo recomendado por el fabricante

20

#### Ensayo de apoptosis

El ensayo LIVE/DEAD y la tinción de Hoechst-33342 se usaron para detectar células apoptóticas. En resumen, después de 48 h de cultivo, cada medio de crecimiento respectivo se retiró del cultivo, se añadieron con 200 µl de los reactivos de ensayo LIVE/DEAD combinados y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células vivas se distinguen por la tinción de fluorescencia verde del citoplasma celular, mientras que las células muertas se tiñen con fluorescencia roja en los núcleos. Para caracterizar la morfología nuclear como un medio para evaluar la apoptosis, se añadió colorante Hoechst-33342 a cada medio de crecimiento respectivo a una concentración final de 10 µg/ml, y se incubó a 37 °C, durante 15 minutos. Hoechst-33342 tiñe los núcleos de las células vivas e identifica las células apoptóticas por el aumento de la fluorescencia y la fragmentación o condensación nuclear.

25

30

#### Ensayo de migración

El efecto inhibitorio de ASE sobre la quimiotaxis inducida por VEGF se probó en HUVEC usando el ensayo de Transwell. Se cultivaron HUVEC en el medio de crecimiento completo durante 36 h. Después de la tripsinización, el lavado y la resuspensión de las células en el medio de crecimiento incompleto suplementado con FBS al 0.5%, se sembraron 60,000 células en 200 ml en el interior de los insertos de Transwell (8 mm de diámetro), que está separado por una membrana de policarbonato de tamaño de poro de 8-µm, con o sin 200 µg/mL de ASE. El medio de crecimiento en el volumen de 800 µl suplementado con FBS al 1% y 10 ng/ml de VEGF se añadió como un quimioatrayente directamente en una placa de 24 pocillos fuera del inserto Transwell. El medio de crecimiento suplementado con FBS al 0.5% se añadió directamente en una placa de 24 pocillos como control negativo. Después de la incubación a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante 4.5 h, las células no migradas se aspiraron, mientras que la membrana se lavó con PBS, se fijó en formaldehído al 4% en PBS, se tiñó con cristal violeta y se observó bajo microscopio. Se contaron las células que migraban al otro lado de la membrana.

35

40

#### Ensayo de formación de tubo endotelial

Se añadió matrigel en 320 µL a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se dejó polimerizar a 37 °C, durante 30 min. Se sembraron HUVECs (50,000 células/pocillo) en el medio de cultivo de células endoteliales con FBS al 10% en Matrigel en presencia de diferentes concentraciones de ASE. Las células de control se incubaron con BSA a la misma concentración. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C y se fotografiaron bajo un microscopio (Nikon, Japón). Se fotografiaron 40X campos aleatorios para cada pozo, y los tubos se contaron, se promediaron y se compararon.

50

#### Análisis estadístico

Todos los experimentos descritos anteriormente se repitieron tres veces, cada uno por triplicado o más. Se compararon los promedios de grupo usando la versión apropiada de la prueba t no pareada de Student. Los

resultados de las pruebas se informaron como valores de p de dos colas, donde  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Los datos resumidos se presentan como la media  $\pm$  S.D.

## Resultados

### ASE inhibe preferencialmente la proliferación de células HUVEC

5 Primero probamos si el ASE añadido al medio de cultivo inhibiría la proliferación celular. En comparación con el control sin la adición de ASE, la proliferación de HUVEC se inhibió significativamente por 50 a 200  $\mu\text{g/mL}$  de ASE (figura 34A,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, la proliferación de RCE y HCF fue significativamente inhibida por ASE solo a la concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  (figura 34B y 34C, respectivamente, cada  $p < 0.01$ ). Este resultado indicó que ASE inhibió preferencialmente la proliferación de HUVEC.

10 Apoptosis inducida por ASE en células HUVEC.

Las imágenes de contraste de fase mostraron que las células HUVEC se redujeron de una forma de huso a una forma pequeña y redonda y la densidad celular se redujo notablemente cuando se trató con 200  $\mu\text{g/mL}$  de ASE durante 48 h. En contraste, la morfología celular y la densidad de las células HCF y RCE no se modificaron cuando se trataron con 200  $\mu\text{g/mL}$  de ASE durante 48 h (datos no mostrados). Para determinar si dicho cambio en las células HUVEC causado por 200  $\mu\text{g/mL}$  de ASE fue acompañado por la muerte celular, se realizaron el ensayo LIVE/DEAD y la tinción de Hoechst-33342 después de la incubación con 200  $\mu\text{g/mL}$  de ASE durante 48 h. Los resultados mostraron que las células HUVEC estaban vivas en el control sin la adición de ASE (figura 35Aa) pero mostraron una muerte celular pronunciada después del tratamiento con ASE (figura 35Ad). En contraste, tanto las células HCF como las RCE no revelaron ninguna muerte celular notable en cultivos sin (figura 35Ab y 35Ac, respectivamente) o con (35Ae y 35Af, respectivamente) tratamiento con ASE. La tinción de Hoechst-33342 mostró que las HUVEC tratadas con ASE tenían  $61.6 \pm 7.7\%$  de núcleos condensados y fragmentados (figura 35Bd), que era significativamente más alto que  $3.1 \pm 1.8\%$  del control sin tratamiento con ASE (figura 35Ba, véase también 2C,  $p < 0.001$ ). En contraste, no hubo una apoptosis obvia en las HCF ni en las RCE sin (figura 35Bb y 35Bc, respectivamente) o con (figura 35Be y 35Bf, respectivamente) tratamiento con ASE (véase también figura 36,  $p = 0.84$  y  $0.30$ , respectivamente). Estos resultados indicaron que el ASE inhibió la proliferación de HUVEC al inducir la apoptosis.

### ASE inhibió la migración de células HUVEC con o sin estimulación con VEGF

Luego probamos si el ASE podía inhibir la migración de HUVEC estimulada por VEGF. Algunas células migraron a través de los poros de la membrana de policarbonato en el control sin VEGF como quimioatrayente durante el período de prueba de 4.5 h (figura 37A). La migración celular aumentó dramáticamente cuando se trató con VEGF como un quimioatrayente (figura 37B,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, cuando las HUVEC se trataron con 200  $\mu\text{g/mL}$  de ASE, la magnitud de la migración celular bajo la influencia de VEGF se retrasó significativamente (figura 37C) cuando se comparó ya sea con el control positivo con VEGF ( $p < 0.001$ ) o el control negativo sin VEGF ( $p < 0.01$ ). Estos resultados indicaron que ASE no solo anuló la función de quimioquinas del VEGF, sino que también inhibió la migración intrínsecamente presente en las HUVEC.

### ASE inhibió la formación de tubos de células HUVEC

Para investigar más a fondo la acción antiangiogénica de ASE, realizamos el ensayo de formación de tubos in vitro. Cuando se sembraron HUVEC en Matrigel, un gel sólido de proteínas de membrana basal, se alinearon rápidamente y formaron estructuras similares a tubos huecos después de 24 h (figura 38A). En contraste, cuando se añadió ASE al cultivo, la formación de tubos de HUVEC se inhibió significativamente a la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  (figura 38B) o 200  $\mu\text{g/mL}$  (figura 38C) (ambos  $p < 0.001$ ). La diferencia entre estas dos dosis de ASE no fue estadísticamente significativa (figura 38D). En conjunto, estos resultados indicaron que el ASE también ejercía su acción antiangiogénica al inhibir la formación del tubo durante el procedimiento angiogénico.

### Ejemplo 9: composición de loción para la piel que contiene extracto de AM

45 Se prepara una loción para la piel mediante el siguiente método. Se disuelven 0.25 g de hidroxibenzoato de metilo y 7.5 g de glicerina en 75 ml de agua a 150 °F. 0.7 g de monolaurato de sorbitán, 0.7 g de polisorbato 20 y 1.0 g de alcohol cetosteárico se funden a 150 °F y luego se combinan en la solución. La mezcla se deja enfriar mientras se mezcla. Cuando la mezcla alcanza una temperatura inferior a aproximadamente 90 °F, se añaden mientras se mezclan 4 ml de preparaciones de AM y composiciones purificadas descritas en este documento. También se añade una pequeña cantidad de fragancia mientras se mezcla. La loción se envasa en alícuotas de 10 ml y se almacena a temperatura ambiente.

### Ejemplo 10: Composición tópica en gel de matriz estromal de AM y tratamiento de la inflamación de la piel

Para preparar una composición farmacéutica tópica de gel, se mezclan 100 mg de una matriz de estroma de AM liofilizada, molida por congelación, liofilizada con 1.75 g de hidroxipropilcelulosa, 10 mL de propilenglicol, 10 mL de

miristato de isopropilo y 100 mL de alcohol USP purificado. La mezcla de gel resultante se incorpora luego en recipientes, tal como tubos, que son apropiados para la administración tópica. El gel se aplica a la piel inflamada 2 veces al día. Mediante el uso de este método, la inflamación de la piel disminuye.

Ejemplo 11: Composición de la solución oftalmológica y tratamiento de una enfermedad ocular

5 Se prepara una solución oftálmica para gotas oculares mezclando 100 mg de extracto de AM liofilizada molida con 0.9 g de NaCl en 100 mL de agua purificada y se filtra con un filtro de 0.2 micras. La solución isotónica resultante se incorpora luego a las unidades de administración oftálmica, tal como los recipientes de gotas oculares, que son apropiados para la administración oftálmica. Dos gotas de la composición se aplican a un ojo dañado por quemaduras 4 veces al día. Mediante el uso de este método, el ojo vuelve a la salud normal.

10 Ejemplo 12: composición de ungüento ocular y tratamiento de la enfermedad ocular usando la misma

Se prepara una composición de ungüento para ojos estéril combinando 90 gramos de vaselina blanca, 10 gramos de vaselina líquida y 0.5 gramos de AM de polvo liofilizado. La mezcla se pasteuriza y se envasa en recipientes de tubos individuales de 2.0 g cada uno.

15 Para tratar una enfermedad ocular usando la composición, se aplica suavemente una parte alícuota desde aproximadamente 0.1 g directamente desde el tubo hasta el borde interior del párpado inferior. El ungüento se aplica 4 veces al día. El progreso del paciente es controlado cada dos semanas por un oftalmólogo. Mediante el uso de este método, la enfermedad ocular mejora.

Ejemplo 13: Tratamiento de la enfermedad del ojo humano usando la preparación de AM

20 Se identifica un individuo con daño por quemadura en el ojo. Se prepara una preparación de AM al 1%, colágeno al 0.5% en DMEM. El individuo se trata 4X por día con 2 gotas de la composición. Mediante el uso de este método, el daño ocular mejora en comparación con un ojo dañado por quemadura no tratado.

Ejemplo 14: Tratamiento de la enfermedad de la piel humana usando preparación de AM

25 Se identifica un individuo con psoriasis. El individuo se trata con un 5% de preparación de AM reconstituida, suplementada con 1 mg/ml de Smad7 purificada derivada de una fuente comercial. La formulación se disuelve en una composición de loción. El tratamiento se administra 2 veces al día. Mediante el uso de este método, la psoriasis se alivia o desaparece.

Ejemplo 15: Composición de gel rectal que contiene extracto de AM

30 Se prepara una composición de gel rectal combinando 100 mg de HA comercialmente disponible y TSG-6 (purificado) con 5 ml de extracto de AM estéril preparado a partir de material de membrana de AM congelado como se describe en el ejemplo 1. A esta mezcla se le añaden 2.5 g de metilcelulosa (1500 mPa), 100 mg de metilparapeno, 5 g de glicerina y 95 mL de agua purificada. La mezcla de gel resultante se incorpora luego a las unidades de administración rectal, tal como jeringas, que son apropiadas para la administración rectal.

Ejemplo 16: Un kit para tratar la inflamación de la piel

35 Se prepara un kit de venta libre para el tratamiento de la inflamación de la piel. El kit está hecho de un paquete que contiene un recipiente de 1 ml de extracto de AM en una formulación de pasta, un aplicador y una hoja de instrucciones.

Ejemplo 17: forma de dosificación sólida de liberación prolongada y uso para disminuir la inflamación de la artritis

40 Se prepara una forma de dosificación de liberación prolongada mezclando 100 mg de matriz de estroma de AM liofilizada y molida por congelación con 800 mg de metilcelulosa y luego se microencapsula en un recubrimiento de carboximetilcelulosa. Aproximadamente 15 mg del material microencapsulado se implanta como un bolo debajo de la piel en una articulación de la rodilla inflamada de un paciente con artritis. El procedimiento de implantación se repite una vez a la semana. Mediante el uso de este método, la inflamación de la rodilla disminuye.

Ejemplo 18: Composición parenteral

45 Se prepara una composición parenteral para administración intramuscular mezclando 10 mg de cada uno de: HA, TSG-6, PTX-3 y TSP-1, cada uno de los cuales se obtiene de una fuente comercial, con 100 mg de sal soluble en agua de un compuesto descrito en este documento se disuelve en DMSO y luego se mezcla con 10 ml de solución salina estéril al 0.9%. La mezcla se incorpora en una forma unitaria de dosificación apropiada para la administración por inyección.

