

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 633**

51 Int. Cl.:

A61K 35/56 (2015.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2008 E 08852340 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2211878**

54 Título: **Efectos mediados por calcio de corales y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

19.11.2007 US 996450 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2015

73 Titular/es:

**BEN GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY
(100.0%)
P.O. Box 653
84105 Beer Sheva, IL**

72 Inventor/es:

VAGO, RAZI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 536 633 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

Efectos mediados por calcio de corales y métodos de uso de los mismos

5 Esta invención está dirigida a andamios de corales sembrados con células precursoras en cultivo en presencia de un quelante de calcio y a usos de los mismos en la inducción o la mejora de la formación de hueso y/o cartílago en un sujeto, y a kits relacionados con ellos. También se describe en esta memoria el uso de corales supra-reguladores de cadherina para tratar el cáncer o inhibir la progresión del cáncer y el uso de especies productoras de aragonita o calcita para la liberación de calcio *in vivo*.

Antecedentes de la invención

10 La intervención quirúrgica y el injerto son a veces necesarios para restaurar la función mecánica y reconstruir la morfología del hueso resultante de trauma, tumores, o desarrollos óseos anormales. También se han utilizado durante muchos años materiales sintéticos tales como metales y cementos óseos, pero a menudo resultan en una osteopenia asociada al uso de implantes protésicos para el hueso circundante y el fallo por fatiga del implante. Otra posibilidad es el injerto autólogo de hueso, aunque el suministro de tejido óseo autólogo es limitado y su recogida es dolorosa, con el riesgo de infección, hemorragia, discapacidad cosmética, lesión de los nervios y la pérdida de función del hueso. Además, una morbilidad significativa se asocia con los sitios de recogida del autoinjerto. Estos problemas pueden ser superados mediante tejido de ingeniería utilizando andamios hechos de biomateriales sintéticos o naturales que fomentan la adherencia, migración, proliferación y diferenciación de células madre de la médula ósea, también conocidas como células madre mesenquimales (MSCs). Se puede fomentar una asociación entre biocomponentes y respuestas regenerativa y de reparación biológicas proporcionando un andamio que contenga espacios morfológicamente compatibles con osteonas y sus interconexiones vasculares.

20 El microentorno inmediato y la organización tridimensional (3D) son factores importantes en la diferenciación en general, y particularmente en la diferenciación osteogénica.

25 Algunos andamios de ingeniería de tejido óseo consisten en polímeros naturales tales como colágeno, alginato, ácido hialurónico y quitosano. Los materiales naturales ofrecen las ventajas de la interacción específica de las células, una fácil siembra de células debido a sus interacciones hidrofílicas, baja toxicidad y baja respuesta inflamatoria crónica. Sin embargo, estos andamios son a menudo mecánicamente inestables y no contribuyen fácilmente a la creación de estructuras de tejido con una forma predefinida específica para el trasplante. Para obtener una resistencia mecánica, se requiere una modificación química, que puede conducir a la toxicidad.

30 Aunque la mayoría de los materiales candidatos deben ser sintéticamente modificados para cumplir con los requisitos esenciales de un sustituto adecuado de hueso y/o cartílago, este no es necesariamente el caso de material esquelético marino tal como los exoesqueletos de coral naturales. Organismos sésiles y de vida libre calcificados albergan una gran variedad de materiales esqueléticos modularmente organizados a nanoescala hasta mesoescala.

Compendio de la invención

35 La presente invención proporciona un método para preparar un andamio de corales o biomatriz de corales sembrado con células precursoras para inducir o potenciar la formación de hueso y/o cartílago, en el que el método comprende sembrar un andamio de corales o biomatriz de corales con células precursoras en cultivo en presencia de un quelante de calcio durante un periodo de tiempo suficiente para sembrar dicho andamio de corales o biomatriz de corales, con la condición de que las células precursoras no sean células madre embrionarias humanas. En otra realización, la presente invención proporciona un kit para la formación de hueso y/o cartílago que comprende un andamio de corales o biomatriz de corales, un quelante de calcio y células precursoras de hueso y/o cartílago para la siembra en dicho andamio de corales o biomatriz de corales en cultivo en presencia de dicho quelante de calcio, con la condición de que las células precursoras no sean células madre embrionarias humanas.

45 También se describe en esta memoria y no es una realización de la presente invención un método para tratar el cáncer o inhibir la progresión del cáncer, que comprende poner en contacto una célula neoplásica, pre-neoplásica o hiperplásica en un sujeto con una composición que comprende coral, en el que dicho coral supra-regula los niveles de cadherina y en el que dicho coral es de las especies *Porites* o *Acropora*.

50 También se describe en esta memoria y no es una realización de la presente invención un método para prevenir una recaída de cáncer, reducir la incidencia de cáncer, prolongar la remisión de cáncer o tratar un precursor precanceroso, comprendiendo el método poner en contacto una célula neoplásica, pre-neoplásica o hiperplásica en un sujeto con una composición que comprende coral, en el que dicho coral supra-regula los niveles de cadherina.

55 También se describe en esta memoria y no es una realización de la presente invención un método de liberación de calcio *in vivo*, que comprende poner en contacto células en un sujeto con una especie productora de aragonita o calcita, mediante el cual células reclutadas a dicha aragonita o calcita fomentan la liberación de calcio a partir de dicha aragonita o calcita.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1A es un dibujo esquemático del experimento de biomarcaje. El experimento se realizó en tres etapas: (A) clonación bajo el agua de microcolonias de *M dichotoma*, (B) incubación y biomarcaje de microcolonias en un sistema de tanque y (C) siembra de MSCs en biomatrices marcadas.

- 5 La Fig. 1B presenta fotografías de las etapas de biomarcaje representados en la Fig. 2A. Se cortaron puntas de *M dichotoma*, se pegaron a portaobjetos de vidrio y se colocaron en placas de PVC (a y b). Las puntas actúan como centros de crecimiento a partir de los cuales se estableció una fina capa porosa de aragonita cristalina (c). Las microcolonias fueron transferidas a sistemas de tanques y se incubaron con $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (d) y calceína (e) durante 48 horas. Después, las MSCs fueron sembradas en biomatrices marcadas y se cultivaron con medio con bajo contenido en calcio o de control. Fotografías de la zona central de la biomatriz de aragonita porosa y cristales situados en los lados/márgenes de la biomatriz sembrada con MSCs se muestran en (f) y (g), respectivamente.

- 10 Las Figs. 2A y 2B presentan micrografías electrónicas de barrido (SEMs) que muestran la distribución de células y la densidad en biomatrices de Porites lutea (POR) y POR revestida de oro (GCPOR) sembradas con MSCs los días 1, 4 y 7 después de la siembra. También se demostró el efecto de la incubación con el quelante de calcio, EGTA sobre la distribución y densidad de las células. Barra de escala = 100 micras.

- 15 La Fig. 3 presenta las mediciones de calcio en células madre mesenquimales (MSCs) sembradas en biomatrices biomarcadas. (A) fotografías de microscopía de fluorescencia que muestran la absorción de calcio en la biomatriz marcada con calceína (B-D) por parte de MSCs 7 días después de la siembra (en rojo); los núcleos de las células se muestran en azul. Aumentos de fotografía: (A y B) X200; (C y D) X400. (E) medición de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en MSCs sembradas en biomatrices biomarcadas, 3 y 10 días después de la siembra. Los resultados están normalizados a concentraciones de ADN y se muestra como media \pm DE. (ensayo t de Student: (*)) $p < 0,01$.

- 20 La Fig. 4 presenta la expresión de ARNm de cadherina en MSCs sembradas en Porites lutea (POR). (A) expresión de ARNm de cadherina-11 (Cad-11) en MSCs sembradas en biomatrices de POR y POR (GOLD) revestidas de oro en diferentes días después de la siembra. Los niveles de expresión de ARNm se muestran como cambios veces \pm DE, en relación con el nivel de expresión de biomatrices GOLD el día 1. (B) la expresión de ARNm de N-cadherina (N-Cad) en MSCs sembradas en biomatrices de Porites lutea (POR) y revestidas de oro POR (GOLD) en diferentes días después de la siembra. Los niveles de expresión de ARNm se muestran como veces de cambios \pm DE, en relación con el nivel de expresión de biomatrices GOLD el día 1.

Descripción detallada de la presente invención

- 30 El coral, que se compone de CaCO_3 en la forma cristalina de calcita, aragonita y silicato de SiO_2 combinado con $\text{Mg}(\text{OH})_2$, tiene las ventajas de permitir una rápida invasión, adhesión y proliferación celular. Sorprendentemente, se encontró que el coral, cuando entra en contacto con las células en presencia de un quelante, aumentó la densidad de células madre mesenquimales locales (Ejemplo 1, Fig. 2).

- 35 En una realización, la presente invención está dirigida al uso de coral sembrado con una célula precursora en cultivo en presencia de un quelante de calcio para inducir o potenciar la formación de hueso y/o cartílago en un sujeto, y kits relacionados con los mismos.

- 40 También se describe en esta memoria y no es una realización de la presente invención un método para inducir o potenciar la formación de hueso y/o cartílago en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende coral, en el que dicho coral se siembra con una célula precursora en Y en presencia de un quelante durante un período de tiempo suficiente para sembrar dicha célula precursora en dicho coral.

- 45 La expresión formación de hueso y/o cartílago, u osteogénesis, se refiere a la creación de nueva masa de hueso y/o cartílago o a la reparación de fracturas, incluyendo fracturas no consolidadas. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende un nuevo crecimiento de la estructura del hueso y/o cartílago o una densidad incrementada de hueso y/o cartílago existente. La masa de hueso y/o cartílago y/o curación de la fractura son evaluados mediante histología, fotografías de rayos X, densitometría de rayos X computarizada, densitometría de fluorescencia informatizada o cualquier otro método conocido en la técnica, o cualquier combinación de los mismos.

- 50 Los métodos de esta invención se pueden utilizar para potenciar la formación hueso y/o cartílago en un sujeto, en los que dicho sujeto puede ser un vertebrado, p.ej., un mamífero, incluyendo animales domésticos tales como cerdos, vacas, caballos, ovejas y cabras, y también incluyendo mascotas tales como perros, gatos, y mamíferos experimentales tales como roedores. El sujeto puede ser un ser humano, p. ej., hombre o mujer que padece, por ejemplo, osteoporosis o fragilidad ósea o un defecto del cartílago.

- 55 El sujeto puede padecer osteoartritis, artritis reumatoide, necrosis aséptica, osteocondritis disecante, lesiones del cartílago articular, condromalacia rotuliana, condrosarcoma, condrosarcoma- cabeza y cuello, costocondritis, encondroma, hallux rigidus, desgarramiento del labrum de la cadera, osteocondritis disecante, menisco desgarrado, policondritis recidivante, artritis canina, defecto del cuarto arco branquial o la oreja de coliflor. En una realización, los métodos de esta invención inducen o potencian la reparación del cartílago en los trastornos cartilaginosos

degenerativos que comprenden trastornos caracterizados, al menos en parte, por la degeneración o alteración metabólica de tejidos conjuntivos del cuerpo, incluyendo no sólo las articulaciones o estructuras relacionadas, incluyendo músculos, bursas (membrana sinovial), tendones y tejido fibroso, sino también la placa de crecimiento, el sistema meniscal y los discos intervertebrales.

5 Los métodos de la presente invención son útiles para la regeneración de hueso y de cartílago.

En realizaciones de la presente invención, los métodos y kits emplean el uso de un coral. En una realización, el coral comprende cualquier especie, incluyendo, entre otras, Porites, Acropora, Millepora, o una combinación de los mismos.

10 En una realización, el coral es de la especie de Porites. En una realización, el coral es Porites lutea. En la mayoría de las especies, las relaciones de hueco a macizo está generalmente en el intervalo de 0,4 a 0,6, y la fase de hueco se interconecta completamente, formando una red altamente regular que interpenetra en la fase de carbonato de calcio sólido. En una realización, esta arquitectura uniforme y de interconexión es particularmente útil como un andamio en los métodos y kits de la presente invención.

15 En una realización, el coral es de una especie de Acropora. En una realización, el coral es Acropora grandis, que en una realización es muy común, de crecimiento rápido y fácil de cultivar en cultivo. Por lo tanto, en una realización, se pueden recoger fácilmente muestras de Acropora en zonas protegidas de los arrecifes de coral y la recogida de los arrecifes de coral se puede evitar mediante el uso de material de coral cultivado.

20 La densidad media del esqueleto de Acropora grandis es -2,7g/cml. Debido a que el esqueleto de esta especie de coral es densa y fuerte, se puede mecanizar fácilmente a una diversidad de configuraciones de productos conformados o estructuras de diferentes tamaños, por ejemplo mediante molienda. Este material es particularmente adecuado para su uso en un dispositivo de implante, en particular para huesos que soportan carga en donde la resistencia es una propiedad esencial del dispositivo de implante. Por lo tanto, en una realización, el coral Acropora es útil como un andamio en los métodos y kits de la presente invención.

25 En otra realización, el coral es de una especie de Millepora. En una realización, el coral es Millepora dichotoma. En una realización, el coral tiene un tamaño de poros de 150 µm y se puede clonar y cultivar, haciendo a Millepora útil como un andamio en los métodos y kits de la presente invención, en una realización.

30 En otra realización, el coral es de una cualquiera o más de las siguientes especies: *Favites halicora*; *Goniastrea retiformis*; *Acanthastrea echinata*; *Acanthastrea hemprichi*; *Acanthastrea ishigakiensis*; *Acropora aspera*; *Acropora austera*; *Acropora sp. "digitada parda"*; *Acropora carduus*; *Acropora cerealis*; *Acropora chesterfieldensis*; *Acropora clathrata*; *Acropora cophodactyla*; *Acropora sp. "similar a danai"*; *Acropora divaricata*; *Acropora donei*; *Acropora echinata*; *Acropora efflorescens*; *Acropora gemmifera*; *Acropora globiceps*; *Acropora granulosa*;

35 *Acropora cf hemprichi*; *Acropora kosurini*; *Acropora cf loisettae*; *Acropora longicyathus*; *Acropora loripes*; *Acropora cf lutkeni*; *Acropora paniculata*; *Acropora proximalis*; *Acropora rudis*; *Acropora selago*; *Acropora solitaryensis*; *Acropora cf spicifera as per Veron*; *Acropora cf spicifera as per Wallace*; *Acropora tenuis*; *Acropora valenciennesi*; *Acropora vauhani*; *Acropora vermiculata*; *Astreopora gracilis*; *Astreopora myriophthalma*; *Astreopora randalli*; *Astreopora suggesta*; *Australomussa rowleyensis*; *Coscinaraea collumna*; *Coscinaraea crassa*; *Cynarina lacrymalis*; *Distichopora violacea*; *Echinophyllia echinata*; *Echinophyllia cf echinoporoides*; *Echinopora gemmacea*; *Echinopora hirsutissima*; *Euphyllia ancora*; *Euphyllia divisa*; *Euphyllia yaeyamensis*; *Favia rotundata*; *Favia truncatus*; *Favites acuticollis*; *Favites pentagona*; *Fungia granulosa*; *Fungia klunzingeri*; *Fungia mollucensis*; *Galaxea acrhelia*;

40 *Goniastrea edwardsi*; *Goniastrea minuta*; *Hydnophora pilosa*; *Leptoseris explanata*; *Leptoseris incrustans*; *Leptoseris mycetoseroides*; *Leptoseris scabra*; *Leptoseris yabei*; *Lithophyllon undulatum*; *Lobophyllia hemprichii*; *Merulina scabricula*; *Millepora dichotoma*; *Millepora exaesa*; *Millipora intricata*; *Millepora murrayensis*; *Millipora platyphylla*; *Monastrea curta*; *Monastrea colemani*; *Montipora caliculata*; *Montipora capitata*; *Montipora foveolata*; *Montipora meandrina*; *Montipora tuberculosa*; *Montipora cf vietnamensis*; *Oulophyllia laevis*; *Oxypora crassispinosa*; *Oxypora lacera*; *Pavona bipartita*; *Pavonavenosa*; *Pectinia alcornis*; *Pectinia paeonea*; *Platygyra acuta*; *Platygyra pini*;

45 *Platygyra sp "green"*; *Platygyra verweyi*; *Podabacia cf lanakensis*; *Porites annae*; *Porites cylindrica*; *Porites evermanni*; *Porites monticulosa*; *Psammocora digitata*; *Psammocora explanulata*; *Psammocora haimeana*; *Psammocora superficialis*; *Sandalolitha dentata*; *Seriatorpora caliendrum*; *Stylocoeniella armata*; *Stylocoeniella guentheri*; *Stylaster sp.*; *Tubipora musica*; *Turbinaria stellulata*; o cualquier coral conocido en la técnica, o una

50 combinación de los mismos.

