

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 347**

51 Int. Cl.:

A61K 31/727 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
C07K 14/51 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2009 E 09813323 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2324065**

54 Título: **Heparán sulfato que se une a BMP2**

30 Prioridad:

11.09.2008 US 96274 P
06.10.2008 GB 0818255

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2015

73 Titular/es:

AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (100.0%)
1 Fusionopolis Way 20-10 Connexis
Singapore 138632, SG

72 Inventor/es:

COOL, SIMON MCKENZIE;
NURCOMBE, VICTOR y
DOMBROWSKI, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 537 347 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

Heparán sulfato que se une a BMP2

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a glucosaminoglucanos que pueden unirse a BMP2, incluyendo su aislamiento e identificación, y al uso de los glucosaminoglucanos aislados en el crecimiento y/o desarrollo de tejido.

10 Antecedentes de la invención

Los glucosaminoglucanos (GAG) son macromoléculas complejas de hidratos de carbono responsables de realizar y regular una inmensa cantidad de funciones celulares esenciales.

15 Los GAG se han implicado en la modulación o mediación de muchos sistemas de señalización junto con los muchos cientos de factores adhesivos y de crecimiento de unión a heparina conocidos. Se contempla que la asociación de factores de crecimiento con los GAG modula sus diversas actividades con una diversa serie de acciones, tales como la prolongación de sus semividas protegiéndolas de la degradación proteolítica, modulando la localización de estas citocinas en la superficie celular, mediando interacciones moleculares y estableciendo complejos de ligando-receptor.

20 Hay un número cada vez mayor de factores de crecimiento de unión a heparina identificados, añadido a los cientos ya conocidos, la mayoría de los cuales se purificaron por cromatografía de afinidad con heparina. Éstos incluyen la gran familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los PDGF, las pleiotrofinas dentro de la superfamilia de citocinas TGF- β . Esta última familia de factores incluye la subfamilia de la proteína morfogenética ósea (BMP) osteoinductora, denominada así por su capacidad para inducir la formación de hueso ectópico.

25 La naturaleza y el efecto de la interacción de los GAG y los factores de crecimiento siguen sin aclararse. Aunque se ha demostrado que la interacción entre el FGF2 y las secuencias de sacáridos particulares encontradas en la heparina es de alta afinidad, generalmente sigue sin aclararse si la asociación, entre otros factores de crecimiento y los heparanos, implica una alta afinidad o interacción de unión específica entre una secuencia de aminoácidos o un epítipo conformacional en el factor de crecimiento de la proteína y una secuencia de sacáridos incorporada en el GAG, o si la asociación está mediada por interacciones inespecífica, de afinidad más baja, entre el GAG y el factor de crecimiento de proteínas.

30 Si las interacciones entre los GAG y las proteínas que residen, o que se secretan, en la matriz extracelular son específicas, los compañeros de unión deben identificarse para desenmarañar las interacciones y comprender cómo estas interacciones pueden usarse o modularse que para proporcionar nuevos tratamientos.

35 Por tanto, una cuestión principal que surge es saber si en las cadenas de las moléculas de GAG hay secuencias de sacáridos insertadas que coinciden con la conformación de la secuencia de aminoácidos primaria/3dimensional terciaria dentro la estructura polipeptídica de los factores de crecimiento controlando así su asociación, y por tanto la bioactividad, con una especificidad absoluta, o al menos relativa.

40 La proteína morfogenética ósea 2 (también denominada proteína morfogénica ósea 2, BMP2 o BMP-2) es un miembro de la superfamilia de FGF- β fuertemente implicada en el desarrollo de hueso y cartílago. Es una proteína osteogénica, es decir, es un fuerte inductor de la diferenciación de osteoblastos (Marie *et al.* (2002) "Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling". *Histol. Histopathol.* 17 (3): 877-85). Se ha demostrado que el implante de esponjas de colágeno impregnadas con BMP-2 induce la formación de hueso nuevo (Geiger M, Li RH, Friess W (noviembre de 2003). *Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2.* *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (12): 1613-29.). La BMP2 humana recombinante está disponible para el uso ortopédico en Estados Unidos (por ejemplo, injerto óseo INFUSE®, Medtronic Inc, Estados Unidos).

55 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una preparación de heparán sulfato, como se define en las reivindicaciones. Se ha descubierto que el HS/BMP2 potencia la generación, reparación y regeneración de tejido conectivo.

60 En un aspecto de la presente invención se proporciona heparán sulfato HS/BMP2. El HS/BMP2 puede proporcionarse en forma aislada o en forma sustancialmente purificada. La composición de la invención es al menos 97 % de heparán sulfato HS/BMP2 que puede unirse específicamente a la SEC ID N^o: 1 o 6, o a la BMP2, en la que después de la digestión con heparín liasas (heparinasa, heparitinasa I y II) hasta el final y posterior sometimiento de los fragmentos de disacáridos resultantes a HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC), el heparán sulfato HS/BMP2 tiene una composición de disacáridos que comprende:

- 65 ▪ UA-GlcN 8,2 % (\pm 3 %);

- UA-GlcNAc 17,5 % (\pm 3 %);
- UA-GlcN,6S 3,7 % (\pm 3 %);
- UA,2S-GlcN 4,5 % (\pm 3 %);
- UA-GlcNS 16,2 % (\pm 3 %);
- 5 ▪ UA,2S-GlcNS,6S 0,5 % (\pm 3 %);

en la que la digestión se realiza disolviendo una muestra de HS/BMP2 (100 μ g) en acetato sódico 100 mM/acetato cálcico 0,2 M (pH 7,0); digiriendo secuencialmente la muestra con heparinasa (10 mU/ml) a 37 °C durante 2 horas, seguido de heparitinasa I (10 mU/ml) a 37 °C durante 1 hora, seguido de heparitinasa II (10 mU/ml) a 37 °C durante 10 18 horas, seguido de una alícuota de cada dicha liasa a 37 °C durante 6 horas, en la que después de la digestión, las muestras se procesan en una columna de BioGel P-2 (1 x 120 cm) equilibrada con NH₄HCO₃ 0,25 M, en la que el pico que comprende los disacáridos se liofiliza y después se disuelve en agua acidificada (pH 3,5 con HCl) y después se hace pasar sobre una columna ProPac PA-1 SAX-HPLC, en la que los disacáridos se eluyen con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1,0 M (pH, 3,5) durante 60 minutos a un caudal de 1 ml/min.

En el presente documento se describen composiciones en las que el componente de heparán sulfato es al menos 80 % de HS/BMP2, más preferentemente es uno de al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 %.

En realizaciones preferidas, el HS/BMP2 puede unirse a un péptido o polipéptido que tiene, o consta de, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N^o: 1 o 6. En algunas realizaciones este péptido es la SEC ID N^o: 1 o 6, en otras realizaciones es una proteína BMP2. En algunas realizaciones el HS/BMP2 se une a un péptido que tiene, o consta de, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N^o: 1 o 6 con una K_D menor de 100 μ M, más preferentemente menor de 50 μ M, 40 μ M, 30 μ M, 20 μ M o 10 μ M.

En algunas realizaciones preferidas, el HS/BMP2 está N-sulfatado. Éste puede comprender la N-sulfatación de restos de *N*-acetil-*D*-glucosamina (GlcNAc) en la cadena de oligosacáridos de heparán sulfato. Preferentemente al menos el 80 % de los restos de *N*-acetil-*D*-glucosamina (GlcNAc) en el HS/BMP2 están N-sulfatados. En algunas realizaciones esto puede ser uno de al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

En algunas realizaciones preferidas el HS/BMP2 está 6-O-sulfatado (O-sulfatación en el C6 de los restos de la *N*-sulfoglucosamina (GlcNS). Preferentemente, al menos el 80 % de los restos de *N*-sulfoglucosamina (GlcNS) en el HS/BMP2 están 6-O-sulfatados. En algunas realizaciones, esto puede ser uno de al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

El HS/BMP2 puede obtenerse, identificarse, aislarse o enriquecerse de acuerdo con la metodología de los inventores descrita en el presente documento, que puede comprender las siguientes etapas:

- (i) proporcionar un soporte sólido que tenga moléculas polipeptídicas adheridas al soporte, en el que el polipéptido comprenda un dominio de unión a heparina que tenga la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o: 1 o 6;
- (ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprenda glucosaminoglucanos de tal manera que puedan formarse complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
- (iii) separar los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano del resto de la mezcla;
- (iv) disociar los glucosaminoglucanos de los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
- 45 (v) recoger los glucosaminoglucanos disociados.

En la metodología de los inventores la mezcla puede comprender glucosaminoglucanos obtenidos de fuentes disponibles en el comercio. Una fuente adecuada es una fracción de heparán sulfato, por ejemplo, un heparán sulfato disponible en el comercio. Durante el aislamiento de heparina de mucosa intestinal de cerdo puede obtenerse una fracción adecuada de heparán sulfato (por ejemplo, de Celsus Laboratories Inc. – algunas veces denominado "HS Celsus"). Otras fuentes adecuadas de heparán sulfato incluyen heparán sulfato de cualquier mamífero (ser humano o no humano), particularmente del riñón, pulmón o mucosa intestinal. En una realizaciones el heparán sulfato es de mucosa intestinal, riñón o pulmón de cerdo (porcino) o de vaca (bovino). Otra fuente adecuada es material de la matriz extracelular de osteoblastos, o una fracción de heparán sulfato obtenida de material de la matriz extracelular de osteoblastos.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición que comprende HS/BMP2 de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores y la proteína BMP2.

En un aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica o un medicamento que comprende HS/BMP2 de acuerdo con los aspectos descritos anteriormente. La composición farmacéutica o el medicamento pueden comprender adicionalmente un transportador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones la composición farmacéutica es para su uso en un método de tratamiento, comprendiendo

el método la reparación y/o regeneración de un hueso roto. En algunas realizaciones la composición farmacéutica o el medicamento pueden comprender adicionalmente la proteína BMP2. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica o el medicamento pueden comprender adicionalmente células madre mesenquimales.

5 En otro aspecto de la presente invención se proporciona HS/BMP2 para su uso en un método de tratamiento médico. El método de tratamiento médico puede comprender un método de cicatrización de heridas *in vivo*, la reparación y/o regeneración de tejido conectivo, la reparación y/o regeneración de hueso y/o la reparación y/o regeneración de hueso en un mamífero o en un ser humano.

10 En un aspecto relacionado de la presente invención se proporciona el uso de HS/BMP2 en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento médico. En algunas realizaciones el método de tratamiento médico comprende la reparación y/o regeneración de un hueso roto en un mamífero o un ser humano.

15 En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un implante o prótesis biocompatible que comprende un biomaterial y HS/BMP2. En algunas realizaciones el implante o la prótesis se recubre con HS/BMP2. En algunas realizaciones el implante o la prótesis se impregna con HS/BMP2. El implante o la prótesis puede recubrirse o impregnarse adicionalmente con la proteína BMP2 y/o con células madre mesenquimales.

20 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para formar un implante o una prótesis biocompatible, comprendiendo el método la etapa de recubrir o impregnar el biomaterial con HS/BMP2. En algunas realizaciones el método comprende adicionalmente recubrir o impregnar el biomaterial con una o tanto con la proteína BMP2 como con células madre mesenquimales.

25 En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método de tratamiento de una fractura ósea en un paciente, comprendiendo el método la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de HS/BMP2. En algunas realizaciones, el método comprende administrar HS/BMP2 al tejido que rodea la fractura. En algunas realizaciones el método comprende inyectar HS/BMP2 al tejido que rodea la fractura. En dichos métodos el HS/BMP2 puede formularse como una composición farmacéutica o medicamento que comprende HS/BMP2 y un transportador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 En algunas realizaciones el método puede comprender adicionalmente administrar al paciente la proteína BMP2. En dichos métodos el HS/BMP2 y la proteína BMP2 pueden formularse como una composición farmacéutica que comprende el HS/BMP2 y la proteína BMP2 y un transportador adyuvante, diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 En algunas realizaciones el método puede comprender adicionalmente administrar al paciente células madre mesenquimales. En dichos métodos al menos dos de HS/BMP2, proteína BMP2 y células madre mesenquimales pueden formularse en una composición farmacéutica que comprenda al menos dos de HS/BMP2, proteína BMP2 y células madre mesenquimales y un transportador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 Preferentemente, el HS/BMP2, la proteína BMP2 y las células madre mesenquimales se proporcionan respectivamente en cantidades terapéuticamente eficaces. En algunas realizaciones el método de tratamiento de una fractura ósea comprende adicionalmente la etapa de formular cantidades terapéuticamente eficaces de HS/BMP2, y/o proteína BMP2 y/o células madre mesenquimales como una composición farmacéutica que comprenda el HS/BMP2, y/o la proteína BMP2 y/o las células madre mesenquimales y un transportador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que la composición farmacéutica se administra al paciente.

45 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de tratamiento de una fractura ósea en un paciente, comprendiendo el método implantar quirúrgicamente en el tejido del paciente o que rodea el sitio de la fractura, un implante o una prótesis biocompatible, cuyo implante o prótesis comprende un biomaterial y HS/BMP2.

50 En algunas realizaciones el implante o la prótesis se recubre con HS/BMP2. En algunas realizaciones el implante o prótesis se impregna con HS/BMP2. En algunas realizaciones el implante o la prótesis se impregna adicionalmente con una o tanto con la proteína BMP2 como con células madre mesenquimales.

55 En un aspecto adicional de la presente invención se proporcionan medios de cultivo, comprendiendo los medios de cultivo HS/BMP2.

60 En otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de HS/BMP2 en cultivo celular *in vitro*. En un aspecto relacionado de la presente invención se proporciona el uso de HS/BMP2 en el crecimiento del tejido conectivo *in vitro*. En otro aspecto relacionado de la presente invención se proporciona un método para cultivar tejido conectivo *in vitro*, comprendiendo el método cultivar células madre mesenquimales en contacto con HS/BMP2 añadido de manera exógena.

65 En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para promover la osteogénesis, comprendiendo el método administrar HS/BMP2 a células precursoras óseas o células madre óseas. El método puede implicar poner en contacto *in vitro* o *in vivo* células precursoras óseas o células madre óseas con HS/BMP2.

En algunas realizaciones, las células precursoras óseas o células madre óseas se ponen en contacto con la proteína BMP2 simultáneamente con HS/BMP2. En realizaciones preferidas las células precursoras ósea o las células madre óseas son células madre mesenquimales.

5 En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para la reparación, reemplazo o regeneración de tejido óseo en un paciente humano o animal que necesite dicho tratamiento, comprendiendo el método:

- 10 (i) cultivar células madre mesenquimales *in vitro* en contacto con HS/BMP2 durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células formen tejido óseo;
- (ii) recoger dicho tejido óseo;
- (iii) implantar dicho tejido óseo en el cuerpo del paciente en un sitio de lesión o enfermedad para reparar, reemplazar o regenerar tejido óseo en el paciente.

15 En algunas realizaciones el método comprende adicionalmente poner en contacto las células madre mesenquimales en cultivo con la proteína BMP2 exógena.

En otro aspecto de la presente divulgación se obtiene tejido óseo mediante cultivo *in vitro* de células madre mesenquimales en presencia de HS/BMP2. En algunas realizaciones el tejido óseo se obtiene por cultivo *in vitro* de células madre mesenquimales en presencia de HS/BMP2 y proteína BMP2.

20

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para cultivar células madre mesenquimales, comprendiendo el método cultivar células madre mesenquimales en contacto con HS/BMP2.

25 En otro aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona un kit de partes, comprendiendo el kit una cantidad predeterminada de HS/BMP2 y una cantidad predeterminada de BMP2. El kit puede comprender un primer envase que contenga una cantidad determinada de HS/BMP2 y un segundo envase que contenga la cantidad predeterminada de BMP2. Adicionalmente el kit puede comprender una cantidad predeterminada de células madre mesenquimales. El kit puede proporcionarse para su uso en un método de tratamiento médico. El método de tratamiento médico puede comprender un método de cicatrización de heridas *in vivo*, la reparación y/o la regeneración de tejido conectivo, la reparación y/o regeneración de hueso y/o la reparación y/o regeneración de hueso en un mamífero o un ser humano. El kit puede proporcionarse junto con instrucciones para la administración del HS/BMP2, la proteína BMP2 y/o las células madre mesenquimales, por separado, secuencialmente o de manera simultánea para proporcionar el tratamiento médico.

30

35

En un aspecto adicional de la presente divulgación se proporcionan productos, conteniendo los productos cantidades terapéuticamente eficaces de:

- 40 (i) HS/BMP2; y uno o ambas de
- (ii) la proteína BMP2;
- (iii) células madre mesenquimales,

para su uso simultáneo, separado o secuencial en un método de tratamiento médico. El método de tratamiento médico puede comprender un método de cicatrización de heridas *in vivo*, la reparación y/o regeneración de tejido conectivo, la reparación y/o regeneración de hueso y/o la reparación y/o regeneración de hueso en un mamífero o un ser humano. Opcionalmente los productos pueden formularse como una preparación combinada para la coadministración.

45

A continuación se exponen aspectos adicionales de la presente invención.

50 En un aspecto de la presente invención se proporciona un GAG que tiene alta afinidad de unión por BMP2. Más preferentemente el GAG es un heparán sulfato (HS). En una realización el HS se aísla de una mezcla de GAG obtenida de la matriz extracelular de osteoblastos siguiendo la metodología descrita en el presente documento en la que un polipéptido que comprendía el dominio de unión a heparina de BMP2 (SEC ID N^o: 1) se unió a un soporte sólido y se permitió formar complejos de GAG-polipéptido. La disociación del componente GAG de los complejos de GAG-polipéptido condujo al aislamiento de un solo HS denominado en el presente documento "HS/BMP2" (denominado a veces "HS-2" o "HS3").

55

En otra realización se usó la misma metodología para aislar HS/BMP2 de un heparán sulfato disponible en el comercio (HS Celsus) obtenido durante el aislamiento de heparina de mucosa intestinal de cerdo y disponible en Celsus Laboratorios Inc, Cincinnati, Estados Unidos (por ejemplo, INW-08-045, Heparán Sulfato I, Celsus Lab Inc, HO-03102, HO-10595, 10 x 100mg).