Ejemplo 19: Tratamiento de un tumor humano mediante inyección directa de una preparación parenteral de AM

5 Se identifica un paciente que tiene un tumor subcutáneo de aproximadamente 2 cm de ancho. Se mezclan 10 gramos de extracto líquido de AM con 10% de PEG 300 en agua durante 2 horas a 4 °C. La mezcla se filtra a través de un filtro de 0.20 µm y se divide en alícuotas en viales de vidrio estériles que se cerraron con tapones de goma y se sellaron con tapas de aluminio. Los viales se almacenan a 4 °C hasta 2 semanas antes de su uso. El paciente se trata inyectando directamente la solución de 0.50 ml a través de la piel en el sitio del tumor, dividiendo el volumen de administración en 4 regiones separadas de la masa tumoral (aproximadamente 125 µl para cada uno de los cuatro sitios). La composición se administra cada 48 horas. El tamaño del tumor se controla semanalmente. Mediante el uso de este método, el tamaño del tumor disminuye.

10 Aunque las realizaciones preferidas se han mostrado y descrito en este documento, los expertos en la técnica podrán realizar numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Se debe entender que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en este documento para poner en práctica la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que se desarrollen dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes, estén cubiertas de este modo según el protocolo sobre la interpretación del Artículo 69 EPC.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende:
- (a) Membrana amniótica pulverizada o molida aislada de placenta congelada o previamente congelada preparada mediante pulverización o molienda de membrana amniótica no homogeneizada congelada, que comprende:
- 5 • hialuronano (HA) de alto peso molecular que está reticulado por un enlace covalente a la cadena pesada del inhibidor de la inter- $\alpha$ -tripsina ( $I\alpha I$ ), teniendo el HA de alto peso molecular un peso molecular mayor que  $10^6$  Dalton;
- gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TSG-6);
- pentraxina (PTX-3); y
- trombospondina (TSP-1); y
- 10 (b) un componente químico seleccionado del grupo que consiste en portadores, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y excipientes.
2. Una composición según la reivindicación 1, en la que la composición se formula como una forma de dosificación no sólida.
3. Una composición según la reivindicación 2, en la que la forma de dosificación no sólida es una solución, suspensión, aerosol, pasta, pulverización, ungüento, aceite, emulsión, crema, loción, gel, un vendaje recubierto, parche, barra, bálsamo, champú, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 4. Una composición según las reivindicaciones 2 o 3, en la que la composición se formula para administración oftálmica, administración tópica o administración sistémica.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la que la composición comprende además un potenciador de la penetración y un adyuvante acuoso.
- 20 6. Una composición según la reivindicación 1, en la que la composición se formula como una forma de dosificación sólida.
7. Una composición según la reivindicación 6, en la que la composición se formula como una forma de dosificación oral sólida.
- 25 8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en un método de tratamiento de cicatrización de heridas.
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en un método de tratamiento cosmético o reversión de la formación de cicatrices en un sujeto.
- 30 10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en un método de tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis en un sujeto.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en un método de disminución de la inflamación en un sujeto.
12. Una composición para uso según la reivindicación 10, en la que la composición tiene las siguientes propiedades:
- i. induce la apoptosis de las células endoteliales implicadas en la formación vascular;
- 35 ii. previene la migración de células endoteliales implicadas en la formación vascular;
- y
- iii. previene la formación de tubos de células endoteliales implicadas en la formación vascular.
13. Una composición para uso según la reivindicación 11, en la que la composición tiene al menos dos de las siguientes propiedades:
- 40 i. induce apoptosis de macrófagos en el sitio de la inflamación;
- ii. aumento de la proporción de prostaglandina D2 a prostaglandina E1 en el sitio de la inflamación;
- iii. suprime la actividad de TGF- $\beta$ 1 en el sitio de la inflamación;
- iv. inhibe la transducción de la señal de interferón-gamma en el sitio de la inflamación.

Actividad del promotor TGF- $\beta$ 1

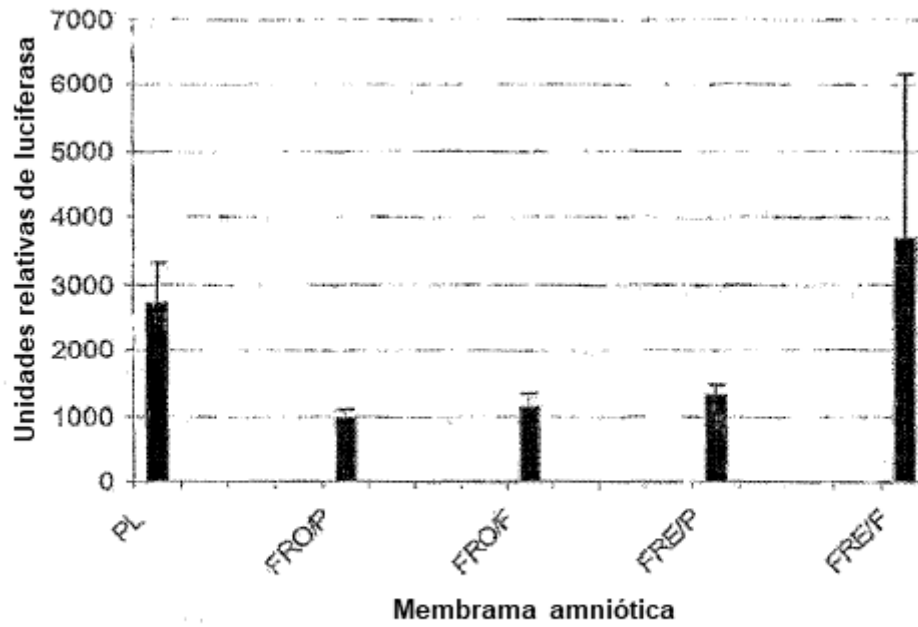


Fig. 1A

Comparacion del valor P en dos lados

	PL	FRO/P	FRO/F	FRE/P	FRE/F
PL	X	x	x	x	x
FRO/P	0.007692	x	x	x	x
FRO/F	0.007268	0.30195	x	x	x
FRE/P	0.012185	0.024442	0.23750452	x	x
FRE/F	0.500177	0.115462	0.12833157	0.14812627	x

