

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 658**

51 Int. Cl.:

A61K 31/74	(2006.01)
A61K 35/50	(2015.01)
A61K 38/18	(2006.01)
C12N 15/19	(2006.01)
A61L 27/34	(2006.01)
A61L 31/10	(2006.01)
A61L 27/54	(2006.01)
A61L 31/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023173**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164669**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14778140 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2968402**

54 Título: **Dispositivo médico que tiene un revestimiento que comprende ACCS**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361779032 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BROWN, LARRY, R. y
SING, GEORGE, L.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 821 658 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

Dispositivo médico que tiene un revestimiento que comprende ACCS

5 **Campo de la invención**

El campo de la invención está dirigido a un dispositivo médico mejorado. En particular, el campo de la invención se dirige a un dispositivo médico mejorado que tiene un revestimiento que comprende nuevas composiciones en solución que contienen factor celular (denominadas en el presente documento como composiciones CFS), tales composiciones de CFS que incluyen composiciones de medio acondicionado obtenidas a partir del cultivo de células secretoras de citocinas extraembrionarias (células ECS), específicamente la solución de citocinas celulares derivadas del amnios (denominada en el presente documento ACCS) obtenida a partir del cultivo de células progenitoras multipotentes derivadas del amnios (AMP), dispersada en un material de revestimiento polimérico.

15 **Antecedentes de la invención**

Hay aproximadamente 25 millones de personas en los EE.UU. con dispositivos médicos implantados, insertados o transcutáneos (véase, por ejemplo, Hanna, K.E., Institute of Medicine (U.S.) Innovation and invention in medical devices: workshop summary. Washington, D.C: National Academy Press; 2001. Roundtable on Research and Development of Drugs B, and Medical Devices). La demanda estadounidense esperada de dichos dispositivos aumenta un 8% cada año (véase, por ejemplo, The Freedomia Group, Cleveland, OH, EE.UU.: Freedomia; 2010, Implantable Medical Devices to 2014 - Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders). Estos dispositivos incluyen, aunque no de forma limitativa, marcapasos, desfibriladores, injertos vasculares, implantes dentales, tornillos para huesos, catéteres, stents de arteria coronaria, grapas, cables, derivaciones y dispositivos de reemplazo de articulaciones.

Aunque muchos dispositivos médicos funcionan adecuadamente durante años, la implantación, la inserción o la colocación transcutánea de biomateriales y dispositivos médicos provoca una respuesta inflamatoria dinámica del hospedador (véase, por ejemplo, Anderson, J.M., *et al.*, Foreign body reaction to biomaterials, Semin Immunol 2008;20(2):86-100, N. Brogini, L.M. McManus, J.S. Hermann, R. Medina, R.K. Schenk, D. Buser y D.L. Cochran, Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface, J Dent Res 85(5):473-478, 2006) que limita gravemente la integración y el rendimiento a largo plazo de muchos dispositivos médicos, incluidas las prótesis articulares, los biosensores químicos, los cables/electrodos eléctricos, los sistemas de administración terapéutica y las construcciones de ingeniería de tejidos, que afecta a millones de pacientes cada año.

Un ejemplo importante con graves consecuencias potencialmente mortales son los implantes de stents coronarios. Los stents coronarios se utilizan con frecuencia después de una angioplastia con balón para mantener un flujo sanguíneo adecuado del músculo coronario. Sin embargo, el uso de stents coronarios altera fundamentalmente la respuesta vascular a la lesión al provocar un estado inflamatorio intenso y prolongado (véase, por ejemplo, Welt, F. y Rogers, C., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002;22: 1769-1776). Esta afección inflamatoria provoca la proliferación de células lisas dentro de las paredes de las arterias coronarias como resultado del daño y la eliminación de la capa de células endoteliales que recubre el lumen de estos vasos. Hasta el 60 % de la implantación de stents da como resultado la reestenosis.

El documento WO 2007/005910 A desvela dispositivos médicos implantables con un revestimiento que comprende un polímero y un compuesto generador de óxido nítrico para prevenir una respuesta inflamatoria.

Un dispositivo médico que se mejora de tal manera que la respuesta inflamatoria asociada con su implantación, inserción o colocación transcutánea se previene o se regula a la baja tendría un gran impacto en el éxito de dispositivos implantados, insertados o transcutáneos (AW Bridges y AJ Garcia, Anti-Inflammatory Polymeric Coatings for Implantable Biomaterials and Devices, Journal of Diabetes Science and Technology, 2,(6):984-994, 2008). Es un objeto de la invención que se describe a continuación proporcionar tal dispositivo médico mejorado.

55 **Breve resumen de la invención**

Los solicitantes presentan con el presente documento por primera vez la presente invención cuyo objeto es emplear las propiedades antiinflamatorias de las composiciones de CFS, específicamente de la solución de citocinas derivada del amnios (ACCS), para prevenir y/o regular negativamente la respuesta inflamatoria asociada con prácticamente todos los dispositivos médicos implantados, insertados o colocados por vía transcutánea. También es un objeto de la invención administrar, de manera controlada, citocinas moduladoras de la respuesta inflamatoria y factores de crecimiento fisiológicamente relevantes que son capaces de prevenir y/o regular negativamente la respuesta inflamatoria asociada con prácticamente todos los dispositivos médicos implantados, insertados o colocados por vía transcutánea. También es un objeto de la invención administrar, de manera controlada, factores de crecimiento de cicatrización de heridas fisiológicamente relevantes y citocinas que son capaces de promover la cicatrización del tejido en el sitio de la implantación, inserción o colocación transcutánea del dispositivo médico en un paciente.

En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo médico mejorado así como métodos para usar el dispositivo médico mejorado, en el que el dispositivo médico mejorado ha absorbido sobre él nuevas composiciones en solución que contienen factor celular denominadas en el presente documento composiciones CFS, específicamente ACCS. La ACCS contiene una combinación compleja y única de niveles fisiológicos de citocinas moduladoras de la respuesta inflamatoria y factores de crecimiento que se encuentran de forma natural en el cuerpo. Las citocinas moduladoras de la respuesta inflamatoria y los factores de crecimiento contenidos en las composiciones de CFS, incluyendo ACCS, se liberan en el área local con el tiempo. Por lo tanto, las citocinas moduladoras de la respuesta inflamatoria y los factores de crecimiento se administran con precisión al área para lograr un efecto máximo. Debido a que las citocinas moduladoras de la respuesta inflamatoria y los factores de crecimiento están presentes en niveles comparables a los niveles fisiológicos encontrados en el cuerpo, son óptimos para su uso en aplicaciones terapéuticas que requieren intervención para influir en procesos bioquímicos y biológicos tales como la respuesta inflamatoria. Las citocinas moduladoras de la respuesta inflamatoria y los factores de crecimiento se liberan lentamente con el tiempo para proporcionar un nivel fisiológico continuo y constante de dichas citocinas moduladoras de la respuesta inflamatoria y factores de crecimiento para prevenir y/o regular negativamente la respuesta inflamatoria asociada con los dispositivos médicos implantados, insertados o colocados por vía transcutánea, así como para optimizar la cicatrización y/o recuperación. Además, las composiciones de CFS, incluyendo ACCS, se pueden formular antes de su absorción en el dispositivo médico. Tales formulaciones pueden incluir formulaciones de liberación sostenida/liberación controlada/liberación prolongada/liberación extendida o la adición de agentes gelificantes o espesantes para mejorar la adsorción en el dispositivo médico. Los detalles sobre formulaciones de liberación sostenida de composiciones de CFS, incluyendo ACCS, se pueden encontrar en las Patentes de Estados Unidos N.º 8.058.066 y 8.088.732. Además, las composiciones de CFS, incluyendo ACCS, se pueden liofilizar antes de su absorción en el dispositivo médico. Una característica importante del dispositivo médico mejorado descrito en el presente documento es que es el primer dispositivo médico desvelado que es capaz de administrar simultáneamente numerosas citocinas y factores de crecimiento que modulan la respuesta inflamatoria y la cicatrización de heridas, lentamente y en concentraciones fisiológicas directamente en el lugar de implantación, inserción o colocación transcutánea del dispositivo médico.

Se implantan, se insertan o se colocan por vías transcutáneas decenas de millones de dispositivos médicos en todo el mundo anualmente en pacientes con fines médicos. Desafortunadamente, cualquier material extraño implantado en el cuerpo dará como resultado una reacción inflamatoria que a menudo dará como resultado la encapsulación del dispositivo implantado, insertado o colocado por vía transcutánea. Estas respuestas biológicas también dan como resultado la reducción de la eficacia de los dispositivos médicos y limitan su vida útil como prótesis útiles, stents, etc. La liberación sostenida de composiciones de CFS, incluyendo ACCS, desde dispositivos médicos revestidos tendría un impacto económico significativo al aumentar la eficacia y biocompatibilidad, así como la función de todos los implantes, inserciones o colocaciones transcutáneas de dispositivos médicos y reducen significativamente el número de dispositivos fallidos.

En consecuencia, un primer aspecto de la invención es un dispositivo médico implantable que tiene un revestimiento en su superficie, útil para la implantación quirúrgica en el cuerpo de un sujeto, en el que el revestimiento comprende composiciones de solución de citocinas celulares derivadas del amnios (ACCS) dispersas en un material de revestimiento polimérico.