60

Por tanto, los inventores piensan que el HS/BMP2 puede obtenerse de fracciones de HS obtenidas de una pluralidad de fuentes, incluyendo de tejido de mamífero (de ser humano y no humano) y/o de la matriz extracelular.

65

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, se proporciona HS/BMP2. El HS/BMP2 se proporciona en forma aislada o purificada. En otro aspecto, se proporcionan medios de cultivos que comprenden HS/BMP2.

En otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica o un medicamento que comprende HS/BMP2, opcionalmente en combinación con un transportador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos pueden comprender adicionalmente la proteína BMP2. Las composiciones farmacéuticas o los medicamentos que comprenden HS/BMP2 se proporcionan para su uso en la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad. También se proporciona el uso de HS/BMP2 en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de prevención o tratamiento de lesión o enfermedad en un paciente que lo necesite, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad eficaz de HS/BMP2. El HS/BMP2 administrado puede formularse en una composición farmacéutica o medicamento adecuado y adicionalmente puede comprender un transportador, adyuvante o diluyente, farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición farmacéutica o el medicamento también pueden comprender la proteína BMP2.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para promover o inhibir *in vitro* la osteogénesis (la formación de células óseas y/o de tejido óseo) que comprende administrar HS/BMP2 a células precursoras óseas o a células madre óseas.

En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para promover o inhibir la formación de tejido cartilaginoso (condrogénesis), que comprende administrar HS/BMP2 a células precursoras de cartílago o a células madre cartilaginosas.

Los métodos para estimular o inhibir la osteogénesis o la formación de tejido cartilaginoso pueden realizarse *in vitro* poniendo en contacto células precursoras o células madre óseas o cartilaginosas con HS/BMP2, opcionalmente en presencia de proteína BMP2 añadida de manera exógena. Las células precursoras o células madre pueden ser células madre mesenquimales. Cuando se promueve la formación de tejido, el tejido formado puede recogerse y usarse para su implante en un paciente humano o en un animal.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente divulgación, se proporciona tejido conectivo en el que el tejido conectivo se obtiene mediante el cultivo *in vitro* de células madre mesenquimales en presencia de HS/BMP2 (es decir HS/BMP2 exógeno), y opcionalmente en presencia de BMP2 (es decir BMP2 exógena). El tejido conectivo puede ser de hueso, cartílago, músculo, grasa, ligamento o tendón.

La prevención o el tratamiento de enfermedades usando HS/BMP2 pueden implicar la reparación, regeneración o reemplazo de tejido, particularmente tejido conectivo, tal como de hueso, cartílago, músculo, grasa, ligamento o tendón.

En pacientes que tienen un deterioro de uno de estos tejidos, la administración de HS/BMP2 en el sitio del deterioro puede usarse para estimular el crecimiento, la proliferación y/o la diferenciación de tejido en ese sitio. Por ejemplo, la estimulación de células madre mesenquimales presentes en, o cerca del, sitio de administración, puede conducir, preferentemente cuando también está presente BMP2 en el sitio, a la proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales en el tejido conectivo apropiado, proporcionando de este modo el reemplazo/regeneración del tejido dañado y el tratamiento de la lesión.

Como alternativa, el tejido conectivo obtenido del cultivo *in vitro* de células madre mesenquimales en contacto con HS/BMP2, puede recogerse e implantarse en el sitio de lesión o enfermedad para reemplazar el tejido dañado o deteriorado. Opcionalmente, el tejido dañado o deteriorado puede extirparse primero del sitio de lesión o enfermedad.

En otro aspecto, puede proporcionarse una composición farmacéutica que contenga células madre, preferentemente células madre mesenquimales y HS/BMP2. La administración, por ejemplo, por inyección, de la composición en el sitio de lesión, enfermedad o deterioro, proporciona la regeneración de tejido en el sitio.

Por consiguiente, el HS/BMP2 es útil en la curación de heridas *in vivo*, incluyendo reparación, regeneración y/o reemplazo de tejido (por ejemplo, curación de tejido cicatricial o de un hueso roto) efectuado por aplicación directa al paciente que requiera el tratamiento de HS/BMP2, opcionalmente en combinación con BMP2 y/o con células madre. El HS/BMP2 es también útil en la generación *in vitro* de tejido adecuado para su implante en un paciente que necesite reparación, regeneración y/o reemplazo de tejido.

Los siguientes párrafos (párrs.) numerados contienen afirmaciones de combinaciones generales de las características técnicas inventivas desveladas en el presente documento:

1. Un método para aislar glucosaminoglucanos que pueden unirse a una proteína que tiene un dominio de unión a heparina, comprendiendo el método:

- 5 (i) proporcionar un soporte sólido que tenga moléculas polipeptídicas adheridas a un soporte, en el que el polipéptido comprenda un dominio de unión a heparina;
(ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprenda glucosaminoglucanos de tal manera que puedan formarse complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
(iii) separar los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano del resto de la mezcla;
10 (iv) disociar los glucosaminoglucanos de los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
(v) recoger los glucosaminoglucanos disociados.

2. Un método para identificar glucosaminoglucanos que puede estimular o inhibir el crecimiento y/o diferenciación de células y/o tejidos, comprendiendo el método:

- 15 (i) proporcionar un soporte sólido que tenga moléculas polipeptídicas adheridas al soporte, en el que el polipéptido comprenda un dominio de unión a heparina;
(ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprenda glucosaminoglucanos de tal manera que puedan formarse complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
20 (iii) separar los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano del resto de la mezcla;
(iv) disociar los glucosaminoglucanos de los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
(v) recoger los glucosaminoglucanos disociados;
(vi) añadir los glucosaminoglucanos recogidos a células o tejidos en los que esté presente una proteína que contenga la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina;
25 (vii) medir uno o más de: proliferación de las células, diferenciación de las células, expresión de uno o más marcadores de proteína/glicoproteína/glicolípidos.

3. El método del párrafo 1 o 2 en el que la mezcla que comprende glucosaminoglucanos contiene material de la matriz extracelular.

30 4. El método del párrafo 3 en el que el material de la matriz extracelular procede de tejido conectivo o de células de tejido conectivo.

35 5. El método de uno cualquiera de los párrafos 1 a 4 en el que la mezcla que comprende glucosaminoglucanos contiene uno o más de un dextrán sulfato, un condroitín sulfato, y un heparán sulfato.

6. El método de uno cualquiera de los párrafos 1 a 5 en el que la mezcla que comprende glucosaminoglucanos se ha enriquecido para uno de dextrán sulfato, condroitín sulfato, y heparán sulfato.

40 7. El método de uno cualquiera de los párrafos 1 a 6 en el que el método comprende adicionalmente someter los glucosaminoglucanos recogidos a análisis adicionales para determinar las características estructurales del GAG.

8. El método de uno cualquiera de los párrafos 1 a 7 en el que los complejos de glucosaminoglucano-polipéptido se ponen en contacto con una liasa.

45 9. El método de uno cualquiera de los párrafos 1 a 8 en el que el polipéptido es, o comprende, una de las SEC ID Nos: 1 o 2.

10. Heparán sulfato HS/BMP2.

50 11. Medios de cultivo que comprenden HS/BMP2.

12. Una composición farmacéutica o un medicamento que comprende HS/BMP2.

55 13. La composición farmacéutica o el medicamento del párrafo 12 que comprende adicionalmente un transportador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.

14. La composición farmacéutica o el medicamento del párrafo 12 o 13 que adicionalmente comprende la proteína BMP2.

60 15. Una composición farmacéutica o un medicamento de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 14 para su uso en la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad.

65 16. El uso de HS/BMP2 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad.

17. La composición farmacéutica o uso del párrafo 15 o 16 en el que la prevención o el tratamiento se seleccionan de: reparación, regeneración o reemplazo de tejido conectivo y curación de heridas.
- 5 18. Un método de prevención o tratamiento de lesión o enfermedad en un paciente que necesita el tratamiento, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad eficaz de HS/BMP2.
19. El método del párrafo 18 en el que el HS/BMP2 administrado se formula como una composición farmacéutica o un medicamento.
- 10 20. El método del párrafo 19 en el que la composición farmacéutica o el medicamento comprende adicionalmente la proteína BMP2.
21. Un método para promover o inhibir la osteogénesis que comprende administrar HS/BMP2 a células precursoras óseas o a células madre óseas.
- 15 22. El método del párrafo 21 en el que las células precursoras óseas o células madre óseas se ponen en contacto *in vitro* con HS/BMP2.
23. El método del párrafo 21 en el que las células precursoras óseas o células madre óseas se ponen en contacto *in vivo* con HS/BMP2.
- 20 24. El método de uno cualquiera de los párrafos 21 a 23 en el que las células precursoras óseas o células madre óseas se ponen en contacto con BMP2 simultáneamente con HS/BMP2.
- 25 25. Un método para promover o inhibir la formación de tejido cartilaginoso que comprende administrar HS/BMP2 a células precursoras cartilaginosas o células madre cartilaginosas.
26. El método del párrafo 25 en el que las células precursoras cartilaginosas o células madre cartilaginosas se ponen en contacto *in vitro* con HS/BMP2.
- 30 27. El método del párrafo 25 en el que las células precursoras cartilaginosas o células madre cartilaginosas se ponen en contacto *in vivo* con HS/BMP2.
28. El método de uno cualquiera de los párrafos 25 a 27 en el que las células precursoras cartilaginosas o células madre cartilaginosas se ponen en contacto con BMP2 simultáneamente con HS/BMP2.
- 35 29. Un método para la reparación, reemplazo o regeneración de tejido conectivo en un paciente humano o animal que necesite dicho tratamiento, comprendiendo el método:
- 40 (i) cultivar *in vitro* células madre mesenquimales en contacto con HS/BMP2 durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células formen tejido conectivo;
- (ii) recoger dicho tejido conectivo;
- (iii) implantar dicho tejido conectivo en el cuerpo del paciente en el sitio de lesión o enfermedad para reparar, reemplazar o regenerar tejido conectivo en el paciente.
- 45 30. El método del párrafo 29 que comprende adicionalmente poner en contacto las células mesenquimales en cultivo con BMP2 exógena.
31. Tejido conectivo obtenido por cultivo *in vitro* de células madre mesenquimales en presencia de HS/BMP2.
- 50 32. Tejido conectivo como se indica en el párrafo 31, en el que las células mesenquimales se cultivan en presencia de BMP2 exógena y opcionalmente en presencia de BMP2.
33. Una composición farmacéutica que comprende células madre y HS/BMP2.
- 55 34. La composición farmacéutica del párrafo 32 en el que las células madre son células madre mesenquimales.
35. La composición farmacéutica de los párrafos 33 o 34 en el que la composición comprende adicionalmente BMP2.
- 60 36. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los párrafos 33 a 35 para su uso en el tratamiento de lesión o enfermedad.
- 65 37. Un método para el tratamiento de lesión o enfermedad en un paciente que necesite el tratamiento que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende células madre y HS/BMP2.

38. El método del párrafo 37 en el que las células madre son células madre mesenquimales.

39. El método del párrafo 37 o 38 en el que el método comprende adicionalmente administrar BMP2 al paciente.

5 40. El uso de HS/BMP2 en el crecimiento de tejido conectivo *in vitro*.

41. Un método para el crecimiento de tejido conectivo *in vitro* que comprende cultivar células madre mesenquimales en contacto con HS/BMP2 añadido de manera exógena.

10 42. Un implante biológico que comprende un material de matriz sólido o semisólido impregnado con HS/BMP2.

43. El implante biológico del párrafo 42 adicionalmente impregnado con BMP2.

15 44. El implante biológico del párrafo 42 o 43 adicionalmente impregnado con células madre mesenquimales.

45. Un kit que comprende una cantidad predeterminada de un glucosaminoglucano que tiene alta afinidad por una proteína que tiene un dominio de unión a heparina y una cantidad predeterminada de dicha proteína.

20 46. El kit del párrafo 45 en el que el glucosaminoglucano es HS/BMP2 y la proteína es BMP2.

Descripción de realizaciones preferidas

HS/BMP2

25 La presente invención se refiere a HS/BMP2, que es obtenible por métodos de enriquecimiento de mezclas de compuestos que contienen uno o más GAG que se unen a un polipéptido que corresponde al dominio de unión a heparina de BMP2. El proceso de enriquecimiento puede usarse para aislar HS/BMP2.

30 La presente invención también se refiere a mezclas de compuestos enriquecidos con HS/BMP2, y a métodos de uso de dichas mezclas.

Se piensa que HS/BMP2 potencia (por ejemplo, agoniza) la actividad de BMP-2 y por lo tanto su capacidad para estimular la proliferación de células madre y la formación de hueso.

35 Además de ser obtenible por la metodología descrita en el presente documento, el HS/BMP2 también puede definirse funcional y estructuralmente.

40 Funcionalmente, el HS/BMP2 puede unirse a un péptido que tiene, o que consta de, la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o: 1 a 6. Preferentemente, el HS/BMP2 se une al péptido de SEC ID N^o: 1 o 6 con una K_D menor de 100 μM, más preferentemente menor de una de 50 μM, 40 μM, 30 μM, 20 μM o 10 μM.

45 Preferentemente, el HS/BMP2 también se une a la proteína BMP2 con una K_D menor de 100 μM, más preferentemente menor de una de 50 μM, 40 μM, 30 μM, 20 μM o 10 μM. La unión entre HS/BMP2 y la proteína BMP2 puede determinarse mediante el siguiente método ensayo.

50 La BMP2 se disuelve en Solución Bloqueante (gelatina al 0,2 % en SAB) a una concentración de 3 μg/ml y se establece una serie de diluciones de 0-3 μg/ml en Solución Bloqueante. Se distribuyen 200 μl de cada dilución de BMP2 en pocillos por triplicado de Placas de Unión a Heparina/GAG previamente cubiertas con heparina; se incuba durante 2 h a 37 °C, se lava cuidadosamente tres veces con SAB y en la Solución Bloqueante se añaden 200 μl de anti-BMP2 biotinilado 250 ng/ml. Se incuba durante una hora a 37 °C, se lava cuidadosamente tres veces con SAB, se añaden 200 μl de ExtrAvidina-AP 220 ng/ml en la Solución Bloqueante. Se incuba durante 30 min a 37 °C, se lava cuidadosamente tres veces con SAB y se golpea ligeramente para retirar el líquido residual, se añaden 200 μl de Reactivo de Desarrollo (p-Nitrofenil fosfato de SigmaFAST). Se incuba a temperatura ambiente durante 40 minutos con una lectura de absorbancia a 405 nm al cabo de una hora.

55 En este ensayo, la unión puede determinarse midiendo la absorbancia y puede determinarse con respecto a controles tales como proteína BMP2 en ausencia de heparán sulfato añadido, o proteína BMP2 a la cual se añade un heparán sulfato que no se una a la proteína BMP2.

60 La unión de HS/BMP2 es preferentemente específica, a diferencia de la unión inespecífica y en el contexto, el HS/BMP2 puede seleccionarse de otros heparán sulfatos y/o GAG mediante un método que implica la selección de heparán sulfatos que presentan una interacción de unión de alta afinidad con el péptido de SEC ID N^o: 1 o 6 o con la proteína BMP2.

65 El HS/BMP2 de acuerdo con la presente invención potencia preferentemente la actividad de la Fosfatasa Alcalina

(ALP) inducida por BMP2 en células de la línea celular C2C12 de mioblasto de ratón a un mayor grado que la potenciación obtenida por la adición de cantidades correspondientes de proteína BMP2 o solo Heparina. Preferentemente también potencia la actividad ALP inducida por BMP2 en células C2C12 a un mayor grado que el inducido por la adición combinada de cantidades correspondientes de proteína BMP2 y heparina, o de proteína BMP2 y un heparán sulfato que no se une a la proteína BMP2 con alta afinidad (por ejemplo con referencia a la Figura 46).

La potenciación de la actividad ALP puede medirse realizando el siguiente ensayo ALP. Células C2C12 se siembran en placas a 20.000 células/cm² en una placa de 24 pocillos en DMEM (por ejemplo Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) que contiene FCS al 10 % (por ejemplo Lonza Group Ltd., Suiza) y antibióticos (Penicilina al 1 % y Estreptomocina al 1 %) (por ejemplo, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) a 37 °C/CO₂ al 5 %. Después de 24 horas, el medio de cultivo se cambia a medio de bajo contenido en suero FCS al 5 % que contiene diferentes combinaciones de BMP2 100 ng/ml (por ejemplo, R&D Systems, Minneapolis, MN), HS Celsus 3 mg/ml y diversas concentraciones de preparaciones de HS Celsus específico (HS +vo) y no específico (HS-vo) de BMP2. La lisis celular se realiza después de 3 días usando tampón RIPA que contiene Tritón X-100 al 1 %, NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, Igepal al 0,5 % (NP40), dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1 % y Cóctel de Inhibidor de Proteasa al 1 % SET III (Calbiochem, Alemania). El contenido proteico del lisado celular se determina usando el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). La actividad ALP en los lisados celulares se determina después incubando los lisados celulares con sustrato de *p*-nitrofenilfosfato (Invitrogen, Carlsbad, CA). La lectura se normaliza a cantidad de proteína total y se presenta como cantidad relativa para el grupo que contiene solo el tratamiento con BMP2.

La potenciación de la actividad ALP en células C2C12 también puede seguirse con técnicas inmunohistoquímicas, tales como el siguiente protocolo de tinción con ALP, ilustrado en la Figura 47. Tinción con ALP. Células C2C12 se cultivan como se describe en la metodología de ensayo que acaba de describirse. Después de 3 días de tratamiento, la capa celular se lava en PBS y se tiñe usando el Kit de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria (por ejemplo, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La capa celular se fija en acetona al 60% tamponada con citrato y se tiñe en una mezcla de colorante alcalino que contiene Fosfatasa Alcalina con Naftol AS-MX y sal de diazonio. La tinción nuclear se realiza usando solución de Hexamotxilina de Mayer.

Estas técnicas pueden usarse para identificar el HS/BMP2 como un heparán sulfato que potencia un mayor grado de actividad ALP inducida por la proteína BMP2 en células C2C12 en comparación con heparán sulfatos inespecíficos, por ejemplo heparán sulfatos que no se unen a la proteína BMP-2.