Fig. 1B

**Extracto de AM congelado /Lado F/PBS**

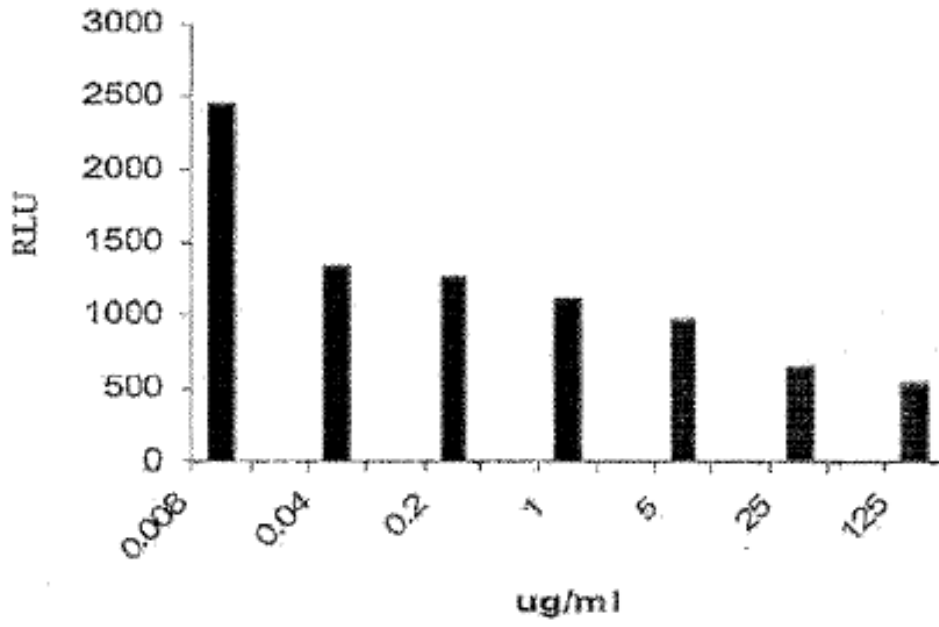


Fig. 2



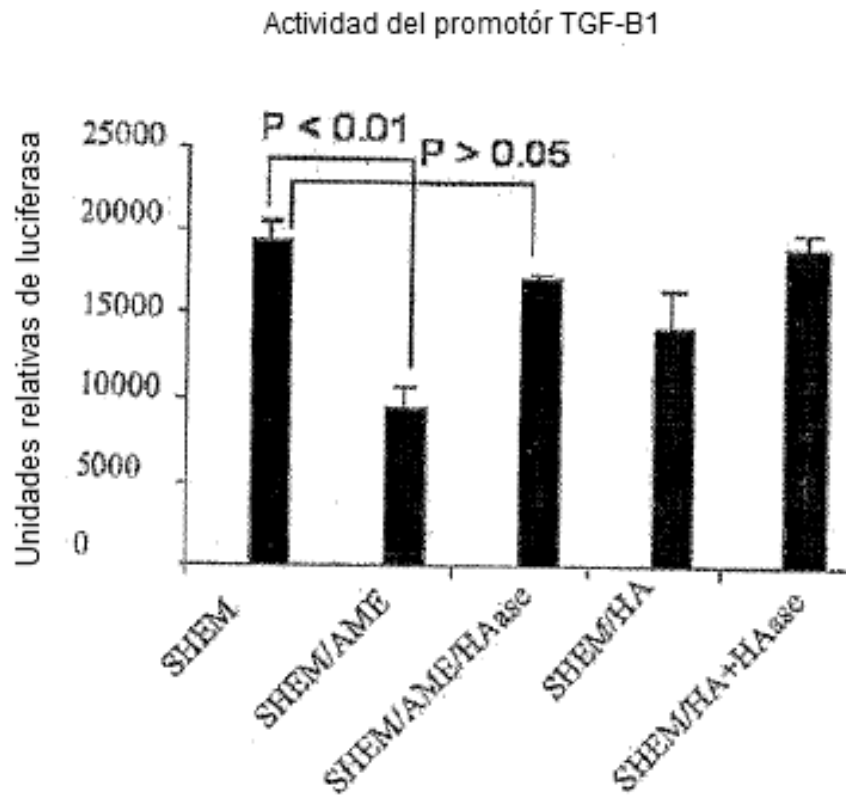


Fig. 3

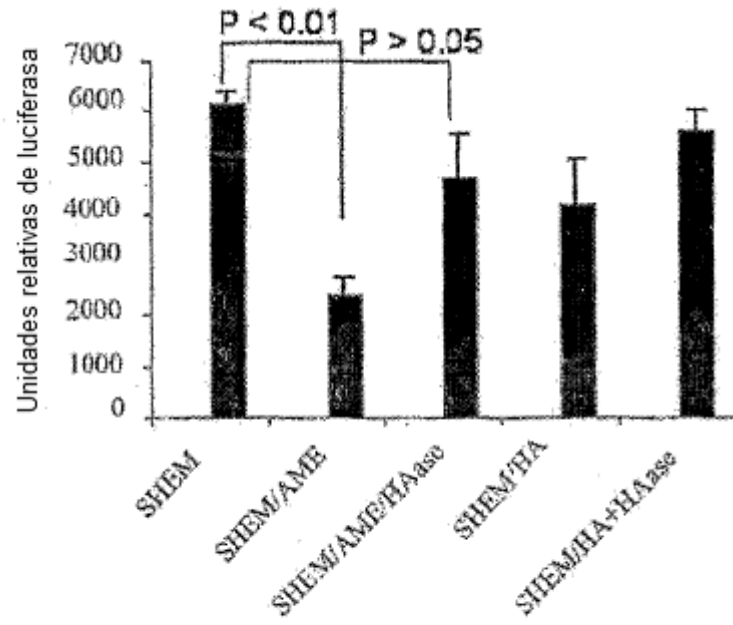


Fig. 4

**Comparación de AM vs Gelatina y velocidad baja vs alta**

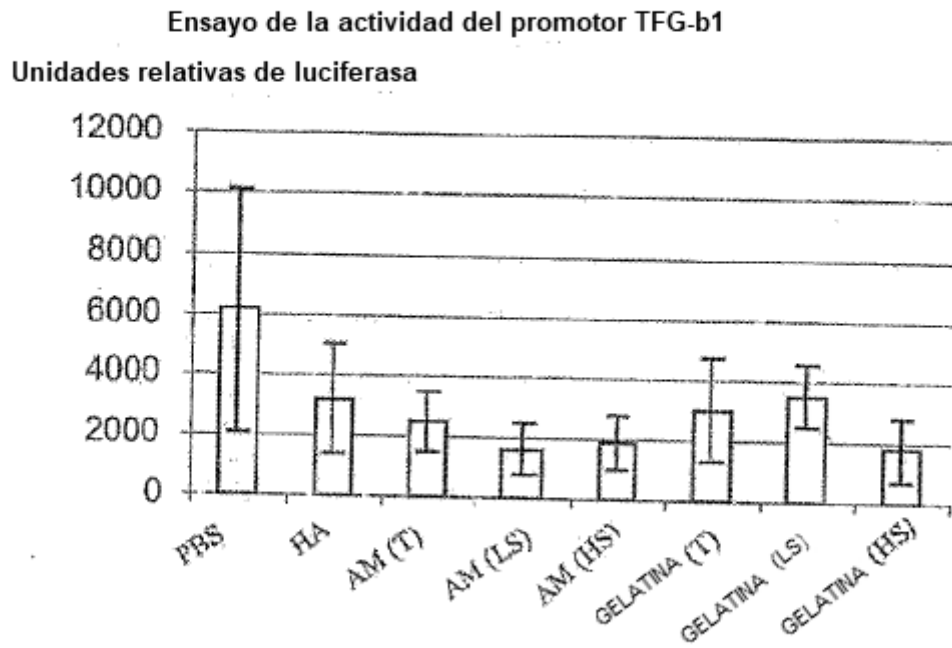


Fig. 5

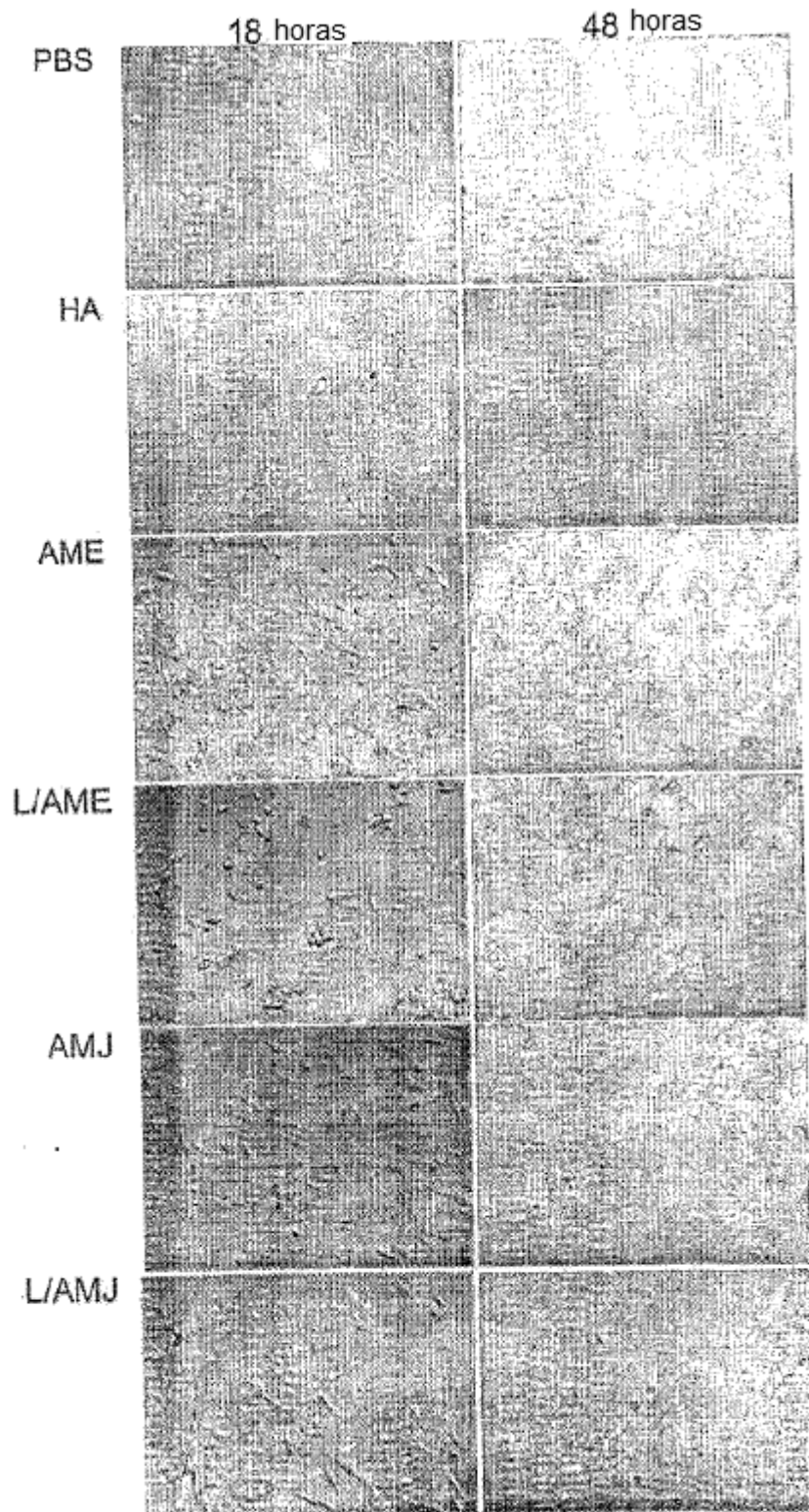


Fig. 6

**Ensayo de actividad del promotor TGF- $\beta$ 1**

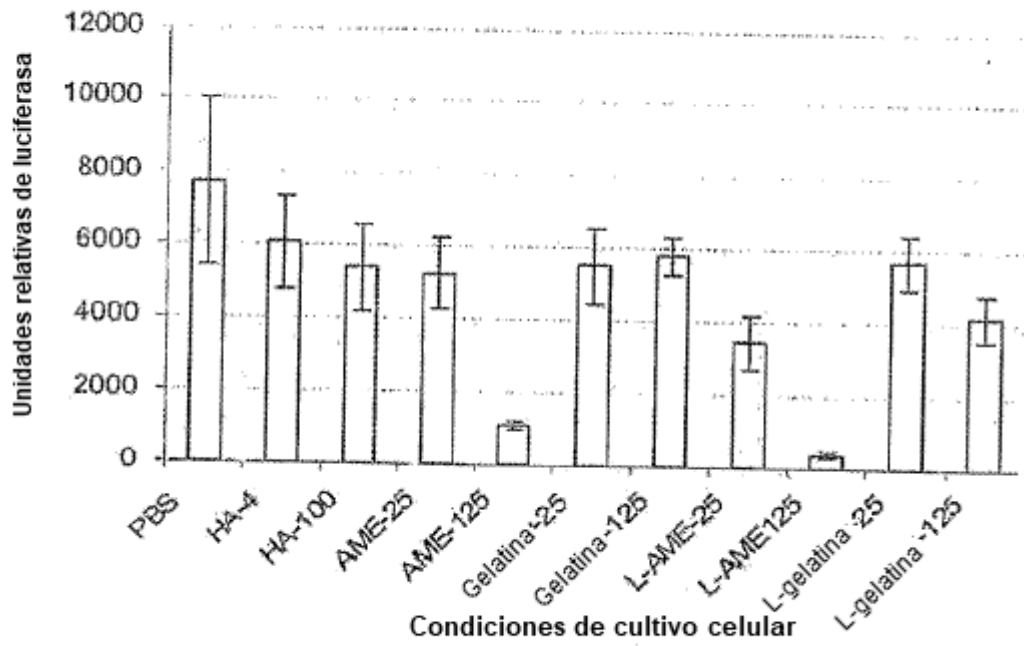