Un segundo aspecto de la invención es el dispositivo médico implantable del primer aspecto en el que la ACCS se liofiliza antes de la dispersión en el material de revestimiento polimérico.

Un tercer aspecto de la invención es el dispositivo médico implantable del primer aspecto que se selecciona del grupo que consiste en stents, dispositivos de reemplazo de articulaciones, dispositivos de reemplazo de dientes, tornillos para huesos, varillas de reparación ósea, placas de reparación ósea, alambres de reparación de huesos, clavijas de reparación de huesos, tornillos de columna vertebral, varillas de la columna vertebral, discos intervertebrales artificiales, marcapasos, desfibriladores implantables, implantes cocleares e implantes dentales.

Un cuarto aspecto de la invención es un dispositivo médico insertable que tiene un revestimiento en su superficie, útil para la inserción quirúrgica en el cuerpo de un sujeto, en el que el revestimiento comprende ACCS dispersa en un material de revestimiento polimérico.

Un quinto aspecto de la invención es el dispositivo médico insertable del cuarto aspecto en el que la ACCS se liofiliza antes de la dispersión en el material de revestimiento polimérico.

Un sexto aspecto de la invención es un dispositivo médico transcutáneo que tiene un revestimiento en su superficie, útil para la inserción en el cuerpo de un sujeto, en el que el revestimiento comprende ACCS dispersa en un material de revestimiento polimérico.

Un séptimo aspecto de la invención es el dispositivo médico transcutáneo del sexto aspecto en el que la ACCS se liofiliza antes de la dispersión en el material de revestimiento polimérico.

Un octavo aspecto de la invención es el dispositivo médico de cualquiera de los aspectos anteriores, donde la ACCS

comprende niveles fisiológicos de VEGF, PDGF, angiogenina, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2, en donde los niveles fisiológicos son aproximadamente 5,0-16 ng/ml para VEGF, aproximadamente 3,5-4,5 ng/ml para angiogenina, aproximadamente 100-165 pg/ml para PDGF, aproximadamente 2,5-2,7 ng/ml para TGFβ2, aproximadamente 0,68 µg/ml para TIMP-1 y aproximadamente 1,04 µg/ml para TIMP-2.

5 Un noveno aspecto de la invención es un método para regular negativamente la respuesta inflamatoria que se produce después de la implantación, inserción o colocación transcutánea de un dispositivo médico en un paciente, comprendiendo el método la etapa de revestir el dispositivo médico con una composición que comprende ACCS dispersa en un material de revestimiento polimérico.

10 Un décimo aspecto de la invención es el método del noveno aspecto en el que la ACCS se liofiliza antes de la dispersión en el material de revestimiento polimérico.

15 Un undécimo aspecto de la invención es el método del noveno aspecto en el que el dispositivo médico se selecciona del grupo que consiste en stents, dispositivos de reemplazo de articulaciones, dispositivos de reemplazo de dientes, tornillos para huesos, varillas de reparación ósea, placas de reparación ósea, alambres de reparación de huesos, clavijas de reparación de huesos, tornillos de columna vertebral, varillas de la columna vertebral, discos intervertebrales artificiales, marcapasos, desfibriladores implantables, implantes cocleares e implantes dentales.

20 Un duodécimo aspecto de la invención es el método del undécimo aspecto en el que la ACCS comprende niveles fisiológicos de VEGF, PDGF, angiogenina, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2, en donde los niveles fisiológicos son aproximadamente 5,0-16 ng/ml para VEGF, aproximadamente 3,5-4,5 ng/ml para angiogenina, aproximadamente 100-165 pg/ml para PDGF, aproximadamente 2,5-2,7 ng/ml para TGFβ2, aproximadamente 0,68 µg/ml para TIMP-1 y aproximadamente 1,04 µg/ml para TIMP-2.

25 **Leyendas de la figura**

Figura 1 - Liberación sostenida de ACCS del dispositivo protésico de reemplazo de cadera Zimaloy® y de una sección de un injerto vascular Dacron®.

30 **Definiciones**

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

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

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente purificado" significa una población de células sustancialmente homogénea para un marcador particular o una combinación de marcadores. Por sustancialmente homogénea se entiende al menos el 90 %, y preferentemente el 95 % homogénea para un marcador particular o combinación de marcadores.

45 El término "placenta", tal como se usa en el presente documento, significa placenta tanto prematura como a término.

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

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células madre pluripotentes" tendrá el siguiente significado. Las células madre pluripotentes son verdaderas células madre con el potencial de producir cualquier célula diferenciada en el cuerpo, pero no puede contribuir a fabricar los componentes de las membranas extraembrionarias que se obtienen del trofoblasto. El amnios se desarrolla a partir del epiblasto, no del trofoblasto. Hasta la fecha se han confirmado tres tipos de células madre pluripotentes: Células madre embrionarias (ES) (también pueden ser totipotentes en primates), células germinales embrionarias (EG) y células de carcinoma embrionario (EC). Estas células EC pueden aislarse de teratocarcinomas, un tumor que ocurre ocasionalmente en la gónada de un feto. A diferencia de los otros dos, suelen ser aneuploides.

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células madre multipotentes" son verdaderas células madre, pero solo pueden diferenciarse en un número limitado de tipos. Por ejemplo, la médula ósea contiene células madre multipotentes que dan lugar a todas las células de la sangre, pero es posible que no puedan diferenciarse en otros tipos de células.

65

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células secretoras de citocinas extraembrionarias" o "células ECS" significa una población de células que provienen del tejido extraembrionario que tienen la característica de secretar VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2 y los inhibidores de MMP TIMP-1 y/o TIMP-2 a niveles fisiológicamente relevantes de una manera temporal fisiológicamente relevante en el espacio extracelular o en los medios de cultivo circundantes. Las células ECS no se han cultivado en presencia de ningún material animal no humano, haciéndolas y los productos celulares derivados de ellas adecuados para uso clínico humano, ya que no están xenocontaminados. Las células ECS pueden seleccionarse de poblaciones de células y composiciones descritas en la presente solicitud y en los documentos US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, las solicitudes provisionales de los Estados Unidos N.º 60/666.949, 60/699.257, 60/742.067, 60/813.759, la solicitud de los EE.UU. N.º 11/333.849, la solicitud de los EE.UU. N.º 11/392.892, PCTUS06/011392, US2006/0078993, PCT/US00/40052, la patente de EE.UU. N.º 7.045.148, US2004/0048372 y US2003/0032179. Las células ECS se han denominado anteriormente células TSE.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula progenitora multipotente derivada del amnios" o "célula AMP" significa una población específica de células que son células epiteliales derivadas del amnios. Las células AMP tienen las siguientes características. No se han cultivado en presencia de ningún material animal no humano, haciéndolas y los productos celulares derivados de ellas adecuados para uso clínico humano, ya que no están xenocontaminados. Las células AMP se cultivan en medio basal suplementado con albúmina de suero humano. En una realización preferida, las células AMP secretan las citocinas VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2 y los inhibidores de MMP TIMP-1 y/o TIMP-2. El intervalo fisiológico de la citocina o citocinas en la combinación única es el siguiente: aproximadamente 5-16 ng/ml para VEGF, aproximadamente 3,5-4,5 ng/ml para angiogenina, aproximadamente 100-165 pg/ml para PDGF, aproximadamente 2,5-2,7 ng/ml para TGFβ2, aproximadamente 0,68 µg/ml para TIMP-1 y aproximadamente 1,04 µg/ml para TIMP-2. Las células AMP pueden expresar opcionalmente timosina β4. Las células AMP crecen sin capas alimentadoras, no expresan la proteína telomerasa y no son tumorigénicas. Las células AMP no expresan la proteína marcadora de células madre hematopoyéticas CD34. La ausencia de células positivas para CD34 en esta población indica que los aislados no están contaminados con células madre hematopoyéticas como sangre de cordón umbilical o fibroblastos embrionarios. Prácticamente el 100 % de las células reaccionan con anticuerpos frente a citoqueratinas de bajo peso molecular, confirmando su naturaleza epitelial. Las células derivadas del amnios recién aisladas, de las cuales se aíslan las células AMP, no reaccionarán con anticuerpos contra los marcadores de células madre/progenitoras c-kit (CD117) y Thy-1 (CD90). Se conocen en la técnica varios procedimientos utilizados para obtener células de placenta a término o prematuro (véase, por ejemplo, US 2004/0110287; Anker *et al.*, 2005, Stem Cells 22:1338-1345; Ramkumar *et al.*, 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500). Sin embargo, los métodos usados en el presente documento proporcionan composiciones y poblaciones de células mejoradas.

Por el término "sin animales" cuando se hace referencia a determinadas composiciones, condiciones de crecimiento, medio de cultivo, etc. descritos en el presente documento, significa que ningún material obtenido de animales no humanos, tales como suero bovino, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, vitaminas, etc., se utilizan en la preparación, el crecimiento, el cultivo, la expansión, el almacenamiento o la formulación de determinada composición o proceso. Por "materiales no obtenidos de animales no humanos" se entiende que los materiales nunca han estado dentro o han estado en contacto con un cuerpo o sustancia de un animal no humano, por lo que no están xenocontaminados. Solo materiales de grado clínico, tales como las proteínas humanas producidas de forma recombinante, se utilizan en la preparación, el crecimiento, el cultivo, la expansión, el almacenamiento y/o la formulación de tales composiciones y/o procesos.