En otra realización, coral para su uso en los métodos de la presente invención puede ser Madreporaria, Helioporida de la orden Coenothecalia, Tubipora de la orden Stolonifera, Millepora de la orden Milleporina, u otros conocidos en la técnica.

55 En algunas realizaciones, coral para su uso en los andamios, métodos y/o kits de esta invención puede comprender coral escleractinio, incluyendo en algunas realizaciones, Goniopora y otros. En algunas realizaciones, coral para su uso en los andamios, métodos y/o kits de esta invención puede comprender Alveopora. En algunas realizaciones, coral para su uso en los andamios, métodos y/o kits de esta invención puede comprender corales bambú, incluyendo en algunas realizaciones coral de la familia Isididae, géneros Keratoisis, Isidella y otros.

La presente invención abarca el uso de coral como se describe aquí para inducir o potenciar la formación de hueso y/o cartílago. En una realización, coral se puede administrar en forma sólida. En otra realización, coral se puede administrar localmente, que en una realización es directamente a un sitio de dolencia del hueso y/o cartílago o a un sitio de la formación deseada de hueso y/o cartílago. En una realización, coral se puede mecanizar en una
 5 diversidad de configuraciones, y se pueden formar configuraciones bastante complejas tales como estructuras cilíndricas y estructuras roscadas mediante un procesamiento mecánico adecuado. En otra realización, coral se puede administrar en bloques sólidos, barras o formas granulares. En una realización, materiales coralinos se configuran de una manera para adaptarse a la forma de hueso existente y/o cartílago o para rellenar huecos y defectos de contorno en el hueso y/o cartílago. En una realización, que no forma parte de la presente invención, el
 10 coral se implanta en una orientación que le permite ponerse en contacto con la superficie específica máxima de un hueso y/o cartílago adyacente. En otra realización, el coral se conforma de manera que se inserte en una fractura de no unión.

En una realización, el tamaño de los andamios de coral puede ser de cualquier tamaño que sea útil para los fines de la presente invención, como se conocerá por un experto en la técnica dependiendo de la finalidad. Por ejemplo, y en
 15 una realización, el andamio de coral puede ser sustancialmente del mismo tamaño que la estructura que está destinada a reemplazar, mientras que en otra realización, el andamio o una porción del mismo puede ser del tamaño de una fisura o fractura de hueso tal que puede ser colocado en ella para potenciar la formación de hueso en una ubicación discreta. En otra realización, el tamaño medio de los poros del coral es apropiado para la siembra de células precursoras, que en una realización es 1 micra-1 mm, 50-500 micras, o en otra realización, 150-220 micras.

20 En una realización, el coral se lava, blanquea, congela, seca, o una combinación de los mismos antes de la siembra con células precursoras.

En una realización, el coral se siembra con una célula precursora, con la condición de que la célula precursora no sea una célula madre embrionaria humana. En una realización, la célula precursora es una célula madre mesenquimal. En otras realizaciones, la célula puede ser una célula mesenquimal; condrocitos; fibrocondrocitos;
 25 osteocitos; osteoblastos; osteoclastos; sinoviocitos; células de la médula ósea; células del estroma; célula madre; célula madre embrionaria no humana; célula precursora, derivada de tejido adiposo; célula progenitora de la sangre periférica; célula madre aislada de tejido adulto; célula transformado genéticamente; o una combinación de los mismos. En otra realización, una célula precursora puede referirse a una combinación de condrocitos y otras células; una combinación de osteocitos y otras células; una combinación de sinoviocitos y otras células; una combinación de
 30 células de la médula ósea y otras células; una combinación de células mesenquimales y otras células; una combinación de células del estroma y otras células; una combinación de células madre y otras células; una combinación de células madre embrionarias no humanas y otras células; una combinación de células precursoras aisladas de tejido adulto y otras células; una combinación de células progenitoras de la sangre periférica y otras células; una combinación de células madre aisladas de tejido adulto y otras células; y una combinación de células
 35 transformadas genéticamente y otras células.

En una realización de la presente invención, las células precursoras para su uso en el método de la presente invención se preparan a partir de un tejido de órgano del mamífero receptor (es decir, autólogo), o un mamífero
 singénico. En otra realización, se pueden utilizar células precursoras alogénicas y xenogénicas.

40 Las células precursoras utilizadas para la administración se preparan a partir de un donante que es el antígeno leucocitario humano (HLA) emparejado con el receptor, en que HLA es el complejo principal de histocompatibilidad en los seres humanos. El donante y el receptor se pueden emparejar para genes de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) genes de clase II del MHC, o una combinación de los mismos. Los genes de clase I del MHC pueden comprender HLA-A, HLA-B y HLA-C, en donde, por ejemplo una falta de coincidencia de genes de clase I del MHC aumenta el riesgo de rechazo del injerto, y los genes de clase II del MHC pueden comprender HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB1, en donde, por ejemplo, una falta de coincidencia
 45 de genes de clase II del MHC aumenta el riesgo de GVHD. El donante y el receptor se pueden emparejar para los genes HLA-DM y HLA-DO.

El coral se siembra con células precursoras en presencia de un quelante de calcio. El término quelante se refiere a un agente quelante o reactivo quelante. En una realización, el quelante puede comprender: ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA), ácido O,O'-bis(2-aminofeniletenglicol)etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), N,N-bis(2-hidroxietyl)glicina (bicina), ácido trans-1,2-diaminociclohexano-etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético (CyDTA), ácido 1,3-diamino-2-hidroxiopropano-etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético (DPTA-OH), ácido dietilentriammina-N,N,N',N",N"-pentaacético (DPTA), dihidrocloruro de ácido etilendiamina-N,N'-dipropiónico (EDDP), etilendiamina-N,N'-bis(ácido metilfosfónico) hemihidrato (EDDPO), ácido N-(2-hidroxietyl)etilendiamina- N,N',N'-triacético (EDTA-OH), etilendiamina-N,N,N',N'-tetrakis(ácido metilfosfónico) (EDTPO), ácido O,O'-bis(2-aminoetyl)etilenglicol-tetraacético (EGTA), ácido N,N'-bis(2-hidroxibencil)etilendiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido 1,6-hexametilendiamina- N,N,N',N'-tetraacético (HDTA), ácido N-(2-hidroxietyl)iminodiacético (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), ácido 1,2-diaminopropano-N,N,N',N'-tetraacético (metil-EDTA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido nitrilotripropiónico (NTP), nitrilotris(ácido metilfosfónico) sal trisódica (NTPO), N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN) y ácido trietilentetramina-N,N,N',N",N"-hexaacético (TTHA), rhod-2, DMSA, FLUO 3, FURA 2, INDO 1, QUIN 2, u otros quelantes conocidos en la técnica, o una combinación de los mismos.
 50
 55
 60

En una realización, coral se siembra con una célula precursora en cultivo en presencia de un quelante de calcio durante un periodo de tiempo suficiente para sembrar dicha célula precursora en dicha coral. En una realización, el coral se siembra con la célula precursora en medio libre de suero. En otra realización, la siembra se realiza en medio bajo en suero. En otra realización, la siembra se realiza en un medio al que se añadió suero. En una realización, dicho medio suplementado con suero comprende suplemento sustituto de suero al 10%, suero bovino fetal (FBS o FCS) al 10%, suero de ternero enriquecido, suero de caballo, suero de cabra, suero humano, o una combinación de los mismos.

Por "cultivo celular" o "cultivo" se quiere dar a entender el mantenimiento de células en un entorno artificial, in vitro. Ha de entenderse, sin embargo, que la expresión "cultivo celular" es un término genérico y puede utilizarse para abarcar el cultivo no sólo de células individuales, sino también de los tejidos, órganos, sistemas de órganos u organismos enteros, para los que las expresiones "cultivo de tejidos", "cultivo de órganos", "cultivo de sistema orgánico" o "cultivo organotípico" se puede utilizar ocasionalmente de manera indistinta con la expresión "cultivo celular".

En una realización, los medios para el cultivo o el crecimiento de células eucariotas y/o procariotas, tejidos, órganos, etc., pueden utilizarse para cultivar células precursoras de la presente invención. Dichos medios comprenden Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal de Eagle (BME), RPMI-1640, F10 de Ham, F-12 de Ham, Medio Mínimo Esencial α (aMEM), Medio Mínimo Esencial de Glasgow (G-MEM), Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM), o una combinación de los mismos. Otros medios de comunicación que están disponibles comercialmente (p. ej., de Life Technologies, Inc.; Rockville, Md.) o que son conocidos de otro modo en la técnica pueden utilizarse de manera equivalente de acuerdo con la presente invención incluyendo, pero no limitado a, 293 SFM, medio CD-CHO, VP SFM, medio BGJb, medio BMOC-3 de Brinster, medio de congelación de cultivo celular, medios CMRL, medio EHAA, medio eRDF, medio de Fischer, medio B-5 de Gamburg, medio Glutamax™, medio de células de insecto de Grace, medios HEPES, MEM modificado por Richter, medio de células de insectos IPL-41, medio L-15 de Leibovitz, medio 5A de McCoy, medio MCDB 131, medios 199, Medio de Eagle Modificado (MEM), Medio NCTC-109, media de Drosophila de Schneider, medio de insectos TC-100, medios MB 752/1 de Waymouth, Medios E de William, medio de hibridoma II exento de proteínas (PFHM II), medios AIM V, SFM de queratinocitos, SFM de queratinocitos definido, STEMPRO® SFM, STEMPRO® medio de metilcelulosa completa, HepatoZYME-SFM, medio Neurobasal™, medio Neurobasal A, medio Hibernate™ A, medio Hibernate E, SFM endotelial, SFM endotelial humano, SFM de hibridoma, PFHM II, medio Sf 900, Sf 900 II SFM, medio EXPRESS FIVE®, CHO-S-SFM, medio completo AMINOMAX-II, medio completo AMINOMAX-C 100, medio basal AMINOMAX-C 100, media de cariotipado PB-MAX™, medio cariotipado de la médula ósea KARYOMAX, KNOCKOUT D-MEM y medio independiente de CO₂.

En una realización, el coral se siembra con una célula precursora en cultivo en presencia de un quelante de calcio durante un periodo de tiempo suficiente para sembrar la célula precursora en el coral. En una realización, las células se cultivan durante hasta 72 horas. En otra realización, las células se cultivan durante hasta 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 4 días, 5 días, 1 semana, 1,5 semanas, 2 semanas, 3 semanas o un mes. En una realización, el enriquecimiento del precursor se produce dentro de 1 día de la siembra (Fig.

2). En una realización, el 50% de las células se siembran en las 3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 4 días, 5 días, o una semana.

Cuando andamios de este tipo se implantan en un sitio de lesión de hueso y/o cartílago, se produce la formación de hueso y/o cartílago. En una realización, estos andamios conducen a una formación más rápida y de mayor calidad de hueso y/o cartílago, dan lugar a una amplia remodelación, muestran evidencia de integración y conducen a un nuevo hueso y/o cartílago con una organización y resistencia mejoradas.

La formación de hueso y/o cartílago in vivo y/o in vitro se puede evaluar utilizando uno o más de los siguientes marcadores. Ya que el sello distintivo funcional de los osteoblastos es su capacidad para mineralizar el ECM, la incorporación de calcio en el tejido recién formado (tinción de rojo de alizarina) y la deposición de fosfato (tinción de von Kossa) como una medida de la formación de nódulos de hueso puede ser seguido. Posible acumulación de grasa, lo que indicaría la diferenciación de las MSCs en adipocitos en el tejido recién formado, también se puede monitorizar (tinción de aceite rojo O). La diferenciación de las MSCs en osteoblastos puede ser evaluada en términos de actividad de la fosfatasa alcalina, un indicador de la diferenciación de osteoblastos temprana, y la concentración de osteocalcina, que es secretada solamente por los osteoblastos maduros. La formación de tejido puede ser evaluada en términos de concentraciones de colágeno de tipo I, que es específico para el hueso, y los niveles de ADN se pueden utilizar como una medida de la proliferación celular.

Además, los métodos de la presente invención podrían ser útiles en la prevención y/o tratamiento de una diversidad de trastornos o lesiones relacionados con el hueso y/o cartílago, como son conocidos en la técnica. En una realización, que no forma parte de la invención, el mamífero es un ser humano en necesidad de una formación de hueso y/o cartílago incrementada. En un aspecto, que no forma parte de la invención, el ser humano en necesidad tiene un déficit de hueso y/o cartílago, lo que significa que tendrá menos hueso y/o cartílago que el deseable o que el hueso y/o cartílago será menos denso o fuerte de lo deseado. Un déficit de hueso y/o cartílago puede ser localizado tal como el provocado por una fractura de hueso, o sistémico tal como el provocado por osteoporosis.

Déficits de hueso pueden resultar de un trastorno de la remodelación del hueso mediante el cual se desplaza el equilibrio entre la formación de hueso y la resorción del hueso, dando lugar a un déficit de hueso.

El sujeto que recibe la composición hecha por el método de la presente invención puede tener osteoporosis. Alternativamente, el sujeto puede tener la enfermedad de Paget, displasias fibrosas u osteodistrofias.

5 Alternativamente, el sujeto puede tener fragilidad del hueso y/o cartílago. Alternativamente, el sujeto puede tener otros trastornos de remodelación de los huesos, incluidos osteomalacia, raquitismo, artritis reumatoide, acondroplasia, osteocondritis, hiperparatiroidismo, osteogénesis imperfecta, hipofosfatasa congénita, lesiones fibromatosas, mieloma múltiple, recambio óseo anormal, enfermedad osteolítica de los huesos, enfermedad periodontal o una combinación de los mismos. Los trastornos de la remodelación de los huesos incluyen enfermedades metabólicas óseas que se caracterizan por alteraciones en la matriz orgánica, la mineralización del hueso, la remodelación de los huesos, endocrino, nutricional y otros factores que regulan la homeostasis ósea y mineral, o una combinación de los mismos. Trastornos de este tipo pueden ser hereditarios o adquiridos, y en un ejemplo, son sistémicos y afectan a todo el sistema esquelético.