Fig. 7

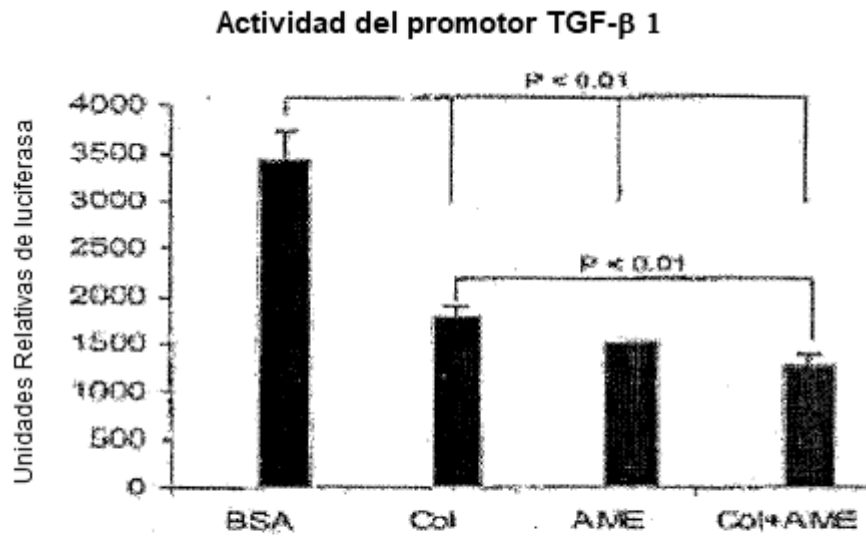


Fig. 8

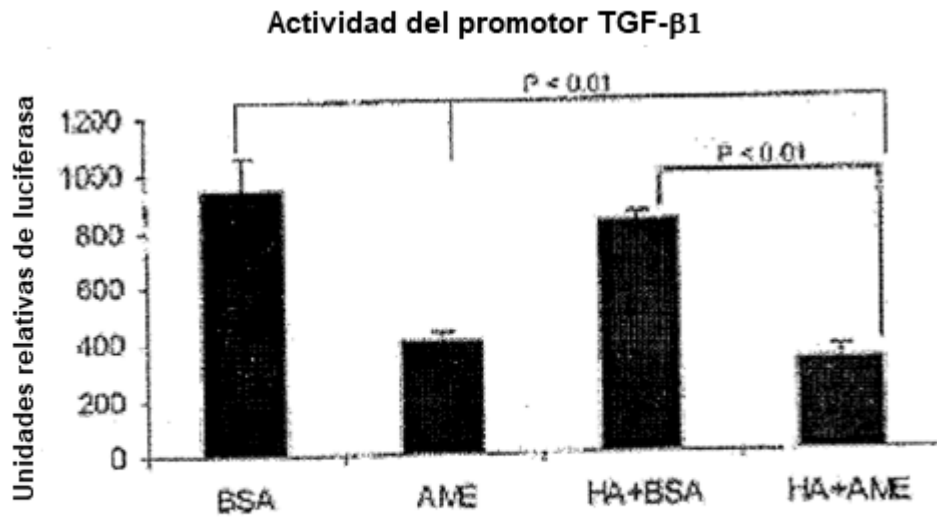


Fig. 9

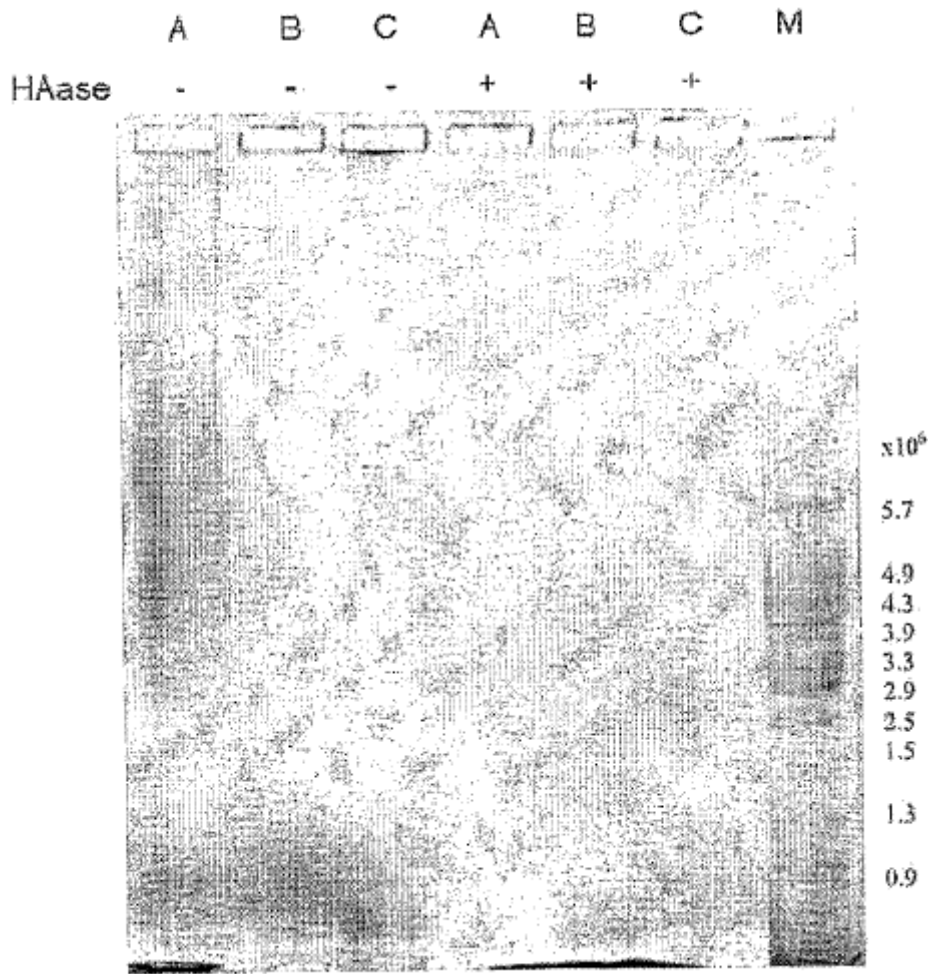


Fig. 10



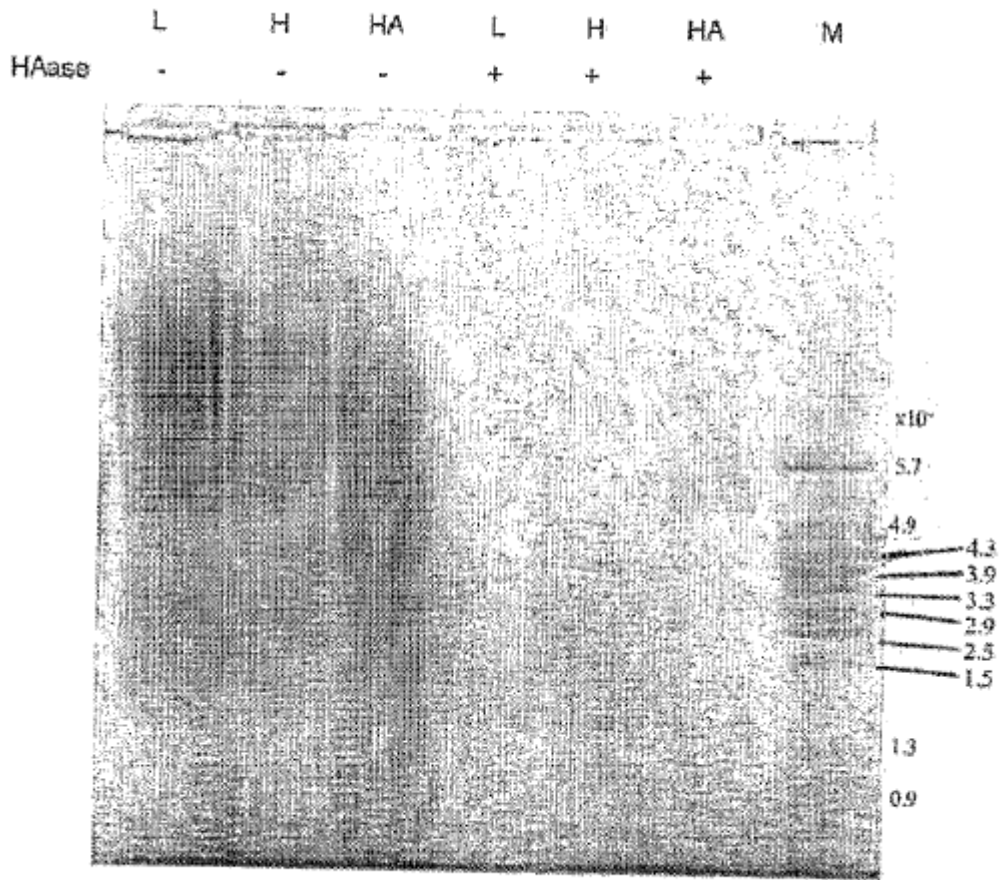


Fig. 11

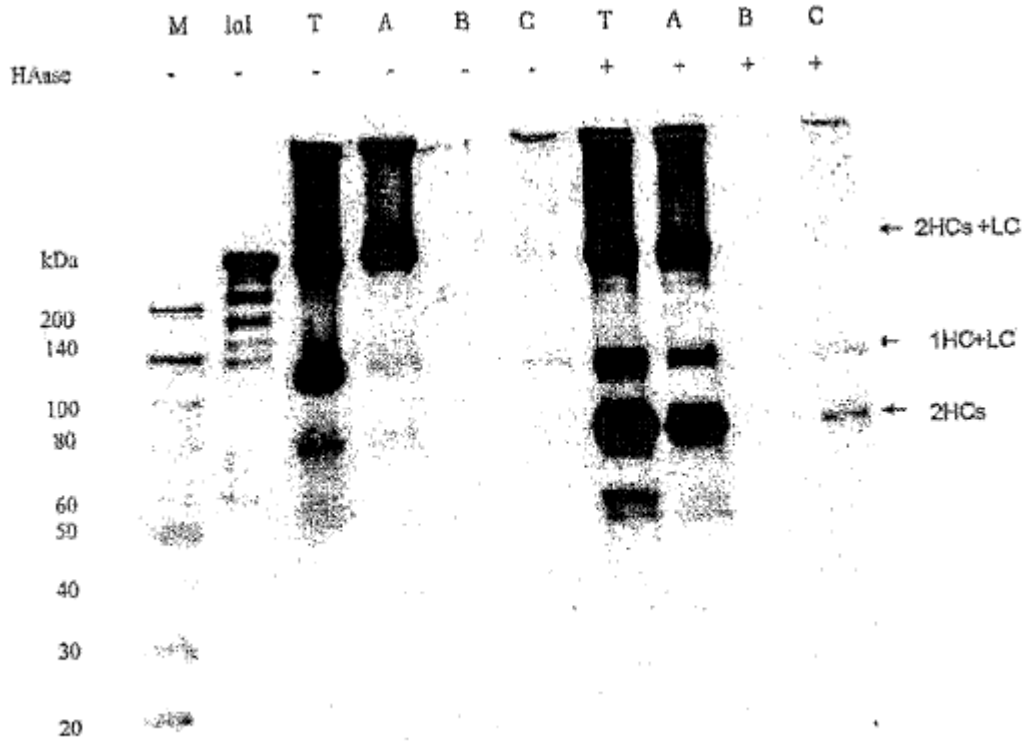


Fig. 12

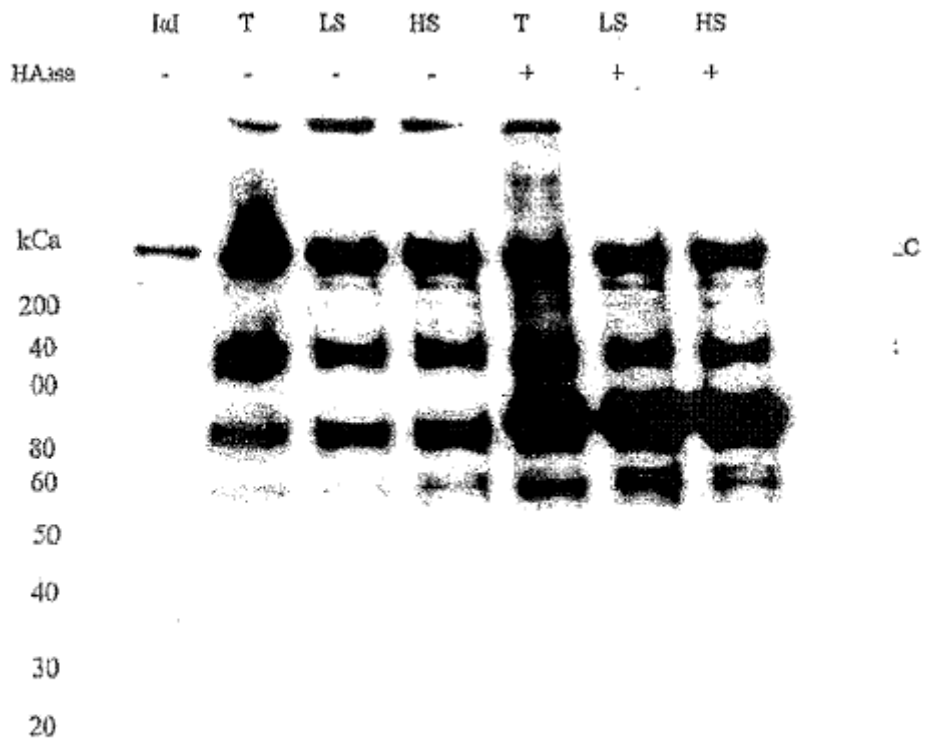


Fig. 13

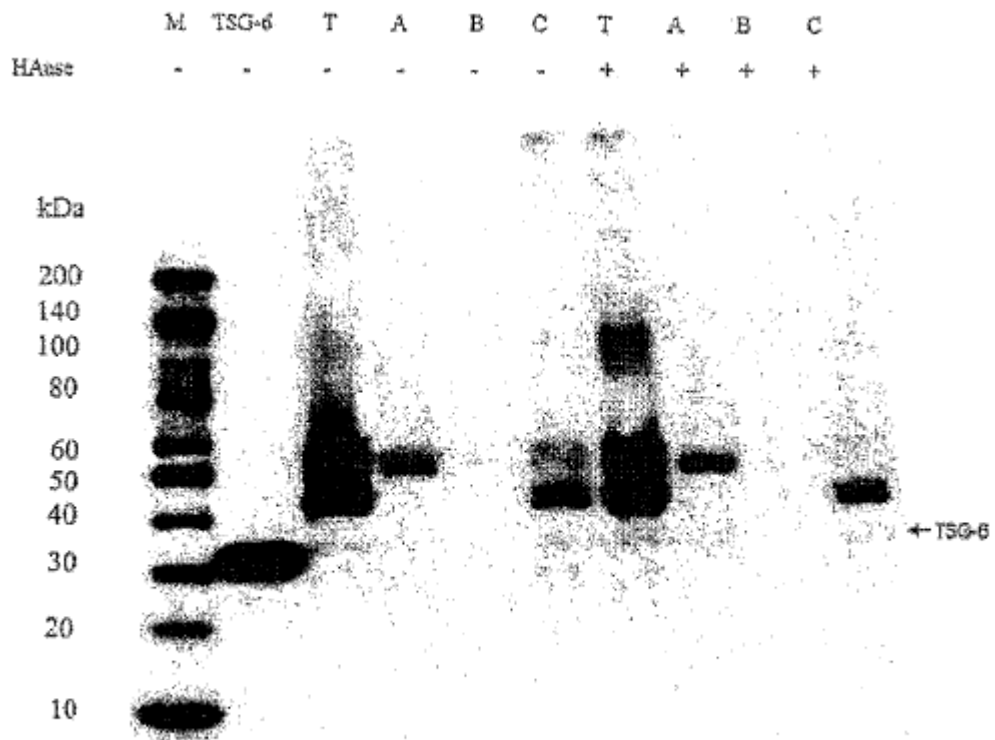


Fig. 14