Por el término "expandido", en referencia a las composiciones celulares, significa que la población celular constituye una concentración de células significativamente mayor que la obtenida usando métodos anteriores. Por ejemplo, el nivel de células por gramo de tejido amniótico en composiciones expandidas de células AMP es al menos 50 y hasta 150 veces mayor que el número de células epiteliales del amnios en el cultivo primario después de 5 pases, en comparación con un aumento de aproximadamente 20 veces en tales células usando métodos anteriores. En otro ejemplo, el nivel de células por gramo de tejido amniótico en composiciones expandidas de células AMP es al menos 30 y hasta 100 veces mayor que el número de células epiteliales del amnios en el cultivo primario después de 3 pases. En consecuencia, una población "expandida" tiene al menos 2 veces y hasta 10 veces, mejora en el número de células por gramo de tejido amniótico con respecto a métodos anteriores. El término "expandido" está destinado a abarcar solo aquellas situaciones en las que una persona ha intervenido para elevar el número de células.

Tal como se usa en el presente documento, el término "pase" significa una técnica de cultivo celular en la que las células que crecen en cultivo que han alcanzado la confluencia o están cerca de la confluencia en un recipiente de cultivo de tejidos se extraen del recipiente, se diluyen con medio de cultivo fresco (es decir, se diluyen a 1:5) y se colocan en un nuevo recipiente de cultivo de tejidos para permitir su crecimiento y viabilidad continuos. Por ejemplo, las células aisladas del amnios se denominan células primarias. Estas células se expanden en cultivo haciéndolas crecer en el medio de crecimiento descrito en el presente documento. Cuando estas células primarias se subcultivan, cada ronda de subcultivo se denomina pase. Tal como se usa en el presente documento, "cultivo primario" significa la población celular recién aislada.

Tal como se usa en el presente documento, "medio acondicionado" es un medio en el que se ha cultivado una célula o población de células específica y luego se ha eliminado. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar

factores celulares que pueden brindar apoyo o afectar al comportamiento de otras células. Tales factores incluyen, pero sin limitación, hormonas, citocinas, matriz extracelular (MEC), proteínas, vesículas, anticuerpos, quimiocinas, receptores, inhibidores y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado. En la patente de EE.UU. 6.372.494 se describen ejemplos de métodos para preparar medios acondicionados.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "Solución de citocinas celulares derivada del amnios" o "ACCS" significa medio acondicionado que se ha obtenido de células AMP que se han cultivado en medio basal suplementado con albúmina de suero humano y EGF humano recombinante.

10 La expresión "nivel fisiológico", tal como se usa en el presente documento, significa el nivel en el que se encuentra una sustancia en un sistema vivo y que es relevante para el funcionamiento adecuado de un proceso bioquímico y/o biológico.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "solución" tal como se utiliza en "Solución de citocinas celulares derivadas del amnios" significa un líquido que contiene componentes dispersos, es decir, citocinas. Los componentes dispersos se pueden solubilizar completamente, solubilizar parcialmente, suspender o dispersar de otro modo en el líquido. Los líquidos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, agua, soluciones osmóticas como soluciones de sal y/o azúcar, medios de cultivo celular y otras soluciones acuosas o no acuosas.

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

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

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustrato" significa un revestimiento definido en una superficie a la que se adhieren las células, sobre la que crecen y/o a la que migran. Tal como se usa en el presente documento, el término "matriz" significa una sustancia en la que crecen las células o sobre la que puede estar definida o no en sus componentes. La matriz incluye sustancias biológicas y no biológicas. Tal como se usa en el presente documento, el término "andamiaje" significa una estructura tridimensional (3D) (sustrato y/o matriz) dentro de o sobre la que crecen las células. Puede estar compuesta por componentes biológicos, componentes sintéticos o una combinación de
40 ambos. Además, puede ser construida de manera natural por células o construida de manera artificial. Además, el andamiaje puede contener componentes que tengan actividad biológica en condiciones apropiadas.

45 La expresión "producto celular" o "productos celulares" tal como se usa en el presente documento se refiere a todas y cada una de las sustancias elaboradas y secretadas por una célula, incluyendo, pero sin limitación, factores proteicos (es decir, factores de crecimiento, factor de diferenciación, factores de injerto, citocinas, morfógenos, proteasas (es decir, para promover la delaminación celular endógena, inhibidores de proteasa), componentes de la matriz extracelular (es decir, fibronectina, etc.).

50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "citocinas y factores de crecimiento moduladores de la respuesta inflamatoria" significa citocinas y factores de crecimiento fisiológicamente relevantes que son capaces de prevenir y/o regular negativamente la respuesta inflamatoria asociada con prácticamente todos los implantes de dispositivos médicos.

55 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un agente terapéutico necesaria para lograr un efecto fisiológico deseado (es decir, prevenir y/o regular negativamente una respuesta inflamatoria asociada con un dispositivo médico implantado/insertado).

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que los componentes, además del agente terapéutico, que comprende la formulación, son adecuados para su administración al paciente en tratamiento.

65 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proteína terapéutica" incluye una amplia gama de proteínas biológicamente activas que incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento, enzimas, hormonas, citocinas, inhibidores de citocinas, factores de coagulación sanguínea, factores de crecimiento y diferenciación de péptidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tejido" se refiere a una agregación de células especializadas

de manera similar unidas en el desempeño de una función particular.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "un" o "una" significan uno o más; al menos uno.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" significa conjuntamente, junto con, además de, en conjunto con, y similares.

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

- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término "agente" significa un agente activo o un agente inactivo. Por el término "agente activo" se entiende un agente que es capaz de tener un efecto fisiológico cuando se administra a un sujeto. Los ejemplos no limitantes de agentes activos incluyen factores de crecimiento, citocinas, antibióticos, células, medios acondicionados de células, etc. Por el término "agente inactivo" se entiende un agente que no tiene un efecto fisiológico cuando se administra. Dichos agentes pueden denominarse alternativamente "excipientes farmacéuticamente aceptables". Los ejemplos no limitantes incluyen cápsulas de liberación prolongada y similares.

- 20 Los términos "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" son reconocidos en la técnica y se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente, mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracárdica, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural, inyección o infusión intracerebral e intraesternal.

- 25 El término "administración enteral" y "administrado por vía enteral" son reconocidos en la técnica y se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por vía oral o rectal.

El término "administración tópica" y "administrado por vía tópica" son reconocidos en la técnica y se refieren a modos de administración distintos de la administración parenteral y enteral, generalmente por aplicación sobre la piel.

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

- 35 Los términos "liberación sostenida", "liberación prolongada", "liberación en el tiempo", "liberación controlada" o "liberación continua" tal como se usa en el presente documento significa un agente, típicamente un agente terapéutico o un fármaco, que se libera con el tiempo.

- 40 Los términos "biodegradable" o "bioerosión", tal como se usan en el presente documento, significan una combinación de procesos físicos (es decir, disolución) y químicos (es decir, ruptura de enlaces químicos) que dan como resultado la descomposición de una sustancia.

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

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

- 50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dispositivo médico" significa un equipo, aparato, implante, reactivo *in vitro* o artículo similar o relacionado que se utiliza para diagnosticar, prevenir o tratar enfermedades u otras afecciones, y no logra sus propósitos a través de la acción química dentro o sobre el cuerpo (lo que lo convertiría en un fármaco). El dispositivo médico incluye un dispositivo médico implantado, un dispositivo médico implantable, un dispositivo médico insertado, un dispositivo médico insertable y dispositivos médicos colocados en una superficie corporal (es decir, en la piel, la córnea, etc.).

- 55 Tal como se usa en el presente documento, el término "dispositivo médico transcutáneo" significa un dispositivo médico que se implanta en el cuerpo y sale externamente a través de la piel.

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

- 65 Tal como se usa en el presente documento, una "herida" es cualquier alteración, por cualquier causa, de la anatomía

normal (anatomía interna y/o externa), incluidas, entre otras, lesiones traumáticas tales como las mecánicas (es decir, contusión, penetración), térmicas, químicas, eléctricas, lesiones por conmoción cerebral e incisión; lesiones electivas tales como cirugía operatoria y hernias incisionales resultantes, fistulas, etc.; heridas agudas, heridas crónicas, heridas infectadas y heridas estériles, así como heridas asociadas con estados patológicos (es decir, úlceras causadas por neuropatía diabética o úlceras del tracto gastrointestinal o genitourinario). Una herida es dinámica y el proceso de cicatrización es un continuo que requiere una serie de procesos celulares integrados e interrelacionados que comienzan en el momento de la herida y continúan más allá del cierre inicial de la herida hasta llegar a una cicatriz estable. Estos procesos celulares están mediados o modulados por sustancias humorales que incluyen, entre otras, citocinas, linfocinas, factores de crecimiento y hormonas. "Curación de heridas" se refiere a mejorar, por alguna forma de intervención, los procesos celulares naturales y las sustancias humorales de reparación de tejidos de manera que la curación sea más rápida y/o el área curada resultante tenga menos cicatrices y/o el área herida posea una resistencia tisular más cercana a la del tejido sano y/o el tejido herido alcance cierto grado de recuperación funcional.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "modelo animal estándar" se refiere a cualquier modelo animal aceptado en la técnica en el que las composiciones de la invención exhiben eficacia.