15 Por lo tanto, el ser humano puede tener un trastorno de la remodelación de los huesos. La remodelación de los huesos, tal como se usa aquí, se refiere al proceso mediante el cual se está retirando el hueso viejo y se está formando hueso nuevo por una rotación continua de la matriz ósea y mineral que implica la resorción del hueso por osteoclastos y la formación de hueso por osteoblastos.

20 La osteoporosis es un trastorno común de la remodelación de los huesos que se caracteriza por una disminución en la densidad ósea del hueso mineralizado normalmente, dando como resultado el adelgazamiento y un aumento de la porosidad de las cortezas de hueso y trabecular. La fragilidad del esqueleto causada por osteoporosis predispone a los enfermos de dolor de huesos y a una mayor incidencia de fracturas. La pérdida progresiva de hueso en este estado puede resultar en una pérdida de hasta el 50% de la masa esquelética inicial.

25 La osteoporosis primaria incluye la osteoporosis idiopática, que se presenta en niños o adultos jóvenes con la función normal de las gónadas, la osteoporosis de tipo I, también descrita como osteoporosis post-menopáusica, y la osteoporosis de tipo II, osteoporosis senil, se produce principalmente en las personas mayores de 70 años de edad. Las causas de la osteoporosis secundaria pueden ser endocrinas (p. ej., el exceso de glucocorticoides, hiperparatiroidismo, hipogonadismo), inducidas por fármacos (p. ej., corticosteroides, heparina, tabaco) y misceláneas (p. ej., insuficiencia renal crónica, enfermedad hepática y osteoporosis por síndrome de mala absorción).

30 Aquellos susceptibles a desarrollar un déficit de hueso y/o cartílago pueden ser beneficiarios de los métodos de la presente invención. Sujetos susceptibles a la osteoporosis incluyen mujeres post-menopáusicas, varones de edad avanzada (p. ej., las personas mayores de 65 años), hombres en la terapia de privación hormonal para el tratamiento del cáncer de próstata u otra razón, y los que están siendo tratados con fármacos que se sabe causan osteoporosis como un efecto secundario (p. ej., osteoporosis inducida por esteroides). Determinados factores son bien conocidos en la técnica y pueden utilizarse para identificar a aquellos en riesgo de desarrollar un déficit de hueso y/o cartílago debido a trastornos en la remodelación de los huesos y/o cartílago tales como la osteoporosis. Factores importantes incluyen baja masa ósea y/o de cartílago, los antecedentes familiares, estilo de vida, deficiencia en estrógenos o andrógenos y el balance de calcio negativo. Las mujeres post-menopáusicas están particularmente en riesgo de desarrollar osteoporosis.

40 Los métodos de la invención también se pueden utilizar para potenciar la formación de hueso y/o cartílago en condiciones en las que un déficit de hueso y/o cartílago es provocado por factores distintos de los trastornos de la remodelación de los huesos. Tales deficiencias óseas incluyen fracturas, traumatismos de los huesos, condiciones asociadas con la cirugía post-traumática de los huesos, cirugía articular post-protésica, cirugía ósea post-plástica, quimioterapia de los huesos, cirugía post-dental y radioterapia ósea. Fracturas incluyen todos los tipos de fracturas microscópicas y macroscópicas. Algunos ejemplos de fracturas incluyen fractura por avulsión, fractura conminuta, fractura transversal, fractura oblicua, fractura espiral, fractura segmentaria, fractura desplazada, fractura impactada, fractura en tallo verde, fractura de torus, fractura por fatiga, fractura intraarticular (fractura epifisaria), fractura cerrada (fractura simple), fractura abierta (fractura compuesta) y fractura oculta. En un ejemplo, las fracturas son no-unión.

50 Este método puede ser utilizado para: aumentar la reparación de fracturas de huesos largos; generar hueso en defectos segmentales; proporcionar un injerto óseo para sustitución de fracturas; facilitar la reconstrucción del tumor o la fusión de la columna vertebral; proporcionar un tratamiento local (mediante inyección) para el hueso osteoporótico o débil tal como en la osteoporosis de cadera, vértebras, o la muñeca, o una combinación de los mismos. En otra realización, que no forma parte de la invención, está un método para acelerar la reparación de huesos largos fracturados; tratar de la unión retardada o no uniones de fracturas de huesos largos o pseudoartrosis de fusiones de la columna vertebral; inducir la formación de hueso nuevo en la necrosis avascular de la cadera o de rodilla, o una combinación de los mismos.

55 Los dispositivos de prótesis o implantes y otros productos o estructuras conformados de la presente invención son para fines médicos o relacionados. La expresión "fines médicos o relacionados" se utiliza en toda esta memoria descriptiva para incluir los campos de la medicina humana y no humana, y odontología en particular. Una

composición, hecha por el método de la presente invención, puede utilizarse para la restauración o sustitución tanto de hueso roto como enfermo para implantes ortopédicos, craneales, maxilofaciales, dentales y oculares y de suelo de la órbita. Alternativamente, se puede utilizar una composición de la presente invención para reemplazar trabéculas del hueso perdido, que en una realización, pueden mejorar la resistencia mecánica de la fijación para fracturas de cadera.

También se describe en esta memoria, y no es una realización de la presente invención, un método de ingeniería de órganos o tejidos en un sujeto, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una composición que comprende coral sembrado con una célula precursora en cultivo en presencia de un quelante. También se describe en esta memoria, y no es una realización de la presente invención, un método de reparación o regeneración de órganos o tejidos en un sujeto, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una composición que comprende coral sembrado con una célula precursora en cultivo en presencia de un quelante.

Los métodos son útiles en la ingeniería, reparación o regeneración de un tejido conector. La expresión "tejido conector" se refiere, en un caso, a un tejido unido físicamente a dos tejidos diferentes, proporcionando una conexión física entre ellos. En un ejemplo, el tejido conector cumple una conexión no específica tal como, por ejemplo, la presencia de la fascia. En otro ejemplo, el tejido conector confiere propiedades funcionales tales como, por ejemplo, los tendones, ligamentos, cartílago articular, y otros, en donde el correcto funcionamiento de uno o de ambos tejidos conectado de esta manera depende de la integridad, funcionalidad o combinación de los mismos del tejido conector.

Por ejemplo, el tendón de fijación al hueso implica la inserción de fibras de colágeno (fibras de Sharpey) en el hueso. Las fibras tienen una arquitectura distinta, en comparación con la del colágeno en el tendón, y en el hueso. La estructura mineral difiere también, debido a que los tendones están exentos de hidroxiapatito, sin embargo, en las regiones, que están en una proximidad más cercana al hueso, las fibras de colágeno están calcificadas, por una incorporación incrementada de cristal de hidroxiapatito, y en regiones de aposición a hueso se vuelve esencialmente indistinguibles, en términos de su composición.

El uso de los andamios para la reparación y regeneración de tejido es en los casos en los que el tejido nativo está dañado, por ejemplo, por trauma. El coral producido por el método de esta invención es útil en la reparación, regeneración o ingeniería del tejido conector, y para facilitar el establecimiento de conexiones físicas a los tejidos que conecta el tejido conector. Por ejemplo, la reparación del tendón, así como su reinserción al hueso pueden facilitarse mediante el uso de los andamios gradiente de esta invención, y representa una realización de la misma. El andamio gradiente permite la incorporación de células individuales, que se desea que estén presentes en el tejido de desarrollo/reparación/regeneración.

El coral producido mediante el método de la presente invención puede utilizarse para adsorber o unir, y suministrar, otras sustancias terapéuticamente activas que ayudan en el proceso de reparación o regeneración del hueso y/o cartílago, o que tienen otra actividad terapéutica deseada. Sustancias de este tipo incluyen, a modo de ejemplo, antibióticos sintéticos o semisintéticos conocidos que pueden introducirse en las cavidades de los poros del producto o estructura conformado, o un factor de crecimiento tal como el factor de crecimiento transformante o una de las proteínas morfogénicas del hueso y/o cartílago que pueden utilizarse para ayudar a fomentar el crecimiento de hueso y/o cartílago.

En cualquiera de las realizaciones en esta memoria, coral para uso en la presente invención puede comprender además, o puede ser suministrado con otros compuestos tales como, por ejemplo, antioxidantes, factores de crecimiento, citocinas, antibióticos, antiinflamatorios, inmunosupresores, conservante, medicamentos contra el dolor, otros productos terapéuticos y agentes excipientes. En una realización, ejemplos de factores de crecimiento que se pueden administrar además del inhibidor de la HMG-CoA reductasa incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento de células endoteliales humanas (ECGF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), proteína morfogenética derivada de cartílago (CDMP), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o cualquiera de sus combinaciones. Ejemplos de antibióticos incluyen antimicrobianos y antibacterianos.

En otra realización, la presente invención proporciona un kit, que en una realización, es un kit para la formación de hueso y/o cartílago, y en una realización, comprende coral, células precursoras y un quelante de calcio. En una realización, el kit comprende coral, células madre mesenquimales y un quelante de calcio. En otra realización, el kit comprende coral, células precursoras o madre de hueso y/o cartílago, y un quelante de calcio.

Cualquiera de las composiciones descritas en esta memoria puede estar comprendida en un kit. Los kits, por lo tanto, comprenderán, en un medio de recipiente adecuado para el coral, células precursoras, quelantes de calcio o una combinación de los mismos de la presente invención, y cualesquiera agentes adicionales que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención. En una realización, cualquier recipiente del kit comprenderá, además, un conservante, que, en una realización, aumentará la "vida útil" del componente o componentes del kit a los que se añade.

Los kits pueden comprender composiciones adecuadamente divididas en partes alícuotas de la presente invención. Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada. Los medios de recipiente de los kits incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringa u otros medios de recipiente, en los que se puede colocar un componente y dividir adecuadamente en partes alícuotas. En los casos
 5 en los que haya más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro recipiente adicional en el que los componentes adicionales se pueden colocar por separado. Sin embargo, pueden estar comprendidas en un vial varias combinaciones de componentes.

Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener recipientes de reactivo en un estrecho confinamiento para la venta comercial. Recipientes de este tipo pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se conservan los viales deseados.
 10

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más disoluciones líquidas, la disolución líquida es una disolución acuosa, que en una realización es una disolución acuosa estéril. Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvo o polvos secos. Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan en forma de un polvo seco, el polvo puede ser reconstituido mediante la adición de un disolvente adecuado. En una
 15 realización, el disolvente también puede proporcionarse en otros medios de recipiente.

Revestimiento de Coral

En una realización, el coral utilizado en el método de la presente invención ha sido revestido sustancialmente con un material estructural, por ejemplo un material metálico tal como plata, oro o titanio. En una realización, se proporciona una región o una pluralidad de sub-regiones del coral ausente de material de enchapado, para permitir que el hueso
 20 y/o cartílago adyacente al mismo haga contacto con y digiera el coral. Convenientemente, en una realización, el coral se puede revestir con el material metálico por medio de galvanoplastia. Cuando el coral se reviste con el material de enchapado, el material metálico penetra en los poros dentro de la coral y queda bien anclado.

La galvanoplastia es bien conocida en la técnica y se refiere al revestimiento de un objeto con una capa delgada de un metal a través de deposición electrolítica. El proceso se utiliza ampliamente, con el propósito de hacer un acabado lustroso no corrosivo en algún artículo. En galvanoplastia, el objetivo general es emplear el artículo a ser
 25 enchapado como cátodo en un baño electrolítico compuesto de una disolución de sal del metal que se está enchapando. El otro terminal, el ánodo, puede estar hecho del mismo metal, o puede ser algún conductor químicamente no afectado. Una corriente de baja tensión se hace pasar a través de la disolución, que electroliza y enchapa los artículos catódicos con el metal al espesor deseado.

La adhesión celular es un proceso complejo que es importante para mantener la integridad del tejido y generar barreras físicas y de permeabilidad dentro del cuerpo. La adhesión celular es mediada por moléculas específicas de adhesión de la superficie celular (CAMs). Entre las muchas familias diferentes de CAMs, incluyendo las superfamilias de inmunoglobulina, integrina y selectina, cadherinas son una familia de rápida expansión de CAMs dependientes de calcio. Las cadherinas clásicas son glicoproteínas integrales de membrana que fomentan
 30 generalmente la adhesión celular a través de interacciones homofílicas (una cadherina en la superficie de una célula se une a una cadherina idéntica en la superficie de otra célula), aunque las cadherinas también parecen ser capaces de formar complejos heterotípicos entre sí en determinadas circunstancias y con menor afinidad. Las cadherinas han demostrado regular la adhesión de células epiteliales, endoteliales, neurales y cancerígenas, con diferentes cadherinas expresadas en diferentes tipos de células. La cadherina N (neural) es expresada predominantemente por
 35 células neurales, células endoteliales y una diversidad de tipos celulares cancerígenas. La cadherina E (epitelial) es expresada predominantemente por células epiteliales. Otros cadherinas son cadherina P (placentaria), que se encuentra en la piel humana y la cadherina R (retinal).

También se describe en esta memoria, y no es una realización de la presente invención, el uso de coral regulador positivo de cadherina para tratar el cáncer o inhibir la progresión del cáncer. Sorprendentemente, el crecimiento de
 45 células madre mesenquimales de *Porites Lutea* supra-regulaba el ARNm de cadherina (Ejemplo 3, Fig. 4).

Sin estar ligado por la teoría, la solicitante propone que el contacto de MSCs con la biomatriz de CaCO_3 conduce a una alta concentración de calcio y a la absorción de calcio, que a su vez puede afectar a la estabilización del dominio extracelular de moléculas de cadherina y/o estimular su expresión a través de la señalización de calcio. β -catenina se puede encontrar en tres localizaciones celulares: unida a las moléculas de cadherina, en el citoplasma,
 50 interactuando con la APC, GSK y el complejo de axina, o en el núcleo, actuando como un coactivador para LEF/TCF. Normalmente, β -catenina es fosforilada por GSK, ubiquitinizada, y destinada a la degradación. Cuando el ligando Wnt se une a su receptor; activa Dsh, que a su vez inactiva GSK. β -catenina se acumula en el citoplasma, penetra en el núcleo e interactúa con los factores de transcripción para activar la expresión de genes diana. Por lo tanto, la estabilización y/o la expresión de cadherinas pueden modular la señalización de β -catenina (basado en
 55 Rowlands, 2005).

La función y/o expresión de cadherina han sido implicadas en el progreso del cáncer y la metástasis. La regulación negativa de determinadas cadherinas disminuye la fuerza de adhesión celular dentro de un tejido, resultando en un

aumento de la motilidad celular, permitiendo que las células cancerosas crucen la membrana basal e invadan los tejidos circundantes.

5 En la neoplasia temprana, las cadherinas juegan un papel en la transformación de las células en un fenotipo proliferativo anormal. Algunas cadherinas están implicadas en la inducción de la detención del ciclo celular. Sin embargo, algunas cadherinas también fomentan la supervivencia celular en las células cancerosas normales. En algunos casos, un tipo de cadherina es sub-regulada acompañado por la regulación positiva de otras cadherinas.