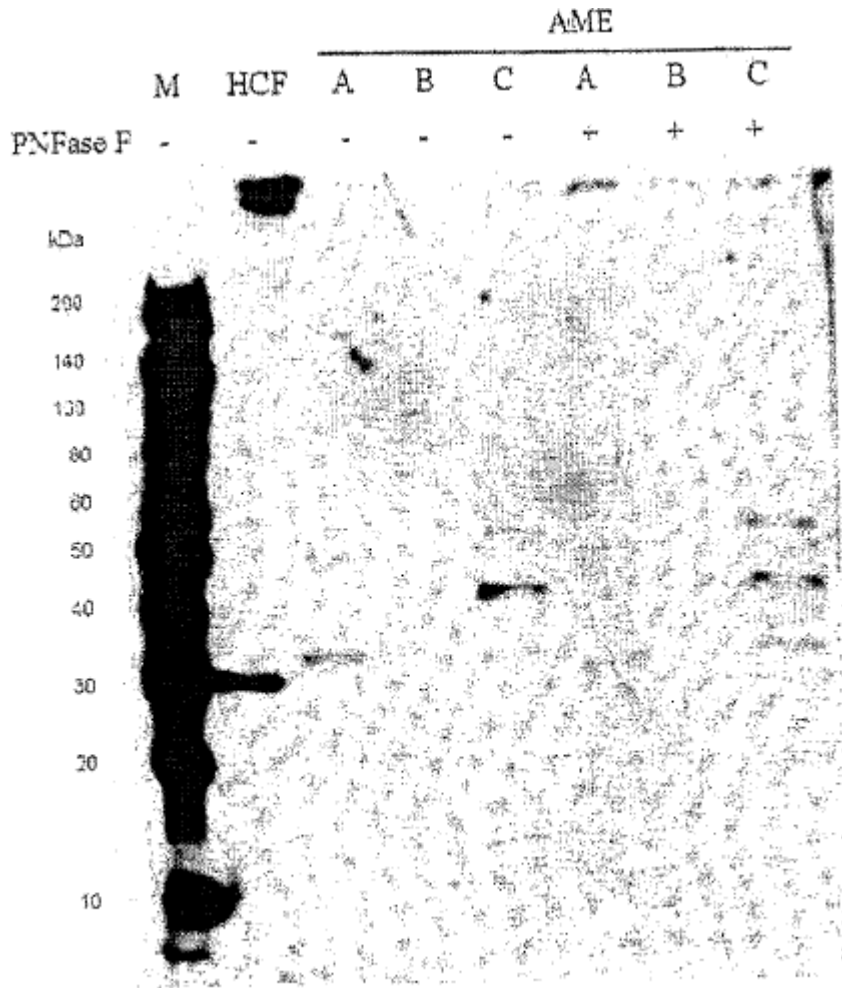


Fig. 15

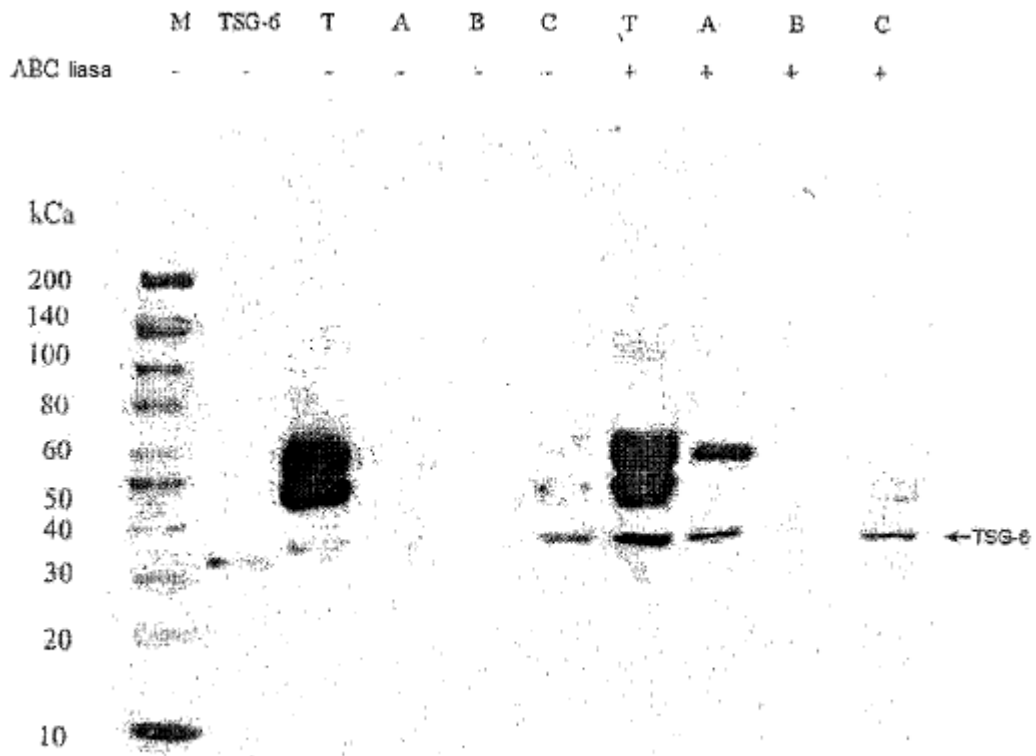


Fig. 16

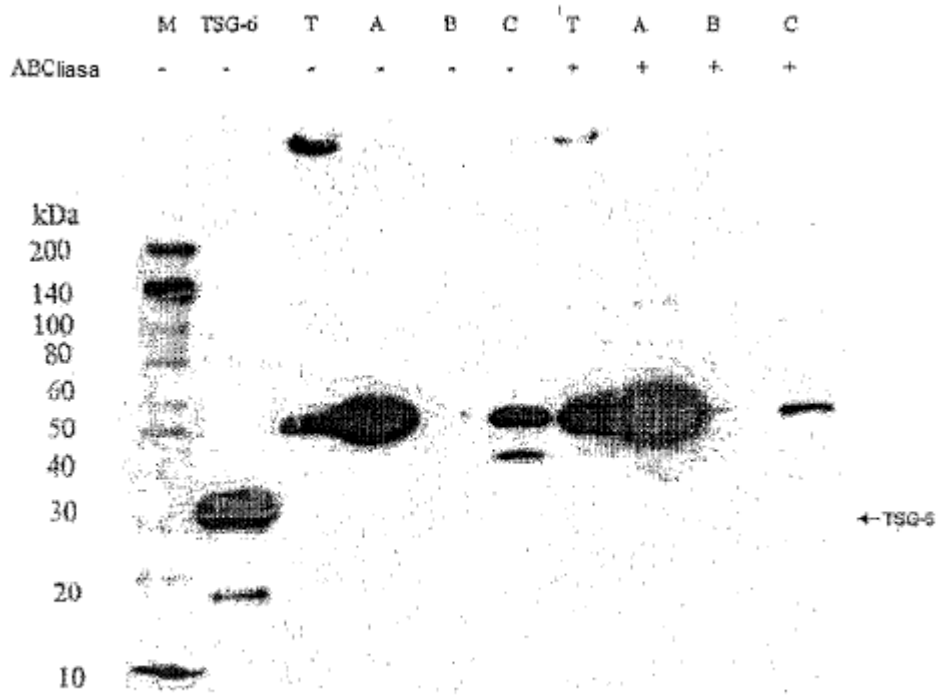


Fig. 17

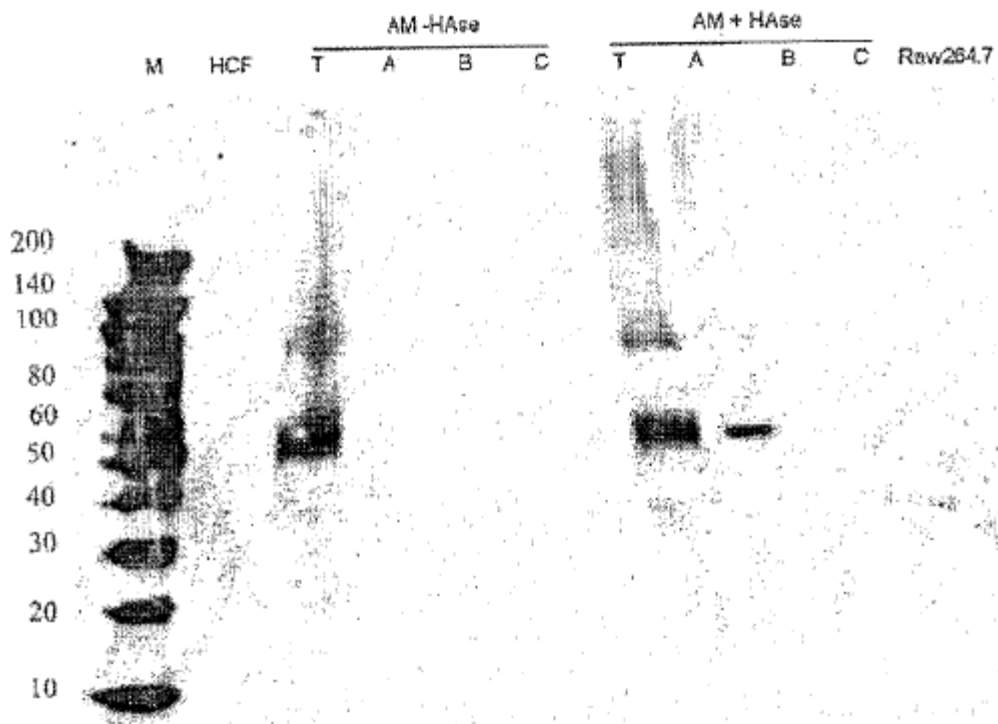


Fig. 18



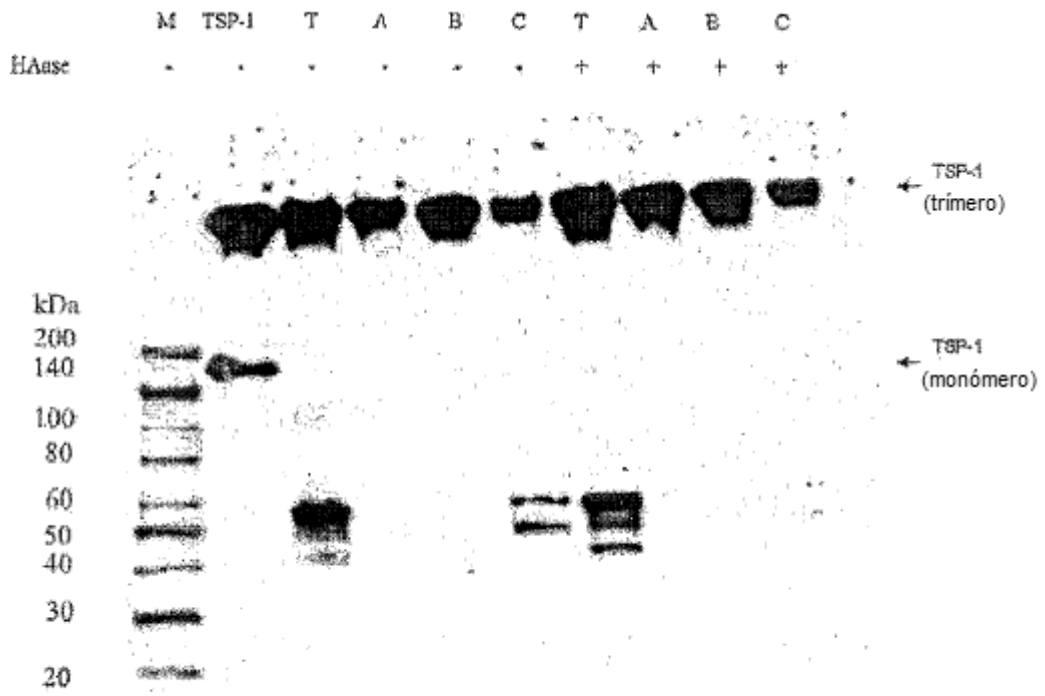


Fig. 19

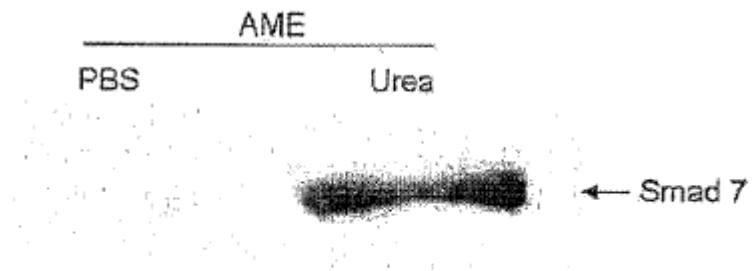


Fig. 20

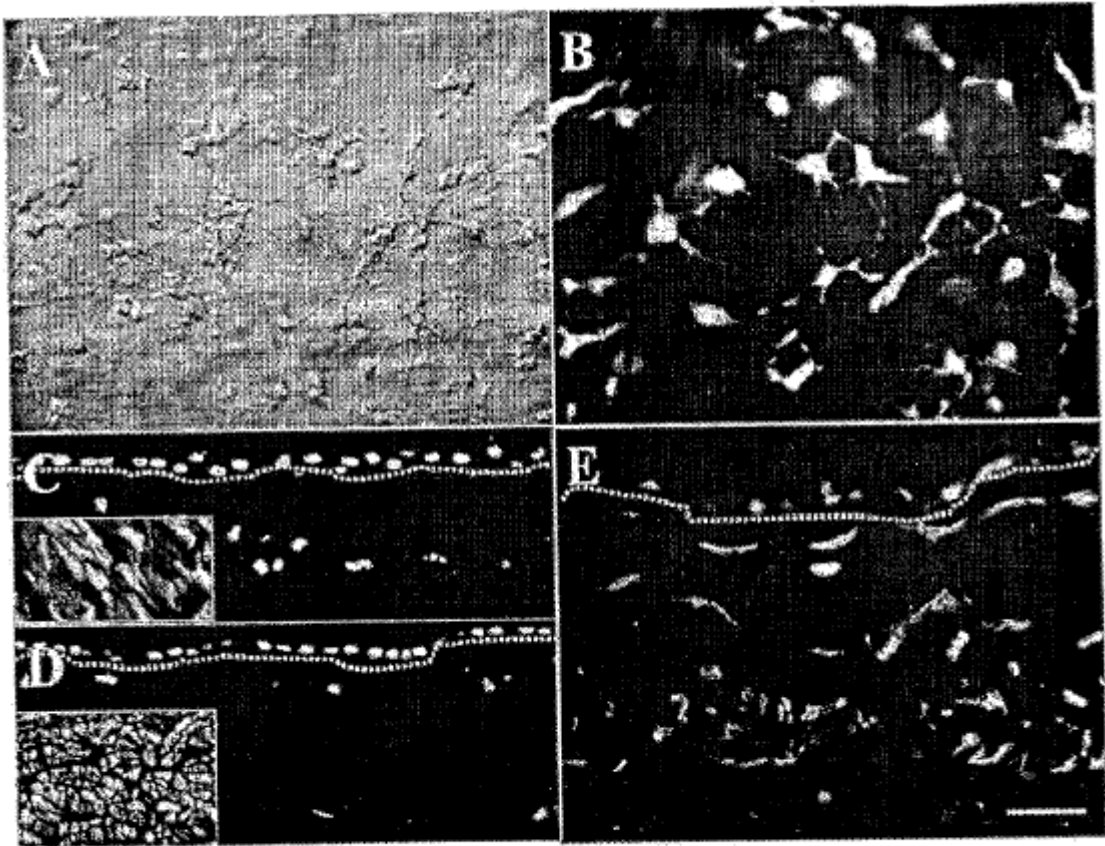
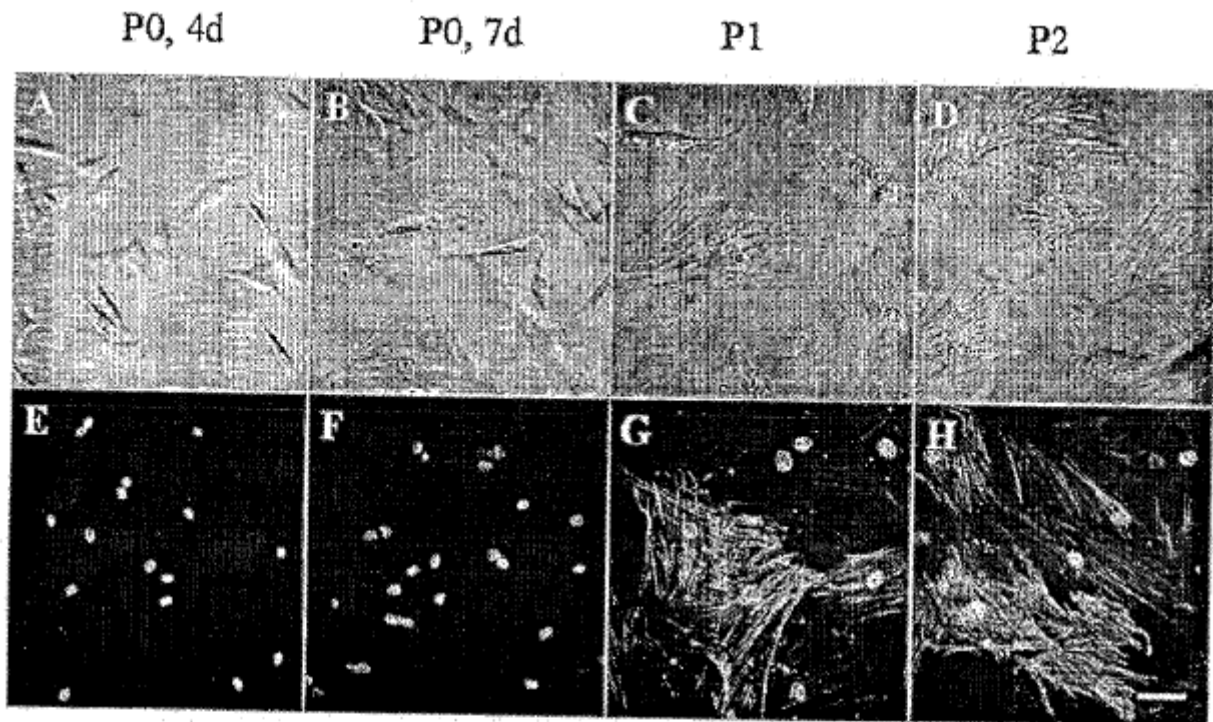
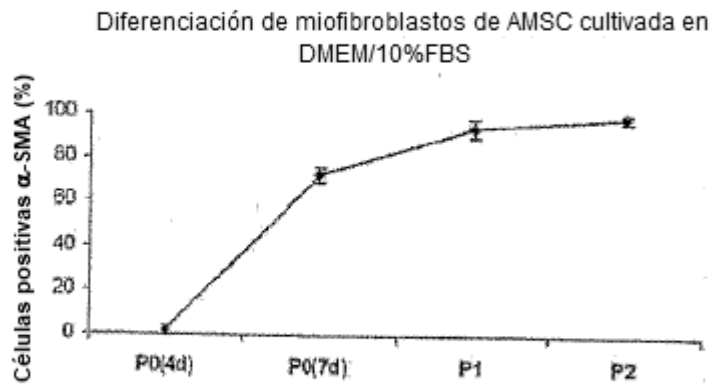