El HS/BMP2 de acuerdo con la presente invención también prolonga los efectos de señalización de BMP2 a niveles que igualan o superan a los de la heparina. Esto puede evaluarse mediante el siguiente ensayo. Células C2C12 se exponen (i) a nada, (ii) solo a BMP2, (iii) a BMP2 + Heparina o (iv) a BMP2 + HS/BMP2 durante 72 horas y los niveles de fosforilación de la molécula de señalización intracelular específica de BMP2 Smad1/5/8 se controlan por inmunotransferencia.

Una propiedad funcional importante de HS/BMP2 es su capacidad para potenciar el proceso de reparación ósea, particularmente en sujetos mamíferos. Esto puede ensayarse en un modelo de reparación ósea, tal como el que se describe en los Ejemplos 8 y 9, en el que se compara la velocidad y la calidad de la reparación ósea en animales control (por ejemplo animales que no reciben HS o animales que reciben un HS que no se une a la proteína BMP2 o al péptido de SEC ID N°: 1 o 6) y en animales tratados con HS/BMP2. La velocidad y calidad de la reparación ósea puede evaluarse analizando la generación de volumen óseo en el sitio de la herida a lo largo del tiempo, por ejemplo, por rayos X y análisis de formación de imágenes microCT de la herida.

Estructuralmente, se ha descubierto que la *N*-sulfatación de los restos de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) en HS/BMP2 es importante en cuanto al mantenimiento de la afinidad de unión por la proteína BMP2. Se mostró que la *N*-desulfatación conducía a una reducción significativa en la afinidad de unión por la proteína BMP2 (Figura 49).

También se descubrió que la 6-*O*-sulfatación (*O*-sulfatación en C6) de restos de *N*-sulfoglucosamina (GlcNS) tenía significación moderada en cuanto al mantenimiento de la afinidad de unión por la proteína BMP2. La 6-*O*-desulfatación conducía a alguna reducción en la afinidad de unión por la proteína BMP2 (Figura 49).

Se descubrió que la 2-*O*-sulfatación (*O*-sulfatación en C2) de restos de IdoA y/o ácido *D*-glucurónico (GlcA) no afectaba a la unión de la proteína BMP2. Por tanto, el HS/BMP2 puede estar opcionalmente 2-*O*-sulfatado o 2-*O*-desulfatado.

La composición de disacáridos de HS/BMP2 se muestra en la Figura 43. El HS/BMP2 según la presente invención incluye heparán sulfato que tiene una composición de disacáridos de ± 10 % (más preferentemente \pm una de 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %) de los valores mostrados para cada disacárido en la Figura 43 en la columna titulada "HS Específico de BMP2" y que presenta mayor afinidad de unión con la proteína BMP2 o el péptido de SEC ID N°: 1 o 6, como se describe en esta memoria descriptiva.

También se ilustran las diferencias estructurales del HS/BMP2 comparadas las de los heparán sulfatos que no se unen a la proteína BMP2, realizando análisis de resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, la curva de desplazamiento de ángulo ilustrada en la Figura 44 puede usarse para diferenciar el HS/BMP2 de otros heparán sulfatos.

Adicionalmente se ilustran las diferencias estructurales del HS/BMP2 comparadas con las de los heparán sulfatos que no se unen a la proteína BMP2 realizando cromatografía líquida a alta presión de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC). La Figura 40 ilustra el espectro SAX-HPLC de HS/BMP2, que puede compararse con los espectros SAX-HPLC de heparán sulfatos que no se unen a la proteína BMP2 (Figuras 41 y 42).

Para identificar el HS/BMP2 los inventores idearon un método que implicaba el enriquecimiento de moléculas de glucosaminoglucano que presentan unión a polipéptidos particulares que tienen un dominio de unión a heparina. Después, las mezclas y/o las moléculas de GAG aisladas pueden identificarse y ensayar su capacidad para modular el crecimiento y la diferenciación de células y tejidos que expresan una proteína que contiene el dominio de unión a heparina. Esto permite realizar análisis controlados del efecto de secuencias de sacáridos de GAG particulares sobre el crecimiento y la diferenciación de células y tejidos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los inventores aplicaron esta metodología a la Proteína Morfogenética Ósea 2 (BMP2) para aislar y caracterizar los GAG que tienen alta unión a BMP2.

Por consiguiente, para identificar el HS/BMP2 los inventores proporcionaron un método para aislar glucosaminoglucanos capaces de unirse a proteínas que tienen dominios de unión a heparina/heparán, comprendiendo el método:

- (i) proporcionar un soporte sólido que tenga moléculas polipeptídicas adheridas al soporte, en el que polipéptido comprenda un dominio de unión a heparina;
- (ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprenda glucosaminoglucanos de tal manera que puedan formarse complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
- (iii) separar los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano del resto de la mezcla;
- (iv) disociar los glucosaminoglucanos de los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
- (v) recoger los glucosaminoglucanos disociados.

Los inventores también proporcionan glucosaminoglucanos aislados, identificados por su capacidad para modular el crecimiento o la diferenciación de células o tejidos. Para hacer esto, proporcionan un método de identificación de glucosaminoglucanos que podían estimular o inhibir el crecimiento y/o la diferenciación de células y/o tejidos, comprendiendo el método:

- (i) proporcionar un soporte sólido que tenga moléculas polipeptídicas adheridas al soporte, en el que el polipéptido comprenda un dominio de unión a heparina;
- (ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprenda glucosaminoglucanos de tal manera que puedan formarse los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
- (iii) separar los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano del resto de la mezcla;
- (iv) disociar los glucosaminoglucanos de los complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
- (v) recoger los glucosaminoglucanos disociados.
- (vi) añadir los glucosaminoglucanos recogidos a células o tejidos en los que esté presente una proteína que contenga la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina;
- (vii) medir uno o más de: proliferación de las células, diferenciación de las células, expresión de uno o más marcadores de proteína.

Los inventores usaron estos métodos para identificar un GAG capaz de unirse a BMP2 (que denominaron HS/BMP2 o HS3 o HS-3), en el que el polipéptido usado en la metodología de los inventores comprende el dominio de unión a heparina de la SEC ID N^o: 1 o 6, obtenido de la secuencia de aminoácidos de BMP2.

En la metodología de los inventores, la mezcla que comprende los GAG puede contener glucosaminoglucanos sintéticos. Sin embargo, se prefieren GAG obtenidos de células o tejidos. Por ejemplo, la mezcla puede contener matriz extracelular en la que el material de la matriz extracelular se obtiene raspando tejido vivo *in situ* (es decir directamente del tejido del cuerpo del ser humano o animal del cual se obtiene) o raspando tejido (vivo o muerto) que se ha extraído del cuerpo de un ser humano o animal. Como alternativa, el material de la matriz extracelular puede obtenerse de células que se crecen en cultivo. El material de la matriz extracelular puede obtenerse de tejido conectivo o de células del tejido conectivo, por ejemplo, hueso, cartílago, músculo, grasa, ligamento o tendón. Para el aislamiento del HS/BMP2, una fuente adecuada de material de la matriz extracelular son los osteoblastos, tales como células MC3T3 de ratón.

El componente GAG puede extraerse de una muestra o extracto de tejido o célula mediante una serie de etapas de separación rutinarias (por ejemplo cromatografía de intercambio aniónico), bien conocidas por los expertos en la materia.

Las mezclas de GAG pueden contener una mezcla de diferentes tipos de glucosaminoglucano, que pueden incluir dextrán sulfatos, condroitín sulfatos y heparán sulfatos. Preferentemente, la mezcla de GAG en contacto con el soporte sólido está enriquecida en heparán sulfato. Una fracción de GAG enriquecida en heparán sulfato puede obtenerse realizando cromatografía en columna en la mezcla de GAG, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico débil, media o fuerte, así como cromatografía líquida a alta presión fuerte (SAX-HPLC), con selección de la fracción apropiada.

Los GAG recogidos pueden someterse a análisis adicional para identificar el GAG, por ejemplo, determinar la composición o secuencia de GAG, o determinar características estructurales del GAG. La estructura del GAG es típicamente muy compleja, y, teniendo en cuenta las técnicas analíticas de las que se dispone actualmente, en la mayoría de los casos no es posible realizar determinaciones con exactitud de la estructura de secuencia del GAG.

Sin embargo, las moléculas de GAG recogidas pueden someterse a digestión de sacáridos parcial o completa (por ejemplo, químicamente mediante ácido nítrico o enzimáticamente con liasas, tal como heparinasa III) para producir fragmentos de sacáridos que son tanto característicos como diagnósticos del GAG. En particular, puede usarse digestión para producir disacáridos (o tetrasacáridos) para medir el porcentaje de cada disacárido obtenido que proporcionará una "huella" de disacárido característica del GAG.

El patrón de sulfatación del GAG también puede determinarse y usarse para determinar la estructura del GAG. Por ejemplo, para el heparán sulfato puede usarse el patrón de sulfatación en los aminoazúcares y en las posiciones C2, C3 y C6 para caracterizar el heparán sulfato.

Los análisis de disacáridos, tetrasacáridos y de sulfatación pueden usarse junto con otras técnicas analíticas, tales como HPLC, espectrometría de masas y RMN, pudiendo proporcionar cada una de ellas espectros exclusivos del GAG. En combinación, estas técnicas pueden proporcionar una caracterización estructural definitiva del GAG.

Una interacción de unión de alta afinidad entre el GAG y el dominio de unión a heparina indica que el GAG contendrá una secuencia de sacáridos específica que contribuye a la interacción de unión de alta afinidad. Una etapa adicional puede comprender la determinación de la secuencia completa o parcial de sacáridos del GAG, o de la parte clave del GAG, implicada en la interacción de unión.

Los complejos de GAG-polipéptido pueden someterse a tratamiento con un agente que produzca la lisis de las cadenas de los glucosaminoglucanos, por ejemplo, una liasa. El tratamiento con liasa puede escindir partes del GAG unido que no participan en la interacción de unión con el polipéptido. Las partes del GAG que participan en la interacción de unión con el polipéptido pueden protegerse de la acción de la liasa. Después de retirar la liasa, por ejemplo, tras una etapa de lavado, la molécula de GAG que permanece unida al polipéptido representa el compañero de unión específico ("ligando GAG") del polipéptido. Debido a la menor complejidad de las moléculas de GAG más pequeñas, después de la disociación y recogida del ligando GAG, puede esperarse un mayor grado de caracterización estructural del ligando GAG. Por ejemplo, la combinación de cualquiera de los análisis de secuencias de sacáridos (es decir la secuencia (linear) primaria de monosacáridos contenida en el ligando GAG), patrón de sulfatación, digestión de disacáridos y/o tetrasacáridos, espectros de RMN, espectros de espectrometría de masas y espectros de HPLC, puede proporcionar un alto nivel de caracterización estructural del ligando GAG.

Como se usa en el presente documento, los términos "enriquecer", "enriquecimiento", "enriquecido", etc., describen un proceso (o estado) mediante el cual la composición relativa de una mezcla se altera (o se ha alterado) de tal manera que la fracción de esa mezcla proporcionada por una o más de estas entidades está aumentada, mientras que la fracción de esa mezcla proporcionada por una o más entidades diferentes está disminuida.

Los GAG aislados por enriquecimiento pueden ser puros, es decir, solo contienen sustancialmente un tipo de GAG, o pueden continuar siendo una mezcla de diferentes tipos de GAG, teniendo la mezcla una mayor proporción de GAG particulares que se unen al dominio de unión a heparina con respecto a la mezcla de partida.

Los GAG identificados presentan preferentemente un efecto funcional cuando se ponen en contacto con células o tejidos en los que se expresa o está incluida una proteína en contacto con el dominio de heparina. El efecto funcional puede ser un efecto modulador o potenciador.

El efecto funcional puede ser promover (estimular) o inhibir la proliferación de las células de un determinado tipo o la diferenciación de un tipo de célula en otro, o la expresión de uno o más marcadores de proteína. Por ejemplo, los GAG pueden promover la proliferación celular, es decir, un aumento en el número de células, o promover la diferenciación de células madre en tipos de células especializadas (por ejemplo, células madre mesenquimales en tejido conectivo), promover o inhibir la expresión de marcadores de proteína indicativos del estado de multipotencia o diferenciación de las células (por ejemplo, marcadores tales como, la actividad de la fosfatasa alcalina, la detección de RUNX2, osterix, colágeno I, II, IV, VII, X, osteopontina, Osteocalcina, BPSII, SOX9, Agrecano, ALBP, CCAAT/proteína α de unión a potenciador (C/EBP α), proteína de unión a lípidos de adipocito (ALBP), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea 2, (BSPII), Colágeno 2a1 (Coll2a) y SOX9).

Como se usa en el presente documento, la expresión “efecto modulador” se entiende que significa el efecto que una primera entidad tiene sobre una segunda entidad en el que la presencia de la primera entidad modifica la función normal de la segunda entidad en otro proceso o procesos. El efecto modulador puede ser agonista o antagonista.

5 El efecto modulador puede ser un efecto potenciador. La expresión “efecto potenciador” se entiende que significa el efecto de aumentar la potencia. En una realización preferida de la presente invención, la expresión “efecto potenciador” se refiere al efecto que una primera entidad tiene sobre una segunda entidad, cuyo efecto aumenta la potencia de la segunda entidad en otro proceso o procesos. En una realización preferida adicional de la presente invención, el efecto potenciador se entiende que significa el efecto de los GAG aislados sobre un factor de unión a heparina, en el que dicho efecto aumenta la potencia de dicho factor de unión a heparina.

10 El efecto potenciador puede ser un aumento de la biodisponibilidad del factor de unión a heparina. En una realización preferida de la presente invención, el efecto potenciador es un aumento de la biodisponibilidad de BMP2. Un método para medir un aumento de la biodisponibilidad del factor de unión a heparina es a través de la determinación de un aumento de la concentración local del factor de unión a heparina.

15 El efecto potenciador puede ser proteger de la degradación al factor de unión a heparina. En una realización especialmente preferida de la presente invención, el efecto potenciador es proteger a BMP-2 de la degradación. Un método para determinar una disminución en la degradación del factor de unión a heparina es a través de la medición de un aumento en la semivida del factor de unión a heparina.

El efecto potenciador puede ser secuestrar factores de unión a heparina fuera de los receptores celulares o puede ser estabilizar la interacción entre el ligando y el receptor.

20 El efecto potenciador (por ejemplo, modulación de crecimiento o diferenciación) puede determinarse mediante el uso de ensayos apropiados. Por ejemplo, el efecto que un HS tiene sobre la estabilidad de BMP-2 puede determinarse por ELISA. El efecto que un HS tiene sobre la actividad de BMP-2 puede determinarse midiendo la activación/expresión de uno o más de SMAD 1, 5 u 8 o midiendo la expresión de uno o más genes marcadores osteogénicos tales como Runx2, fosfatasa alcalina, Osterix, Osteocalcina y BSP1, o midiendo los niveles de mineralización usando tinción tal como Rojo de Alizarina y de von Kossa.

25 Como se usa en el presente documento, el proceso de ‘poner en contacto’ implica poner en estrecha proximidad física una o más entidades distintas. El proceso de ‘poner en contacto’ implica poner en estrecha proximidad dos o más entidades distintas durante un tiempo, y en condiciones suficientes para permitir que una parte de estas dos o más entidades distintas interaccionen a un nivel molecular. Preferentemente, como se usa en el presente documento, el proceso de ‘poner en contacto’ implica poner en estrecha proximidad la mezcla de compuestos que posee uno o más GAG y el polipéptido correspondiente al dominio de unión a heparina de un factor de unión a heparina. Los ejemplos de procesos de ‘puesta en contacto’ incluyen mezcla, disolución, hinchamiento, lavado. En realizaciones preferidas el ‘contacto’ de la mezcla de GAG y polipéptido es suficiente para formar complejos, que pueden estar unidos por enlace covalente pero que preferentemente es por enlace no covalente, entre los GAG y los polipéptidos que presenten alta afinidad entre sí.

30 El polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos primaria de longitud completa o casi completa de una proteína seleccionada que tenga un dominio de unión a heparina. Debido al plegamiento que puede producirse en polipéptidos más largos, lo que conduce a una posible ocultación del dominio de unión a heparina de la mezcla de GAG, se prefiere que el polipéptido sea corto. Preferentemente, el polipéptido tendrá una secuencia de aminoácidos que incluya el dominio de unión a heparina y que opcionalmente incluya uno o más aminoácidos en uno o en cada uno de los extremos N y C de los péptidos. Estos aminoácidos adicionales pueden permitir la adición al polipéptido de moléculas enlazadoras o de unión que son necesarias para unir el polipéptido al soporte sólido.

35 En realizaciones preferidas de la metodología de los inventores, además del número de aminoácidos en el dominio de unión a heparina el polipéptido contiene 1-20, más preferentemente 1-10, aún más preferentemente 1-5 aminoácidos adicionales. En algunas realizaciones la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina representa al menos el 80 % de los aminoácidos del polipéptido, más preferentemente al menos el 90 %, aún más preferentemente al menos el 95 %.

40 Para unir polipéptidos a la superficie de un soporte sólido los polipéptidos se modifican preferentemente para incluir una etiqueta molecular y la superficie del soporte sólido se modifica para incorporar una sonda molecular correspondiente que tenga alta afinidad por la etiqueta molecular, es decir, la etiqueta molecular y la sonda forman un par de unión. La etiqueta y/o sonda pueden seleccionarse de uno cualquiera de: un anticuerpo, un receptor celular, un ligando, biotina, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de lo anterior o cualquier otra estructura con la que pueda diseñarse o configurarse una sonda para unirse o, de otra manera, asociarse con especificidad. Un par de unión preferido adecuado para su uso como etiqueta y sonda es la biotina y la avidina.

65

El polipéptido se obtiene de la proteína de interés, que en el presente caso es la BMP-2. Por “se obtiene de” se entiende que el polipéptido se escoge, se selecciona o se prepara porque contiene la secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a heparina que está presente en la proteína de interés. La secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina puede modificarse del que aparece en la proteína de interés, por ejemplo, para investigar el efecto de cambios en la secuencia del dominio de unión a heparina sobre la unión al GAG.