10 Por lo tanto, también se describe en esta memoria y no es una realización de la presente invención, un método para tratar el cáncer o inhibir la progresión del cáncer, que comprende poner en contacto una célula neoplásica, pre-neoplásica o hiperplásica en un sujeto con una composición que comprende coral, en el que dicho coral regula positivamente los niveles de cadherina y en el que dicho coral es de la especie Porites o Acropora.

En otra realización, que no forma parte de la presente invención proporciona, se trata de un método para prevenir una recaída en el cáncer, reducir la incidencia de cáncer, prolongar la remisión de cáncer, o tratar un precursor precanceroso, que comprende poner en contacto una célula neoplásica, pre-neoplásica o hiperplásica en un sujeto con una composición que comprende coral, en el que dicho coral regula positivamente los niveles de cadherina.

15 Una célula neoplásica es una célula tumoral, y puede estar presente en tumores, o tejido o fluidos corporales que contienen células tumorales. Neoplásica se refiere a un crecimiento anormal y desorganizado en un tejido u órgano, por lo general formando una masa distinta. En un ejemplo, un crecimiento de este tipo se denomina un neoplasma, también conocido como un tumor. En otro ejemplo, neoplásica significa canceroso. En un ejemplo, las células neoplásicas pueden ser benignas o malignas. En un ejemplo, una célula pre-neoplásica es una célula que es morfológicamente identificable por tener un alto potencial maligno, pero no se considera neoplásica.

20 En un ejemplo, hiperplásico se refiere a una célula dentro de un órgano o tejido que muestra un aumento de tamaño debido a un aumento del número de células. En un ejemplo, la hiperplasia puede ser debida a una demanda incrementada, respuesta inflamatoria crónica, disfunciones hormonales, neoplasia, o una combinación de los mismos.

25 En un ejemplo, "tratar" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en que el objetivo es prevenir o reducir la afección o trastorno patológico específico tal como se describe aquí anteriormente. Por lo tanto, en un ejemplo, el tratamiento puede incluir directamente afectar o curar, suprimir, inhibir, prevenir, reducir la gravedad, retrasar la aparición, reducir los síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, en un ejemplo, "tratar" se refiere, entre otras cosas, a

30 retrasar o inhibir la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de o disminuir la resistencia a agentes terapéuticos alternativos, o una combinación de los mismos. En un ejemplo, "prevenir" se refiere, entre otras cosas, a retrasar la aparición de los síntomas, reducir la incidencia de la enfermedad, prolongar la remisión de una enfermedad, o tratar un precursor de una enfermedad, o una combinación de los mismos. En otro ejemplo, prevenir se refiere a prevenir la recaída de una

35 enfermedad, disminuir el número o frecuencia de los episodios de recaída, aumentar la latencia entre episodios sintomáticos, o una combinación de los mismos. En un ejemplo, "suprimir" o "inhibir" se refiere, entre otras cosas, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir el número de síntomas, reducir la incidencia de síntomas relacionados con la enfermedad, lo que reduce la latencia de síntomas, mejorar los síntomas, reducir síntomas secundarios, reducir infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una combinación de los mismos.

40 En un ejemplo, los síntomas son primarios, mientras que en otro ejemplo, los síntomas son secundarios. En un ejemplo, "primario" se refiere a un síntoma que es un resultado directo de una enfermedad o trastorno, mientras que en un ejemplo, "secundario" se refiere a un síntoma que se deriva de o es consecuencia de una causa primaria. En un ejemplo, las composiciones para uso en la presente invención tratan síntomas primarios o secundarios o complicaciones secundarias.

45 En otro ejemplo, "síntomas" puede ser cualquier manifestación de una enfermedad o estado patológico, que comprende inflamación, hinchazón, fiebre, dolor, sangrado, picazón, secreción nasal, tos, dolor de cabeza, migraña, mareo, visión borrosa, etc., o una combinación de los mismos. En un ejemplo, los síntomas incluyen picazón en los ojos, párpados hinchados, enrojecimiento, irritación, lagrimeo, secreción mucosa, dolor, o una combinación de los

50 mismos.

55 En un ejemplo, los métodos tratar el cáncer, que en un ejemplo, se manifiesta como un tumor. En un ejemplo, el tumor es un tumor de laringe, colon, rectal, de próstata, de mama, torácico, de vejiga o de piel. En otro ejemplo, el tumor es un tumor torácico tal como, pero no limitado a los tumores broncogénicos tales como carcinomas de pulmón primarios y/o metastásicos [tanto cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) como cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)]; derrames pleurales malignos; o cánceres del parénquima pulmonar, de las vías respiratorias, la pared torácica y los espacios pleurales. En otro ejemplo, el tumor es un tumor sólido de pulmón; tumor de laringe, tumor cerebral, u otro tumor de la cabeza y el cuello; tumor de colon, rectal o de próstata; tumor de mama o sólido torácico; tumor de ovario o uterino; tumor del esófago, estómago, páncreas o hígado; tumor de vejiga

o vesícula biliar; tumor de la piel tal como melanoma; y similares, o una combinación de los mismos. Además, el tumor tratado en la invención puede ser primario o un tumor secundario resultante de la metástasis de células cancerosas en otras partes del cuerpo.

5 Para los fines de estas realizaciones, que no forman parte de la presente invención, las composiciones se ponen en contacto con células, que en un ejemplo son células neoplásicas, pre-neoplásicas o hiperplásicas. En otro ejemplo, las células pueden ser citológicamente displásicas y/o premalignas. "Células hiperplásicas" incluyen, en un ejemplo, células normales en una disposición normal en un tejido, que exhiben una multiplicación o aumento anormal en el número de células, por ejemplo, como es común en la hiperplasia benigna de próstata. Crecimiento o proliferación celular citológicamente displásico y/o premaligno incluye aumentos en los números celulares de células
10 cariotípicamente anormales pero no malignas dentro de un tejido. Ejemplos incluyen algunas hiperplasias prostáticas benignas/displasia e hiperplasias/displasias cervicales.

"Células neoplásicas", en un ejemplo, son células que presentan tejido anormalmente organizado, incluye neoplasmas malignos y no malignos. Los neoplasmas malignos incluyen tumores cancerosos primarios, recurrentes y/o metastásicos que proceden de cualquier tejido, por ejemplo carcinomas, sarcomas, linfomas, mesoteliomas, melanomas, gliomas, nephroblastomas, glioblastomas, oligodendrogliomas, astrocitomas, ependimomas, tumores neuroectodérmicos primitivos, meningiomas atípicos, meningiomas malignos, o neuroblastomas, originarios de la hipófisis, hipotálamo, pulmón, riñón, adrenal, uréter, vejiga, uretra, pecho, próstata, testículos, cráneo, cerebro, columna vertebral, tórax, peritoneo, ovario, útero, estómago, hígado, intestino, colon, recto, hueso, sistema linfático, piel, o en cualquier otro órgano o tejido del sujeto.

20 Dosificaciones y Vías de Administración

También se describe en esta memoria, y no forma parte de la presente invención, el uso de composiciones como se describen en esta memoria para tratar el cáncer, inhibir la progresión del cáncer, prevenir la recaída en el cáncer, reducir la incidencia de cáncer, prolongar la remisión de cáncer o tratar un precursor precanceroso.

25 En un ejemplo, las composiciones son farmacéuticamente aceptables. En un ejemplo, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier formulación que sea segura, y proporcione la entrega apropiada para la vía de administración deseada de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para su uso antes mencionado. Esta expresión se refiere también al uso de formulaciones tamponadas, en donde el pH se mantiene en un valor particular deseado, que oscila desde pH 4,0 a pH 9,0, de acuerdo con la estabilidad de los compuestos y de la vía de administración.

30 En un ejemplo, coral de esta invención puede administrarse solo o dentro de una composición. En otro ejemplo, se pueden utilizar composiciones que comprenden coral en mezcla con excipientes convencionales, es decir, sustancias de soporte orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables, adecuadas para aplicación parenteral, enteral (p. ej., oral) o tópica que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos. En un ejemplo, soportes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, disoluciones salinas, alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, silícico ácido, parafina viscosa, parafina blanca, glicerol, alginatos, ácido hialurónico, colágeno, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. En otra realización, las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, p.
35 ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos. En otro ejemplo, también se pueden combinar cuando se desee con otros agentes activos, p. ej., vitaminas.

45 En un ejemplo, las composiciones terapéuticas comprenden coral y compuestos adicionales eficaces en la prevención o el tratamiento de cáncer o trastornos relacionados con el cáncer. En un ejemplo, los compuestos adicionales comprenden composiciones anti-inflamatorias que, en un ejemplo, son medicamentos anti-inflamatorios no esteroides, antihistamínicos, antibióticos, corticosteroides, cromolina sódica (cromoglicato de sodio), estabilizadores de mastocitos, o una combinación de los mismos.

50 En un ejemplo, compuestos adicionales de este tipo pueden ser fármacos contra el cáncer que, en un ejemplo, pueden inhibir la formación de nucleótidos y pueden incluir, entre otros, fármacos tales como metotrexato (Abitrexate®), fluorouracilo (Adrucil®), hidroxurea (Hydrea®), mercaptopurina (Purinethol®), o una combinación de los mismos. En otro ejemplo, dichos fármacos anti-cáncer pueden dañar el ADN y pueden incluir, entre otros, fármacos tales como cisplatino (Platinol®) y 7) antibióticos - daunorubicina (Cerubidine®), doxorubicina (Adriamycin®), etopósido (VePesid®), o una combinación de los mismos. En otro ejemplo, dichos fármacos contra el
55 cáncer pueden ser agentes alquilantes tales como mostaza nitrogenada o ciclosporamidea. En otro ejemplo, dichos fármacos contra el cáncer pueden afectar a la síntesis o degradación de los husos mitóticos y pueden incluir, entre otros, fármacos tales como vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), paclitaxel (Taxol®), o una combinación de los mismos.

En un ejemplo, las composiciones terapéuticas se administran con otros tratamientos que alivian los síntomas.

En un ejemplo, la vía de administración puede ser parenteral, enteral, o una combinación de las mismas. En otro ejemplo, la vía puede ser intratumoral, paracancer, tópica, intraperitoneal, intravenosa, intra-arterial, transdérmica, intradérmica, subcutánea, vaginal, rectal, transmucosa, intramuscular, intravascular, intraventricular, intracraneal, por inhalación, aspiración nasal (spray), sublingual, oral, intra-ocular, conjuntival, por aerosol o supositorio o una combinación de las mismas.

5

En un ejemplo, el régimen de dosificación será determinado por los médicos expertos, en base a factores tales como la naturaleza exacta de la afección que esté siendo tratada, la gravedad de la afección, la edad y la condición física general del paciente, etc.

10 En un ejemplo, administración "intratumoral" significa la implantación de un depósito de un agente o agentes terapéuticos dentro de un tumor. Administraciones intratumorales son ventajosas para el tratamiento de tumores debido a que las capas de células exteriores de los tumores a menudo están compuestas de un alto porcentaje de células necróticas y/o de tejido conjuntivo y de soporte que ralentizan y/o impiden el suministro vascular extra-tumoral o parenteral de agentes terapéuticos a las células cancerosas de crecimiento activo en el centro de los tumores sólidos.

15

Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuadas disoluciones inyectables, estériles, en un ejemplo, disoluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluyendo supositorios y enemas. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes. Un supositorio de este tipo puede comprender cualquier agente descrito aquí.

20 Para la aplicación por inhalación, son adecuadas disoluciones o suspensiones de los compuestos mezclados y en forma de aerosol o nebulizados en presencia del vehículo apropiado. Un aerosol de este tipo puede comprender cualquier agente descrito aquí.

25 Para la aplicación tópica, particularmente en la zona alrededor del ojo, es aceptable una mezcla de los compuestos con las cremas, lociones o parches de liberación retardada convencionales. Una crema o loción de este tipo puede comprender cualquier agente descrito aquí.

Para la aplicación enteral, son particularmente adecuados comprimidos, grageas, líquidos, gotas o cápsulas. Se puede utilizar un jarabe, elixir o similares cuando se emplea un vehículo edulcorado.

Para la aplicación intra-ocular, se puede utilizar, en una realización, gotas para los ojos, pomadas, lociones, cremas o parches oculares revestidos.

30 Composiciones de liberación sostenida o dirigida se pueden formular, p. ej., liposomas o aquellas en las que el compuesto activo está protegido con revestimientos diferencialmente degradables, p. ej., mediante microencapsulación, revestimientos múltiples, etc. También es posible liofilizar los nuevos compuestos y utilizar los liofilizados obtenidos, por ejemplo, para la preparación de productos para inyección. En un ejemplo, la composición puede ser una composición de liberación prolongada. En un ejemplo, la expresión "liberación prolongada", tal como se utiliza aquí, incluye, sin limitación, diversas formas de liberación tales como liberación controlada, liberación en el tiempo, liberación sostenida, liberación retardada, de acción prolongada, y la entrega pulsátil, liberación inmediata que se produce con diversas velocidades. La capacidad de obtener una liberación prolongada, liberación controlada, liberación en el tiempo, liberación sostenida, liberación retardada, de acción prolongada, y la entrega pulsátil o liberación inmediata se realiza utilizando procedimientos y técnicas bien conocidos, disponibles para el experto ordinario en la materia.

35

40

Por lo tanto, en un ejemplo, la vía de administración puede ser dirigida a un órgano o sistema que está directamente afectado por el cáncer. Por ejemplo, coral se puede administrar intra-tumoralmente. En otro ejemplo, la vía de administración puede ser dirigida a un órgano o sistema diferente al que se ve afectado por la enfermedad. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse a un sitio distal o a un sitio aguas abajo del tumor para tratar un tumor.

45

En un ejemplo, las dosis de coral en forma molida o en polvo utilizadas para cualquiera de los fines descritos anteriormente se administrarán generalmente a una dosis de 1 a aproximadamente 1000 miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg), administradas de una a cuatro veces al día, o por infusión IV. Cuando las composiciones se dosifican por vía tópica o intraocular, estarán generalmente en un intervalo de concentraciones de 0,1 a aproximadamente 10% p/v, administradas 1, 2, 3 ó 4 veces al día. En otro ejemplo, de 0,5 a 5%, y en otro ejemplo, 1-4%.

50

En una realización, que no forma parte de la invención, las concentraciones de las composiciones dependerán de varios factores, incluyendo la naturaleza de la afección a tratar, el estado del paciente, la vía de administración y la tolerabilidad individual de las composiciones.

Se apreciará que las cantidades preferidas reales de composición activa en un caso específico variarán de acuerdo con las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación y las condiciones particulares y el organismo que esté siendo tratado. Las dosificaciones para un huésped dado pueden determinarse utilizando consideraciones convencionales, p. ej., por comparación habitual de las actividades diferenciales de los compuestos en cuestión y de un agente conocido, p. ej., por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado.