Descripción detallada

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior salvo que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor afirmado o mencionado en este intervalo queda englobado dentro de la invención. También queda englobado dentro del invención que los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse, de forma independiente, en los intervalos más pequeños, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, en la invención también se incluyen los intervalos que excluyen cualquiera de estos límites.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Las propiedades antiinflamatorias de la solución de citocinas derivadas del amnios (ACCS) se utilizan actualmente para ayudar en la cicatrización de heridas en ensayos clínicos en humanos. La ACCS contiene más de 200 proteínas, citocinas y factores de crecimiento en solución y se ha demostrado que reduce la inflamación en varios modelos animales (véase el ejemplo a continuación). Además, actualmente, la ACCS se está probando en varios ensayos clínicos en humanos que involucran inflamación resultante de quemaduras por radiación e injertos de piel en pacientes diabéticos que están siendo tratados por quemaduras.

Tal como se ha descrito anteriormente, la implantación de cualquier dispositivo médico produce una inflamación local en el lugar del implante. En el caso de los stents coronarios, el reclutamiento y la infiltración de leucocitos tiene lugar en sitios de lesión vascular donde las células endoteliales que recubren los vasos han quedado descubiertas y se han depositado plaquetas y fibrina. Los estudios *in vivo* han demostrado que los leucocitos y las plaquetas se colocan en los sitios de hemorragia, dentro de las lesiones ateroscleróticas y reestenóticas posangioplastia, y en áreas de lesión por isquemia/reperfusión. Esta interacción entre plaquetas y leucocitos parece ser fundamental para la respuesta inflamatoria. La proteína quimioatrayente de monocitos (MCP) 1 participa en el reclutamiento de monocitos, así como de basófilos y ciertos linfocitos T activados. La interleucina (IL) 8, desempeña un papel fundamental en el reclutamiento de leucocitos a áreas de lesión vascular. Es bien sabido que la IL-8 es una citocina fundamental en el reclutamiento de neutrófilos. El marcador inflamatorio inespecífico, la proteína C-reactiva, ha demostrado que se regula positivamente después de la colocación de un stent.

La presente invención está dirigida a la incorporación de composiciones de CFS, específicamente ACCS, en o sobre cualquiera o todos los dispositivos médicos implantables/insertables/transcutáneos con el fin de efectuar la administración sostenida de composiciones de CFS, específicamente ACCS, y sus propiedades antiinflamatorias en el sitio de implantación/inserción. Esta novedosa mejora de los dispositivos médicos impartirá una mayor biocompatibilidad y seguridad a estos dispositivos.

La composición de CFS, incluyendo ACCS, puede revestirse directamente sobre los dispositivos médicos o suspenderse en una solución de polímero formada disolviendo un polímero farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, copolímero de etileno acetato de vinilo, EVAc) en un disolvente orgánico volátil tal como diclorometano. A continuación, el dispositivo médico se sumerge en el revestimiento de polímero y se retira. Se deja evaporar el disolvente orgánico, dejando un revestimiento de polímero que contiene el polímero con las proteínas de las composiciones de CFS, incluidas las proteínas de la ACCS, dispersas en forma de polvo seco dentro del revestimiento. Tal composición de

CFS/revestimiento de polímero sería capaz de suministrar de forma sostenida la composición de CFS desde los dispositivos médicos. Además, ya que la composición de CFS incorporada en o sobre los dispositivos médicos estará en forma liofilizada o secada por congelación, la liberación de la composición de CFS solo tendrá lugar al entrar en contacto con una solución acuosa capaz de solubilizar y liberar la composición de CFS.

5 También es posible revestir cualquier dispositivo médico pulverizando la composición de CFS/solución de polímero sobre el dispositivo médico y dejando que el disolvente orgánico se evapore.

10 Por lo tanto, la absorción local de una composición de CFS, incluyendo ACCS, desde el dispositivo médico revestido se espera que suministre de manera eficaz las 200 proteínas, citocinas, y factores de crecimiento, incluyendo factores de crecimiento moduladores de la respuesta inflamatoria y citocinas, a los sitios de inflamación asociados con la implantación/inserción de un dispositivo médico de forma sostenida. Debe entenderse que la cinética de liberación de las composiciones de CFS del revestimiento se puede alterar ajustando la carga de fármaco, el tamaño de partícula de fármaco, la geometría del dispositivo, etc. para lograr el primer orden, el orden cero u otros perfiles cinéticos de liberación.

Obtención y cultivo de células

20 Células ECS - En la técnica se describen diversos métodos para aislar células de tejido extraembrionario, que luego se pueden usar para producir las células ECS (véase, por ejemplo, US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, las solicitudes provisionales de los Estados Unidos N.º 60/666.949, 60/699.257, 60/742.067, 60/813.759, la solicitud de los EE.UU. N.º 11/333.849, la solicitud de los EE.UU. N.º 11/392.892, PCTUS06/011392, US2006/0078993, PCT/US00/40052, la patente de EE.UU. N.º 7.045.148, US2004/0048372 y US2003/0032179).

25 Identificación de células ECS - Una vez aislado el tejido extraembrionario, es necesario identificar qué células del tejido tienen las características asociadas con las células ECS (véase la definición anterior). Por ejemplo, las células se analizan para determinar su capacidad para secretar VEGF, angiogenina, PDGF y TGFβ2 y los inhibidores de MMP TIMP-1 y/o TIMP-2 en el espacio extracelular o en los medios de cultivo circundantes. En algunos casos, puede ser difícil o imposible detectar ciertos factores utilizando ensayos convencionales. Esto se puede deber a que las células secretan ciertos factores a niveles fisiológicos inferiores al nivel de detección mediante los métodos de ensayo. También puede ser que los factores estén siendo utilizados por la célula ECS y/o por otras células locales, evitando así la acumulación a niveles detectables utilizando ensayos convencionales. También es posible que la manera temporal en que se secretan los factores no coincida con el momento del muestreo.

35 Composiciones de células AMP se preparan usando las etapas de a) recuperación del amnios de la placenta, b) disociación de las células epiteliales de la membrana amniótica usando una proteasa, c) cultivo de las células en un medio basal con la adición de una proteína humana de origen natural o producida de manera recombinante (es decir, albúmina de suero humano) y ninguna proteína animal no humana; d) selección de células AMP del cultivo de células epiteliales y, opcionalmente, e) proliferación adicional de las células, opcionalmente usando aditivos y/o factores de crecimiento adicionales (es decir, EGF humano recombinante). Los detalles se encuentran en las patentes de EE. UU. N.º 8.278.095, presentada el 2 de octubre de 2012, 8.058.066, presentada el 15 de noviembre de 2011 y 8.088.732, presentada el 3 de enero de 2012.

45 Cultivo de células AMP - Las células se cultivan en medio basal. Dicho medio incluye, pero sin limitación, medio de cultivo EPILIFE® para células epiteliales (Cascade Biologicals), medio de cultivo sin suero OPTI-PRO™, medio sin suero VP-SFM, medio basal altamente enriquecido en IMDM, medio de baja osmolalidad KNOCKOUT™ DMEM, medio sin suero definido 293 SFM II (todos fabricados por Gibco; Invitrogen), medio de crecimiento progenitor hematopoyético HPGM, medio sin suero Pro 293S-CDM, medio sin suero Pro 293A-CDM, medio sin suero UltraMDCK™ (todos fabricados por Cambrex), medio de expansión de linfocitos T STEMLINE® y medio de expansión de células madre hematopoyéticas STEMLINE® II (ambos fabricados por Sigma-Aldrich), medio de cultivo DMEM, medio de crecimiento de mezcla de nutrientes DMEM/F-12 (ambos fabricados por Gibco), medio de crecimiento de mezcla de nutrientes de Ham F-12, medio de cultivo basal M199 (ambos fabricados por Sigma-Aldrich) y otros medios basales comparables. Dichos medios deben contener proteína humana o estar suplementados con proteína humana. Tal como se usa en el presente documento, una "proteína humana" es una que se produce de manera natural o una que se produce usando la tecnología recombinante. "Proteína humana" también pretende incluir un derivado humano o una preparación del mismo, tal como suero humano, que contiene proteína humana. En divulgaciones específicas, el medio basal es un medio basal altamente enriquecido en IMDM, medio de expansión de linfocitos T STEMLINE® o medio de expansión de células madre hematopoyéticas STEMLINE® II, o medio de cultivo sin suero OPTI-PRO™, o combinaciones de los mismos y la proteína humana es la albúmina de suero humano es de al menos el 0,5 % y hasta el 10 %. En divulgaciones particulares, la albúmina de suero humano es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente el 2 %. En una divulgación específica, la albúmina humana está al 0,5 %. La albúmina humana puede provenir de una forma líquida o seca (polvo) e incluye, pero sin limitación, albúmina de suero humano recombinante, albúmina de suero humano normal PLASBUMIN® y fracción de sangre humana PLASMANATE® (ambos fabricados por Talecris Biotherapeutics).