En esta memoria descriptiva la proteína es BMP2. La secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina preferida de BMP2 es QAKHKQRKRLKSSCKRHP (SEC ID N°: 1), que se encuentra en los aminoácidos 283-300 de la SEC ID N°: 2 (Figura 35) o QAKHKQRKRLKSSCKRH (SEC ID N°: 6) que se encuentra en los aminoácidos 283-299 de la SEC ID N°: 2.

Los expertos en la técnica entienden que pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido particular pueden permitir que se conserve la funcionalidad intrínseca de esa parte. También se entiende que la sustitución de determinados restos de aminoácidos en un péptido por otros restos de aminoácidos que son isostéricos y/o isoelectrónicos puede conservar o mejorar determinadas propiedades del péptido no sustituido. Estas variaciones también se incluyen en el ámbito de la presente invención. Por ejemplo, el aminoácido alanina puede sustituirse algunas veces por el aminoácido glicina (y viceversa) conservando al mismo tiempo una o más de las propiedades del péptido. El término ‘isostérico’ se refiere a una similitud espacial entre dos entidades. Dos ejemplos de porciones que son isostéricas a temperaturas moderadamente elevadas son los grupos *iso*-propilo y *terc*-butilo. El término ‘isoelectrónico’ se refiere a una similitud electrónica entre dos entidades, siendo un ejemplo el caso en el que dos entidades poseen una funcionalidad del mismo valor pKa o similar.

El polipéptido correspondiente al dominio de unión a heparina puede ser sintético o recombinante.

El soporte sólido puede ser cualquier sustrato que tenga una superficie a la cual puedan unirse las moléculas, directa o indirectamente, a través de enlaces covalentes o no covalentes. El soporte sólido puede incluir cualquier material sustrato que sea capaz de proporcionar soporte físico a las sondas que se unen a la superficie. Este puede ser un soporte de matriz. El material es generalmente capaz de soportar condiciones relacionadas con la unión de las sondas a la superficie y cualquier tratamiento, manipulación, o procesamiento posterior encontrado durante la realización de un ensayo. Los materiales pueden ser de origen natural, sintético, o una modificación de un material de origen natural. El soporte sólido puede ser un material de plástico (incluyendo polímeros tales como, por ejemplo, copolímeros de poli(cloruro de vinilo) ciclo-olefina, poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), politetrafluoroetileno (PTFE o Teflon®), nylon, poli(butirato de vinilo)), etc., bien usados ellos mismos o junto con otros materiales. Pueden considerarse materiales rígidos adicionales, tales como vidrio, que incluyan sílice y que adicionalmente incluyan, por ejemplo, vidrio que se encuentra disponible como Bioglass. Otros materiales que pueden emplearse incluyen materiales porosos, tales como, por ejemplo, perlas de vidrio de poro controlado. También se contempla cualquier otro material conocido en la técnica que, en su superficie pueda tener uno o más grupos funcionales, tales como uno de un grupo amino, carboxilo, tiol o hidroxilo funcional.

Los soportes sólidos preferidos incluyen columnas que tienen un polipéptido inmovilizado en una superficie de la columna. La superficie puede ser una pared de la columna, y/o puede proporcionarse con perlas compactadas en el espacio central de la columna.

El polipéptido puede inmovilizarse en el soporte sólido. Los ejemplos de métodos de inmovilización incluyen: adsorción, unión covalente, atrapamiento y confinamiento en membranas. En una realización preferida de la presente invención la interacción entre el polipéptido y la matriz es sustancialmente permanente. En una realización preferida adicional de la presente invención, la interacción entre el péptido y la matriz es adecuadamente inerte para cromatografía de intercambio iónico. En una disposición preferida, el polipéptido está unido a la superficie del soporte sólido. Se entiende que un experto en la técnica tendría una gran variedad de opciones para elegir unir química y/o físicamente dos entidades entre sí. Todas estas opciones se incluyen en el ámbito de la presente invención. En una disposición preferida, el polipéptido se adsorbe a un soporte sólido a través de la interacción de biotina con estreptavidina. En un ejemplo representativo de esta disposición, una molécula de biotina se une por enlace covalente con el polipéptido, después de lo cual el conjugado biotina-polipéptido se une a estreptavidina, que a su vez, se une por enlace covalente a un soporte sólido. En otra disposición, puede usarse una porción espaciadora o enlazadora para conectar la molécula de biotina con el polipéptido, y/o a la estreptavidina con la matriz.

Poniendo en contacto la mezcla de GAG con el soporte sólido pueden formarse complejos de GAG- polipéptido. Éstos se separan del resto de la mezcla retirando el resto de la mezcla del soporte sólido, por ejemplo, lavando el soporte sólido para eludir los materiales no unidos. Cuando se usa una columna como soporte sólido los componentes de la mezcla de GAG que no se unen pueden eluirse de la columna dejando los complejos de GAG-polipéptido unidos a la columna.

Se entiende que determinados oligosacáridos pueden interactuar de una manera inespecífica con el polipéptido. En determinadas realizaciones, los oligosacáridos que interactúan con el polipéptido de una manera inespecífica

5 pueden incluirse, o excluirse de la mezcla de compuestos enriquecidos con uno o más GAG que modulan el efecto de un factor de unión a heparina. Un ejemplo de una interacción inespecífica es el confinamiento temporal dentro de un bolsillo de una molécula dimensionada y/o conformada adecuadamente. Adicionalmente se entiende que estos oligosacáridos pueden eluirse más lentamente que los oligosacáridos que de ningún modo presentan interacción con el péptido. Además se entiende que los compuestos que se unen inespecíficamente pueden no requerir la entrada del mismo estímulo externo para hacer que se eluyan al igual que aquellos compuestos que se unen de una manera específica (por ejemplo a través de una interacción iónica). La metodología de los inventores puede separar una mezcla de oligosacáridos en aquellos componentes de esa mezcla que: se unen de una manera específica con el polipéptido; aquellos que se unen de una manera inespecífica con el polipéptido; y aquellos que no se unen con el polipéptido. Estas denominaciones se definen de un modo operativo para cada par de GAG-péptido.

10 Modificando las condiciones (por ejemplo, la concentración salina) presentes en la superficie del soporte sólido donde se produce la unión del GAG y el polipéptido, pueden seleccionarse los GAG que tengan la mayor afinidad y/o especificidad por el dominio de unión a heparina.

15 Por consiguiente pueden obtenerse GAG que tengan una alta afinidad de unión por una proteína de interés y/o por el dominio de unión a heparina de la proteína de interés. La afinidad de unión (K_d) puede seleccionarse de una de: menos de 10 μ M, menos de 1 μ M, menos de 100 nM, menos de 10 nM, menos de 1 nM, menos de 100 pM.

20 Los GAG obtenidos por los métodos descritos pueden ser útiles en diversas aplicaciones, *in vitro* y/o *in vivo*. Los GAG pueden proporcionarse para su uso en la estimulación o inhibición de crecimiento y/o proliferación y/o diferenciación de células o tejidos en cultivo celular o tisular *in vitro*, o en células o tejidos *in vivo*.

25 Los GAG pueden proporcionarse como una formulación para dichos propósitos. Por ejemplo, pueden proporcionarse medios de cultivo que comprendan un GAG obtenido por el método descrito, es decir, que comprenda HS/BMP2.

30 Las células o tejidos obtenidos de cultivo de células o tejidos *in vitro* en presencia de HS/BMP2 pueden recogerse e implantarse en un paciente humano o animal que necesite el tratamiento. Por tanto puede proporcionarse un método de implante de células y/o tejidos, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) cultivar células y/o tejidos *in vitro* en contacto con HS/BMP2;
- (b) recoger las células y/o los tejidos;
- (c) implantar las células y/o los tejidos en un sujeto humano o animal que necesite el tratamiento.

35 Las células pueden cultivarse en parte (a) en contacto con HS/BMP2 durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el crecimiento, la proliferación o diferenciación de las células o tejidos. Por ejemplo, el periodo de tiempo puede seleccionarse entre: al menos 5 días, al menos 10 días, al menos 20 días, al menos 30 días o al menos 40 días.

40 En otra realización el HS/BMP2 puede formularse para su uso en un método de tratamiento médico, que incluye la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad. Puede proporcionarse una composición farmacéutica o un medicamento que comprenda HS/BMP2 y un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas o medicamentos pueden proporcionarse para la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad. También se proporciona el uso del HS/BMP2 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad. Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de acuerdo con la presente invención también pueden contener la proteína de interés (es decir, BMP2) que tenga el dominio de unión a heparina al cual se une el GAG. En realizaciones adicionales las composiciones farmacéuticas y los medicamentos pueden comprender adicionalmente células madre, por ejemplo, células madre mesenquimales.

50 El tratamiento de una lesión o enfermedad puede comprender la reparación, regeneración o reemplazo de células o tejido, tal como tejido conectivo (por ejemplo hueso, cartílago, músculo, grasa, tendón o ligamento). Para la reparación de tejido, la composición farmacéutica o el medicamento que comprende HS/BMP2 puede administrarse directamente en el sitio de la lesión o enfermedad para estimular el crecimiento, la proliferación y/o diferenciación de nuevo tejido para efectuar una reparación de la lesión o curar o aliviar (por ejemplo, proporcionar alivio de los síntomas de) la patología. La reparación o regeneración del tejido puede mejorarse combinando células madre en la composición farmacéutica o medicamento.

55 Para el reemplazo de tejido, el HS/BMP2 puede ponerse en contacto con células y/o tejido durante el cultivo *in vitro* de las células y/o tejidos para generar células y/o tejidos para su implante en el sitio de lesión o enfermedad en el paciente. El implante de células o tejido puede usarse para efectuar una reparación del tejido lesionado o enfermo en el paciente, reemplazando el tejido lesionado o enfermo. Esto puede implicar extirpar tejido lesionado/enfermo e implantar el tejido nuevo preparado por cultivo de células y/o tejido en contacto con HS/BMP2.

65 Por tanto, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender uno de:

- (a) HS/BMP2;
- (b) HS/BMP2 en combinación con células madre;
- (c) HS/BMP2 en combinación con una proteína que contenga el dominio de unión a heparina unido por HS/BMP2 (es decir SEC ID N°: 1 o 6);
- 5 (d) HS/BMP2 en combinación con células madre y una proteína que contenga el dominio de unión a heparina unido por HS/BMP2 (es decir SEC ID N°: 1 o 6);
- (e) tejidos o células obtenidos de cultivo de células o tejidos en contacto con HS/BMP2.

10 El HS/BMP2 puede usarse en la reparación o regeneración de tejido corporal, especialmente regeneración ósea, regeneración neuronal, construcción de tejido esquelético, reparación de lesiones cardiovasculares y expansión y autorrenovación de células madre embrionarias y adultas. Por consiguiente, el HS/BMP2 puede usarse para prevenir o tratar una amplia serie de enfermedades y lesiones, incluyendo osteoartritis, reemplazo de cartílago, rotura de huesos de cualquier tipo (por ejemplo, tratamientos de fusión de discos intervertebrales, roturas de huesos largos, defectos craneales), regeneración de defectos óseos críticos o sin unión.

15 El uso del HS/BMP2 en la reparación, regeneración o reemplazo de tejido puede implicar su uso en la curación de heridas, por ejemplo aceleración de curación de heridas, curación de escaras o de tejido óseo e injerto tisular.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un armazón biológico que comprende HS/BMP2. En algunas realizaciones, los armazones biológicos de la presente invención pueden usarse en aplicaciones ortopédicas, vasculares, protésicas, de piel y córnea. Los armazones biológicos proporcionados por la presente invención incluyen dispositivos de suministro de fármacos de liberación prolongada, válvulas tisulares, valvas de válvulas tisulares, endoprótesis de elución de fármacos, injertos vasculares, injertos para cicatrices y piel y prótesis ortopédicas tales como hueso, ligamento, tendón, cartílago y músculo. En una realización preferida de la presente

25 invención, el armazón biológico es un catéter en el que la superficie interna (y/o externa) comprende uno o más compuestos de GAG (incluyendo HS/BMP2) unidos al catéter.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona uno o más GAG (incluyendo HS/BMP2) aislados por el método descrito para su uso como un adyuvante. El adyuvante puede ser un inmunoadyuvante.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una mezcla de compuestos que comprende uno o más GAG, estando dicha mezcla enriquecida con respecto a HS/BMP2. En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticamente aceptables que comprenden:

- (i) una mezcla de compuestos que comprenden uno o más GAG, estando dicha mezcla enriquecida con respecto a HS/BMP2; y
- (ii) BMP-2,

40 para la administración por separado, simultánea o secuencial. En una realización preferida la formulación comprende la mezcla de compuestos que comprende en uno o más GAG, estando dicha mezcla enriquecida con respecto a HS/BMP2 y BMP-2 en mezcla íntima, y se administra simultáneamente al paciente que necesita el tratamiento.

45 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un kit para su uso en la reparación o regeneración de tejido, comprendiendo dicho kit (i) una cantidad predeterminada de HS/BMP2, y (ii) una cantidad determinada de BMP2.

50 Los compuestos de las mezclas enriquecidas de la presente invención pueden administrarse a un sujeto como una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Por ejemplo, las sales básicas de los compuestos de las mezclas enriquecidas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las formadas con cationes farmacéuticamente aceptables, tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amoníaco y alquilamonio. La presente invención incluye en su ámbito sales catiónicas, por ejemplo las sales de sodio o potasio.

55 Se apreciará que los compuestos de las mezclas enriquecidas de la presente invención que llevan un grupo de ácido carboxílico pueden suministrarse en forma de un profármaco administrable, en el que la porción ácida está esterificada (para que tenga la forma-CO₂R'). El término "pro-fármaco" se refiere específicamente a la conversión del grupo -OR' a un grupo -OH, o al anión carboxilato del mismo, *in vivo*. Por consiguiente, los profármacos de la presente invención pueden actuar para potenciar la adsorción del fármaco y/o el suministro del fármaco en las células. La conversión *in vivo* del profármaco puede facilitarse bien por enzimas celulares, tales como lipasas y esterases o bien por escisión química tal como por hidrólisis del éster *in vivo*.

60 Para su administración, los medicamentos y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con aspectos de la presente invención pueden formularse mediante diversas vías, incluyendo, pero sin limitación, inyección en el sitio de enfermedad o lesión. Los medicamentos y composiciones pueden formularse en forma fluida o sólida. Las formulaciones fluidas pueden formularse para su administración por inyección a una región seleccionada del cuerpo humano o animal.

65

La administración se realiza preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar un beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y ciclo de administración, dependerá de la naturaleza y de la gravedad de la lesión o enfermedad que vaya a tratarse. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., se encuentra dentro de la responsabilidad del médico de cabecera y de otros médicos, y típicamente tiene en cuenta el trastorno a tratar, la afección del paciente individual, el sitio de liberación, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Pueden encontrarse ejemplos de técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

En esta memoria descriptiva un paciente a tratar puede ser cualquier animal o ser humano. El paciente puede ser un mamífero no humano, pero más preferentemente es un paciente humano. El paciente puede ser de sexo masculino y femenino.

Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*, según se indique. La expresión "*in vitro*" pretende incluir procedimientos con células en cultivo mientras que la expresión "*in vivo*" pretende incluir procedimientos con organismos multicelulares intactos.

Células madre

Las células que se ponen en contacto con HS/BMP2 incluyen células madre.

Las células madre cultivadas y descritas en el presente documento pueden ser células madre de cualquier tipo. Éstas pueden ser totipotentes o multipotentes (pluripotentes). Éstas pueden ser células madre embrionarias o adultas de cualquier tejido y pueden ser células madre hematopoyéticas, células madre neuronales o células madre mesenquimales. Preferentemente son células madre adultas. Más preferentemente son células madre mesenquimales adultas, por ejemplo, capaces de diferenciación en tejido conectivo y/o células óseas tales como condrocitos, osteoblastos, miocitos y adipocitos. Las células madre pueden obtenerse de cualquier animal o ser humano, por ejemplo, de animales no humanos, por ejemplo, de conejo, cobaya, rata, ratón u otro roedor (incluyendo células de cualquier animal del orden *Rodentia*), de gato, perro, cerdo, oveja, cabra, ganado, caballo, primate no humano u otro organismo vertebrado no humano; y/o de animales mamíferos no humanos y/o humanos. Opcionalmente son de seres no humanos.

En esta memoria descriptiva, por células madre se entiende cualquier tipo de célula que tenga la capacidad de dividirse (es decir auto-renovarse) y de permanecer totipotente o multipotente (pluripotente) y que dé lugar a células especializadas, si se desea.

Las células madre cultivadas en la presente invención pueden obtenerse o proceder de cultivos existentes o directamente de cualquier tejido adulto, embrionario o fetal, incluyendo sangre, médula ósea, piel, epitelio o cordón umbilical (un tejido que normalmente se excluye).

La multipotencia de las células madre puede determinarse mediante el uso de ensayos adecuados. Dichos ensayos pueden comprender detectar uno o más marcadores de pluripotencia, por ejemplo, la actividad de la fosfatasa alcalina, la detección de RUNX2, osterix, colágeno I, II, IV, VII, X, osteopontina, Osteocalcina, BPSII, SOX9, Agrecano, ALBP, CCAAT/proteína α de unión a potenciador (C/EBP α), proteína de unión a lípidos de adipocito (ALBP), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea 2, (BSPII), Colágeno 2a1 (Coll2a) y SOX9.

Las células madre mesenquimales o células madre estromales de médula ósea se definen como células progenitoras pluripotentes (multipotentes) con la capacidad de generar cartílago, hueso, músculo, tendón, ligamento y grasa. Estos progenitores primitivos existen posnatalmente y presentan características de células madre, particularmente una baja frecuencia y un extenso potencial renovador. Estas propiedades en combinación con su plasticidad evolutiva han generado un tremendo interés en el uso potencial de células madre mesenquimales para reemplazar tejidos dañados. En esencia las células madre mesenquimales podrían cultivarse para expandir sus números, después de trasplantarse en el sitio lesionado o después de sembrarse en/sobre armazones para generar construcciones tisulares apropiadas.

Por tanto, un enfoque alternativo para la reparación de esqueleto, músculo, tendón y ligamento es la selección, expansión y modulación de células progenitoras apropiadas, tales como células osteoprogenitoras en el caso de hueso, en combinación con un armazón conductor o inductor para dar soporte y conducir la regeneración junto con una selección sensata de factores de crecimiento tisulares específicos.