En un ejemplo, las composiciones pueden ser administradas de forma aguda para el tratamiento agudo de afecciones temporales, o pueden administrarse crónicamente, especialmente en el caso de enfermedad progresiva, recurrente o degenerativa. En un ejemplo, pueden administrarse simultáneamente uno o más compuestos, o en otro ejemplo, se pueden administrar de una manera escalonada. En un ejemplo, la forma escalonada puede ser dictada por la etapa o fase de la enfermedad.

En un ejemplo, un artículo sólido que comprende la composición se inserta en el tumor sólido que está siendo tratado por implantación, inyección, o que está siendo colocado de otra manera dentro del tumor del sujeto que está siendo tratado, por ejemplo, durante o después de la eliminación quirúrgica de una porción de tejido visiblemente canceroso.

En otro ejemplo, las composiciones para se administran en forma no sólida. En un ejemplo, las composiciones se producen de acuerdo con un procedimiento que comprende el lavado de arena de coral de origen natural con agua a desalinizar, a continuación, desinfectar y secar la arena de coral desalinizada a temperaturas de aproximadamente 80 ° a aproximadamente 150° C, preferiblemente de 90° a 120° C, y moliendo el coral desinfectado y secado en pequeñas partículas, que en un ejemplo comprenden partículas de 1-10 micras. En otro ejemplo, el coral es molido en partículas de 1-5, 1-20, 1-50, 1-100, 5-10, 10-15, 15-20, 10-50, 10-100, 20-100 ó 50-100 micras. En otro ejemplo, el coral se muele a 150 hasta aproximadamente 500 de malla. La molienda también puede efectuarse ya sea por liofilización de la arena de coral desinfectada y secada a temperaturas de aproximadamente -180° C a -200° C en una atmósfera de nitrógeno, o en un estado en el que la arena de coral ha sido amasada junto con agua de mar o agua de la fuente.

Los polvos de arena de coral finamente divididos, así obtenidos, son extremadamente finamente porosos y tienen una alta solubilidad en agua. Los polvos de arena de coral así obtenidos se pueden disolver en agua (los polvos se disuelven en forma de iones) tal como son y la disolución resultante se pueden proporcionar como agua potable. Alternativamente, los polvos finos de la arena de coral se pueden formular como gránulos, comprimidos, emulsiones, píldoras, concentrados en suspensión, etc., en presencia o ausencia de aglutinantes. Los gránulos se fabrican habitualmente por técnicas de aglomeración o impregnación. Generalmente los gránulos contendrán de 0,5 a 25% en peso de los polvos finos de arena de coral y de 0 a 10% en peso de aditivos, si es necesario y deseado, tal como estabilizadores, modificadores de liberación lenta y aglutinantes. Los comprimidos o píldoras pueden ser fabricados de manera convencional, mezclando con aglutinantes tales como almidón, gelatina, etc., y la formando comprimidos con la mezcla utilizando una máquina de formación de comprimidos.

La composición también pueden contener otros ingredientes, por ejemplo diversos nutrientes tales como vitaminas (vitaminas A, B, C, E, F, etc.), azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, o similares), etc. Además, los polvos de arena de coral por se también se pueden emplear como aditivos para diversos productos alimenticios.

En un ejemplo, la composición se administra a adultos en una dosis diaria de 1,0 a 10 g.

En otro ejemplo, que no forma parte de la presente invención, se proporciona un método de liberación de calcio *in vivo* que comprende poner en contacto células en un sujeto con una especie productora de aragonita o calcita, mediante el cual células reclutadas de dicha aragonita o calcita fomentan la liberación de calcio a partir de dicha aragonita o calcita.

Esto proporciona, en algunos ejemplos, métodos y composiciones para la liberación de calcio localizada potenciada, que a su vez puede reclutar células madre y/o progenitoras al sitio, estimular la regeneración o reparación de tejidos, en múltiples tipos de tejidos.

El calcio es un factor importante para la salud de la piel apropiado. Se sabe que la integridad de calcio de la epidermis superior regula las funciones principales de la piel. El calcio regula la renovación celular [vía "diferenciación" celular estimulada por la enzima proteína quinasa C (PKC)]. El aumento de calcio epidérmico estimula la renovación celular rápida y, por lo tanto, la renovación puede ser supra-regulada con calcio tópico absorbible dando como resultado una piel de aspecto más rollizo.

El calcio regula el proceso de barrera lipídica. El despellejado, la microdermabrasión y el frío clima de invierno eliminan la barrera contra la humedad de la piel. Un alto contenido de calcio en la epidermis superior ayuda a mantener funciones de barrera continuas y eficientes. Los sujetos con piel seca o sequedad de la piel debido al tiempo responden bien al tratamiento tópico de calcio. El calcio puede reducir significativamente la sequedad provocada por la microdermabrasión, haciendo que la piel se vea bien hidratado y más completa en apariencia.

Estudios epidemiológicos han demostrado que un bajo contenido de calcio en la piel resulta en el envejecimiento prematuro de la piel y en una mayor incidencia de cáncer de piel, mientras que, por el contrario, las personas con

alto contenido de calcio de la piel experimentan un menor envejecimiento prematuro y una menor incidencia de cáncer de piel. El calcio también puede servir como un regulador de la producción de la piel de antioxidantes, por ejemplo a través de la promoción de la actividad de la catalasa.

5 Los antioxidantes previenen el daño del ADN que conduce a un envejecimiento prematuro de la piel y a cáncer de piel, en parte por la prevención de daños al colágeno y la elastina y otros componentes de la piel. La aplicación de los compuestos/composiciones de esta invención, por ejemplo mediante el suministro por inyección tópica o dérmica, puede aumentar las concentraciones de calcio localizado, y en algunas realizaciones, por lo tanto inhibe el envejecimiento de la piel a través de su supra-regulación de antioxidantes.

10 Cargas dérmicas inyectables se utilizan ampliamente para el aumento de tejido blando tal como para eliminar las arrugas, tratar la cicatrización dérmica debido a un traumatismo, acné, cirugía y similares, o para aumentar el tejido blando de los labios y pliegues nasolabiales. Tales cargas son bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, el documento WO06102676A1. En algunos ejemplos, las composiciones de coral se formularán como una carga dérmica inyectable. En algunos ejemplos, el coral se ajustará a cualquier realización como se describe en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, formas en polvo. En algunos ejemplos, la composición comprenderá, además, un agente quelante tal como se describe aquí. En algunos ejemplos, el quelante se formulará para ser liberado después de la aplicación a una superficie de la piel en el sujeto, por medios conocidos en la técnica.

15 La composición inyectable puede, además de incluir los corales según se describe en esta memoria, y opcionalmente un quelante según se describe en esta memoria, comprende, además, ácido hialurónico reticulado, p. ej., cuerpos o materiales en partículas que consisten esencialmente en ácido hialurónico que tienen un tamaño de partícula y una configuración que es inyectable mediante un inyector, tal como inyectable a través de una aguja. En algunos ejemplos, las composiciones inyectables pueden comprender partículas de un tamaño y configuración tales que son inyectables a través de una aguja de jeringa que varían en tamaño desde calibre 18 a 33, o en algunos ejemplos, de calibre 24 a 31, o en algunos ejemplos, de calibre 27 a 30.

20 En algunos ejemplos, composiciones de este tipo para aplicación en la piel también pueden comprender zinc, betaglucano y pantenol para fomentar la curación.

25 En algunos ejemplos, cualquiera de las composiciones comprenderá un coral, en cualquier forma o ejemplo tal como se describe en esta memoria. En algunos ejemplos, cualquiera de las composiciones consistirá en un coral, en cualquier forma o ejemplo tal como se describe en esta memoria. En algunos ejemplos, las composiciones consistirán esencialmente en un coral, en cualquier forma o ejemplo tal como se describe en esta memoria. En algunos ejemplos, el término "comprenden" se refiere a la inclusión del agente activo indicado, tal como el coral, o el coral y el quelante, así como la inclusión de otros agentes activos, y soportes, excipientes, emolientes, estabilizadores, etc. farmacéuticamente aceptables, tal como se conocen en la industria farmacéutica. En algunos ejemplos, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición, cuyo único ingrediente activo es el ingrediente activo indicado, sin embargo, pueden estar incluidos otros compuestos los cuales son para estabilizar, conservar, etc. la formulación, pero no están directamente involucrados en el efecto terapéutico del ingrediente activo indicado. En algunos ejemplos, la expresión "que consiste esencialmente en" puede referirse a componentes que facilitan la liberación del ingrediente activo. En algunos ejemplos, la expresión "que consiste en" se refiere a una composición, que contiene el ingrediente activo y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 En algunos ejemplos, las composiciones son para fines cosméticos, y pueden comprender un polvo, una crema, una espuma, un maquillaje, un aceite, un lavado, o cualquier composición cosmética tal como se conoce en la técnica.

En algunos ejemplos, las composiciones comprenderán un coral, y opcionalmente un quelante tal como se describe en esta memoria, y otros agentes activos adecuados para uso en las composiciones, incluyendo en algunos ejemplos, agentes activos cosméticos destinados a mejorar el aspecto estético de la piel y/o los labios.

45 En algunos ejemplos, la composición puede comprender, además, al menos un agente seleccionado entre: - los agentes que actúan sobre la microcirculación, - agentes desescamantes y agentes hidratantes, - agentes despigmentantes o pro-pigmentantes, - agentes antiglicación, - agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o que impiden su descomposición, - agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos o queratinocitos y/o la diferenciación de queratinocitos, - relajantes musculares o agentes dermo-descontracturantes, - agentes tensores, - agentes para combatir la contaminación o los radicales libres, - agentes calmantes.

Agentes que actúan sobre la microcirculación Los agentes activos que actúan sobre la microcirculación (agentes vasoprotectores o vasodilatadores) se pueden elegir de flavonoides, ruscogeninas, esculósidos, la escina extraída del castaño de Indias, nicotinas, hesperidina metil chalcona, aceites esenciales de la lavanda o el romero, o extractos de Ammi visnaga.

55 También se puede hacer mención a (13-hidroxi-etil)rutósido o trimetilrutósido; extractos de árnica; ácido nicotínico y sus derivados tales como ésteres de ácido nicotínico, por ejemplo nicotinato de xantanol o nicotinato de inositol; ácido salicílico y sus ésteres; dihidroergotoxina metanosulfonato, dihidroergocornina metanosulfonato, dihidroergocristina metanosulfonato, cinarizina, vincamina, pentoxifilina, bametano sulfato, benciclorano hidrógeno-

fumarato, 3-piridilcarbinol, flavoglicósidos de Ginkgo, extractos de caléndulas, hesperidina, a-G-hesperidina, y sus mezclas. Mención también se puede hacer de visnadina o esculósido, amentoflavona o dímeros de Ginkgo biloba en forma libre o formando un complejo con fosfolípidos, icarina y derivados o extractos que los comprenden, escina, escina 13-sitosterol formando complejo con fosfolípidos, sericosido, opcionalmente formando complejo con fosfolípidos, o un extracto de Centella asiatica en forma libre o formando complejo con fosfolípidos tal como se describe en Application Desquamating y agentes hidratantes. La expresión "agente descamante" se entiende que quiere dar a entender cualquier compuesto capaz de actuar: - ya sea directamente en la descamación fomentando la exfoliación tales como J3 hidroxiácidos, en particular ácido salicílico y sus derivados (incluyendo ácido S-(n-octanoil)salicílico); a- hidroxiácidos tales como ácido glicólico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico o ácido mandélico; urea; ácido gentísico; oligofucosas; ácido cinámico; extracto de Saphora japonica; resveratrol y algunos derivados de ácido jasmónico; - o sobre las enzimas implicadas en la descamación o descomposición de los corneodesmosomas tales como glicosidasas, enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) o, de hecho, incluso otras proteasas (tripsina, quimotripsina). Se pueden mencionar agentes que quelan sales inorgánicas: EDTA; ácido N-acil-N,N',N'-etilileno-diaminotriacético; compuestos aminosulfónico y, en particular, ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico (HEPES); derivados del ácido 2-oxotiazolidina-4-carboxílico (procisteína); derivados de a-aminoácidos de tipo glicina (tal como se describe en el documento EP-0 852 949, y también el metilglicinadiacetato sódico comercializado por BASF bajo el nombre comercial Trilon M); miel; o derivados de azúcar tales como O-octanoil-6-D-maltosa y N-acetilglucosamina.

La expresión "agente humectante" se entiende que quiere dar a entender: - un compuesto que actúa sobre la función de barrera, con el propósito de mantener el estrato córneo hidratado, o un compuesto oclusivo. Se puede hacer mención a ceramidas, compuestos a base de esfingoides, lecitinas, glicoesfingolípidos, fosfolípidos, colesterol y sus derivados, fitosteroles (stigmasterol, 3-sitosterol o campesterol), ácidos grasos esenciales, 1,2-diacilglicerol, 4-cromanona, triterpenos pentacíclicos tal como ácido ursólico, vaselina y lanolina; - o un compuesto que aumenta directamente el contenido de agua del estrato córneo tal como trehalosa y sus derivados, ácido hialurónico y sus derivados, glicerol, pentanodiol, pidolato de sodio, serina, xilitol, lactato de sodio, poliácido de glicerilo, ectoína y sus derivados, quitosano, oligo- y poli-sacáridos, carbonatos cíclicos, ácido N-lauroilpirrolidonacarboxílico y N-a-benzoil-L-arginina; - o un compuesto que activa las glándulas sebáceas tales como derivados de esteroides (incluyendo DHEA o sus derivados 7-oxidados y/o 17-alkilados, y sapogeninas), dihidrojasmonato de metilo, y vitamina D y sus derivados.

Estos compuestos pueden, en algunos ejemplos, representar de 0,001% a 30% o, en otros ejemplos, de 0,01 a 20% del peso total de la composición.

Agentes pigmentantes o pro-pigmentantes – Los agentes despigmentantes o antipigmentantes capaces de ser incorporados en la composición comprenden, por ejemplo, los siguientes compuestos: ácido kójico; ácido elágico; arbutina y sus derivados tales como los descritos en las solicitudes EP-895 779 y EP-524 109; hidroquinona; derivados de aminofenol tales como los descritos en las solicitudes WO 99/10318 y WO 99/32077, en particular N-colesteriloxycarbonil-para-aminofenol y N-etiloxycarbonil-para-aminofenol; derivados de iminofenol, en particular los descritos en la solicitud WO 99/22707; ácido L-2-oxotiazolidina-4-carboxílico o procisteína, y sus sales y ésteres; D-panteteinasulfonato de calcio; ácido ascórbico y sus derivados, en particular ascorbil glucósido; y extractos de plantas, en particular, de regaliz, de la zarzamora, escutelaria de Virginia y de Bacopa monnieri, sin que esta enumeración sea limitativa.

Se puede hacer mención, como agente propigmentante, del extracto de pimpinela mayor (*Sanguisorba officinalis*) vendido por Maruzen y extractos de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) Agentes antiglicación La expresión "agente antiglicación" se entiende que significa un compuesto que previene y/o reduce la glicación de las proteínas de la piel, en particular de las proteínas dérmicas tales como el colágeno.

Ejemplos de agentes antiglicación son extractos de plantas de la familia Ericaceae tales como un extracto de arándano (*Vaccinium angustifolium*); ergotioneína y sus derivados; e hidroxiestilbenos y sus derivados tales como resveratrol y 3,3',5,5'-tetrahidroxiestilbeno. Estos agentes antiglicación se describen en las solicitudes FR 2 802 425, FR 2 810 548, FR 2 796 278 y FR 2 802 420, respectivamente.