65 Se desvela el uso de cualquiera de los medios basales anteriores en el que las proteínas de origen animal se

reemplazan con proteínas humanas recombinantes y el suero de origen animal, tal como BSA, se reemplaza con albúmina de suero humano. En las realizaciones preferidas, el medio está libre de suero además de estar libre de animales.

- 5 Opcionalmente, se utilizan otros factores, por ejemplo, se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a una concentración de entre 0-1 µg/ml. En una divulgación preferida, la concentración de EGF es de alrededor de 10-20 ng/ml. Todos los suplementos son de grado clínico.

Generación de composiciones de CFS, incluyendo ACCS

- 10 El medio acondicionado de ECS se obtiene como se describe a continuación para ACCS, excepto que se utilizan células ECS.

- 15 Generación de ACCS - Las células AMP se pueden utilizar para generar ACCS. En una divulgación, las células AMP se aíslan tal como se describe en el presente documento y se siembran 1×10^6 células/ml en matraces T75 que contienen entre 5 y 30 ml de medio de cultivo, preferentemente entre 10-25 ml de medio de cultivo y, lo más preferentemente, aproximadamente 10 ml de medio de cultivo. Las células se cultivan hasta confluir, se cambia el medio y en una divulgación se recoge la ACCS 1 día después de la confluencia. En otra divulgación, se cambia el medio y se recolecta la ACCS 2 días después de la confluencia. En otra divulgación, se cambia el medio y se recolecta la ACCS 4 días después de la confluencia. En otra divulgación, se cambia el medio y se recolecta la ACCS 5 días después de la confluencia. En una divulgación preferida, se cambia el medio y se recolecta la ACCS 3 días después de la confluencia. En otra divulgación preferida, se cambia el medio y se recolecta la ACCS 3, 4, 5, 6 o más días después de la confluencia. Los expertos en la materia reconocerán que otras divulgaciones para recolectar la ACCS de cultivos de células AMP, tales como el uso de otros vasos de cultivo de tejidos, incluyendo pero no limitado a fábricas de células, matraces, fibras huecas, o aparatos de cultivo en suspensión, o recolectando la ACCS de cultivos subconfluentes y/o en proliferación activa, también se contemplan. También se contempla que la ACCS se criopreserve después de la recolección. También se contempla que la ACCS se liofilice después de la recolección. La invención también contempla que la ACCS se formule para liberación sostenida después de la recolección. Los expertos en la materia están familiarizados con la liofilización para criopreservación y las metodologías de formulación de liberación sostenida.

- 20 La ACCS de la invención se caracteriza por analizar las citocinas fisiológicamente relevantes secretadas en el intervalo fisiológicamente relevante de aproximadamente 5-16 ng/ml para VEGF, aproximadamente 3,5-4,5 ng/ml para angiogenina, aproximadamente 100-165 pg/ml para PDGF, aproximadamente 2,5-2,7 ng/ml para TGFβ2, aproximadamente 0,68 µg/ml para TIMP-1 y aproximadamente 1,04 µg/ml para TIMP-2.

- 25 También se contempla que la ACCS, incluida la ACCS agrupada, se concentre antes de su uso. El nivel apropiado de concentración requerido dependerá del uso pretendido y, por lo tanto, deberá determinarse empíricamente.

- 30 Las composiciones de la invención se pueden preparar de diversas formas dependiendo del uso pretendido de las composiciones. Por ejemplo, una composición útil en la práctica de la invención puede ser un líquido que comprende un agente de la invención, es decir, composiciones de CFS, específicamente ACCS, en solución, en suspensión, o ambos (solución/suspensión). El término "solución/suspensión" se refiere a una composición líquida en la que una primera porción del agente activo está presente en solución y una segunda porción del agente activo está presente en forma de partículas, en suspensión en una matriz líquida. Una composición líquida también incluye un gel. La composición líquida puede ser acuosa o en forma de pomada, bálsamo, crema, o similares.

- 35 Una suspensión o solución/suspensión acuosa útil para la práctica de los métodos de la invención puede contener uno o más polímeros como agentes de suspensión. Los polímeros útiles incluyen polímeros solubles en agua tales como polímeros celulósicos y polímeros insolubles en agua tales como polímeros reticulados que contienen carboxilo. Los polímeros basados en proteínas tales como la gelatina también se contemplan como materiales útiles para la formación de matrices. Una suspensión o solución/suspensión acuosa es preferentemente viscosa o mucoadhesiva, o incluso más preferentemente, tanto viscosa como mucoadhesivas. Los polímeros hidrófobos cristalinos o amorfos tales como el copolímero de etileno acetato de vinilo (EVAc) pueden ser útiles como materiales formadores de matrices. Los polímeros tales como el ácido poliláctico (PLA), policaprolactona, polilactida/glicólido (PLGA), poliotroésteres, polianhídridos, etc. son ejemplos de polímeros biodegradables que pueden ser materiales útiles para la formación de matrices.

Formulación alternativa de composiciones de CFS, incluyendo ACCS

- 40 Las composiciones de CFS, incluyendo ACCS, se pueden formular como composiciones de liberación sostenida/liberación controlada/liberación temporizada/liberación prolongada. Los expertos en la materia están familiarizados con las metodologías para crear tales composiciones de agentes terapéuticos, incluidos los agentes terapéuticos a base de proteínas, como las composiciones de CFS, incluyendo ACCS. Las composiciones de CFS de liberación sostenida/controlada/temporizada, incluyendo ACCS, pueden realizarse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, también. Además, otras metodologías de liberación sostenida familiares

para los expertos en la materia, aunque no se describen específicamente en el presente documento, también son adecuadas para su uso con las composiciones de CFS, incluyendo ACCS.

5 Composiciones farmacéuticas - Se desvelan composiciones farmacéuticas de composiciones de CFS, incluyendo
 10 ACCS y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado
 por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o agencia reguladora de otro país, o listado en la Farmacopea
 de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente, en
 los seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se
 15 administra la composición. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites,
 incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetales o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de
 soja, aceite mineral, aceite de sésamo, polímeros biocompatibles tales como copolímero de etileno acetato de vinilo,
 ácido poliláctico, polilactida/glicólido, metacrilato de polihidroximetilo, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, poloxámero
 y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta,
 20 arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche
 desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede
 contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas
 composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas,
 polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos
 adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin, y otros son familiares para los expertos en la
 materia.

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

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la concentración o dosis apropiada, de las composiciones de
 CFS, incluyendo ACCS, para un propósito particular. El experto en la materia reconocerá que una dosis preferida es
 30 aquella que produce un efecto terapéutico, tal como prevenir y/o regular negativamente la respuesta inflamatoria
 asociada con la implantación, inserción o colocación transcutánea de un dispositivo médico, en un paciente. Por
 supuesto, las dosis adecuadas de las composiciones de CFS, incluyendo ACCS, requerirán una determinación
 empírica en el momento de su uso en función de varias variables que incluyen, entre otras, el tipo de dispositivo médico
 que se utiliza; la edad del paciente, el peso, el sexo, la salud; otros medicamentos y tratamientos que se administran
 al paciente; y similares.

35 Puede ser conveniente coadministrar otros agentes, incluyendo agentes activos y/o agentes inactivos, con el
 dispositivo médico revestido. Los agentes activos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, quimiocinas, anticuerpos,
 inhibidores, antibióticos, antifúngicos, antivíricos, agentes inmunosupresores y similares. Los agentes inactivos
 incluyen vehículos, diluyentes, estabilizantes, agentes gelificantes, agentes espesantes (es decir, albúmina de suero
 40 humano, ácido hialurónico), vehículos de suministro, MEC (naturales y sintéticas), andamiajes, colágeno y similares.
 Cuando el producto sanitario se administra junto con otros agentes farmacéuticamente activos, incluso menos de las
 composiciones de CFS, incluyendo ACCS, en el dispositivo médico puede ser necesario para que sea
 terapéuticamente eficaz.

45 Los expertos reconocerán que todos y cada uno de los métodos y modalidades estándar para la implantación, la
 inserción o la colocación transcutánea de dispositivos médicos actualmente en la práctica clínica y el desarrollo clínico
 son adecuados para la práctica de los métodos de la invención. Las vías de administración, la formulación, la
 coadministración con otros agentes (si es apropiado) y similares se tratan en detalle en otra parte del presente
 documento.

50 Usos terapéuticos ejemplares de un dispositivo médico revestido

Lentes artificiales para ojos (Pseudophakos), número de procedimientos: 2.582 millones, gasto anual total: 8 mil
 millones de dólares - 10 mil millones de dólares, coste promedio por ojo: 3.200 dólares - 4.500 dólares, dependiendo
 55 del tipo de lente. Los principales fabricantes incluyen Alcon Laboratories/Novartis, Abbott Laboratories y Bausch &
 Lomb.

Tubos de oído (tubos de timpanostomía), número de procedimientos: 715.000, gasto anual total: mil millones de
 60 dólares - 2 mil millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 1.000 dólares - 4.500 dólares.

Stents coronarios, número de procedimientos: 560.000, gasto anual total: 7,5 mil millones de dólares, coste promedio
 por procedimiento: 13.000 dólares. Los principales fabricantes incluyen Boston Scientific y Abbott Laboratories.