Las células madre mesenquimales de médula ósea humana, pueden aislarse y detectarse usando marcadores selectivos, tales como STRO-I, de una fracción CD34+ que indica su potencial de repoblación de médula. Estos marcadores de superficie celular solo se encuentran en la superficie celular de células madre mesenquimales y son un indicativo de la pluripotencia de las células.

Las células mesenquimales pueden obtenerse fácilmente de médula ósea mediante técnicas mínimamente invasivas y pueden expandirse en cultivo y permitir que se diferencien en el linaje deseado. La diferenciación puede inducirse mediante la aplicación de factores de crecimiento específicos. Las proteínas miembro de la superfamilia del factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta), tales como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), son factores importantes de diferenciación condrogénica y osteogénica de células madre mesenquimales.

Las CMM adecuadas pueden obtenerse o proceder de células mononucleares de médula ósea (CMNMO) recogidas de aspirados de médula ósea (por ejemplo, Wexler *et al.* Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. HAEMOPOIESIS AND LEUCOCYTES British Journal of Haematology 121(2): 368-374, abril 2003) o de gelatina de Wharton del cordón umbilical (por ejemplo, Ta *et al.* Long-term Expansion and Pluripotent Marker Array Analysis of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Dev. 20 julio 2009 (Epub)).

Las células madre mesenquimales pueden obtenerse por diferenciación de células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas, mediante la aplicación de factores de diferenciación adecuados, como se conoce bien en la técnica.

En otro aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende células madre generadas mediante cualquiera de los métodos de la presente divulgación, o fragmentos o productos de las mismas. La composición farmacéutica es útil en un método de tratamiento médico. Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden comprender adicionalmente un transportador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la presente invención, las células madre generadas por cualquiera de los métodos de la presente invención pueden usarse en un método de tratamiento médico, preferentemente, se proporciona un método de tratamiento médico que comprende administrar, a un individuo que necesite el tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho medicamento o composición farmacéutica.

Las células madre obtenidas a través de métodos de cultivo y técnicas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para diferenciarse en otro tipo de célula para su uso en un método de tratamiento médico. Por tanto, el tipo de célula diferenciada puede proceder de, y puede considerarse como un producto de, una célula madre obtenida por los métodos de cultivo y técnicas descritas que posteriormente se han permitido diferenciar. Pueden proporcionarse composiciones farmacéuticas que comprendan dichas células diferenciadas, opcionalmente junto con un transportador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede ser útil en un método de tratamiento médico.

Glucosaminoglucanos

Como se usa en el presente documento, los términos 'glucosaminoglucano' y 'GAG' se usan indistintamente y se entiende que se refieren a una gran cantidad de moléculas que comprenden un oligosacárido, en el que uno o más de los sacáridos unidos poseen un sustituyente amino, o un derivado del mismo. Los ejemplos de GAG son condroitín sulfato, queratán sulfato, heparina, dermatán sulfato, hialuronato y heparán sulfato. Los heparán sulfatos son realizaciones preferidas de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término 'GAG' también se amplía para incluir las moléculas que son conjugados de GAG. Un ejemplo de un conjugado de GAG es un proteoglucosaminoglucano (PGAG, proteoglucano) en el que un componente peptídico está unido por enlace covalente a un componente oligosacárido.

En la presente invención se entiende que hay una gran cantidad de fuentes de compuestos de GAG incluyendo fuentes naturales, sintéticas o semisintéticas. Una fuente preferida de GAG es tejido biológico. Una fuente preferida de GAG es una célula madre. Una fuente especialmente preferida de GAG es una célula madre que puede diferenciarse en una célula que corresponde a un tejido que será objeto de tratamiento. Por ejemplo, los GAG pueden provenir de preosteoblastos para su uso en regeneración ósea o construcción de tejido esquelético. En una realización especialmente preferida de la presente invención, los GAG pueden provenir de una línea celular inmortalizada. En una realización preferida adicional de la presente invención, los GAG pueden provenir de una línea celular inmortalizada que se cultive en un biorreactor. Otra fuente preferida de GAG es una fuente sintética. En este sentido, los GAG pueden obtenerse de la elaboración sintética de materiales de partida disponibles en el comercio en productos químicos más complicados a través de técnicas conocidas, o concebible, por un experto en la técnica. Un ejemplo de dicho material de partida disponible en el comercio es la glucosamina. Otra fuente preferida de GAG es una fuente semisintética. En este sentido, la elaboración sintética de un material de partida natural, que posee gran parte de la complejidad del material deseado, se elabora sintéticamente usando técnicas conocidas, o concebibles, por un experto en la técnica. Son ejemplos de dicho material de partida natural la quitina y el dextrano, y son ejemplos de los tipos de etapas sintéticas que pueden elaborar el material de partida, en una mezcla de GAG idónea para su uso en la presente invención, la hidrólisis, la oxidación y la sulfatación de enlaces amida. Otro ejemplo de una vía semi-sintética para los GAG de la estructura deseada comprende la interconversión sintética de GAG relacionados para obtener GAG adecuados para su uso en la presente invención.

Heparán sulfato (HS)

En aspectos preferidos de la invención el glucosaminoglucano o proteoglucano es preferentemente un heparán sulfato.

5

Los proteoglucanos de heparán sulfato (HSPG) representan un subgrupo muy diverso de proteoglucanos y están compuestos por cadenas laterales de glucosaminoglucano de heparán sulfato unidas por enlace covalente a una estructura de proteína. La proteína núcleo existe en tres formas principales: una forma secretada conocida como perlecano, una forma anclada en la membrana plasmática conocida como glipicano, y una forma transmembrana conocida como sindecano. Son constituyentes ubicuos de las superficies de células de mamífero y de la mayoría de las matrices extracelulares. Hay otras proteínas tales como la agrina, o la proteína precursora amiloidea, en las que la cadena de HS puede unirse a núcleos menos comúnmente encontrados.

10

El "Heparán Sulfato" ("Heparán sulfato" o "HS") se sintetiza inicialmente en el aparato de Golgi como polisacáridos que consisten en repeticiones en tándem de ácido *D*-glucurónico (GlcA) y *N*-acetil-*D*-glucosamina (GlcNAc). Los polisacáridos nacientes pueden modificarse posteriormente en una serie de etapas: *N*-desacetilación/*N*-sulfatación de la GlcNAc, epimerización en C5 del GlcA en ácido idurónico (IdoA), *O*-sulfatación en C2 de IdoA y GlcA, *O*-sulfatación en C6 de la *N*-sulfoglucosamina (GlcNS) y ocasional *O*-sulfatación en C3 de la GlcNS. La *N*-desacetilación/*N*-sulfatación, 2-*O*-, 6-*O*- y 3-*O*-sulfatación de HS están mediadas por la acción específica de HS *N*-desacetilasa/*N*-sulfotransferasa (HSNDST), HS 2-*O*-sulfotransferasa (HS2ST), HS 6-*O*-sulfotransferasa (HS6ST) y HS 3-*O*-sulfotransferasa, respectivamente. En cada una de las etapas de modificación, solo se modifica una fracción de los posibles sustratos, dando como resultado una diversidad de secuencias considerable. Esta complejidad estructural del HS ha hecho que sea difícil determinar su secuencia y entender la relación entre la estructura y función del HS.

15

20

25

Las cadenas laterales del heparán sulfato consisten en ácido *D*-glucurónico o ácido *L*-idurónico y *D*-glucosamina dispuestos alternativamente, ligados mediante enlaces glucosídicos (1 → 4). A menudo la glucosamina está *N*-acetilada o *N*-sulfatada y tanto el ácido urónico como la glucosamina pueden estar adicionalmente *O*-sulfatados. La especificidad de un HSPG particular para un compañero de unión particular se crea por el patrón específico de grupos carboxilo, acetilo y sulfato unidos a la glucosamina y al ácido urónico. A diferencia de la heparina, el heparán sulfato contiene menos grupos *N*- y *O*-sulfato y más grupos *N*-acetilo. Las cadenas laterales de heparán sulfato están ligadas a un resto de serina de la proteína núcleo a través de una región tetrasacárido conectora (-glucuronosil-β-(1→3)-galactosil-β-(1→3)-galactosil-β-(1→4)-xilosil-β-1-*O*-(Serina)).

30

35

Tanto las cadenas de heparán sulfato como la proteína núcleo pueden experimentar una serie de modificaciones que finalmente influyen en su actividad biológica. Se ha considerado que la complejidad del HS sobrepasa la de los ácidos nucleicos (Lindahl *et al.*, 1998, *J. Biol. Chem.* 273, 24979; Sugahara y Kitagawa, 2000, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 518). La variación en las especies de HS surge de la síntesis de secuencias no aleatorias, muy sulfatadas de restos de azúcar que están separados por regiones no sulfatadas de disacáridos que contienen glucosamina *N*-acetilada. La conversión inicial de *N*-acetilglucosamina en *N*-sulfoglucosamina crea un foco para otras modificaciones, incluyendo la epimerización del ácido glucurónico en ácido idurónico y un patrón complejo de *O*-sulfataciones sobre la glucosamina o ácidos idurónicos. Además, dentro de las secuencias no modificadas, poco sulfatadas, *N*-acetiladas, los restos de hexuronato permanecen como glucuronato, mientras que en las regiones *N*-sulfatadas muy sulfatadas, predomina el epímero C-5 de iduronato. Esto limita el número de variantes de disacáridos en potencia, posible en cualquier cadena determinada pero no la abundancia de cada una de ellas. La mayoría de las modificaciones se produce en los dominios *N*-sulfatados, o directamente adyacentes a los mismos, de tal manera que en la cadena madura hay regiones de alta sulfatación separadas por dominios de baja sulfatación (Brickman *et al.* (1998), *J. Biol. Chem.* 273(8), 4350-4359).

40

45

50

Se crea la hipótesis de que las cadenas de heparán sulfato altamente variables desempeñan papeles clave en la modulación de la acción de un gran cantidad de ligandos extracelulares, incluyendo la regulación y presentación de factores de crecimiento y de adhesión a la célula, mediante una combinación complicada de bucles de retroalimentación autocrina, juxtacrina y paracrina, controlando de este modo la señalización intracelular y por lo tanto la diferenciación de células madre. Por ejemplo, aun cuando los glucosaminoglucanos de heparán sulfato puedan describirse genéticamente (Alberts *et al.* (1989) Garland Publishing, Inc, Nueva York y Londres, págs. 804 y 805), las especies de glucosaminoglucanos de heparán sulfato aisladas de una sola fuente pueden diferenciarse en cuanto a la actividad biológica. Como se observa en Brickman *et al.*, 1998, *Glycobiology* 8, 463, dos conjuntos separados de glucosaminoglucanos de heparán sulfato obtenidos de células neuroepiteliales podrían activar específicamente el FGF-1 o FGF-2, dependiendo del estado mitogénico. De manera similar, la capacidad del heparán sulfato (HS) para interactuar bien con FGF-1 o con FGF-2 se describe en el documento WO 96/23003. De acuerdo con esta solicitud de patente, puede obtenerse un HS respectivo capaz de interactuar con el FGF-1 de células murinas en días embrionarios de aproximadamente 11 a aproximadamente 13, mientras que un HS capaz de interactuar con el FGF-2 puede obtenerse el días embrionarios de aproximadamente 8 a aproximadamente 10.

55

60

65

Como se ha indicado anteriormente, la estructura del HS es muy compleja y variable entre los HS. De hecho, se considera que la variación en la estructura del HS desempeña una parte importante contribuyendo hacia la actividad

diferente de cada HS en la promoción del crecimiento celular y en el direccionamiento de la diferenciación celular. Se considera que la complejidad estructural sobrepasa a la de los ácidos nucleicos y aunque la estructura del HS puede caracterizarse como una secuencia de unidades de disacáridos de repetición que tiene patrones de sulfatación exclusivos y específicos, actualmente no se dispone de ninguna técnica de secuenciación convencional equivalente a las disponibles para la secuenciación de ácidos nucleicos para determinar la estructura de la secuencia del HS. En ausencia de métodos sencillos para determinar una estructura de secuencia definitiva del HS, las moléculas de HS se identificaron positivamente y se caracterizaron estructuralmente por expertos en el campo mediante diversas técnicas analíticas. Éstas incluyen una o una combinación de análisis de disacáridos, análisis de tetrasacáridos, HPLC y determinación de peso molecular. Estas técnicas analíticas son muy conocidas y usadas por los expertos en la técnica.

Dos técnicas para la producción de di- y tetra- sacáridos de HS incluyen digestión con ácido nitroso y digestión con liasa. Más adelante se proporciona una descripción de una forma de realizar estas técnicas de digestión, como ejemplo únicamente, no limitándose dicha descripción al ámbito de la presente invención.

Digestión con ácido nitroso

La despolimerización del heparán sulfato basada en ácido nitroso conduce a la degradación eventual de la cadena de carbohidrato en sus componentes disacáridos individuales cuando se lleva hasta el final.

Por ejemplo, el ácido nitroso puede prepararse enfriando 250 μ l de H_2SO_4 0,5 M y $Ba(NO_2)_2$ 0,5 M por separado en hielo durante 15 min. Después de enfriar, el $Ba(NO_2)_2$ se combina con el H_2SO_4 y se somete a agitación vorticial antes de centrifugarse para retirar el precipitado de sulfato de bario. Se añaden 125 μ l de HNO_2 a las muestras de GAG resuspendidas en 20 μ l de H_2O y se somete a agitación vorticial antes de incubarse durante 15 minutos a 25 $^\circ C$ con mezcla ocasional. Después de la incubación, se añade Na_2CO_3 1 M a la muestra para llevarla a un pH de 6. A continuación, a la muestra se añaden 100 μ l de $NaBH_4$ 0,25 M en $NaOH$ 0,1 M y la mezcla se calienta a 50 $^\circ C$ durante 20 min. Después, la mezcla se enfría a 25 $^\circ C$ y se añade ácido acético glacial para acidificar para llevar la muestra a un pH de 3. Después la mezcla se neutraliza con $NaOH$ 10 M y se reduce el volumen por liofilización. Las muestras finales se procesan en una columna P-2 de Bio-Gel para separar los di- y tetrasacáridos para verificar el grado de degradación.

Digestión con liasa

La heparinasa III escinde cadenas de azúcar a enlaces glucuronídicos. Cada una de las series de enzimas Heparinasa (I, II y III) presenta actividad relativamente específica por despolimerización de determinadas secuencias de heparán sulfato en sitios de reconocimiento de sulfatación particulares. La heparinasa I escinde cadenas de HS con regiones NS a lo largo de la cadena HS. Esto conduce a la alteración de los dominios sulfatados. La heparinasa III despolimeriza HS con dominios NA, dando como resultado la separación de la cadena carbohidrato en dominios sulfatados individuales. La heparinasa II escinde principalmente en los dominios "hombro" NA/NS de las cadenas de HS, donde se encuentran diversos patrones de sulfatación. Obsérvese que: La estructura de disacáridos de repetición del polímero de heparán es un ácido urónico conectado a la glucosamina del aminoazúcar. "NS" significa que el aminoazúcar lleva un sulfato en el grupo amino lo que permite la sulfatación de otros grupos en C2, C6 y C3. "NA" indica que el grupo amino no está sulfatado y que permanece acetilado.

Por ejemplo, para la despolimerización de las regiones NA usando Heparinasa III tanto la enzima como las muestras de HS liofilizadas se preparan en un tampón que contiene Tris-HCL 20 mM, BSA 0,1 mg/ml y $CaCl_2$ 4 mM, a un pH de 7,5. Únicamente como ejemplo, la Heparinasa III puede añadirse a 5 mU por 1 μ g de HS e incubarse a 37 $^\circ C$ durante 16 h antes de detener la reacción calentando a 70 $^\circ C$ durante 5 min.

Los di- y tetrasacáridos pueden eluirse por cromatografía en columna.

Dominios de unión a heparina

Cardin y Weintraub (Molecular Modeling of Protein-Glycosaminoglycan Interactions, Arteriosclerosis Vol. 9 N $^\circ$ 1 ene/feb 1989 págs. 21-32), describen secuencias consenso para dominios de unión a heparina - polipéptido. La secuencia tiene un tramo de restos di- o tri-básicos separados por dos o tres restos hidropáticos terminados por uno o más restos básicos. Se identificaron dos secuencias consenso particulares: XBBXB [SEC ID N $^\circ$: 3] y XBBBXXBX [SEC ID N $^\circ$: 4] en la que B es un resto básico (por ejemplo Lisina, Arginina, Histidina) y X es un resto hidropático (por ejemplo, Alanina, Glicina, Tirosina, Serina). Se indica que los dominios de unión a heparina son abundantes en aminoácidos Asn, Ser, Ala, Gly, Ile, Leu y Tyr y que tienen una baja aparición de aminoácidos Cys, Glu, Asp, Met, Phe y Trp.

Estas secuencias consenso pueden usarse para investigar secuencias de aminoácidos de proteínas o polipéptidos para identificar secuencias de aminoácidos candidatas de dominio de unión a heparina que pueden sintetizarse y ensayarse con respecto a la unión al GAG de acuerdo con la presente invención.

El documento WO 2005/014619 A2 también desvela numerosos péptidos de unión a heparina.

Fractura ósea

5 En algunos aspectos, la presente invención se refiere al uso terapéutico (humano y veterinario) del HS/BMP2 para tratar una fractura ósea. En el presente documento se indica que el HS/BMP2 aumenta la cicatrización ósea. El HS/BMP2 estimula la degeneración ósea después de una lesión y contribuye a mejorar la cicatrización ósea. El HS/BMP2 proporciona mejoras en la velocidad de reparación de una fractura ósea permitiendo que se reduzca el tiempo de recuperación de la lesión.

10 La fractura ósea es una afección médica. En esta solicitud "fractura" incluye daño o lesión al hueso en el que un hueso se fractura, se rompe o se astilla. Una rotura se refiere a discontinuidad en el hueso. Una fractura puede producirse por impacto físico, o por estrés mecánico o por afecciones médicas, tales como osteoporosis u osteoartritis.