El resveratrol se utiliza en algunos ejemplos de las composiciones.

Agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o que impiden su descomposición. Se puede hacer mención, entre los agentes activos que estimulan las macromoléculas dérmicas o que impiden su descomposición, de los que actúan: - ya sea sobre la síntesis de colágeno tales como extractos de *Centella asiatica*; asiaticósidos y derivados; ácido ascórbico o vitamina C y sus derivados; péptidos sintéticos tales como iamina, biopéptido CL o el palmitoiloligopéptido vendido por Sederma; péptidos extraídos de plantas tales como el hidrolizado de soja comercializado por Coletica bajo el nombre comercial Phytokine®; y hormonas vegetales tales como auxinas y lignanos; - o sobre la síntesis de elastina tal como el extracto de *Saccharomyces cerevisiae* comercializado por LSN bajo el nombre comercial Cytovitin®; y el extracto del alga *Macrocystis pyrifera* vendido por Secma bajo el nombre comercial Kelpadellie®; - o en la síntesis de glicosaminoglicanos tales como el producto de fermentación de la leche por *Lactobacillus vulgaris* vendido por Brooks bajo el nombre comercial Biomin yogourth®; el extracto del alga parda *Padina pavonica* vendido por Alban Muller bajo el nombre comercial HSP3®; y el extracto

de *Saccharomyces cerevisiae* disponible en particular de Silab bajo el nombre comercial Firmalift® o de LSN bajo el nombre comercial Cytovitin®; - o en la síntesis de la fibronectina tales como el extracto de zooplancton Sauna vendido por Seporga bajo el nombre comercial GP4G®; el extracto de levadura disponible, en particular, de Alban Muller bajo el nombre comercial Drieline®; y el pentapéptido de palmitoilo vendido por Sederma bajo el nombre comercial Matrixil®; - o en la inhibición de metaloproteinasas (MMP) tales como, más particularmente, MMP 1, 2, 3 ó 9. Se puede hacer mención de: retinoides y derivados; oligopéptidos y lipopéptidos; lipoaminoácidos; el extracto de malta comercializado por Coletica bajo el nombre comercial Collalift®; extractos de arándano o de romero; licopeno; o isoflavonas, sus derivados o los extractos de plantas que los comprenden, en particular extractos de soja (vendidos, por ejemplo, por Ichimaru Pharcos bajo el nombre comercial Flavosterone SB®), de trébol rojo, de lino, de Pueraria lobata o de salvia; - o en la inhibición de serin-proteasas tales como la elastasa leucocitaria o la catepsina G. Se puede hacer mención de: el extracto peptídico de semillas de leguminosas (*Pisum sativum*) vendidas por LSN bajo el nombre comercial Parelasyt®; heparinoides; y pseudodipéptidos tales como ácido {2-[acetil(3-(trifluorometil)fenil)amino]-3-metil-butirilamino}acético.

Se puede hacer mención, en particular, entre los agentes activos que estimulan las macromoléculas epidérmicas tales como filagrina y queratinas, del extracto de lupino vendido por Silab bajo el nombre comercial Structurine®; el extracto de brotes de haya *Fagus sylvatica* vendidos por Gattefosse con el nombre comercial Gatuline®; y el extracto de zooplancton Salina vendido por Seporga bajo el nombre comercial GP4G®.

Agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos o queratinocitos y/o la diferenciación de queratinocitos Los agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos que se pueden utilizar en la composición descrita en esta memoria pueden, por ejemplo, elegirse de proteínas o polipéptidos vegetales, extractos, en particular de soja (por ejemplo, un extracto de soja vendido por LSN bajo el nombre comercial Eleseryl SH-VEG 8® o vendido por Silab bajo el nombre comercial Raffermine®); y hormonas vegetales tales como giberelinas y citoquininas.

Agentes que estimulan la proliferación de los queratinocitos que se pueden utilizar en la composición descrita en esta memoria comprenden, en particular, retinoides tales como retinol y sus ésteres, incluyendo palmitato de retinilo; adenosina; floriglucinol; los extractos de harina de nuez vendido por Gattefosse; y los extractos de *Solanum tuberosum* vendidos por Sederma.

Los agentes que estimulan la diferenciación de queratinocitos comprenden, por ejemplo, materiales inorgánicos tales como calcio; un extracto peptídico de altramuz tal como el vendido por Silab bajo el nombre comercial Structurine®; 3-sitosteril-sulfato de sodio tal como el vendido por Seporga bajo el nombre comercial Phytocohesine®; y un extracto de maíz soluble en agua tal como el vendido por Solabia bajo el nombre comercial Phytovityl®; un extracto peptídico de *Voandzeia subterranea* tal como el vendido por Laboratoires Srobiologiques bajo el nombre comercial Filladyn LS 9397®; y lignanos tales como secoisolariciresinol.

Relajantes musculares o agentes dermo-descontracturantes Los relajantes musculares o agentes dermo-descontracturantes que pueden utilizarse en la composición descrita en esta memoria comprenden alverina y sus sales, gluconato de manganeso, diazepam, el hexapéptido Argireline R vendido por Lipotec, algunas aminas secundarias y terciarias carboniladas, adenosina, y también sapogeninas y los extractos naturales, en particular de hilo silvestre, que los comprenden, así como extractos de *Boswellia serrata*.

Agentes tensores La expresión "agente tensor" se entiende que significa un compuesto capaz de ejercer tensión en la piel, cuyo efecto es hacer temporalmente desniveles menos distintos en la superficie de la piel tales como arrugas y líneas finas.

Se puede hacer mención, en particular, entre los agentes tensores que se pueden utilizar en la composición descrita en esta memoria, de: (1) polímeros sintéticos tales como látices de poliuretano o látices de silicona acrílicos, en particular a los descritos en la solicitud de patente EP-1 038 519, tal como un poldimetilsiloxano injertado con propiltio y [poli(acrilato de metilo) 3, propiltio] [poli-(metacrilato de metilo) y polipropiltio [poli(ácido metacrílico)] o un poldimetilsiloxano injertado con propiltio [poli (metacrilato de isobutilo)]; y propiltio [poli (ácido metacrílico)]. Tales polímeros de silicona injertados se venden en particular por 3M bajo los nombres comerciales VS 80, VS 70 o L021, (2) polímeros de origen natural, en particular, (a) polisacáridos, por ejemplo (i) en forma de almidón resultante, en particular, de arroz, maíz, patata, mandioca, guisantes, trigo, avena, y similares, o (ii) en forma de carragenanos, alginatos, agares, gelanos, polímeros de celulosa y pectinas, ventajosamente como una dispersión acuosa de micropartículas de gel, y (b) látices compuestos de resina de goma laca, goma sandarac, dammars, elemis, copales, derivados de celulosa, y sus mezclas, (3) proteínas vegetales e hidrolizados de proteínas, en particular de maíz, centeno, trigo, trigo sarraceno, sésamo, espelta, guisantes, habas, lentejas, soja y altramuz, (4) silicatos mixtos, en particular filosilicatos y, especialmente, laponitas, (5) micropartículas de cera, por ejemplo elegida de carnauba, candelilla o ceras de alfalfa, (6) partículas coloidales de carga inorgánica que tiene un diámetro medio numérico de entre 0,1 y 100 nm, preferiblemente entre 3 y 30 nm, y elegidas, por ejemplo, de: sílice, compuestos de sílice/alúmina, óxido de cerio, óxido de zirconio, alúmina, carbonato de calcio, sulfato de bario, sulfato de calcio, óxido de zinc y dióxido de titanio.

Agentes para combatir la contaminación o radicales libres La expresión "agente para combatir la contaminación" se entiende que significa cualquier compuesto capaz de atrapar el ozono, compuestos aromáticos monocíclicos o

policíclicos tales como benzopireno, y/o metales pesados tales como cobalto, mercurio, cadmio y/o níquel. La expresión "agente para combatir radicales libres" se entiende que significa cualquier compuesto capaz de atrapar los radicales libres.

5 Se puede hacer mención, en particular, como agentes para atrapar el ozono que se pueden utilizar en la composición descrita en esta memoria, a la vitamina C y sus derivados, incluyendo glucósido de ascorbilo; fenoles y polifenoles, en particular taninos, el ácido elágico y ácido tánico; epigallocatequina y los extractos naturales que la comprenden; extractos de hoja de olivo; extractos de té, en particular de té verde; antocianos; extractos de romero; ácidos fenólicos, en particular el ácido clorogénico; estilbenos, en particular, resveratrol; derivados de aminoácidos que comprenden azufre, en particular S-carboximetilcisteína; ergotioneína; N-acetil-cisteína; agentes quelantes tales como N,N'-bis(3,4,5-trimetoxibencil)etilendiamina o una de sus sales, complejos metálicos o ésteres; carotenoides tales como crocetina; y diversos materiales de partida tales como la mezcla de arginina, ribonucleato de histidina, manitol, adenosina trifosfato, piridoxina, fenilalanina, tirosina y ARN hidrolizado comercializado por Laboratoires S'robiologiques bajo el nombre comercial CPP LS 2633-12F®, la fracción soluble en agua de maíz vendido por Solabia bajo el nombre comercial Phytovityl®, la mezcla de extracto de fumarina y de extracto de limón vendido bajo la denominación Unicetrozon C_49® por Induchem, y la mezcla de extractos de ginseng, de manzana, de melocotón, de trigo y de cebada vendido por Provital bajo el nombre comercial Pronalen Bioprotect®.

20 Se puede hacer mención, en particular, como agentes que atrapan compuestos aromáticos monocíclicos o policíclicos que pueden ser utilizados en la composición descrita en esta memoria, de taninos tales como ácido elágico; derivados de indol, en particular indol-3-carbinol; extractos de té, en particular de té verde; extractos de jacinto de agua o Eichhornia crassipes; y la fracción soluble en agua de maíz vendido por Solabia bajo el nombre comercial Phytovityl®.

25 Por último, se puede hacer mención, en particular, como agentes que atrapan metales pesados que pueden ser utilizados en la composición descrita en esta memoria, de agentes quelantes tales como EDTA, la sal pentasódica del ácido etilendiaminatetrametilfosfónico y N,N'-bis (3,4,5- trimetoxibencil)etilendiamina o una de sus sales, complejos metálicos o ésteres; ácido fítico; derivados de quitosano; extractos de té; en particular de té verde; taninos tales como ácido elágico; azufre que comprende aminoácidos tales como cisteína; extractos de jacinto de agua (Eichhornia crassipes); y la fracción soluble en agua de maíz vendido por Solabia bajo el nombre comercial Phytovityl®.

30 Los agentes para combatir los radicales libres que pueden ser utilizados en la composición descrita en esta memoria comprenden, además de algunos agentes para combatir la contaminación mencionados anteriormente, la vitamina E y sus derivados tales como acetato de tocoferilo; bioflavonoides; coenzima Q10 o ubiquinona; ciertas enzimas tales como catalasa, superóxido dismutasa y extractos de germen de trigo que lo componen, lactoperoxidasa, glutatión peroxidasa y quinonas reductasas; glutatión; benciliden-alcanfor; bencilclanonas; naftalenonas sustituidas; pidolatos; fitantriol; 7-orizanol; guanosina; lignanos; y melatonina.

35 Agentes calmantes Se puede hacer mención, como agentes calmantes que se pueden utilizar en la composición descrita en esta memoria, de: triterpenos pentacíclicos y extractos vegetales (por ejemplo, Glycyrrhiza glabra) que los comprenden tal como ácido 3-glicirretínico y su sales y/o sus derivados (monoglucurónido de ácido glicirretínico, glicirretinato estearílico o ácido 3-estearoil-oxiglicirretínico), ácido ursólico y sus sales, ácido oleanólico y sus sales, ácido betulínico y sus sales, extractos de plantas tales como Paeonia suffruticosa y/o lactiflora, Laminaria saccharina, Boswellia serrata, Centipeda cunninghamii, Helianthus annuus, Linum usitatissimum, Cola nitida, Epilobium angustifolium, Aloe vera o Bacopa monnieri, sales del ácido salicílico y, en particular, salicilato de zinc, aceite de canola, bisabolol, extractos de manzanilla, alantoína, Spivital EPC (diéster fosfórico de vitamina E y C) de Seppic, aceites omega 3 insaturados tales como almizcle rosa, semillas de grosella negra, Echium o aceites de pescado, extractos de plancton, capriloilglicina, Seppicaim VG (palmitoilprolina sódica y Nymphaea alba) de Seppic, tocotrienoles, piperonal, un extracto de clavo, fitoesteroles, cortisona, hidrocortisona, indometacina y betametasona.

Se ha de entender que cualquier composición tal como se describe en esta memoria se puede utilizar asimismo en los métodos descritos en esta memoria.

50 También se describe en esta memoria, y no es una realización de la presente invención, un método para mejorar una característica de la piel, comprendiendo el método poner en contacto una superficie de la piel de un sujeto con una composición que comprende un coral descrito en esta memoria. En algunos ejemplos, el método comprende, además, poner en contacto la piel con una composición que comprende, además, un agente quelante, tal como se describe aquí, y en algunos ejemplos, que comprende, además, otros agentes, que directa o indirectamente mejoran una característica de la piel.

55 También se describe en esta memoria, y no es una realización de la presente invención, un método para tratar una enfermedad, trastorno o afección de la piel, comprendiendo el método poner en contacto una superficie de la piel afectada de un sujeto con una composición que comprende un coral descrito en esta memoria. En algunos ejemplos, el método comprende, además, poner en contacto la piel afectada con una composición que comprende, además, un agente quelante, tal como se describe aquí, y en algunos ejemplos, que comprende, además, otros agentes, que directa o indirectamente mejoran una característica de la piel. En algunos ejemplos, La expresión "piel afectada" se

refiere a piel enferma. En algunos ejemplos, la expresión "piel afectada" se refiere a la piel que muestra indicios de un trastorno o afección de la piel. En algunos ejemplos, la expresión "piel afectada" se refiere a la piel, que no es alterada de modo alguno de una apariencia "normal" o "sana". En algunos ejemplos, la expresión "piel afectada" se refiere a la piel, que puede ser identificado como propensa a, o sujeta a una enfermedad, trastorno o afección de la piel.

En algunos ejemplos, la enfermedad, trastorno o afección de la piel es una neoplasia, o lesión preneoplásica o células, por ejemplo, melanoma, carcinoma de células basales, etc. En algunos ejemplos, la enfermedad de la piel, trastorno o afección es un resultado de la infección, por ejemplo, con leishmania, micobacterias, Streptococcus, Staphylococcus, virus herpes, virus de la varicela, u otros. Una enfermedad, trastorno o afección de la piel es el resultado de una respuesta inflamatoria, por ejemplo en respuesta a la alergia o la exposición a una infección, un irritante, u otros.

En algunos ejemplos, la enfermedad, trastorno o afección de la piel es piel cronológica u hormonalmente envejecida o foto-envejecida tal como las líneas de expresión, arrugas y flacidez de la piel y otras afecciones debidas a una degradación progresiva de la unión dérmica-epidérmica (DEJ) y de la cohesión célula-célula en la epidermis. En algunos ejemplos, dicha enfermedad, trastorno o afección puede ser tratado con una composición tópica que comprende el coral y opcionalmente quelante, como se describe en esta memoria, y en algunos ejemplos, se formula como un producto cosmético para la cara y/o el cuerpo.