Rodillas artificiales, número de procedimientos: 543.000, gasto anual total: 12 mil millones de dólares, coste promedio
 65 por procedimiento: 22.000 dólares. Los principales fabricantes incluyen Zimmer, Depuy/J&J, Stryker, y Biomet, Smith
 & Nephew

Tornillos de metal, pasadores, placas y varillas (reparación de fracturas traumáticas), número de procedimientos: 453.000, gasto anual total: 4,5 mil millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 2.000 dólares -20.000 dólares. El fabricante principal incluye Synthes.

5 DIU (dispositivos intrauterinos), número de procedimientos: 425.000, gasto anual total: 340 millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 800 dólares. Los principales fabricantes incluyen Teva Pharmaceutical Industries y Bayer HealthCare.

10 Dispositivos dentales implantables, número de procedimientos: 2 millones de implantes dentales, gasto anual total: 6 mil millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 2.500 dólares, Principales fabricantes: Nobel Biocare y Straumann.

15 Tornillos de columna vertebral, Varillas y discos artificiales (hardware de fusión espinal), número de procedimientos: 413.000, gasto anual total: 10 mil millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 25.000 dólares. El fabricante principal incluye Medtronic.

20 Implantes de pecho, número de procedimientos: 366.000, gasto anual total: 992 millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 3.351 dólares. Los principales fabricantes incluyen Allergan y Mentor.

Marcapasos cardíacos, número de procedimientos: 235.567, gasto anual total: 4,5 mil millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 20.000 dólares. Los principales fabricantes incluyen Medtronic, St. Jude Medical y Boston Scientific.

25 Caderas artificiales, número de procedimientos: 230.000, gasto anual total: 10,5 mil millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 45.000 dólares. Los principales fabricantes incluyen Zimmer, Stryker, DePuy/J&J, Biomet y Wright Medical.

30 Desfibriladores cardioversores implantables, número de procedimientos: 133.262, gasto anual total: 5,5 mil millones de dólares, coste promedio por procedimiento: 40.000 dólares. Los principales fabricantes incluyen Medtronic, St. Jude Medical y Boston Scientific.

También se contemplan lentes de contacto, grapas y otros dispositivos no mencionados explícitamente.

35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar las composiciones y los métodos de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

45 Ejemplo 1: Preparación de composiciones de células AMP

Las células epiteliales del amnios se disociaron de la membrana amniótica inicial usando los agentes de disociación PXXIII. El intervalo de peso promedio de un amnios fue de 18-27 g. El número de células recuperadas por g de amnios fue de aproximadamente $10\text{-}15 \times 10^6$ para la disociación con PXXIII.

50 Método de obtención de células AMP seleccionadas - Las células epiteliales del amnios se sembraron en placas inmediatamente después del aislamiento del amnios. Después de -2 días en cultivo, se eliminaron las células no adherentes y se mantuvieron las células adherentes. Esta unión a un recipiente de cultivo de tejidos de plástico es el método de selección utilizado para obtener la población deseada de células AMP. Las células AMP adherentes y no adherentes parecen tener un perfil de expresión de marcador de superficie celular similar, pero las células adherentes tienen mayor viabilidad y son la población de células deseada. Las células de AMP adherentes se cultivaron en medio basal suplementado con albúmina de suero humano hasta que alcanzaron -120.000-150.000 células/cm². En este punto, los cultivos eran confluentes. Los cultivos celulares adecuados alcanzarán este número de células entre -5-14 días. Alcanzar este criterio es un indicador del potencial proliferativo de las células AMP y las células que no alcanzan este criterio no se seleccionan para su posterior análisis y uso. Una vez que las células AMP alcanzaron -120.000-150.000 células/cm², se recolectaron y se criopreservaron. Este punto de tiempo de recolección se llama p0.

Ejemplo 2: Generación de ACCS

65 Las células AMP se pueden utilizar para generar ACCS, incluidas las ACCS agrupadas. Las células AMP se aislaron tal como se describió anteriormente y se sembraron aproximadamente 1×10^6 células/ml en matraces T75 que

contenían -10 ml de medio de cultivo tal como se describió anteriormente. Las células se cultivaron hasta que confluyeron, se cambió el medio y se recolectó la ACCS 3 días después de la confluencia. Opcionalmente, la ACCS se recolecta nuevamente después de 3 días y, opcionalmente, nuevamente después de 3 días. Los expertos en la materia reconocerán que otras divulgaciones para recolectar la ACCS de cultivos confluentes, tales como el uso de otros vasos de cultivo de tejidos, incluyendo pero no limitado a fábricas de células, matraces, fibras huecas, o aparatos de cultivo en suspensión, etc. también se contemplan (véase la descripción detallada anteriormente). También se contempla que la ACCS se criopreserve, se liofilice, se irradie o se formule para la liberación sostenida después de la recolección. También se contempla que la ACCS se recopile en diferentes puntos de tiempo (véase la Descripción detallada para más detalles).

Ejemplo 3: Generación de ACCS agrupada

La ACCS se obtuvo esencialmente tal como se describió anteriormente. En determinadas divulgaciones, se recolectó la ACCS varias veces de un cultivo de AMP que proviene de una placenta y estas recolecciones de ACCS múltiples se agruparon entre sí. Dichos grupos se denominan "grupos de SP" (más de una recolección ACCS/una placenta). En otra divulgación, los cultivos de AMP se obtuvieron de diversas placentas, es decir, de 5 o 10 placentas. Se cultivaron las células AMP de cada placenta y se recolectó una colección de ACCS de cada cultivo y luego se combinaron todas. Estos grupos se denominan "grupos MP1" (una colección de ACCS/placenta, múltiples placentas). En otra divulgación más, los cultivos de células AMP se obtuvieron de varias placentas, es decir, de 5 o 10 placentas. Las células AMP de cada placenta se cultivaron y se realizó más de una recolección de ACCS de cada cultivo de células AMP y luego se agruparon. Estos grupos se denominan "grupos MP2" (más de una colección de ACCS/placenta, múltiples placentas).

Ejemplo 4: Liberación de ACCS desde un dispositivo médico implantable

Preparación de la suspensión de polímero de ACCS: El copolímero de etileno acetato de vinilo (ELVAX 40W, DuPont, Wilmington, DE) se disolvió en diclorometano para formar una solución al 10 % (peso/volumen). Se pesaron veinticinco mg de ACCS liofilizado y se suspendieron en 2 ml de la solución de polímero.

Experimento 1: Se sumergió una parte de un dispositivo de prótesis de cadera Zimaloy® en la suspensión de copolímero de acetato de vinilo y etileno-ACCS para recubrir parcialmente el extremo de inserción de la rótula y el extremo puntiagudo del dispositivo. A continuación, se retiró el dispositivo y se secó el revestimiento de polímero durante la noche mediante la evaporación del disolvente diclorometano. La parte revestida del dispositivo se colocó luego en una solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 para la liberación de las proteínas de ACCS.

Experimento 2: Se cortó una sección de aproximadamente 1 cm x 1 cm de un material de injerto vascular Dacron®. Se sumergió en la suspensión de copolímero de acetato de vinilo y etileno-ACCS descrita anteriormente. Se retiró el material de injerto y se secó el revestimiento de polímero durante la noche tras la evaporación del disolvente diclorometano. La parte revestida del dispositivo se colocó luego en una solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 para la liberación de las proteínas de ACCS.

Resultados del Experimento 1 y 2: Los resultados de la Figura 1 demuestran la liberación acumulada sostenida de microgramos de ACCS de los revestimientos de polímero del dispositivo de reemplazo protésico de cadera Zimaloy® y del injerto vascular Dacron® durante 48 horas. El dispositivo de prótesis de cadera recubierto de Zimaloy® liberó un total acumulativo de aproximadamente 1303 microgramos de proteínas ACCS durante el período de 48 horas probado según lo determinado por el ensayo de proteínas Bradford (Bradford, M.M. (1976), "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal. Biochem. 72: 248-254). El material de injerto vascular recubierto de Dacron® liberó un total acumulativo de aproximadamente 704 microgramos de proteínas ACCS durante el período de 48 horas analizado. La mayor liberación del dispositivo de prótesis de cadera de reemplazo Zimaloy® se debe a la mayor superficie del revestimiento en comparación con el material de injerto vascular Dacron®. Además, se demostró que el ACCS incorporado en los revestimientos de polímero ELVAX contenía 23 analitos de ACCS representativos. La matriz de anticuerpos reveló la siguiente liberación de proteínas de los dispositivos recubiertos con Dacron® y Zymaloy® ELVAX/ACCS; PDGF-BB, sTNF RI, TRAIL R3, IGFBP-6, AXL, anfirregulina, uPAR, PDGF AA, ErbB3, LYVE-1, FLRG, Adipsina/Factor D, angiogenina, VEGF, DIPPIV, IGFBP-2, TIMP-2, TIMP-1, GDF-15, PAI-I, Decorina, CA125 y DKK-3.

Ejemplo 5: Revestimiento de un alambre de implante de titanio con ACCS

La ACCS se diafiltró usando cuatro dispositivos de filtro centrífugo Amicon® Ultra-15 (EMD Millipore Corp., Billerica, MA) con 12 ml cada uno. El intercambio de tampón se realizó usando agua para inyección (API) siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de ACCS filtrada se congeló y liofilizó para recubrir.