Fig. 21



I



J

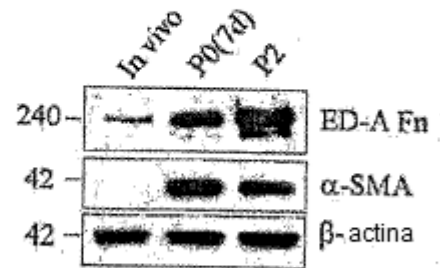


Fig. 22

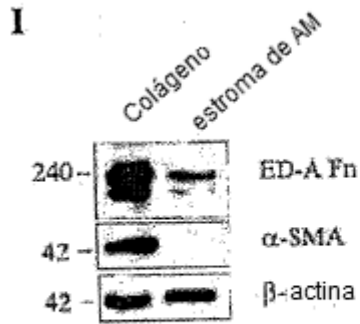
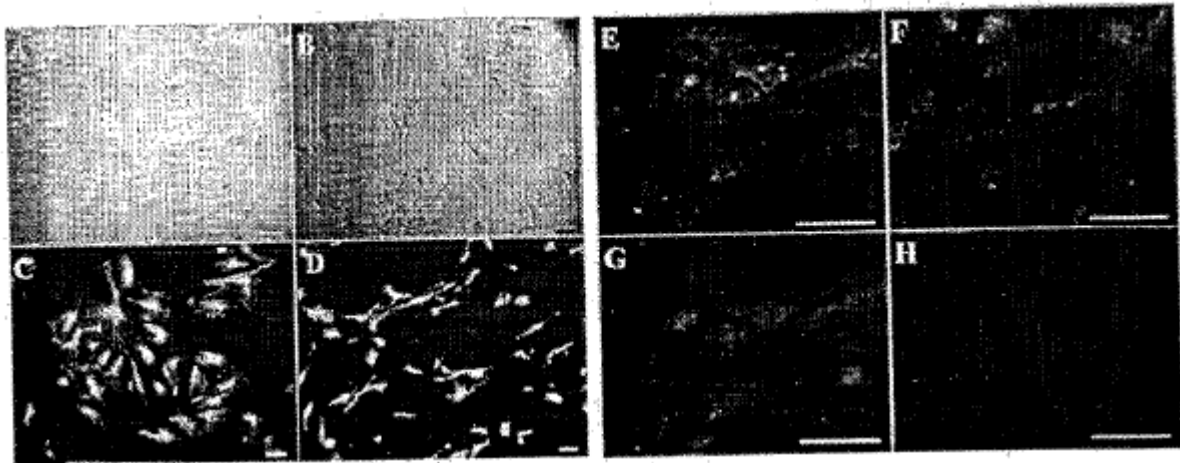