15 La clasificación ortopédica de las facturas incluye fracturas cerradas o abiertas o fracturas simples o multi-fragmentarias. En las fracturas cerradas la piel permanece intacta, mientras que en una fractura abierta el hueso puede quedar expuesto a través del sitio de la herida, lo que conlleva a un mayor riesgo de infección. Las fracturas simples se producen a lo largo de una sola línea, teniendo a dividir el hueso en dos. Las fracturas multi-fragmentarias dividen el hueso en muchas partes.

Otros tipos de fracturas incluyen, fractura por compresión, fractura compactada, fractura en espiral, fracturas completas e incompletas, fracturas transversales, lineales y oblicuas y las fracturas de pequeños fragmentos.

25 En la mayoría de los sujetos la curación del hueso (unión de la fractura) se produce de manera natural y comienza después de producirse la lesión. El sangrado normalmente conduce a la coagulación y atracción de leucocitos y fibroblastos, seguido de la producción de fibras de colágeno. Después de esto se produce la deposición (mineralización) de la matriz ósea (hidroxiapatita de calcio) que transforma la matriz de colágeno en hueso. El hueso inmaduro regenerado es típicamente más débil que el hueso maduro y con el tiempo el hueso inmaduro experimenta un proceso de remodelación para producir hueso maduro "laminar". La duración del proceso completo de curación ósea es considerable, típicamente de muchos meses.

35 Los huesos en los que se producen facturas y que pueden beneficiarse del tratamiento usando HS/BMP2 incluyen todos los tipos de huesos, particularmente todos los huesos de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, huesos largos (por ejemplo fémur, húmero, falanges), huesos cortos (por ejemplo carpos, tarsos), huesos planos (por ejemplo cráneo, costillas, escápula, esternón, cintura pélvica), huesos irregulares (por ejemplo vértebras), huesos sesamoideos (por ejemplo, rótula).

40 Los huesos en los que se producen fracturas y que pueden beneficiarse del tratamiento usando HS/BMP2 incluyen hueso esquelético (es decir, cualquier hueso del esqueleto), huesos de la región craneofacial, huesos del esqueleto axial (por ejemplo vértebras, costillas), hueso apendicular (por ejemplo de las extremidades), hueso del esqueleto pélvico (por ejemplo pelvis).

45 Los huesos en los que se producen fracturas y que pueden beneficiarse del tratamiento usando HS/BMP2 también incluyen los de la cabeza (cráneo) y cuello, incluyendo los de la cara tales como los de la mandíbula, la nariz y mejillas. En este sentido, en algunas realizaciones preferidas el HS/BMP2 puede usarse para ayudar a reparar o regenerar el hueso durante cirugía dental, facial o craneal, que puede incluir la reconstrucción de huesos (que no sean dientes) de la cara y/o boca, incluyendo, por ejemplo, los huesos de la mandíbula.

50 La fractura ósea también incluye porosidad patológica, tal como presentan los sujetos con osteoporosis.

Aunque sin limitar la presente invención, las acciones primarias del HS/BMP2 pueden ser en células dentro, adyacentes a, o que migran al sitio de la herida y pueden ser en las células madre óseas, en los proteoblastos u osteoblastos, o en cualquiera de las células auxiliares o vasculogénicas encontradas o que migran al interior o al lecho de la herida.

55 Se proporciona HS/BMP2 y composiciones farmacéuticas y medicamentos que comprenden HS/BMP2 para su uso en un método de tratamiento de fractura ósea en un sujeto mamífero.

60 El tratamiento puede comprender la cicatrización ósea. El tratamiento puede implicar la reparación, regeneración y crecimiento de hueso. El HS/BMP2 facilita la reparación de la fractura permitiendo el crecimiento de nuevo hueso. El HS/BMP2 actúa mejorando la velocidad de reparación de la fractura permitiendo que se produzca más rápidamente la curación del hueso lo que conduce a mejorar el tiempo de recuperación de la lesión. El tratamiento puede conducir a mejorar la resistencia del hueso.

65

El tratamiento también puede incluir el tratamiento de la osteoporosis u osteoartritis.

La administración de HS/BMP2 se realiza preferentemente en el tejido que rodea la fractura. Esto puede incluir la administración directa al tejido óseo en el que se ha producido la fractura. La administración puede realizarse en el tejido conectivo que rodea el hueso o la fractura o en la vasculatura (por ejemplo, en los vasos sanguíneos) cercana y que alimenta al hueso. La administración puede realizarse directamente en el sitio de la lesión y puede ser en un callo formado por una cicatrización inicial de la herida.

Los medicamentos y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden formularse para su administración mediante diversas vías. Más preferentemente el HS/BMP2 se formula en forma fluida o líquida para inyección.

En algunas realizaciones, el HS/BMP2 se formula como una formulación de liberación controlada, por ejemplo, en una cápsula farmacológica para su implante en el sitio de herida. El HS/BMP2 puede unirse a, impregnarse sobre o empaparse en, un material transportador (por ejemplo un biomaterial) tal como nanofibras o papel o tejido biodegradable.

Las composiciones farmacéuticas, medicamentos, implantes y prótesis que comprenden HS/BMP2 también pueden comprender BMP2. Debido a la capacidad del HS/BMP2 de unirse a la BMP2, el HS/BMP2 puede actuar como un transportador de la BMP2 ayudando a la liberación de la BMP2 en el sitio de la herida y a la conservación de la estabilidad de la BMP2.

La administración se realiza preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mejorar la curación de la fractura ósea en comparación con una fractura no tratada como corresponde. La cantidad real administrada, y la tasa y ciclo de administración, dependerán de la naturaleza y de la gravedad de la fractura. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., se encuentra dentro de la responsabilidad de los médicos de cabecera y de otros médicos y típicamente tendrá en cuenta la naturaleza de la fractura, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Las administraciones sencillas o múltiples de las dosis de HS/BMP2 pueden administrarse de acuerdo con las orientaciones del facultativo médico que las receta. Únicamente como ejemplo, el HS/BMP2 puede administrarse en dosificaciones de al menos 1 ng/ml, más preferentemente al menos 5 ng/ml y opcionalmente 10 ng/ml o más. La dosificaciones individuales de HS/BMP2 pueden ser del orden de menos de 1 mg y de más de 1 µg, por ejemplo, uno de aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 100 µg, aproximadamente 0,5 mg o aproximadamente 1 mg. Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams y Wilkins. El HS/BMP2 puede usarse para tratar fracturas óseas junto con otros tratamientos, tales como la administración de medicamentos que alivien el dolor o antiinflamatorios, inmovilización y fijación del hueso, por ejemplo, inmovilización de la extremidad lesionada en un molde de escayola, intervención quirúrgica, por ejemplo, para reajustar un hueso o mover un hueso a un desplazamiento correcto, angulación o luxación. Si se requiere cirugía el HS/BMP2 puede administrarse directamente a (por ejemplo aplicarse a) la fractura durante el procedimiento quirúrgico.

Biomateriales

Las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención pueden estar en forma de un biomaterial que se recubre y/o impregna con HS/BMP2. Un implante o una prótesis puede formarse a partir de biomaterial. Dichos implantes o prótesis pueden implantarse quirúrgicamente para ayudar al crecimiento, regeneración, reestructuración y/o remodelación del hueso.

El HS/BMP2 puede aplicarse a implantes o a prótesis para acelerar la formación de hueso nuevo en un lugar deseado. Se apreciará que los heparán sulfatos, a diferencia de las proteínas, son particularmente fuertes y tienen una disponibilidad mucho mejor para soportar los disolventes necesarios para la fabricación de bioestructuras sintéticas y para la aplicación a implantes y prótesis.

El biomaterial puede recubrirse o impregnarse con HS/BMP2. La impregnación puede comprender formar el biomaterial mezclando HS/BMP2 con los componentes constitutivos del biomaterial, por ejemplo, durante la polimerización, o absorbiendo el HS/BMP2 en el biomaterial. El recubrimiento puede comprender la absorción del HS/BMP2 sobre la superficie del biomaterial.

El biomaterial debe permitir que el HS/BMP2 recubierto o impregnado se libere del biomaterial cuando se administre al sujeto, o se implante en el mismo. La cinética de liberación del biomaterial puede alterarse alterando la estructura, por ejemplo, porosidad, del biomaterial.

Además de recubrir o impregnar un biomaterial con HS/BMP2, una o más moléculas biológicamente activas pueden impregnarse o recubrirse sobre el biomaterial. Por ejemplo, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: BMP-2, BMP-4, OP-1, FGF-1, FGF-2, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3; VEGF; colágeno; laminina; fibronectina;

vitronectina. Además, o como alternativa, a las moléculas bioactivas anteriores, pueden impregnarse o recubrirse uno o más bisfosfonatos sobre el biomaterial junto con HS/BMP2. Los ejemplos de bisfosfonatos útiles pueden incluir al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: etidronato; clodronato; alendronato; pamidronato; risedronato; zoledronato.

5 Los biomateriales recubiertos o impregnados con HS/BMP2 pueden ser útiles para fines tanto médicos como veterinarios. Se apreciará que la presente invención puede mejorar la calidad de vida de un paciente o posiblemente prolongar la vida de un animal, por ejemplo, de un caballo de carreras valioso para su uso en la cría.

10 El biomaterial proporciona un almacén o soporte de matriz. El biomaterial puede ser adecuado para su implante en tejido o puede ser adecuado para la administración (por ejemplo, como microcápsulas en solución).

15 El implante o la prótesis debe ser biocompatible, por ejemplo, no tóxico y de baja inmunogenicidad (más preferentemente no inmunogénico). El biomaterial puede ser biodegradable de tal manera que el biomaterial se degrada a medida que se produce la curación de la herida, finalmente dejando solo el hueso regenerado *in situ* en el sujeto. Como alternativa puede usarse un material no biodegradable, por ejemplo, para guiar la regeneración ósea a lo largo de una gran discontinuidad y/o actuar como un soporte estructural durante la curación del hueso, siendo la retirada quirúrgica del biomaterial un requisito opcional después de una curación satisfactoria de la herida.

20 Los biomateriales pueden ser blandos y/o flexibles, por ejemplo hidrogeles, una red o malla de fibrina, esponjas de colágeno. Un "hidrogel" es una sustancia formada cuando un polímero orgánico, que puede ser natural o sintético, se establece o solidifica para crear una estructura entramada abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua u otras soluciones para formar un gel. La solidificación puede producirse por agregación, coagulación, interacciones hidrófobas o reticulación.

25 Como alternativa los biomateriales pueden ser estructuras relativamente rígidas, por ejemplo formadas de materiales sólidos tales como plásticos o materiales biológicamente inertes tales como titanio.

30 El biomaterial puede tener una estructura de matriz porosa que puede proporcionarse mediante un polímero reticulado. La matriz es preferentemente permeable a nutrientes y a factores de crecimiento necesarios para el crecimiento de hueso.

35 Las estructuras de la matriz pueden formarse por fibras reticulantes, por ejemplo fibrina o colágeno, o por películas líquidas de alginato sódico, quitosano, u otros polisacáridos con reticulantes adecuados, por ejemplo sales de calcio, ácido poliacrílico, heparina. Como alternativa los armazones pueden formarse como un gel, fabricarse mediante colágeno o alginatos, reticularse usando métodos bien establecidos conocidos por los expertos en la técnica.

40 Los materiales poliméricos adecuados para la formación de matriz incluyen, sin limitación, polímeros biodegradables/bio-reabsorbibles que pueden seleccionarse del grupo de: agarosa, colágeno, fibrina, quitosano, policaprolactona, poli(DL-lactida-co-caprolactona), poli(L-lactida-co-caprolactona-co-glicolida), poliglicolida, polilactida, polihidroxialcanoatos, copolímeros de los mismos, o polímeros no biodegradables que pueden seleccionarse del grupo de: acetato de celulosa; butirato de celulosa; alginato, polisulfona, poliuretano, poliacrilonitrilo, polisulfona sulfonatada, poliamida, poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato, copolímeros de los mismos.

45 El colágeno es un material prometedor para la construcción de matrices debido a su biocompatibilidad y propiedad favorable para dar soporte a la adhesión y función celular (Patente de Estados Unidos N° 5.019.087; Tanaka, S.; Takigawa, T.; Ichihara, S. y Nakamura, T. Mechanical properties of the bioabsorbable polyglycolic acid-collagen nerve guide tube Polymer Engineering y Science 2006, 46, 1461-1467). Las esponjas de colágeno clínicamente aceptables son un ejemplo de una matriz y son muy conocidas en la técnica (por ejemplo de Integra Life Sciences).

50 Los armazones de fibrina (por ejemplo, cola de fibrina) proporcionan un material de matriz alternativo. La cola de fibrina goza de una aplicación clínica ampliamente generalizada como un sellador de heridas, como un depósito para liberar factores de crecimiento y como un ayudante en la colocación y fijación de implantes biológicos (Rajesh Vasita, Dharendra S Katti. Growth factor delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. Expert Reviews in Medical Devices. 2006; 3(1): 29-47; Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgerson S. Thromb.Haemost. 2003.89(3): 573-582; Pandit AS, Wilson DJ, Feldman DS. Fibrin scaffold as an effective vehicle for the delivery of acidic growth factor (FGF-1). J. Biomaterials Applications. 2000; 14(3); 229-242; DeBlois Cote MF. Doillon CJ. Heparin-fibroblast growth factor fibrin complex: *in vitro* and *in vivo* applications to collagen based materials. Biomaterials. 1994; 15(9): 665-672.).

60 Luong-Van *et al* (*In vitro* biocompatibility and bioactivity of microencapsulated heparan sulphate Biomaterials 28 (2007) 2127-2136), describen la administración localizada prolongada de HS a partir de microcápsulas de policaprolactona.

65 Un ejemplo adicional de un biomaterial es un polímero que incorpora hidroxiapatita o ácido y hialurónico.

Un ejemplo de un biomaterial adecuado para su uso en combinación con HS/BMP2 es el relleno de cavidades óseas JAX (Smith y Nephew). Los gránulos de Jax están compuestos de sulfato cálcico de alta pureza y conservan su forma para proporcionar un armazón con porosidad intergranular y estabilidad controlada de migración de gránulos. Los gránulos de Jax se disuelven por completo y de manera inocua en el organismo.

Otros biomateriales adecuados incluyen cerámica o metal (por ejemplo titanio), hidroxiapatita, fosfato tricálcico, matriz ósea desmineralizada (MOD), autoinjertos (es decir, injertos procedentes del tejido del paciente), o aloinjertos (injertos procedentes del tejido de un animal que no es el paciente). Los biomateriales pueden ser sintéticos (por ejemplo, metal, fibrina, cerámica) o biológicos (por ejemplo materiales transportadores fabricados de tejidos de animales, por ejemplo, de mamíferos no humanos (por ejemplo vaca, cerdo) o humanos).

El biomaterial puede complementarse con células adicionales. Por ejemplo, el biomaterial puede “sembrarse” (o co-sintetizarlo) con células precursoras óseas indiferenciadas, por ejemplo, células madre, tales como células madre mesenquimales, más preferentemente de células madre mesenquimales humanas.

El sujeto a tratar puede ser cualquier animal o ser humano. Preferentemente el sujeto es un mamífero, más preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser un mamífero no humano (por ejemplo, conejo, cobaya, rata, ratón u otro roedor (incluyendo células de cualquier animal del orden *Rodentia*), gato, perro, cerdo, oveja, cabra, ganado (incluyendo vacas, por ejemplo, vacas lecheras o cualquier animal del orden *Bos*), caballo (incluyendo cualquier animal del orden *Equidae*), burro y primate no humano). El mamífero no humano puede ser un animal doméstico, o un animal cuidado para fines comerciales, por ejemplo, un caballo de carreras, o animales productores de granja, tales como, cerdo, oveja o ganado. El sujeto puede ser del género masculino o femenino. El sujeto puede ser un paciente.

Medios de cultivo

El medio de cultivo que comprende HS/BMP2 puede ser de cualquier tipo pero preferentemente es un líquido o un gel y puede contener otros nutrientes y factores de crecimiento (por ejemplo FGF-2). El HS/BMP2 estará preferentemente presente en cantidades no traza. Por ejemplo, la concentración de HS/BMP2 en el medio de cultivo puede variar entre aproximadamente 1,0 ng/ml de medio de cultivo a aproximadamente 1000 ng/ml de medio de cultivo. Preferentemente, la concentración de HS/BMP2 en los medios de cultivo es entre aproximadamente 5 ng/ml de medio de cultivo y 200 ng/ml de medio de cultivo, más preferentemente entre aproximadamente 20 ng/ml medio de cultivo y 170 ng/ml de medio de cultivo.

Proteína BMP2

En esta memoria descriptiva BMP2 se refiere a la proteína morfogenética ósea 2 (también denominada proteína morfogénica ósea 2, BMP2 o BMP-2) que es un miembro de la superfamilia del TGF- β y está implicado en el desarrollo de hueso y cartílago.

La secuencia de aminoácidos de la preproteína BMP2 de *Homo sapiens* (SEC ID N°: 2) se muestra en la Figura 35. Los aminoácidos 1 a 23 representan el péptido señal, y los aminoácidos 24 a 396 representan la secuencia de aminoácidos de la proproteína. La secuencia de aminoácidos de la proteína madura se proporciona como SEC ID N°: 5 en el presente documento.

En esta memoria descriptiva la “proteína BMP2” incluye proteínas que tienen al menos una identidad de secuencia de 70 %, más preferentemente una de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la secuencia de aminoácidos de la preproteína BMP2 o la proproteína BMP2 ilustrada en la Figura 35 o con la secuencia de aminoácidos de la proteína BMP2 madura de la SEC ID N°: 5.

La proteína BMP2 también incluye preferentemente un dominio de unión a heparina que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 1 o 6 (encontrada en los aminoácidos 283-300 de la SEC ID N°: 2) o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con las SEC ID Nos: 1 o 6.

La referencia a la proteína BMP2 preferentemente incluye la proteína BMP-2 descrita en Ruppert *et al* (Eur J. Biochem 1996).

La proteína BMP2 es preferentemente osteogénica, es decir, tiene la actividad de inducir, o ayudar en la inducción de, la diferenciación de osteoblastos.