Se preparó una solución de etileno vinil acetato (EVA) al 5 % en diclorometano. Se añadió polvo de ACCS liofilizado al equivalente del 15 % en peso de ACCS/en peso de ACCS más polímero. Esta mezcla se utilizó luego para revestir cinco secciones de 10 cm de longitud de alambres de implante de titanio 6Al-4V (grado 5). Se sumergieron por separado en la solución cinco piezas preenfriadas de los implantes de alambre de titanio y se dejaron secar durante

la noche a temperatura ambiente. Las piezas se pesaron antes y después del revestimiento y mostraron un aumento de peso total de aproximadamente 1 mg. Los implantes de alambre recubiertos se colocaron juntos en un tubo de ensayo que contenía 150 µl de API y se dejaron eluir durante 24 horas a temperatura ambiente. Se realizaron varias recolecciones de medios de liberación después de tiempos de incubación de 2 horas, 6 horas y 24 horas.

5 Los resultados preliminares demostraron que 1329 pg/ml de actividad de DPPIV, un componente de ACCS, se detectó a las 2 h. No es sorprendente, los puntos de tiempo de 6 horas y 24 horas estuvieron por debajo del nivel de detección con este ensayo particular de actividad de DPPIV. Sin embargo, se detectó la presencia de luminiscencia a las 2 horas y 6 horas, lo que indica una liberación sostenida de ACCS desde el revestimiento de EVAc (véase la Tabla 1 a
10 continuación).

Tabla 1

Tiempo (horas)	Luminiscencia media
0	0
2	7721
6	429

15 Además, actualmente se están investigando ensayos más sensibles, como la matriz de anticuerpos para otras proteínas de ACCS.

Ejemplo 6: Retención de la bioactividad de ACCS después de la combinación o incorporación a la película de gelatina

20 Se preparó una gelatina al 5 % en ACCS disolviendo gelatina en una solución acuosa de ACCS a 40 °C durante 15 min. También se preparó como control gelatina al cinco por ciento en PBS a 1X. Se colocaron doscientos µl de ACCS al 5%/gelatina en un tubo de centrífuga de 1,5 ml y se dejó secar al aire durante 48 horas a temperatura ambiente para formar una película sólida transparente. Las muestras de control también se mantuvieron a temperatura ambiente pero no se dejaron secar. El día del ensayo, la película seca de ACCS/gelatina se solubilizó durante 4 horas con 180
25 µl de agua para inyección (API). A continuación, las muestras se calentaron a 37 °C para solubilizar los geles y luego se diluyeron en tampón de ensayo y se analizaron para determinar la actividad de DPPIV.

30 La Tabla 2 a continuación muestra los resultados del experimento que compara la actividad DPPIV de ACCS/gelatina, ACCS/película de gelatina seca y solubilizada, una solución al 95 % de ACCS y un 5 % de solución salina tamponada con fosfato (PBS)/control negativo de gelatina. Los resultados mostraron que la ACCS/gelatina conservó su actividad y que secar la solución no redujo la actividad de DPPIV.

Tabla 2

Formulación	Actividad de DPPIV (pg/ml)
ACCS/gelatina	16.201
ACCS/gelatina seca y solubilizada	23.538
Solución de ACCS al 95 %	18.344
PBS al 5 %/gelatina	116

35 **Ejemplo 7: Liberación acumulativa de 4 proteínas de ACCS representativas de alambres de titanio recubiertos de EVAc medidos por ensayo de matriz de anticuerpos MSD.**

40 Se realizó un experimento para medir la liberación acumulativa de 4 proteínas ACCS representativas de alambres de titanio recubiertos de EVAc medidos por ensayo de matriz de anticuerpos MSD. Tal como se muestra en la Tabla 3 siguiente, se demostró que la liberación acumulativa de cuatro proteínas representativas de los alambres de titanio revestidos con EVAc aumentaba durante 24 horas. Esto indica la liberación sostenida de estas proteínas de ACCS a partir de alambres de titanio recubiertos con EVAc.

Tabla 3

Proteína	TIMP-1 (pg/ml)	GDF-15 (pg/ml)	PAI-1 (pg/ml)	DKK3 (pg/ml)
Tiempo (h)				
2	248,52	60,01	1187,72	9221,26
6	277,68	62,49	1301,68	9501,24
24	298,89	62,49	1303,43	9503,03

Ejemplo 8: Liberación acumulativa de 4 proteínas de ACCS representativas de alambres de titanio recubiertos de gelatina medidos por ensayo de matriz de anticuerpos MSD.

5 Se realizó un experimento para medir la liberación acumulativa de 4 proteínas ACCS representativas de alambres de titanio recubiertos de gelatina medidos por ensayo de matriz de anticuerpos MSD. Tal como se muestra en la Tabla 4 siguiente, se demostró que la liberación acumulativa de cuatro proteínas representativas de los alambres de titanio revestidos con gelatina aumentaba durante 7 horas. Esto indica la liberación sostenida de estas proteínas de ACCS a partir de alambres de titanio recubiertos con gelatina.

10

Tabla 4

Proteína	TIMP-1 (pg/ml)	GDF-15 (pg/ml)	PAI-1 (pg/ml)	DKK3 (pg/ml)
Tiempo (h)				
2	1458,85	94,35	1332,60	48,18
4	1645,15	118,81	2516,20	75,65
7	1756,04	124,40	2905,85	120,19

Ejemplo 9: Modelo inflamatorio: uso de ACCS para prevenir la aparición de enfermedad periodontal en un modelo animal

15

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar el papel preventivo de ACCS en periodontitis experimental en conejos inducida por *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*)

20

Métodos: Se distribuyeron ocho conejos blancos de Nueva Zelanda en 3 grupos: 1. Sin tratamiento (n=2), 2. Control (medios de cultivo de ACCS no acondicionados) (n=3) y 3. ACCS (n=3). Al inicio, todos los conejos recibieron ligaduras de seda atadas bilateralmente alrededor de los segundos premolares mandibulares bajo anestesia general. Los materiales de prueba asignados, ACCS o control, en volúmenes de 10 µl se aplicaron tópicamente a los sitios ligados con una jeringa Hamilton con aguja roma desde el momento de la ligadura; los animales de control recibieron ligadura, pero sin tratamiento. La suspensión tópica que contiene *P. gingivalis* se aplicó posteriormente (1 ml) para inducir la inflamación periodontal. La aplicación de materiales de prueba y *P. gingivalis* continuó durante 6 semanas en una pauta de días alternos. A las 6 semanas, después de la eutanasia, las mandíbulas se extrajeron quirúrgicamente. Se realizaron evaluaciones morfométricas, radiográficas e histológicas.

25

30

Resultados: Las valuaciones macroscópicas, incluidas evaluaciones de tejidos blandos, las mediciones de hueso crestral e infraóseo mostraron una ruptura periodontal significativa inducida por *P. gingivalis* en los grupos de control y sin tratamiento a las 6 semanas en comparación con los grupos tradicionales de ligadura sola (p=0,05, p=0,03, respectivamente). La aplicación de ACCS inhibió significativamente la inflamación de los tejidos blandos y evitó tanto la pérdida de hueso crestral como la formación de defectos infraóseos en comparación con los grupos de control y no tratados (p=0,01, p=0,05, respectivamente). Las evaluaciones histológicas y mediciones histomorfométricas apoyaron los hallazgos clínicos; Los animales tratados con ACCS demostraron una inflamación significativamente menor en los tejidos blandos y una menor pérdida ósea en comparación con los grupos de control y no tratados (p=0,05).

35

40

Conclusiones: La aplicación tópica de ACCS previene los cambios inflamatorios periodontales y la pérdida ósea inducida por *P. gingivalis* tal como se muestra tanto a nivel clínico como histopatológico. La ACCS tiene potencial como enfoque terapéutico para la prevención de enfermedades periodontales

Ejemplo 10: Modelo inflamatorio - Uso de ACCS para detener la progresión o revertir la enfermedad periodontal en un modelo animal

45

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar las acciones terapéuticas de la ACCS en el tratamiento de la periodontitis inducida por *P. gingivalis*.

50

Métodos: El estudio se realizó utilizando un protocolo de periodontitis de conejo de dos fases: 1-Inducción de la enfermedad (6 semanas) y 2- Tratamiento (6 semanas). La enfermedad periodontal fue inducida en 16 conejos blancos de Nueva Zelanda mediante la aplicación de días alternos de *P. gingivalis* a premolares mandibulares ligados. Al final de la Fase 1, se sacrificaron 4 conejos seleccionados al azar para servir como grupo de enfermedad de partida. Para la Fase 2, los 12 conejos restantes se distribuyeron en 3 grupos (n = 4), 1- Sin tratar, 2- Control (medios de cultivo de ACCS no acondicionados) y 3- Tratamiento con ACCS. Al final de la Fase 2, se realizaron evaluaciones morfométricas, radiográficas e histológicas en mandíbulas recolectadas.