Fig. 23

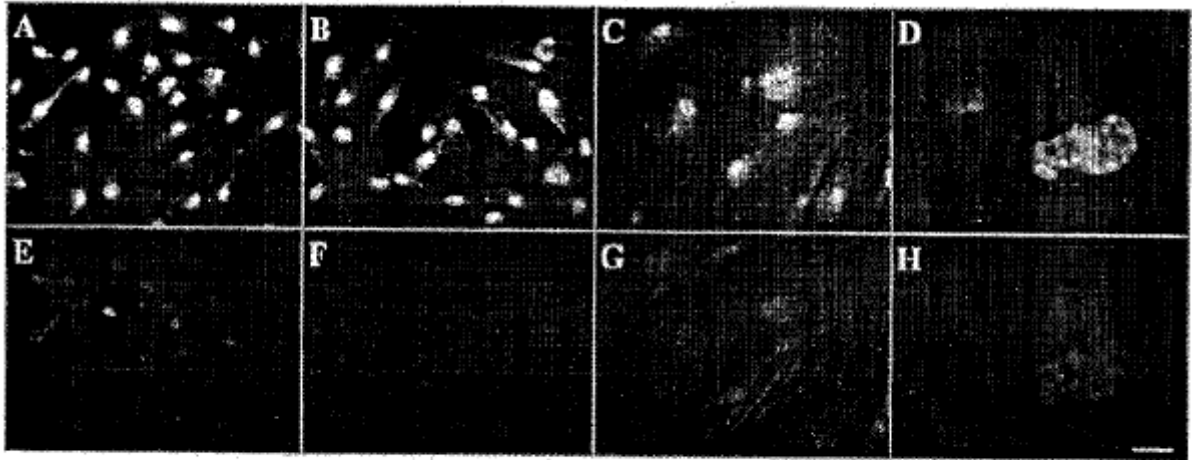


Fig. 24

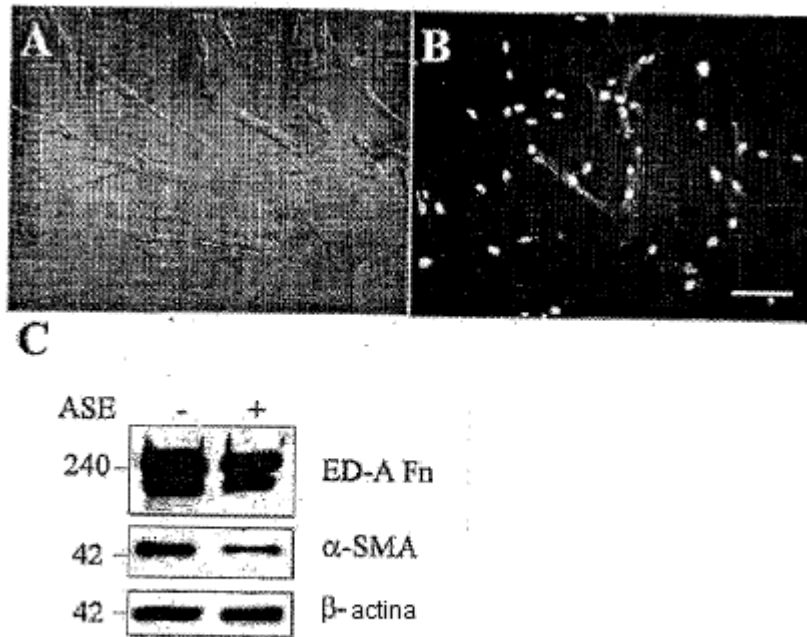


Fig. 25

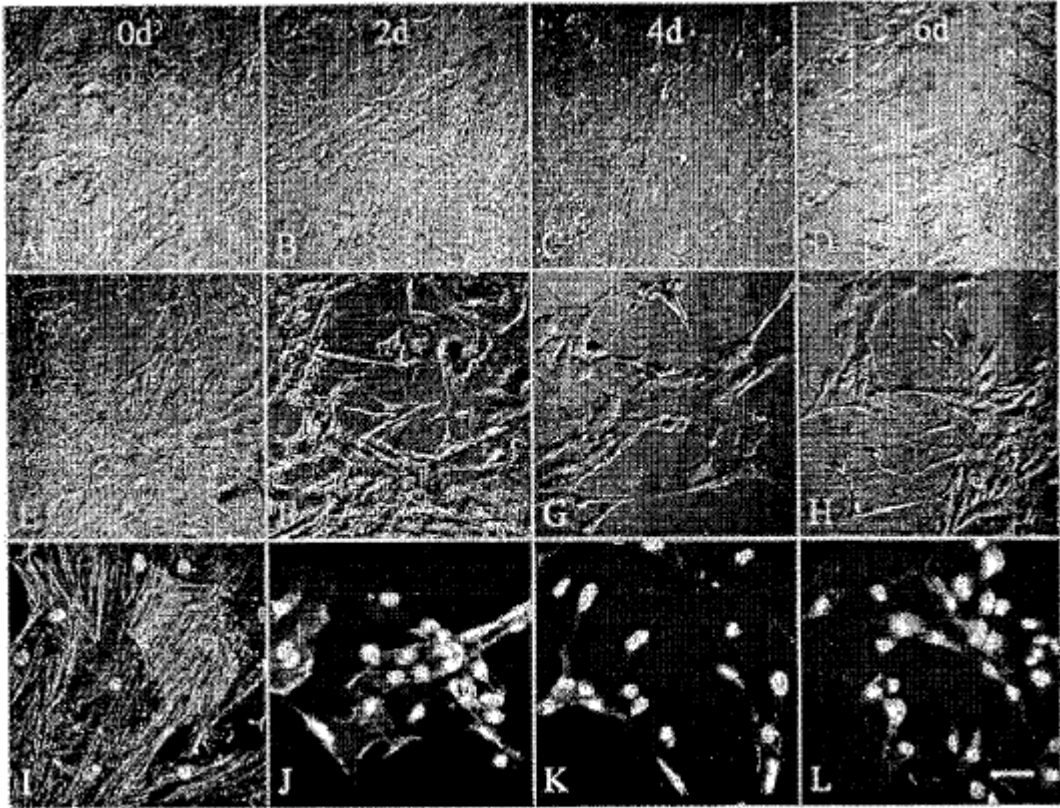


Fig. 26



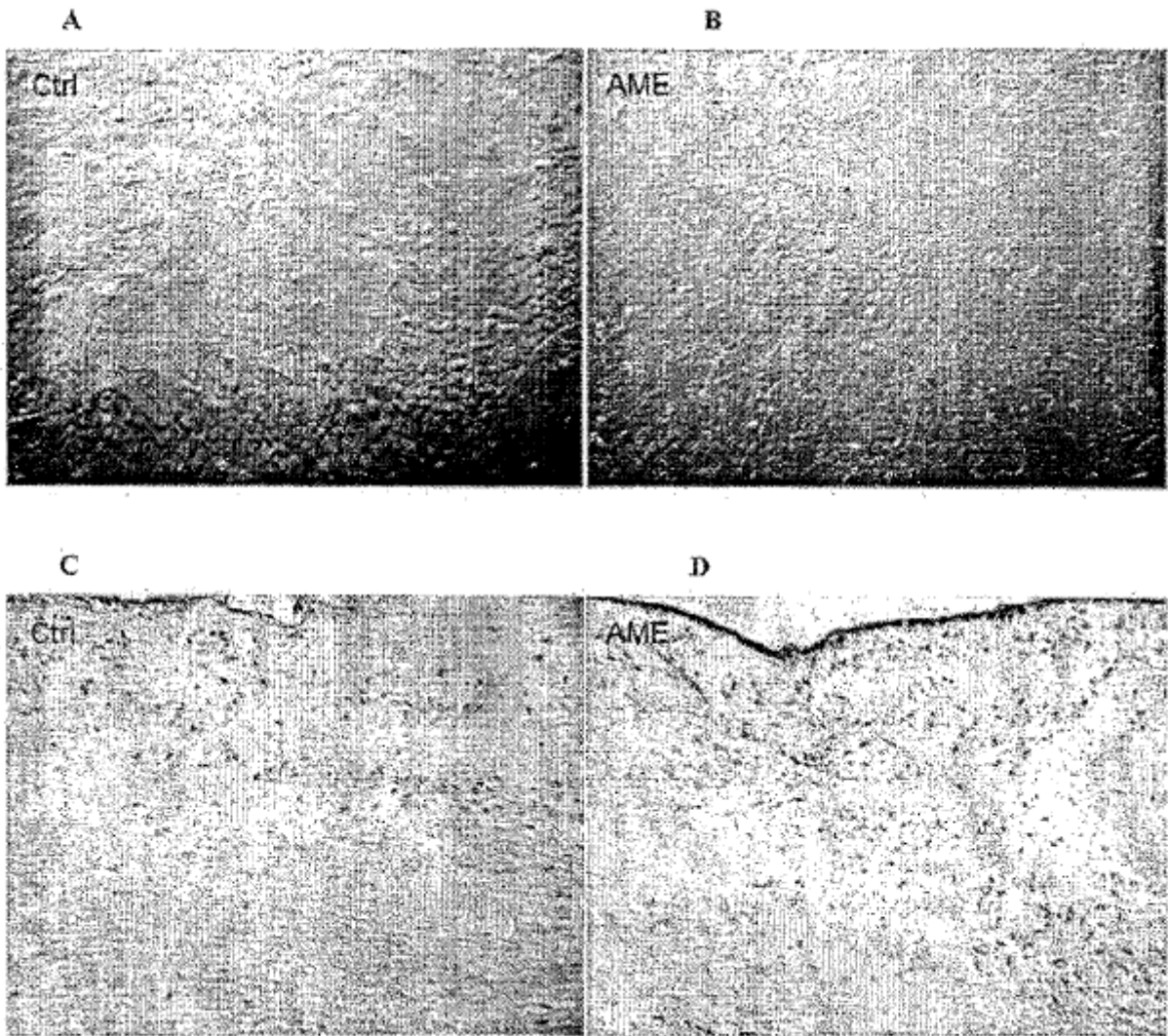
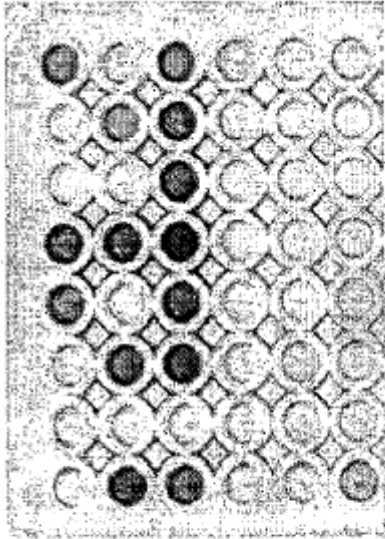
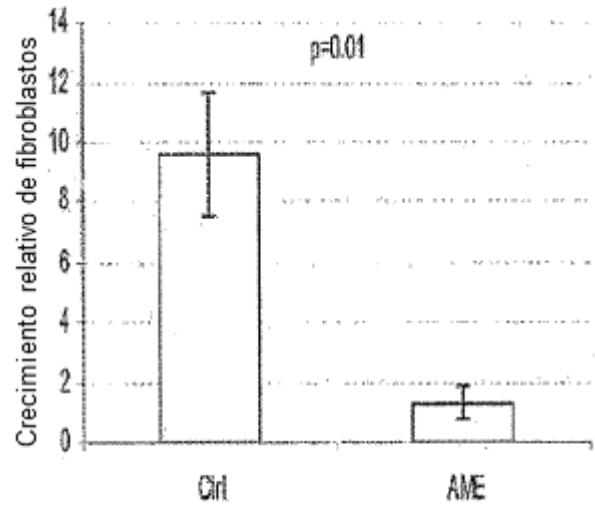