La proteína BMP2 puede ser de, o proceder de, cualquier animal o ser humano, por ejemplo, de animales no humanos, por ejemplo, conejo, cobaya, rata, ratón u otro roedor (incluyendo de cualquier animal del orden *Rodentia*), gato, perro, cerdo, oveja, cabra, ganado (incluyendo vacas, por ejemplo vacas lecheras, o cualquier animal del orden *Bos*), caballo (incluyendo cualquier animal del orden *Equidae*), burro y primate no humano u otro organismo vertebrado no humano; y/o un animal mamífero no humano; y/o un ser humano.

La invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritas excepto cuando dicha combinación no se permita claramente o se impida expresamente.

5 Los títulos de las secciones que se usan en el presente documento son únicamente con fines de organización y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Breve descripción de las figuras

10 Las realizaciones y experimentos que ilustran los principios de la invención se expondrán ahora con referencia a las figuras adjuntas en las que:

Figura 1. Cromatografía de intercambio aniónico de muestras MX alteradas usando tampón de Urea 8 M/CHAPS. Después de elución con NaCl 1 M se observa un gran pico de GAG.

15 **Figura 2.** Cromatograma representativo del sistema de desalinización durante la purificación de GAG derivado de MX. El pico inicial (12 – 18 min) representa las cadenas de GAG de longitud completa. El pico de conductividad y el pico de residuos (19 – 30 min) representan la elución de residuos de sal y de GAG.

20 **Figura 3.** tGAG (2,5 mg) cargados en una columna de estreptavidina Hi-Trap no derivatizada. Todos los GAG se eluyen de la columna en el flujo continuo, indicando no unión de “fondo” de los GAG en la columna.

Figura 4. BMP2-HBP (1 mg) pre-incubado con los tGAG (25 mg) durante 30 min. El perfil de elución muestra el péptido (280 nm) que sale de la columna en el flujo continuo junto con la muestra de tGAG.

25 **Figura 5.** BMP2-HBP (1 mg) cargado en una columna Hi-Trap. Los niveles de absorbancia a 280 nm indican que el péptido permanece unido a la columna incluso en condiciones de baja salinidad; por tanto hubo un acoplamiento satisfactorio del péptido biotinilado con el enlazador estreptavidina.

30 **Figura 6.** BMP2-HBP (1 mg) acoplado a la columna cargado con 25 mg de los tGAG. El cromatograma (232 nm) muestra claramente tanto una sobrecarga de la columna, en el flujo continuo, así como la unión de algunos GAG con el lecho de BMP2-HBP.

35 **Figura 7.** Re-aplicación de fracciones de GAG (flujo continuo) del experimento anterior (Fig. 6). La presencia de un pico de elución significativo de GAG+ indica que todos los sitios de unión a BMP2-HBP disponibles se han saturado, dando como resultado una gran proporción de GAG susceptibles que salen de la columna en el flujo continuo.

40 **Figura 8.** BMP2-HBP (2 mg) acoplado a la columna cargada con los tGAG (6 mg). El cromatograma (232 nm) muestra claramente que no hay sobrecarga de la columna, y la presencia de la subpoblación de GAG con una afinidad relativa por el BMP2-HBP.

45 **Figura 9.** Re-procesamiento de GAG- (flujo continuo) del procesamiento anterior (Fig. 8). La ausencia de un pico de elución GAG+ indica que los sitios de unión a BMP2-HBP disponibles no estaban saturados en el proceso anterior, lo que permite la extracción eficaz de azúcares GAG+ en un solo proceso.

50 **Figura 10.** La re-aplicación de fracciones de GAG+ de longitud completa aisladas (2 mg) muestra que no hay cambios en la afinidad por la columna de BMP2 HBP (2 mg) antes de la digestión con heparinasa III. También se muestra una re-aplicación de fracciones de GAG- contra la columna de BMP2-HBP sin cambio en la afinidad, saliendo todos los GAG de la columna en el flujo continuo esencialmente como en la Figura 9.

55 **Figura 11.** Las fracciones GAG- (1 mg) se sometieron a digestión con heparinasa III antes de cargar sobre la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) muestra claramente que ninguna muestra de GAG permanece unida a la columna, pero sale del flujo continuo. Esto indica la ausencia de cualquier dominio GAG+ en las cadenas de GAG de longitud completa.

60 **Figura 12.** Fracciones GAG+ (2 mg) sometidas a digestión con heparinasa 3 antes de cargar sobre la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) demuestra que las muestras de GAG+ se retienen en la columna, lo que sugiere que todos los dominios de la cadena GAG+ de longitud completa tienen una afinidad relativa por BMP2-HBP. El aumento en el pico de absorbancia, en comparación con la misma cantidad de peso seco de GAG+ (Fig. 10), indica la eficacia del tratamiento con heparinasa 3.

65 **Figura 13.** Las cadenas de GAG+ de longitud completa se separan usando una columna P10 de Biogel con un límite de exclusión de entre 1,5 kDa y 20 kDa. El cromatograma muestra que una gran parte de las cadenas de la muestra tienen un peso molecular global de más de 20 kDa.

- 5 **Figura 14.** Las cadenas de azúcar de GAG+ de longitud completa tratadas con ácido nitroso durante 20 min para degradar diagnosticablemente especies de heparán sulfato. El cromatograma, generado a partir de una columna de calibre P10 de Biogel, muestra una degradación casi completa de todas las cadenas de GAG+ en comparación con la Figura 13, lo que indica que las cadenas aisladas de GAG+ constan principalmente de heparán sulfato.
- 10 **Figura 15.** Condroitín-4-sulfato (6 mg) cargado en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma ilustra claramente que una proporción significativa de las cadenas de GAG tiene una afinidad por el péptido, ya que se eluyen a una concentración salina similar a la de las muestras de GAG+.
- 15 **Figura 16.** Condroitín-6-sulfato (6 mg) cargado en una columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma indica que algunas pocas cadenas del GAG C6S (condroitín-6-sulfato) no tienen afinidad por la columna del péptido.
- 20 **Figura 17.** Dermatógeno sulfato (6 mg) cargado en la columna de afinidad de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma indica que algunas pocas cadenas del GAG DS (dermatógeno sulfato) no tuvieron afinidad por el péptido, eluyéndose solo una pequeña proporción de los GAG a una concentración salina similar a la de las muestras de GAG+.
- 25 **Figura 18.** Heparán sulfato bovino (2,5 mg) cargado en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) revela solo una pequeña fracción de la unión de los GAG a la columna.
- 30 **Figura 19.** Heparina de BPM (Bajo Peso Molecular) (50 mg) cargada en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) revela que casi ningún GAG se unía al péptido.
- 35 **Figura 20.** Heparina de APM (Alto Peso Molecular) (28 mg) cargada en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) revela que casi ningún GAG se unía al péptido.
- 40 **Figura 21.** La heparina de APM (25 mg) previamente digerida con heparinasa I se cargó en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) revela que muy pocos fragmentos de GAG se unían al péptido.
- 45 **Figura 22.** Cromatograma que muestra etapas del aislamiento del HS específico del péptido BMP-2 por cromatografía de afinidad.
- 50 **Figura 23.** Cromatograma que muestra la elución del HS específico del péptido BMP-2 (GAG+) por cromatografía de afinidad.
- 55 **Figura 24.** Cromatograma que muestra la elución del HS no específico del péptido BMP-2 (GAG-) por cromatografía de afinidad.
- 60 **Figura 25.** Cromatograma que muestra la elución del HS Sigma (H9902) convencional con cromatografía de exclusión por tamaño en la columna Superdex 75.
- 65 **Figura 26.** Cromatograma que muestra la elución del HS específico del péptido BMP-2 (GAG+) con cromatografía de exclusión por tamaño en la columna Superdex 75.
- Figura 27.** Gráfico que muestra expresión de Osterix en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP2 100 ng/ml y BMP2 300 ng/ml.
- Figura 28.** Gráfico que muestra la expresión de Osteocalcina en células C2C12 en respuestas a medios de control, BMP2 100 ng/ml y BMP2 300 ng/ml.
- Figura 29.** Gráfico que muestra la expresión de Runx2 en células C2C12 en respuestas a medios de control, BMP2 100 ng/ml y BMP2 300 ng/ml.
- Figura 30.** Gráfico que muestra la expresión de la Fosfatasa Alcalina medida por PCR cuantitativa en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP-2, GAG Negativo (GAG-), GAG Positivo (GAG+), HS Total y Heparina (Hep).
- Figura 31.** Gráfico que muestra la expresión de Osterix medida por PCR cuantitativa en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP-2, GAG Negativo (GAG-) + BMP-2, GAG Positivo (GAG+) + BMP-2, HS total y Heparina (Hep).
- Figura 32.** Gráfico que muestra la expresión de Bsp11 medida por PCR cuantitativa en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP-2, GAG Negativo (GAG-) + BMP-2, GAG Positivo (GAG+) + BMP-2, HS total y Heparina (Hep).

- Figura 33.** Gráfico que muestra la expresión de Runx2 medida por PCR cuantitativa en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP-2, GAG Negativo (GAG-) + BMP-2, GAG Positivo (GAG+) + BMP-2, HS total y Heparina (Hep).
- 5 **Figura 34.** Gráfico que muestra la expresión de Osteocalcina en células C2C12 en respuesta a BMP y GAG+ (+ BMP-2) aislado de células MC3T3-E1.
- Figura 35.** Secuencia de aminoácidos de la preproteína de la proteína morfogenética ósea 2 de *Homo sapiens*, N° de Acceso al NCBI NP_001191 (NP_001191.1 GI:4557369) (SEC ID N°: 2).
- 10 **Figura 36.** Cromatograma que muestra la elución de HS específico del péptido BMP-2 por cromatografía de afinidad. El péptido-BMP2 biotinilado 6 mg (SEC ID N°: 1) se acopló a una columna de estreptavidina de 1 ml. El cromatograma muestra que todos el péptido BMP2 biotinilado se unía a la columna.
- 15 **Figura 37.** Cromatograma que muestra la purificación del heparán sulfato específico del péptido BMP2 (SEC ID N°: 1)
- Figura 38.** Cromatograma que muestra la desalinización del heparán sulfato unido a la columna peptídicaBMP2 (SEC ID N°: 1).
- 20 **Figura 39.** Cromatograma que muestra la desalinización del heparán sulfato no unido a la columna peptídicaBMP2 (SEC ID N°: 1).
- Figura 40.** Perfil SAX-HPLC después de digestión con disacárido del heparán sulfato positivo a BMP2.
- 25 **Figura 41.** Perfil SAX-HPLC después de digestión con disacárido del heparán sulfato negativo a BMP2.
- Figura 42.** Perfil SAX-HPLC que muestra la digestión con disacárido del HS Celsus.
- 30 **Figura 43.** Tabla que muestra la composición en porcentaje de disacárido que se obtiene con liasa del HS específico de BMP2, del HS no específico de BMP2 y del HS Celsus. El área debajo de cada pico se integró para calcular el porcentaje de cada disacárido. -- = no detectado.
- 35 **Figura 44.** Cuadro que muestra el análisis de resonancia de plasmón superficial (RPS) del HS positivo a BMP2 y negativo a BMP2.
- Figura 45.** Cuadro que muestra la capacidad de unión a BMP2 de preparaciones de HS Celsus positivo a BMP2 y negativo a BMP2 aplicadas sobre una placa de unión a Idurón Heparina/GAG.
- 40 **Figura 46.** Cuadro que muestra la actividad de la Fosfatasa Alcalina (ALP) del HS positivo a BMP2 y negativo a BMP2 en células C2C12.
- Figura 47.** Fotografías del análisis inmunohistoquímico de la potenciación de la actividad de la ALP por HS. El HS específico de BMP2 potenció la actividad de la ALP inducida por BMP2 a un mayor grado en comparación con el HS no específico cuando se evaluó histoquímicamente. Se introdujo BMP2 a 100 ng/ml en combinación con 0, 0,3, 3 y 30 µg/ml de HS positivo a BMP2 o negativo a BMP2.
- 45 **Figura 48.** No hay figura.
- 50 **Figura 49.** Cuadro que muestra la capacidad de unión a BMP2 del HS positivo a BMP2 (2-O, 6-O y N-) desulfatado selectivamente y que indica el patrón de sustitución de carga de cadenas de HS necesarias para la unión a BMP2.
- Figura 50.** Cuadro que muestra el efecto de la heparina sobre la estabilidad de BMP-2.
- 55 **Figura 51.** Fotografía por MEB del rellenedor óseo JAX™- fosfato tricálcico, fotografías de rayos X de un modelo de defecto de cúbito en Conejo. Ilustración de combinación con HS/BMP2 30 µg en hidrogel 200 µl (88 % de agua, glicerol, carboximetil celulosa de sodio).
- 60 **Figura 52.** Análisis de rayos X y microCT (microtomografía computerizada) de un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con rellenedor óseo JAX™ (control), o con rellenedor óseo JAX™ más HS/BMP2 (HS3) a las 4 semanas de tratamiento.
- 65 **Figura 53.** Análisis de rayos X y microCT de un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con rellenedor óseo JAX™ (control), o con rellenedor óseo JAX™ más HS/BMP2 (HS3) a las 8 semanas de tratamiento.

Figura 54. Cuadros que muestran el % de volumen óseo evaluado por microCT en un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con relleno óseo JAX™ (control), con relleno óseo JAX™ más HS/BMP2 (HS3) o con relleno óseo JAX™ más HS negativo a BMP2 (A) a las 4 semanas de tratamiento y (B) a las 8 semanas de tratamiento.

5 **Figura 55.** Inmunotransferencia que muestra los niveles de fosforilación de Smad 1/5/8 después de exposición a control negativo, a solo BMP2, a BMP2 + Heparina o BMP2 + HS3.

10 **Figura 56.** Ilustración diagramática del diseño experimental de una reparación de defecto de cúbito en conejo crítica sin unión.

Figura 57. Cuadro que muestra el porcentaje de liberación de heparina de gránulos JAX™ a lo largo del tiempo.

15 **Figura 58.** Micrografías de rayos X que muestran la curación de un modelo de defecto de cúbito en conejo tratado con relleno óseo Jax™ más control (sin HS), HS3 30 µg (HS30) o HS3 100 µg (HS100) a las 0, 4 y 8 semanas.

20 **Figura 59.** Micrografías que muestran micro CT (tomografía computerizada) con interpretación de imagen 3D de las estrellas Jax en el interior de los defectos óseos después de 4 y 8 semanas post-cirugía, en comparación con reconstrucciones de rayos X procesadas con imágenes (nuevo hueso en amarillo). Las imágenes micro CT interpretadas en color gris a la derecha de las imágenes de rayos X.

25 **Figura 60.** Cuadro que muestra la cuantificación del % de volumen óseo con respecto al volumen total (VO/VT) para los grupos de tratamientos (control frente a HS30 y HS100) a las 4 y 8 semanas.

Figura 61. Micrografías que muestran tinción con H y E (véase más adelante) para los 3 grupos de tratamiento (control (sin HS), HS3 30 µg (HS30) o HS3 100 µg (HS100)) durante 4 y 8 semanas.

30 **Figura 62.** Micrografías de mayor aumento (en comparación con la Figura 61) que muestran tinción con H y E para los 3 grupos de tratamiento (control (sin HS), HS3 30 µg (HS30) o HS3 100 µg (HS100)) durante 4 y 8 semanas.

35 **Figura 63.** Micrografías que muestran tinción con Tetracromo de Ralis (véase más adelante) para los 3 grupos de tratamiento (control (sin HS), HS3 30 µg (HS30) o HS3 100 µg (HS100)) durante 4 y 8 semanas.

Figura 64. Micrografías de mayor aumento (en comparación con la Figura 63) que muestran tinción con Tetracromo de Ralis para los 3 grupos de tratamiento (control (sin HS), HS3 30 µg (HS30) o HS3 100 µg (HS100)) durante 4 y 8 semanas.

40 **Figura 65.** Micrografías que muestran la inmunotinción de osteocalcina (véase más adelante) para los 3 grupos de tratamiento (control (sin HS), HS3 30 µg (HS30) o HS3 100 µg (HS100)) durante 4 y 8 semanas.

45 **Figura 66.** Micrografías de mayor aumento (en comparación con la Figura 65) que muestran la inmunotinción de osteocalcina para los 3 grupos de tratamiento (control (sin HS), HS3 30 µg (HS30) o HS3 100 µg (HS100)) durante 4 y 8 semanas.

Figura 67. Ilustración fotográfica de un aparato de ensayo de torsión.

50 **Figura 68.** Cuadros que muestran torsión típica frente a ángulo para cúbito intacto, más rigidez y par de torsión máximo para HS30 a la semana 8.

Figura 69. Micrografías de rayos X a las 0 semanas mostrando un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con esponjas de colágeno empapadas con uno de los siguientes tratamientos (300 µl totales, en PBS): HS3 30 µg, BMP-2 10 µg, HS3 30 µg + BMP-2 10 µg o un mismo volumen de PBS.

55 **Figura 70.** Micrografías de rayos X a las 4 semanas mostrando la curación en un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con esponjas de colágeno empapadas con uno de los siguientes tratamientos (300 µl totales, en PBS): HS3 30 µg, BMP-2 10 µg, HS3 30 µg + BMP-2 10 µg o un mismo volumen de PBS.

60 **Figura 71.** Micrográficos de rayos X a las 8 semanas mostrando la curación en un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con esponjas de colágeno empapadas con uno de los siguientes tratamientos (300 µl totales, en PBS): HS3 30 µg, BMP-2 10 µg, HS3 30 µg + BMP-2 10 µg o un mismo volumen de PBS.

65 **Figura 72.** Cuadro que muestra análisis micro CT a las 4 y 8 semanas para un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con esponjas de colágeno empapadas con uno de los siguientes tratamientos (300 µl totales, en

PBS): HS3 30 µg, BMP-2 10 µg, HS3 30 µg + BMP-2 10 µg o un mismo volumen de PBS.

Figura 73. Cuadros que muestran el par de torsión máximo y la rigidez a las 8 semanas para un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con esponjas de colágeno empapadas con uno de los siguientes tratamientos (300 µl totales, en PBS): HS3 30 µg, BMP-2 10 µg, HS3 30 µg + BMP-2 10 µg o un mismo volumen de PBS.