55

Resultados: El grupo de enfermedad basal mostró periodontitis experimental evidenciada por inflamación tisular y pérdida ósea. Al final de la Fase 2, el grupo no tratado mostró una progresión significativa de la enfermedad

caracterizada por una mayor destrucción de los tejidos blandos y duros ($p=0,05$). La inflamación tisular y la pérdida ósea se redujeron significativamente mediante ACCS tópica en comparación con la enfermedad de referencia y los grupos no tratados ($p=0,05$; $p=0,002$, respectivamente). El tratamiento de control también detuvo la progresión de la enfermedad en comparación con el grupo no tratado ($p=0,01$), pero no hubo mejoría en la salud periodontal en comparación con la enfermedad inicial ($p=0,4$). Las evaluaciones histopatológicas revelaron hallazgos similares; la ACCS detuvo la progresión del proceso inflamatorio ($p=0,003$) y revirtió la destrucción ósea inducida por *P.gingivalis* ($p=0,008$). El grupo tratado con ACCS tuvo una actividad osteoclástica mínima limitada al área crestral en comparación con los grupos de control y no tratados, que mostró una profunda actividad osteoclastogénica en la cresta ósea así como en los sitios interproximales.

Conclusiones: La aplicación tópica de ACCS detuvo la progresión de la inflamación periodontal y dio como resultado la regeneración tisular en la periodontitis de conejo, lo que indica su potencial eficacia terapéutica.

Ejemplo 11: Modelo inflamatorio - Evaluar la eficacia de ACCS aplicada tópicamente para inhibir la inflamación cutánea irritante de 12-O-tetradecanoilforbol-3-acetato (TPA) en ratones

Método: El tratamiento tópico se administró dos veces al día a los siguientes grupos: 1. TPA + control tópico; 2. TPA + ACCS; 3. TPA + clobetasol 0,05 solución tópica (el corticosteroide tópico más fuerte disponible); 4. ACCS sola; 5. Sin tratamiento (se midió la otra oreja sin tratar). Los criterios de valoración del estudio fueron el grosor de la oreja y el peso de la oreja al final del experimento. Cuanto más gruesa es la oreja y más pesa se correlaciona con el grado de inflamación.

Resultados: La ACCS aplicada por vía tópica fue eficaz para reducir la inflamación inducida por TPA. La actividad antiinflamatoria de la ACCS tópica alcanzó el mismo nivel que el clobetasol (un corticosteroide tópico potente de clase 1) 3 días después de comenzar la aplicación.

Conclusión: La ACCS tiene un fuerte efecto antiinflamatorio cuando se aplica sobre la piel.

Ejemplo 12: Modelo inflamatorio - Evaluar la eficacia de la inyección intralesional de ACCS para inhibir la inflamación cutánea irritante (TPA) en ratones.

Método: La inyección intralesional en el oído se administró una vez al día a los siguientes grupos: 1. TPA + control intralesional; 2. TPA + ACCS intralesional; 3. TPA + kenalog intralesional (10 mg/ml) (un potente corticosteroide intralesional); 4. Inyección intralesional de ACCS sola; 5. Inyecciones simuladas de solución salina en el oído normal no tratado. Los criterios de valoración del estudio fueron el grosor de la oreja y el peso de la oreja al final del experimento. Cuanto más gruesa es la oreja y más pesa se correlaciona con el grado de inflamación.

Resultados: La inyección intralesional de ACCS fue eficaz para reducir la inflamación inducida por TPA en todos los momentos a partir del día 2 de las inyecciones diarias. Las inyecciones intralesionales de kenalog (10 mg/ml) indujeron un hematoma en el lugar de la inyección, lo que llevó a cierta inflamación y es por eso que no hay una diferencia sustancial en el grosor de la oreja al comparar TPA + kenalog con TPA + control.

Conclusiones: La ACCS intralesional redujo la inflamación de la piel, pero el ACCS aplicada tópicamente en el Ejemplo 1 anterior tuvo un efecto más potente. No hubo diferencia en el peso de la oreja utilizando ACCS o kenalog intralesional en comparación con TPA + control.

Ejemplo 13: Modelo de cicatrización de heridas - Efectos de la ACCS en un modelo animal de cicatrización de heridas crónicas.

Se utilizó un modelo animal aceptado en la técnica para la granulación de heridas crónicas para estudiar los efectos de la ACCS en la cicatrización de heridas crónicas (Hayward PG, Robson MC: Animal models of wound contraction. En Barbul A, et al: Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair: Normal and Chronic Wounds. John Wiley y Sons, Nueva York, 1990).

Resultados: La ACCS fue eficaz para no permitir la proliferación de la carga biológica bacteriana tisular. La ACCS permitió una cicatrización acelerada de la herida de granulación significativamente más rápido que los grupos de control infectados no tratados.

Ejemplo 14: Modelo animal de artroplastia

Un modelo animal aceptado en la materia para la artroplastia (véase, por ejemplo, Bernthal, N.M., *et al.*, PLoS ONE, Septiembre de 2010, Vol. 5, Número 9, e12582) se utiliza para evaluar el dispositivo médico mejorado revestido con ACCS de la invención y su capacidad para prevenir y/o regular negativamente la respuesta inflamatoria asociada con dispositivos médicos implantados, insertados o colocados por vía transcutánea. Este modelo también se utiliza para evaluar la capacidad del dispositivo médico mejorado revestido de ACCS para administrar, de manera controlada, citocinas moduladoras de la respuesta inflamatoria y factores de crecimiento fisiológicamente relevantes que son

capaces de prevenir y/o regular negativamente la respuesta inflamatoria asociada con los dispositivos médicos implantados, insertados o colocados por vía transcutánea. Este modelo también se utiliza para evaluar la capacidad del dispositivo médico mejorado revestido de ACCS para administrar, de manera controlada, factores de crecimiento de cicatrización de heridas fisiológicamente relevantes y citocinas que son capaces de promover la cicatrización del tejido en el sitio de la implantación, inserción o colocación transcutánea del dispositivo médico en un paciente.

5

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo médico implantable que tiene un revestimiento en su superficie, útil para la implantación quirúrgica en el cuerpo de un sujeto, en el que el revestimiento comprende composiciones de solución de citocinas celulares derivadas del amnios (ACCS) dispersas en un material de revestimiento polimérico.
2. El dispositivo médico implantable según la reivindicación 1, en el que la ACCS se liofiliza antes de la dispersión en el material de revestimiento polimérico.
3. El dispositivo médico implantable de la reivindicación 1 que se selecciona del grupo que consiste en stents, dispositivos de reemplazo de articulaciones, dispositivos de reemplazo de dientes, tornillos para huesos, varillas de reparación ósea, placas de reparación ósea, alambres de reparación de huesos, clavijas de reparación de huesos, tornillos de columna vertebral, varillas de la columna vertebral, discos intervertebrales artificiales, marcapasos, desfibriladores implantables, implantes cocleares e implantes dentales.
4. Un dispositivo médico insertable que tiene un revestimiento en su superficie, útil para la inserción quirúrgica en el cuerpo de un sujeto, en el que el revestimiento comprende ACCS dispersa en un material de revestimiento polimérico.
5. El dispositivo médico insertable según la reivindicación 4, en el que la ACCS se liofiliza antes de la dispersión en el material de revestimiento polimérico.
6. Un dispositivo médico transcutáneo que tiene un revestimiento en su superficie, útil para la inserción en el cuerpo de un sujeto, en el que el revestimiento comprende ACCS dispersa en un material de revestimiento polimérico.
7. El dispositivo médico transcutáneo según la reivindicación 6, en el que la ACCS se liofiliza antes de la dispersión en el material de revestimiento polimérico.
8. El dispositivo médico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la ACCS comprende niveles fisiológicos de VEGF, PDGF, angiogenina, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2, en donde los niveles fisiológicos son aproximadamente 5,0-16 ng/ml para VEGF, aproximadamente 3,5-4,5 ng/ml para angiogenina, aproximadamente 100-165 pg/ml para PDGF, aproximadamente 2,5-2,7 ng/ml para TGFβ2, aproximadamente 0,68 mg/ml para TIMP-1 y aproximadamente 1,04 μg/ml para TIMP-2.
9. Un método para regular negativamente la respuesta inflamatoria que tiene lugar después de la implantación, inserción o colocación transcutánea de un dispositivo médico en un paciente, comprendiendo el método la etapa de revestir el dispositivo médico con una composición que comprende ACCS dispersa en un material de revestimiento polimérico.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la ACCS se liofiliza antes de la dispersión en el material de revestimiento polimérico.
11. El método de la reivindicación 9, en el que el dispositivo médico se selecciona del grupo que consiste en stents, dispositivos de reemplazo de articulaciones, dispositivos de reemplazo de dientes, tornillos para huesos, varillas de reparación ósea, placas de reparación ósea, alambres de reparación de huesos, clavijas de reparación de huesos, tornillos de columna vertebral, varillas de la columna vertebral, discos intervertebrales artificiales, marcapasos, desfibriladores implantables, implantes cocleares e implantes dentales.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la ACCS comprende niveles fisiológicos de VEGF, PDGF, angiogenina, TGFβ2, TIMP-1 y TIMP-2, en donde los niveles fisiológicos son aproximadamente 5,0-16 ng/ml para VEGF, aproximadamente 3,5-4,5 ng/ml para angiogenina, aproximadamente 100-165 pg/ml para PDGF, aproximadamente 2,5-2,7 ng/ml para TGFβ2, aproximadamente 0,68 μg/ml para TIMP-1 y aproximadamente 1,04 μg/ml para TIMP-2.

Figura 1