Fig 27



A



B

Fig. 28

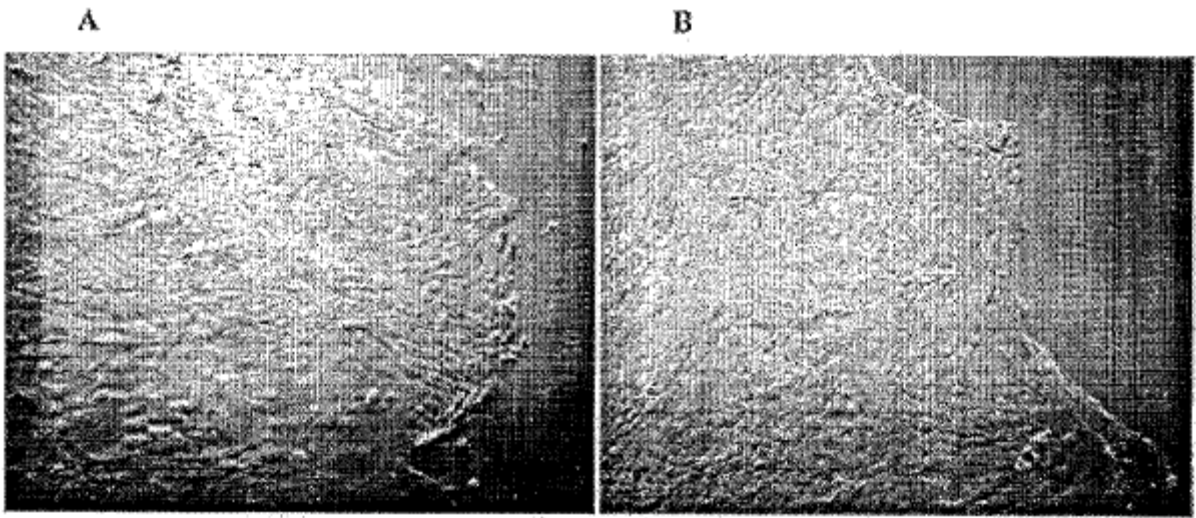


Fig. 29

Ensayo de NO

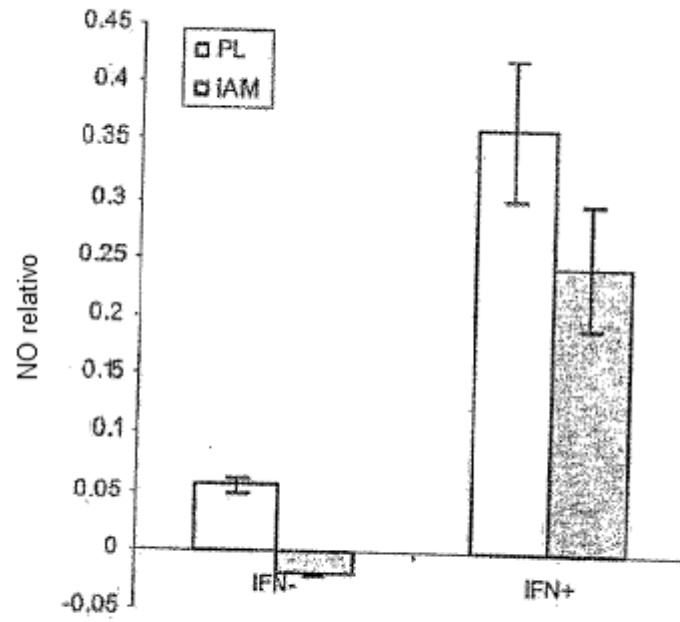


Fig. 30

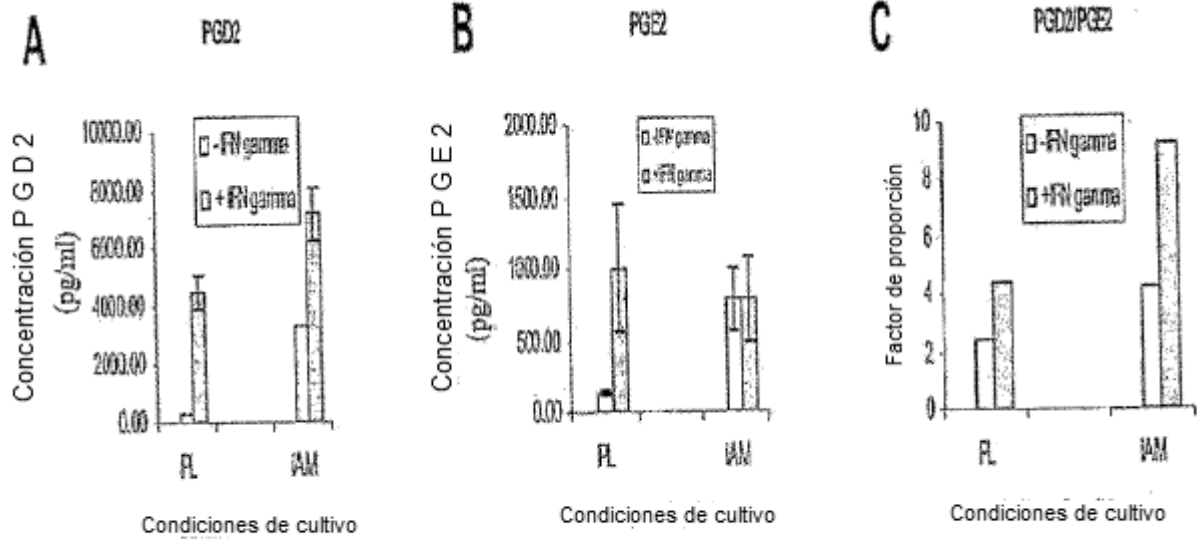


Fig. 31

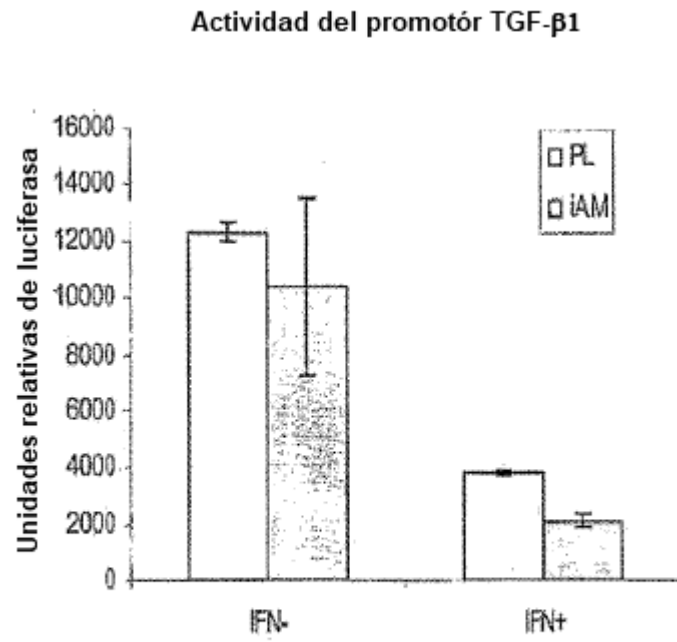


Fig. 32

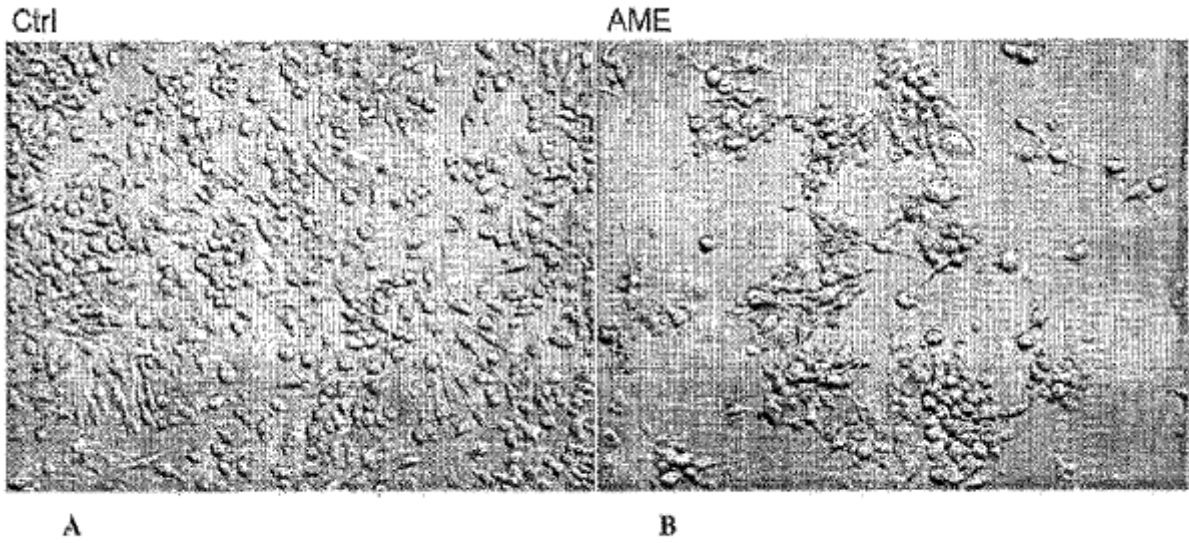
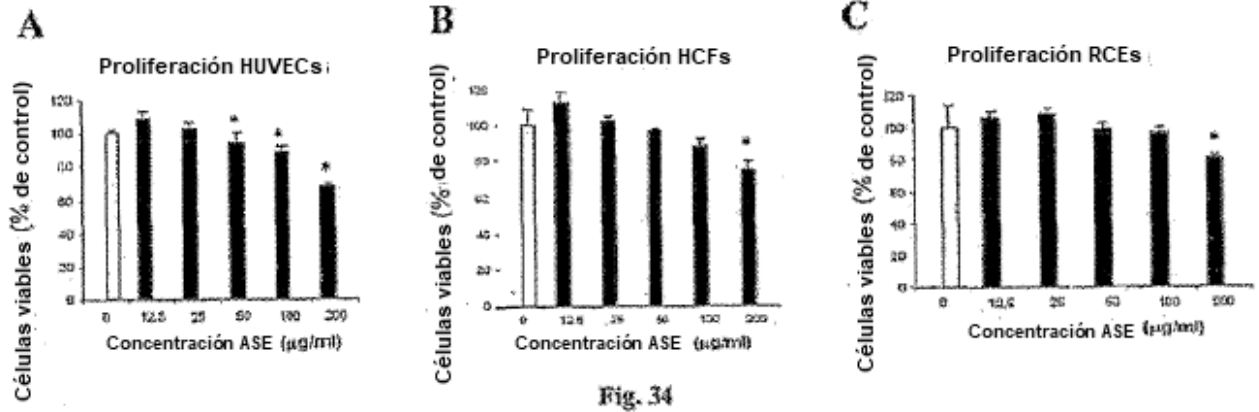


Fig. 33





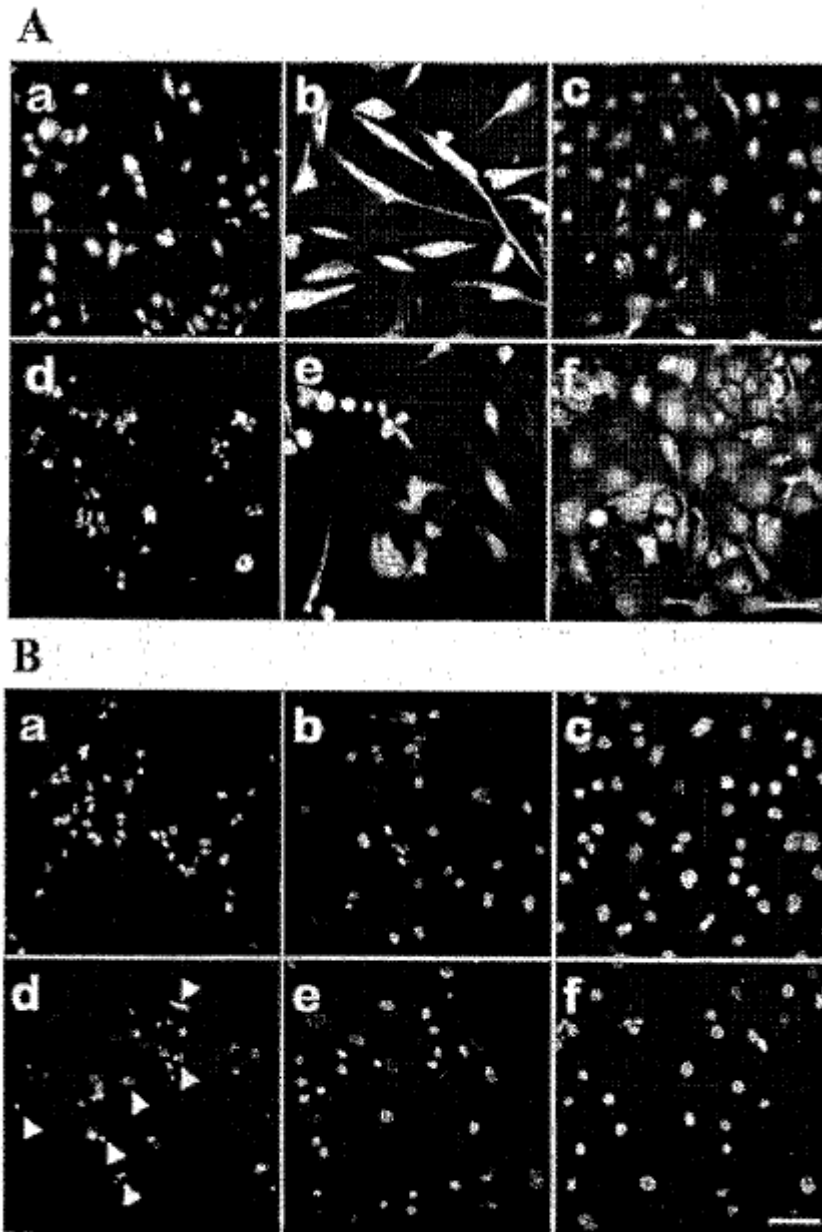


Fig. 35

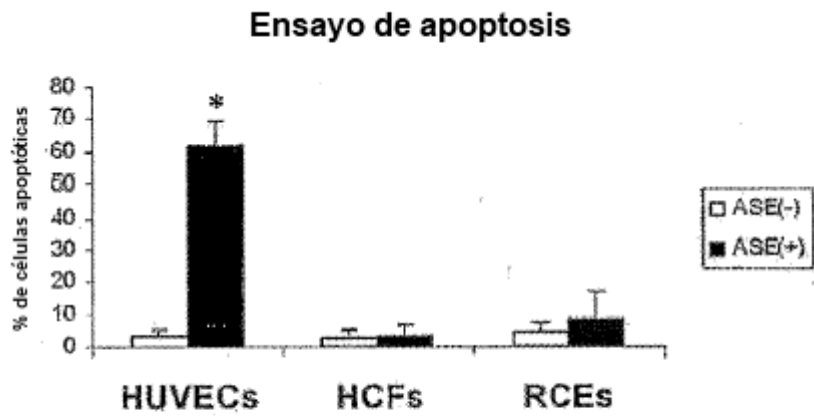


Fig. 36

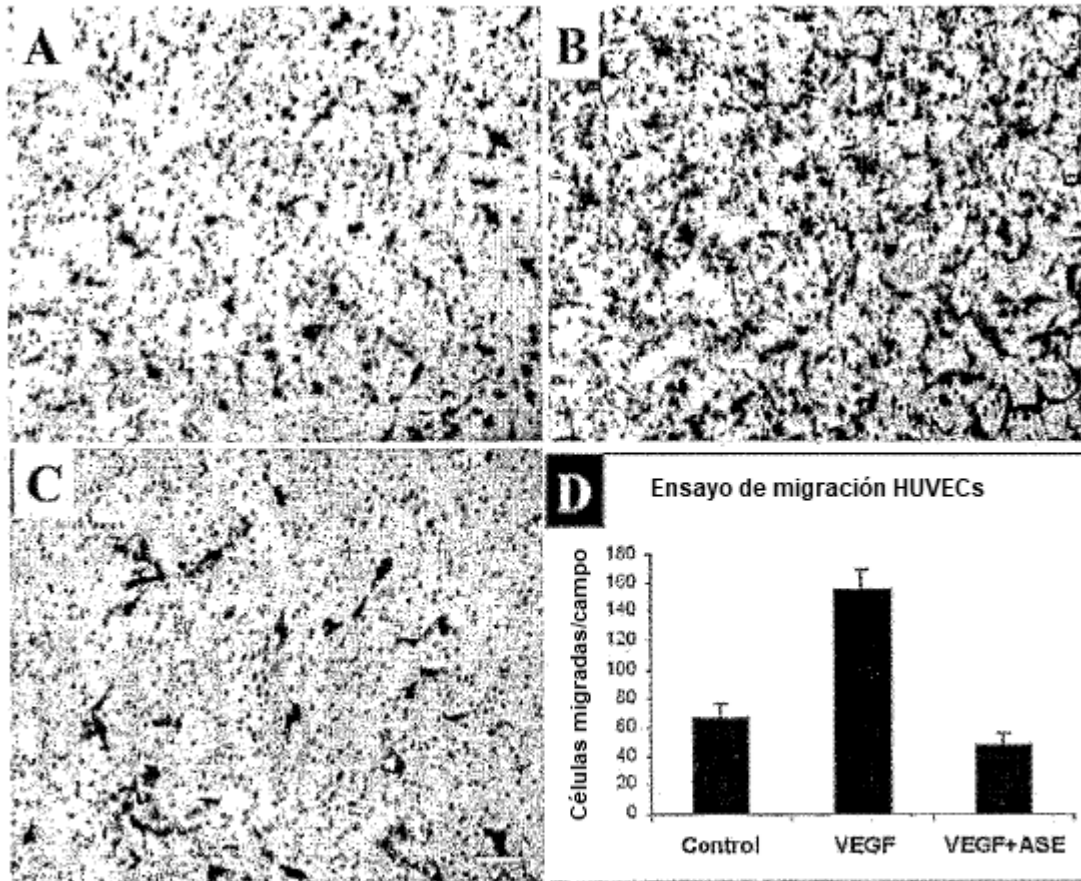


Fig. 37

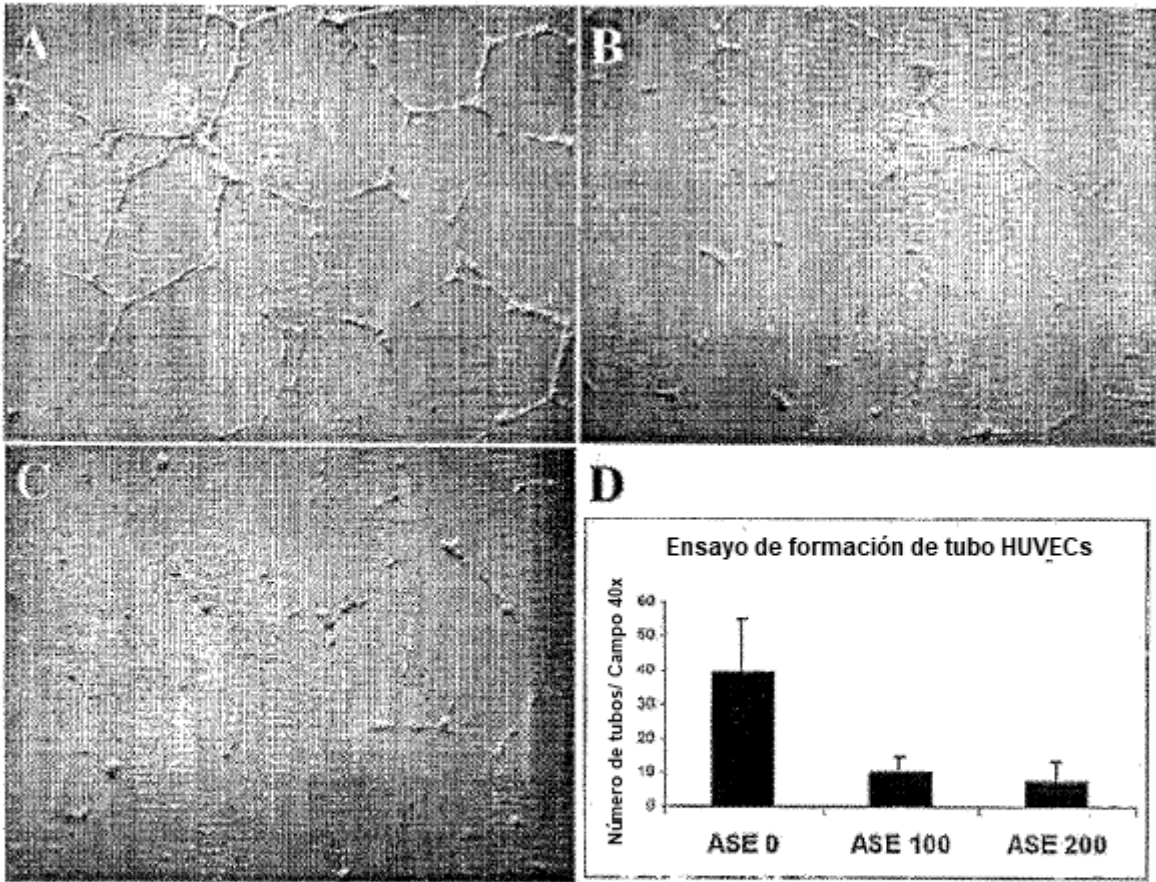


Fig. 38