Ejemplos

Materiales y Métodos

20 Materiales

$^{45}\text{CaCl}_2$ se obtuvo de NEN Life Science (Boston, MA, EE.UU.), y calceína-AM se obtuvo de Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE.UU.

Preparación de la Matriz

Se prepararon dos derivados de biomateriales, uno del hidrocoral *M. dichotoma* (designado MIL) y el otro, para fines de comparación, del coral escleractiniano *P. lutea* (designado POR). Colonias de *M. dichotoma* se obtuvieron de las zonas de agua de mar poco profundas cercanas al Instituto Interuniversitario de Ciencias Marinas (IUI) en Eilat, Israel, a una profundidad de 6-8 metros. Cada una de las colonias fue cortada en fragmentos y pegada con resina epoxídica en la parte superior de tubos de PVC. Después de un período de adaptación de 3 meses, los fragmentos clonados se transfirieron a un sistema de tanque de laboratorio. POR fueron preparados a partir de núcleos perforados desde colonias masivas longevas.

Ambos tipos de esqueleto se cortaron en bloques y se blanquearon utilizando una disolución de hipoclorito comercial. Después de este proceso de limpieza preliminar, las muestras se enjuagaron con agua destilada y se secaron al aire. Los trozos, que eran de 0,5 mm de espesor y aproximadamente 0,5 cm², se pulieron usando un molinillo de 8" (SBT 900, South Bay Technologies, San Clemente, CA) seguido por pulido manual. Las matrices finales utilizados fueron de 2 x 2 x 0,5 mm para la tinción histoquímica y de 4 x 4 x 0,7 mm para otros ensayos. Las muestras fueron lavadas con NaOH (2 N) con el fin de eliminar los residuos orgánicos y con H₂O₂ (Gerdrogen al 30% en peso, Riedel-de Haen, Alemania) con el fin de separar los residuos inorgánicos (cada disolución durante 10 min). Las muestras se trataron en autoclave (121 °C, 40 min) y se secaron en un horno durante la noche a 80 °C.

Microcolonias fueron transferidas a sistemas de tanques y se incubaron con $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y calceína durante 48 horas.

40 Preparación de células madre mesenquimales

MSCs de origen de una línea celular (*Mus-musculus*; ATTC/CRL-12424) fueron sembradas a una concentración de 6400 células/matriz en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 4,5 g/L de D-glucosa, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel), piruvato de sodio 1 mM, suero de ternero fetal al 10% (v/v), 1% de L-glutamina, y disolución al 1% de Pen-Strep-nistatina (todos de Biological Industries, Beit Haeemek, Israel, excepto como se indica). No se añadieron suplementos osteoinductores. Los cultivos celulares se incubaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37 °C. El medio fue reemplazado cada 2 días. MSCs fueron sembradas en biomatrices marcadas y se cultivaron con bajo nivel de calcio o medio de control.

Microscopía electrónica de barrido

Después de la fijación (30 min, 37 °C) en paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1 M, las muestras sembradas se lavaron dos veces en PBS durante 10 min. Las muestras se lavaron a continuación cinco veces durante 15 min cada una en una serie de concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 90 y 95% v/v) y tres veces durante 10 min cada una en etanol analítico. Después de lavados con etanol, las muestras se enjuagaron en una serie de diferentes concentraciones de hexametildisilazano (HMDS) (33,3, 50 y 66,6% v/v en etanol analítico) y tres veces en HMDS al 100% durante 1 min cada una. Las muestras se secaron durante la noche. Las células y la

caracterización de la morfología del tejido se realizó por medio de SEM en un instrumento Quanta 200 ESEM / SEM, FEI (Phillips, Bothell, WA) que funciona con energías del haz de 6-25 kV. Las muestras se pegaron con pasta conductora a muñones de montaje, que fueron luego revestidos por pulverización catódica con oro-paladio.

Microscopía óptica

5 Se llevó a cabo todos los días un seguimiento por microscopía óptica invertida (TE300, Nikon, Tokio, Japón). Las muestras se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS, Biological Industries), se fijaron con disolución de formaldehído (al 12%), y se lavaron de nuevo a temperatura ambiente. Las muestras se tñieron con 5% de colorante azul de tripano (Biological Industries) durante 5 min a temperatura ambiente y luego se lavaron con agua destilada.

10 Análisis de la densidad celular

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Axiovert-200 (Zeiss, Alemania) invertido equipado con objetivos X20 Plan- Neofluar (N.A. 0.50) y X40 LD-Achroplan (N.A. 0.60) y una cámara CCD enfriada (SensiCam, PCO, EE.UU.) controlado por Metamorph (versión 6.2, Universal Imaging, Downingtown, PA). Regiones a lo largo de la superficie pulida que mostraban núcleos 40,6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI)-positivos fueron fotografiados en planos individuales, a 1-2 mm de la superficie cristalina. Las células fueron contadas manualmente, y los números se promediaron e interpolaron para 1 mm² de la superficie cristalina.

Ensayo de Calceína

Microscopía confocal y análisis de imágenes

20 Se cortaron secciones de diez micras y se cargaron inmediatamente en portaobjetos de vidrio y se examinaron utilizando un microscopio invertido Leica DMIRBE acoplado a un sistema confocal Leica TCS SP (Leica Microsystems, Sidney, Australia). Las células fueron excitadas a 488 nm y la fluorescencia se recogió utilizando ventanas de emisión establecidas en 500-540 nm. Todas las señales recogidas se ajustaron para permanecer dentro del intervalo lineal de los detectores. Las imágenes se recogieron utilizando el software TCS NT (Leica Microsystems, Sidney, Australia). Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas mediante ANOVA de Una Vía (software jmp, v3.0.2, SAS Institute Inc.). Imágenes incorporadas en cifras se exportaron como archivos TIFF y se prepararon para su publicación por el software Adobe Photoshop v 5.0.

Ensayo de calcificación (acumulación de ⁴⁵Ca)

30 Coral (~20 mg) se cortó en rodajas y se incubó en 1 ml de solución de Krebs-Henseleit (K-H) (en mmol/L: 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,3 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 25 NaHCO₃ y 5 glucosa; pH 7,2) con 37 kBq/mL de ⁴⁵CaCl₂. La reacción se detuvo mediante la adición de disolución de K-H enfriada con hielo. El coral se disolvió y la concentración de ADN se determinó por espectrofotometría a DO₂₆₀. La radiactividad de ⁴⁵Ca²⁺ se midió mediante recuento por centelleo β (LS 6500; Beckman).

Análisis de ADN

35 La concentración de ADN se determinó utilizando el kit de Cuantificación de dsADN Pico-Green (Molecular Probes, Eugene, OR). Un día antes de que el análisis se llevara a cabo, cada una de las muestras (n = 5 para cada una de las biomatrices) se transfirió a placas individuales de 24 pocillos en 1 mL de medio libre de suero. Las muestras se trataron mediante ultrasonidos durante 1 min, y de cada uno de los pocillos se transfirieron 50 μL de la disolución de ADN a una placa fluorescente de 96 pocillos. 100 μL de disolución 1 X TE (Tris-HCl 20 mM, EDTA 20 mM, tampón pH 7,5) se añadieron a cada uno de los pocillos, seguido de 150 μL de disolución PicoGreen (diluido 1:200 con disolución 1 X TE) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min en la oscuridad. La excitación se leyó a 480 nm y la emisión a 520 nm utilizando un fluorómetro (espectrómetro Cary Eclipse Fluorecence, Varian, Oxford, Reino Unido). Una curva estándar de ADN se representó gráficamente utilizando el ADN del bacteriófago lambda estándar.

RT-PCR de Cadherina-11 y análisis de transferencia Northern

45 La RT-PCR se realizó con 0,2 mg (β-actina) o 1,0 mg (cadherina-11) de ARN total, aislado utilizando el método de isotiocianato de guanidinio (Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). Se utilizaron los siguientes cebadores: β-actina aguas arriba, 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'; β-actina aguas abajo, 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'; cadherina-11 tipo salvaje aguas arriba, 5'-ACCAGATGTCTGTGTCAGA-3'; 11-cadherina tipo salvaje aguas abajo, 5'-GTCATCCTTGTCATCTGCA-3'; 50 cadherina-11 variante aguas arriba, 5'-CGCCGCGGATCCCTTAATGGAACCCCTCTC-3'; y cadherina-11 variante aguas abajo, 5'-CCGCCGGAATTCTCCGTAAGTGTGGTTGGACTCTC-3'. La síntesis de la primera hebra con el cebador aguas abajo y MMLV-RT (Gibco/BRL) fue seguida por PCR utilizando polimerasa Taq (Life Technologies, Inc.) después de añadir el cebador de aguas arriba. Se utilizaron los siguientes parámetros de ciclo: 11-cadherina tipo salvaje, 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 2 min, 35 ciclos; cadherina-11 variante, 94 °C 55 durante 1,5 min, 55 °C durante 2 min, 72 °C durante 3 min, 35 ciclos. Ambos parámetros podrían ser utilizados para

5 β -actina. El producto de PCR se ejecutó en un gel de agarosa al 1%. Se amplificaron los siguientes fragmentos: β -actina, un fragmento de 661 pb que se extiende por un intrón para descartar la contaminación genómica; cadherina-11 de tipo salvaje, un fragmento de 742 pb a partir de una región que codifica parte del dominio extracelular; cadherina-11 variante, un fragmento de 194 pb que codifica la mayor parte de los 75 aminoácidos COOH-terminales presentes sólo en la variante (Okazaki et al., J. Biol. Chem., 269: 12092-12098, 1994).

10 Veinte μ g de ARN total se separaron en un gel de agarosa al 1% y se transfirieron a una membrana de nilón (Boehringer Mannheim; Sambrook et al, 1989). Un fragmento de 1,6 kb del ADNc de la cadherina-11 fue marcado utilizando dCTP marcado con 32 P y se utilizó para sondear el borrón de transferencia. El borrón de transferencia se hibridó a 50 °C durante la noche, luego se lavó tres veces en SSC al 2% a 55 °C y 65 °C (último lavado). Las bandas marcadas se visualizaron utilizando un PhosphorImager. A continuación, el nilón se volvió a sondear para GAPDH como control.

Extracción de ARN de N-cadherina y análisis de transferencia Northern

15 ARN total se preparó a partir de células cultivadas mediante extracción con tiocianato de guanidinio-feno-cloroformo. Veinte microgramos de cada muestra de ARN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% que contenía 1,85% de formaldehído y se transfirieron a una membrana de nilón Hybond N+ (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL). El ARNm de N-cadherina se detectó por análisis de transferencia Northern como en Reid y Hemperly (Nucleic Acids Research 1990, 18:5896). Las sondas fueron cebadas al azar con 32 PdCTP marcada (Amersham). Las membranas se pre-hibridaron durante 18 horas a 42 °C en un tampón de 6x SSC que consiste en 0,05 mol/L de NaH_2PO_4 , 5x Denhardt (50x =% de Ficoll, polivinilpirrolidona al 1%, BSA al 1%), SDS al 1%, 50% de formamida, y 10 μ g/ml de ADN de esperma de salmón. Una sonda desnaturalizada se añadió a los borrones y se hibridó durante la noche. Los borrones se lavaron secuencialmente durante 30 minutos a 65 °C utilizando las siguientes condiciones: 2x SSC/SDS al 0,1%, 0,3x SSC/SDA al 0,5% y 0,1x SSC/SDS al 1,0%. Los borrones se expusieron a película X-OMAT AR (Kodak). La normalización para la carga se comparó con la hibridación de un fragmento PstI de 1,2 kb de GAPDH humano (Acceso a GenBank J04038).

25 Ejemplo 1

Crecimiento de células madre mesenquimales desarrolladas en Porites Lutea

30 Con el fin de determinar los efectos mediados por el calcio de coral en el crecimiento de células madre mesenquimales (MSC), se tomaron micrografías electrónicas de barrido (SEMs) de coral sembradas con MSCs con y sin incubación con un quelante de calcio. Las SEMs mostraron un aumento de la densidad de MSC tanto en biomatrices de Porites lutea (POR) como de POR revestidas de oro (GCPOR) a los 1, 4 y 7 días después de la siembra (Figs. 2A y 2B). La incubación con el quelante de calcio, EGTA aumentó aún más la densidad celular local (Figs.

2Aj, 2Al).

Ejemplo 2

35 Absorción de Calcio de Células Madre Mesenquimales Desarrolladas en Porites Lutea

El marcaje con calceína de MSCs sembradas en biomatrices biomarcadas mostró una absorción de calcio de la biomatriz a los 7 días después de la siembra (Figs. 3B-D). Hubo un mayor incremento en la captación de calcio marcado dentro de las MSCs a los 10 días post-siembra en comparación con los 3 días post-siembra en el control y matrices tratadas con EGTA (Fig. 3E).

40 Ejemplo 3

Cambios de Cadherina en Células Madre Mesenquimales Desarrolladas en Porites Lutea

45 Los niveles de ARNm de cadherina-11 (Cad-11) y N-cadherina (N-Cad) en MSCs aumentaron en función de los días después de la siembra, con la expresión de picos de Cad-11 y N-CAD a los 21 días en Porites lutea no revestida de oro y a los 14 días en Porites lutea revestida de oro. La expresión de Cad-11 fue mayor en Porites lutea no revestida de oro, mientras que la expresión de N-Cad fue mayor en Porites lutea revestida de oro (Figs. 4A-B).

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un andamio de coral o biomatriz de coral sembrado con células precursoras para inducir o potenciar la formación de hueso y/o cartílago, en el que el método comprende sembrar un andamio de coral o biomatriz de coral con células precursoras en cultivo en presencia de un quelante de calcio durante un periodo de tiempo suficiente para sembrar dicho andamio de coral o biomatriz de coral, con la condición de que las células precursoras no sean células madre embrionarias humanas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho coral es de una especie de Porites, una especie de Millepora o una especie de Acropora.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho quelante de calcio es EDTA o calceína.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células precursoras son células madre mesenquimales, condrocitos u osteoblastos.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células precursoras son células madre mesenquimales.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho coral se siembra con dicha célula precursora en medio exento de suero.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células precursoras son autólogas, singénicas o alogénicas.
8. Un kit para la formación de hueso y/o cartílago, en donde el kit comprende un andamio de coral o biomatriz de coral, un quelante de calcio y células precursoras de hueso y/o cartílago para la siembra en dicho andamio de coral o biomatriz de coral en cultivo en presencia de dicho quelante de calcio, con la condición de que las células precursoras no sean células madre embrionarias humanas.

Microcolonias - experimento de biomarcarje

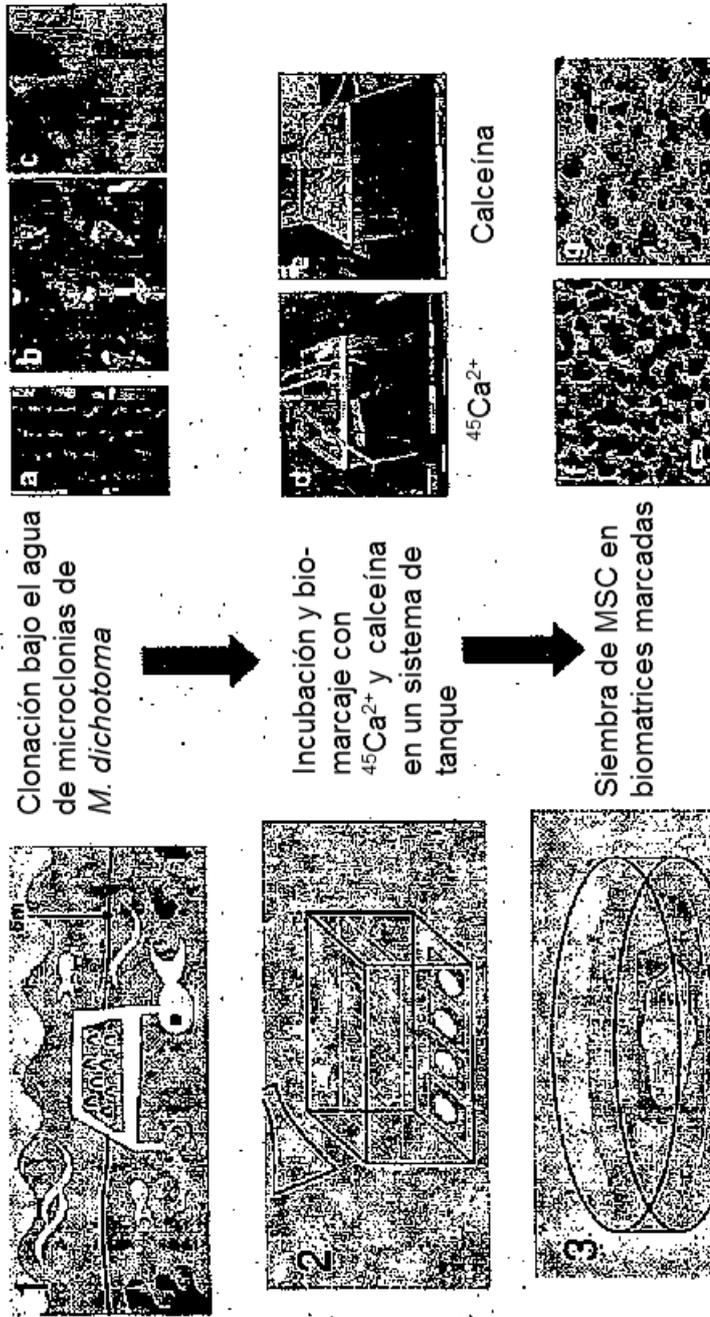


FIGURA 1B

FIGURA 1A

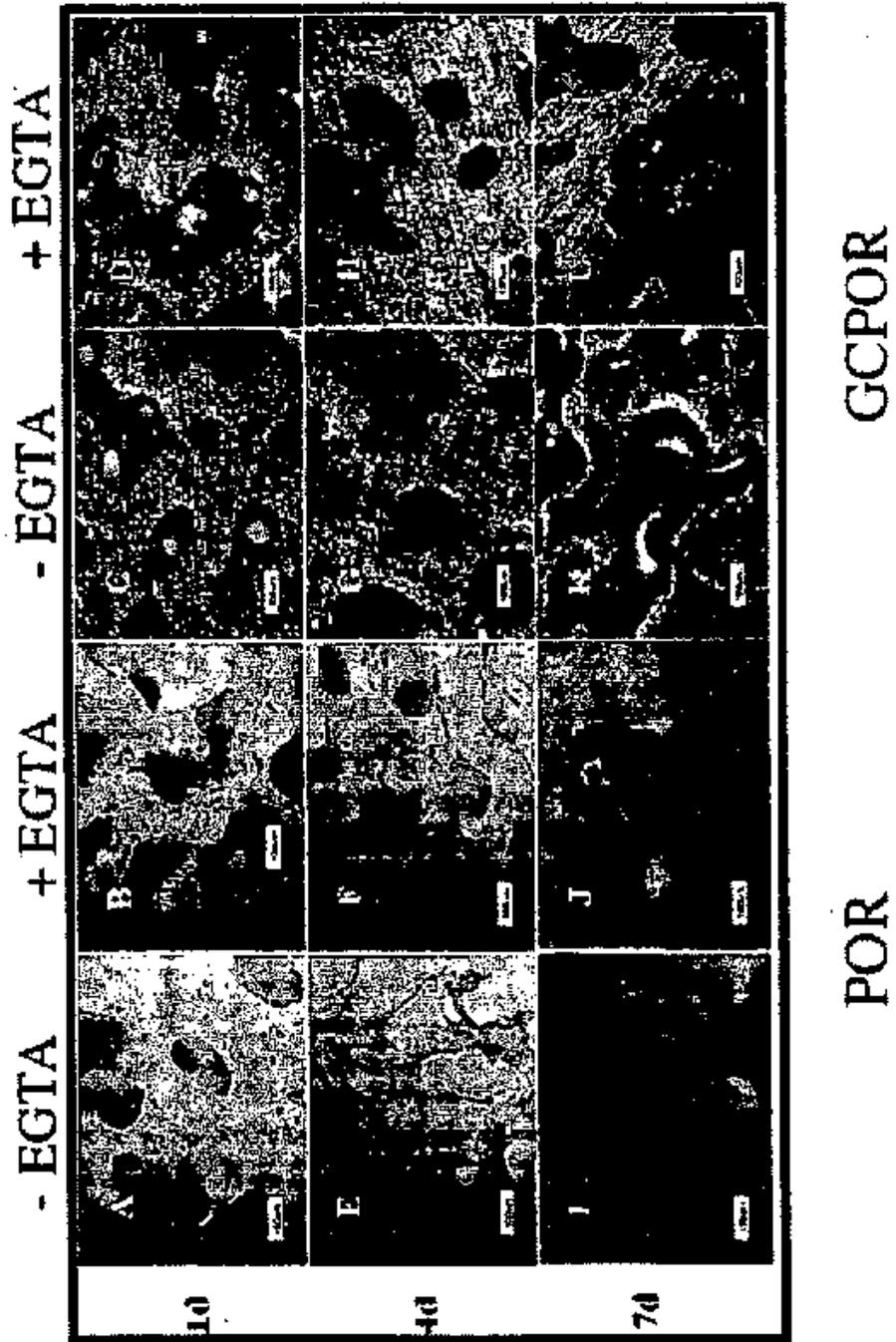


FIGURA 2A

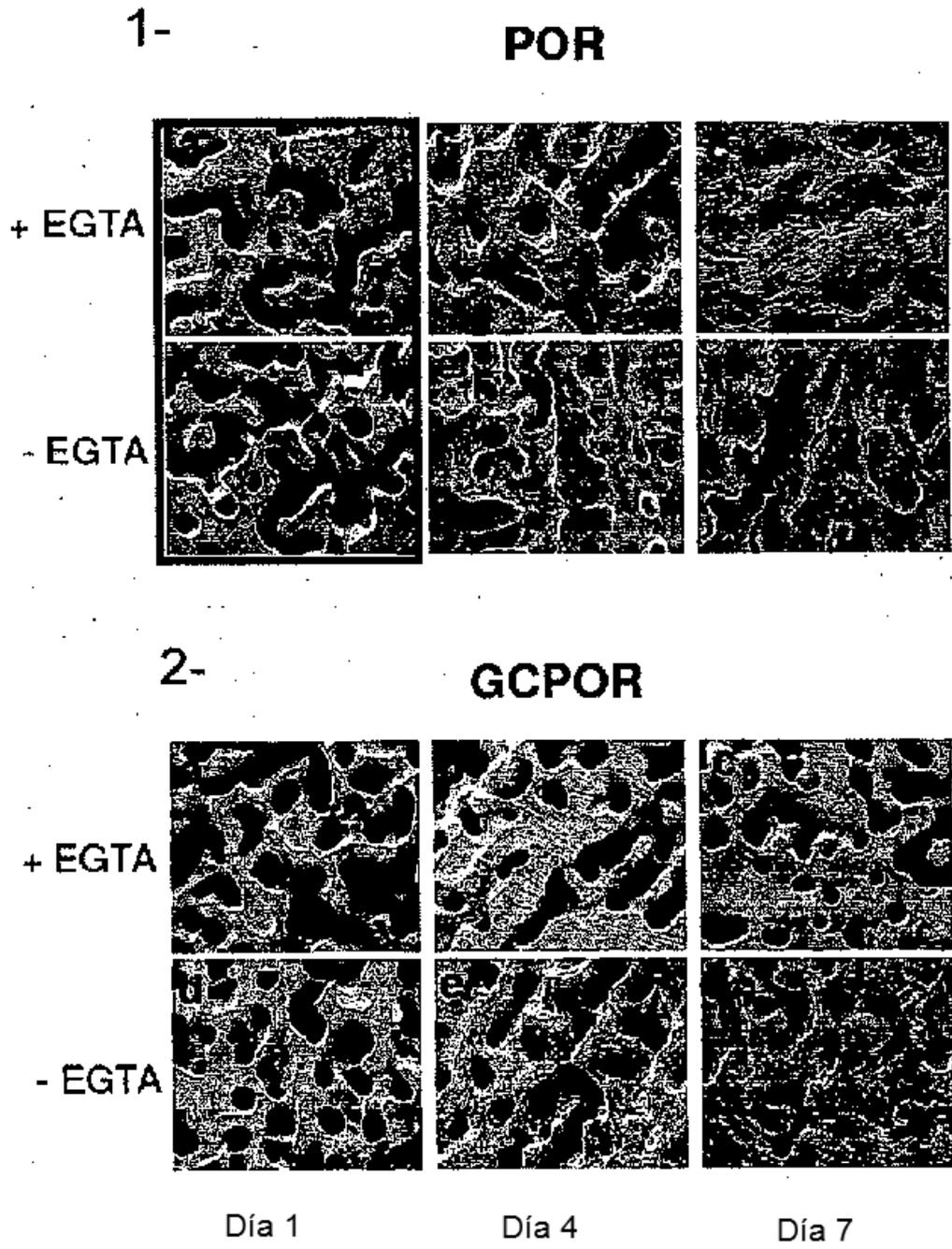


FIGURA 2B

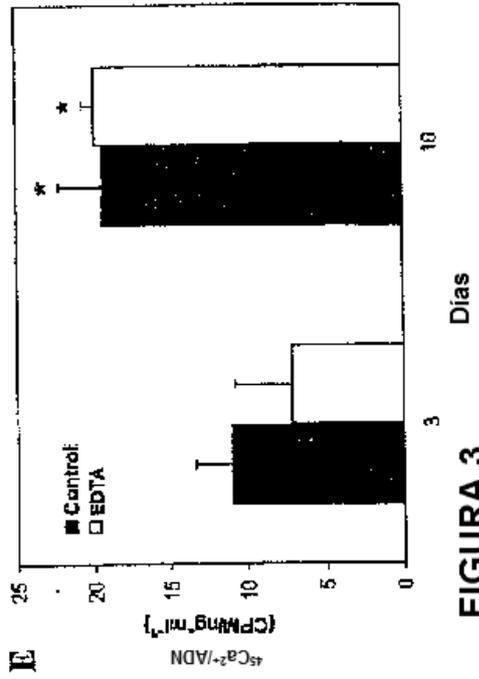
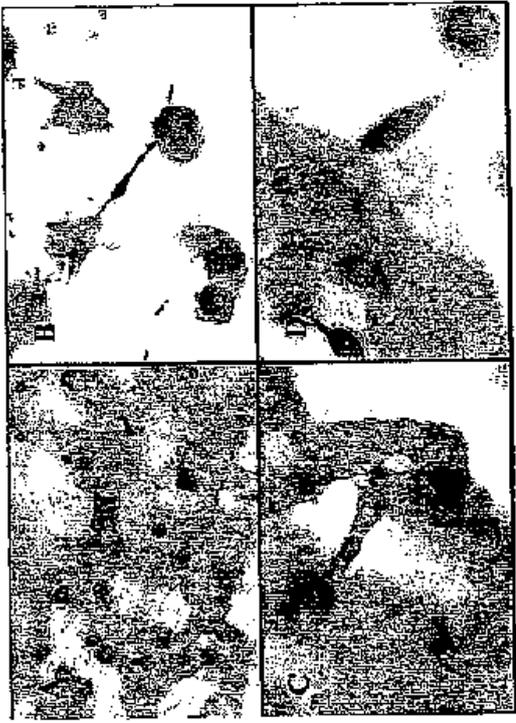
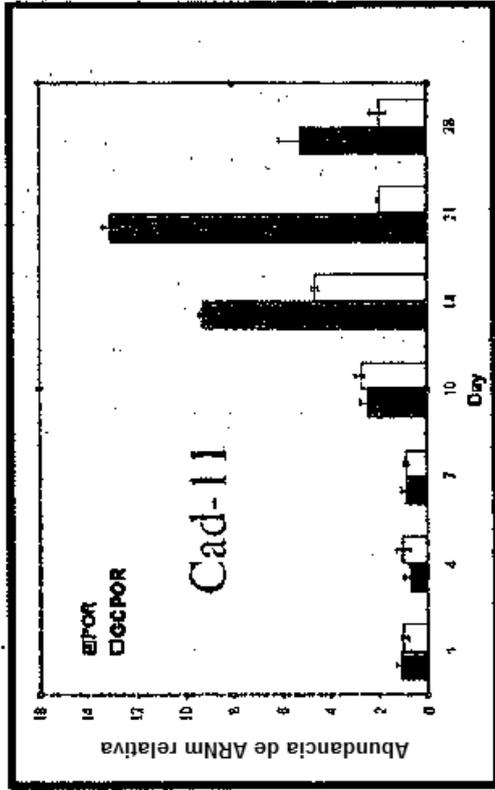
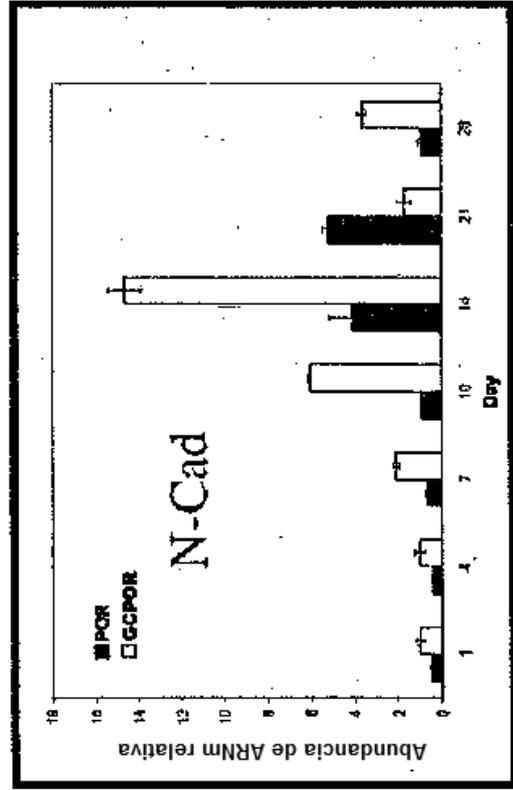


FIGURA 3



1-



2-

FIGURA 4