Figura 74. Cuadro e imagen micro CT que muestra el porcentaje de volumen óseo a las 4 semanas para un modelo de defecto de cúbito en Conejo tratado con esponjas de colágeno empapadas con uno de los siguientes tratamientos (300 µl totales, en PBS): HS3 30 µg, BMP-2 10 µg, HS3 30 µg + BMP-2 10 µg o un mismo volumen de PBS.

Figura 75. Cuadros que muestran una comparación a la semana 4, del porcentaje de volumen óseo en el modelo de defecto de cúbito en conejo, entre el tratamiento con estrellas de Jax™- TCP y esponjas de colágeno cuando se combina con uno de BMP-2 10 µg (BMP10), HS3 30 µg (HS30), BMP-2 10 µg + HS3 30 µg, HS3 100 µg (HS100) o control.

Descripción detallada de la invención

A continuación, como ejemplo, se exponen los detalles de una o más realizaciones de la invención en la descripción adjunta, incluyendo detalles específicos del mejor modo contemplado por los inventores para realizar la invención. Para los expertos en la técnica será obvio que la presente invención pueda llevarse a la práctica sin limitación a estos detalles específicos.

Se investigó la posibilidad de los GAG para aumentar las actividades de la proteína morfogénica ósea 2 (BMP2). La actividad altamente osteoinductora de la BMP2 para la línea celular miogénica murina C2C12 estaba bien caracterizada. Estudios tanto en esta línea celular, como *in vivo*, habían implicado una función de los glucosaminoglucanos en la modulación de esta actividad.

De manera similar, la afinidad de la BMP2 por la heparina estaba bien caracterizada. Se han realizado numerosos estudios que buscaban examinar la interacción dinámica entre la BMP2 y los GAG. Algunos han propuesto que la interacción es inhibitoria, y por tanto responsable del secuestro de citocinas lejos del receptor o de inducir su asociación con sus numerosos inhibidores, tales como la nogina, que se ha demostrado, de manera similar, que tiene una afinidad por la heparina. Hallazgos alternativos implican que la interacción entre la BMP2 y los GAG es la de mantener una concentración local de la citocina alrededor de células que requieren su señalización para diferenciarse en el linaje osteoblástico.

Estos hallazgos también sugieren que la asociación sirve para prolongar de manera significativa la semivida del homodímero, permitiendo que permanezca activo en la MEC durante periodos más largos. Como es el caso de la mayoría de los sistemas, la función real de esta interacción probablemente debe combinarse con alguna, o todas las anteriores.

Aunque muchos estudios han proporcionado pruebas de la interacción que tiene la BMP2 con azúcares modelo, la interacción específica entre el péptido de unión a heparina - BMP2 (BMP2-HBP), un tramo de aminoácidos (QAKHKQRKRLKSSCKRHP [SEC ID N°: 1]) localizado en el extremo N terminal de cada monómero de BMP2, y glucosaminoglucanos apropiados ha recibido relativamente poca atención. Una cuestión principal que surge es si hay una secuencia de sacáridos complementaria incluida en una cadena de HS que controle la asociación con una especificidad absoluta, o al menos relativa.

Se buscó aislar un glucosaminoglucano específico de secuencia que pudiese modular la actividad de BMP2 a través de una interacción directa con la citocina.

Ejemplo 1

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de tampones

La preparación de todos los tampones para la extracción y análisis de GAG se realizó con estricta atención a la calidad. Es vital que el pH de los tampones se mantenga al nivel correcto y que todos los tampones se filtren y se desgasifiquen para impedir la obstrucción de las columnas con precipitados o burbujas. La formación de burbujas, en particular, puede ocasionar daños importantes a las columnas, y en el caso de columnas selladas, prefabricadas, las vuelve inutilizables.

Todos los tampones usados se filtraron con 1x PBS sin Ca²⁺ o Mg²⁺ (NaCl 150 mM), o se sometieron a destilación

doble (ddH₂O) para constituir las soluciones finales.

Tampón de alteración

5 El tampón de alteración de Urea 8 M/CHAPS consistía en PBS (NaCl 150 mM) con CHAPS al 1 %, Urea 8 M y NaN₃ al 0,02 % para impedir la contaminación por crecimiento microbiano durante el almacenamiento. Esta solución se usó para alterar las muestras de matriz (MX), por tanto no estaba desgasificada ni filtrada.

Tampón de intercambio aniónico PGAG de bajo contenido en sal (250 mM)

10 El tampón de intercambio aniónico PGAG de bajo contenido en sal comprende PBS (NaCl 150 mM) con NaCl adicional 100 mM. El tampón se equilibró a pH 7,3 con NaOH y NaN₃ al 0,02 %. Después, la solución se desgasificó a presión negativa y con agitación constante hasta que ninguna burbuja adicional se liberase antes de filtrarse a través de un filtro de 0,4 µm.

Tampón de intercambio aniónico PGAG de alto contenido en sal (1 M)

15 El tampón de intercambio aniónico PGAG de alto contenido en sal comprende PBS (NaCl 150 mM) con NaCl adicional de 850 mM. El tampón se equilibró a pH 7,3 con NaOH y se añadió NaN₃ al 0,02 %. Después, la solución se desgasificó a presión negativa y con agitación constante antes de filtrarse a través de un filtro de 0,4 µm.

Tampón de reconstitución PGAG de Pronasa/Neuraminidasa

20 Este tampón se usó para reconstituir muestras de PGAG desalinizadas después de intercambio aniónico para prepararlas para la digestión enzimática de las proteínas núcleo asociadas. Consiste en acetato sódico (CH₃COONa) 25 Mm. El tampón se equilibró a pH 5,0 con ácido acético (CH₃COOH) glacial. Las dos enzimas, pronasa y neuraminidasa, se reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tampón de cromatografía de afinidad GAG de bajo contenido en sal (150 mM)

25 El tampón de intercambio aniónico GAG de bajo contenido en sal se preparó usando PBS (NaCl 150 mM) sin ninguna sal adicional. El tampón se equilibró a pH 7,3 con NaOH y NaN₃ al 0,02 %. La solución se desgasificó a presión negativa y con agitación constante hasta que ninguna burbuja adicional se liberase antes de filtrarse a través de un filtro de 0,4 µm.

Tampón de cromatografía de afinidad GAG de alto contenido en sal (1 mM)

30 El tampón de intercambio aniónico GAG de alto contenido en sal se preparó usando PBS (NaCl 150 mM) con NaCl adicional 850 mM. El tampón se equilibró a pH 7,3 con NaOH y se añadió NaN₃ al 0,02 %. Después, la solución se desgasificó y se filtró a través de un filtro de 0,4 µm.

Solución desalinizadora

35 La solución desalinizadora se preparó usando ddH₂O que se equilibró a un pH de 7,0 con NaN₃ al 0,02 %. Después la solución se desgasificó y se filtró.

Preparación de muestras

40 Las muestras de matriz se alteraron usando Tampón de Alteración (Urea 8 M/CHAPS), después se rasparon fuera de la superficie de cultivo en este tampón y se agitó durante una noche a 37 °C para garantizar la lisis máxima. Después las muestras se centrifugaron a 5000 g durante 30 min y el sobrenadante se depuró a través de un filtro de 0,4 µm en preparación para extracción de PGAG mediante cromatografía de intercambio aniónico.

Preparación y uso de las columnas

55 La elección y preparación de los tipos de columnas a usar para cada etapa secuencial en el aislamiento y caracterización de los GAG es de vital importancia para el éxito del protocolo. Fue vital que en cada etapa las columnas se equilibrasen y se limpiasen con mucho cuidado.

Columnas de intercambio aniónico

60 Debido a las cantidades relativamente grandes de sustrato MX usado para la extracción de GAG, y a la alta carga que se coloca en el sistema de columna, fue necesario rellenar y preparar manualmente una gran columna de intercambio aniónico, específicamente para este estudio. Las perlas de intercambio aniónico Capto Q (Pharmacia) se rellenaron en una columna XK 26 de Pharmacia (Pharmacia) para producir una columna con una capacidad de

65

carga máxima de 500 ml de lisado de MX por proceso.

Antes del uso, tanto la columna como todos los tampones se equilibraron a temperatura ambiente durante 30 min., antes de lavar y equilibrar la columna en Tampón de Bajo Contenido en Sal (250 mM) de Intercambio Aniónico PGAG durante 30 min hasta que todos los canales de absorbancia permaneciesen estables. Después, el lisado celular depurado se hizo pasar a través de la columna que, de nuevo, se aclaró en 500 ml de tampón de bajo contenido en sal para eliminar cualquier resto no unido específicamente. Después, los PGAG se eluyeron usando 250 ml de Tampón de Alta Concentración en Sal (1 M) de Intercambio Aniónico PGAG y se liofilizó antes de desalinizar. Después, la columna se aclaró en tampón de bajo contenido en sal y retornaron a 4 °C para su conservación.

Protocolo de desalinización

Después del aislamiento de PGAG/GAG fue necesario retirar la gran cantidad de sal que se acumulaba en la muestra durante la elución de la columna. Para esta etapa, todas las muestras eluidas del mismo grupo experimental se combinaron y se cargaron en 4x columnas desalinizadoras HiPrep™ 26/10 4x Pharmacia. Antes de su uso, tanto las columnas como todas las soluciones se equilibraron a temperatura ambiente durante 30 min antes de lavar y equilibrando la columna en Solución Desalinizadora durante 30 min hasta conseguir estabilizar todos los canales de absorbancia. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron en Solución Desalinizadora en el volumen mínimo posible que dio como resultado una solución depurada. Esta combinación de columnas permitió la carga de hasta 60 ml de muestra. Las fracciones que se eluyeron de la columna se liofilizaron primero y se conservaron para una separación o para una aplicación de cultivo celular posterior. Después, las columnas se aclararon en Solución Desalinizadora y retornaron a 4 °C para su conservación.

Preparación de columnas de BMP2-HBP

El aislamiento de los GAG portadores de afinidades relativas por BMP2 se realizó usando una columna de BMP2-HBP. Se prepararon aproximadamente 2 mg de BMP2-HBP biotinilados en un 1 ml del tampón de bajo contenido en Sal (150 mM) de Cromatografía de Afinidad GAG. Esta cantidad se cargó en una columna HP de Estreptavidina HiTrap (Pharmacia) y se permitió que se uniese a la columna durante 5 min. Después la columna se sometió a un ciclo de procesamiento completo en ausencia de los GAG. La columna se lavó en 13 ml de tampón de bajo contenido en sal a un caudal de 0,5 ml/min antes de someterse a 10 ml de tampón de alto contenido en sal GAG a 1 ml/min. Finalmente la columna se aclaró con 10 ml de tampón de bajo contenido en sal. Durante este proceso los datos se controlaron cuidadosamente para garantizar que no se observaba elución peptídica o degradación de la columna.

Aislamiento de muestras GAG+

Una vez que la columna de BMP2-HBP se había preparado y se había ensayado su estabilidad en condiciones de procesamiento normales, estaba lista para usarse para la separación de cadenas GAG+ de muestras de tGAG (GAG total). Las muestras de tGAG (6 mg) se prepararon en 3 ml de tampón de bajo contenido en sal (150 mM) de afinidad GAG y se inyectaron en un bucle estático para su carga en la columna. Antes del uso tanto la columna de BMP2-HBP como todos los tampones se equilibraron a temperatura ambiente durante 30 min antes de lavar y equilibrar la columna en tampón de bajo contenido en sal durante 30 min hasta que todos los canales de absorbancia fueran estables. Después, la muestra se cargó en la columna a 0,5 ml/ml y la columna y la muestra se aclararon en 10 ml de tampón de bajo contenido en sal al 0,5 ml/min. Las muestras de GAG+ retenidas se recuperaron posteriormente por elución con 10 ml de tampón de alto contenido en sal (1 M) y se liofilizaron para su desalinización. Después, la columna se aclaró en 10 ml de tampón de bajo contenido en sal y se conservó a 4 °C.

Tratamiento con Pronasa/Neuraminidasa

Para aislar las cadenas de GAG de sus proteínas núcleo, se sometieron a digestión usando pronasa y neuraminidasa. Las muestras de PGAG liofilizadas se resuspendieron en un volumen mínimo de acetato sódico 25 mM (pH 5,0) y se depuraron por filtración a través de un filtro de jeringa de 0,4 µm. Se dispensó un volumen total de muestra total en tubos de vidrio de 10 ml en alícuotas de 500 µl. Se añadieron 500 µl de neuraminidasa 1 mg/ml y se incubó durante 4 h a 37 °C. Después de la incubación a cada muestra se añadieron 5 ml de Tris-acetato 100 mM (pH 8,0). A cada muestra se añadieron 1,2 ml adicionales de pronasa 10 mg/ml, reconstituido en Tris-acetato 500 mM, acetato cálcico 50 mM (pH 8,0) y se incubó durante 24 h a 36 °C. Después del tratamiento todos los volúmenes se combinaron y se prepararon para procesamiento de intercambio aniónico por centrifugación y filtración.

Protocolos de digestión de los GAG

El análisis de los GAG, incluyendo sus tamaños de dominio sulfatados y niveles de sulfatación relativos, se realizó usando protocolos establecidos que incluían la degradación mediante ácido nitroso o liasas.

Digestión con ácido nitroso

La despolimerización del heparán sulfato basada en ácido nitroso conduce a la degradación eventual de la cadena de carbohidrato en sus componentes de disacárido individuales cuando se lleva hasta el final. El ácido nitroso se preparó enfriando en hielo, por separado, 250 μ l de H_2SO_4 0,5 M y $Ba(NO_2)_2$ 0,5 M, durante 15 min. Después de enfriar, el $Ba(NO_2)_2$ se combinó con el H_2SO_4 y se sometió a agitación vorticial antes de centrifugarse para retirar el precipitado de sulfato de bario. Se añadieron 125 μ l de HNO_2 a las muestras de GAG resuspendidas en 20 μ l de H_2O y se sometió a agitación vorticial antes de incubarse durante 15 min a 25 °C con mezclado ocasional. Después de la incubación, se añadió Na_2CO_3 1 M a la muestra para llevarla a un pH de 6. A continuación, se añadieron a la muestra 100 μ l de $NaBH_4$ 0,25 M en $NaOH$ 0,1 M y la mezcla se calentó a 50 °C durante 20 min. Después, la mezcla se enfrió a 25 °C y se acidificó con ácido acético glacial a pH 3 en la campana de extracción. Después, la mezcla se neutralizó con $NaOH$ 10 M y el volumen se redujo después por liofilización. Las muestras finales se procesaron en una columna P-2 Bio-Gel para separar los di- y tetrasacáridos para verificar la degradación.

Digestión con Heparinasa III

La Heparinasa III es una enzima que escinde las cadenas de azúcar a enlaces glucuronídicos. Cada una de las series de enzimas de heparinasa (I, II y III) presenta una actividad relativamente específica despolimerizando determinadas secuencias de heparán sulfato en sitios de reconocimiento de sulfatación particulares. La Heparinasa I escinde cadenas de HS en regiones NS a lo largo de la cadena. Esto conduce a la alteración de los dominios sulfatados que se piensa que llevan la mayoría de la actividad biológica del HS. La Heparinasa III despolimeriza el HS en los dominios NA, dando como resultado la separación de la cadena de carbohidrato en dominios individuales sulfatados. Finalmente, la Heparinasa II escinde principalmente en los dominios "hombro" NA/NS de las cadenas de HS, donde se encuentran los diversos patrones de sulfatación.

Para aislar los posibles dominios activos se puso el foco sobre la despolimerización de las regiones NA de GAG+. Tanto las muestras enzimáticas como liofilizadas del HS se prepararon en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, BSA 0,1 mg/ml y $CaCl_2$ 4 mM a pH 7,5. La concentración de heparinasa III añadida a cada muestra se rige por la cantidad relativa de componentes de HS en la muestra. El análisis, a través de despolimerización con ácido nitroso, indicaba que las muestras GAG+ consisten predominantemente en HS; por tanto la enzima se usó a 5 mU por 1 μ g de HS. La muestra se incubó a 37 °C durante 16 h antes de detener la reacción calentando a 70 °C durante 5 min. Después, la muestra se aplicó al sistema de columna apropiado para su análisis posterior.

Cultivo de célulasProducción de GAG

Para aislar especies de GAG representativas de osteoblastos en desarrollo, se cultivaron células MC3T3 en condiciones osteogénicas durante 8 días. El componente celular se retiró mediante incubación en una solución diluida de hidróxido de amonio (NH_4OH) 0,02 M a 25 °C durante 5 min. Después de 5 min, el NH_4OH se retiró por inversión de las superficies de cultivo. Los cultivos tratados se dejaron secar en un equipo de flujo laminar durante una noche. Al día siguiente los cultivos tratados se lavaron tres veces con PBS estéril y se dejó secar en el equipo de flujo laminar. Después, los cultivos de matriz preparados se conservaron en condiciones estériles a 4 °C hasta que se liberasen los proteoglicanos primarios mediante tratamiento con tampón de alteración y cromatografía de intercambio aniónico.

Bioactividad de GAG específico de BMP2

Cada 48 h se subcultivaron mioblastos C2C12, hasta un máximo de 15 pases, sembrando en placas a $1,3 \times 10^4$ células/cm² en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con FCS al 10 %. La diferenciación osteogénica se indujo a 2×10^4 células/cm² en DMEM complementado con FCS al 5 %, se designaron concentraciones de fracciones de proteína morfogénica ósea humana recombinante 2 (rhBMP2) y de glucosaminoglucano con una afinidad positiva o negativa para rhBMP2 (GAG+ y GAG- respectivamente). Las fracciones de rhBMP2 y GAG se pre-incubaron durante 30 min a 25 °C antes de la adición a sus cultivos C2C12 correspondientes. Se permitió que los cultivos crecieran en estas condiciones durante 5 días, cambiándose los medios para cada condición cada 48 h, antes de extraer las muestras de ARNm y prepararse para análisis RQ-PCR. La PCR en tiempo real para la expresión de osteocalcina se realizó usando el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7000® /PerkinElmer Life Sciences). Se diseñaron cebadores y sondas usando el programa informático Primer Express (v2.1, PE Applied Biosystems). La sonda diana se rediseñó para incorporar bases de LNA y se marcó con BHQ-1 (Sigma-Prologo). Se usó el gen de la subunidad ribosomal 18S (VIC/TAMRA) como un control endógeno, consistiendo cada condición en tres repeticiones, cada una de ellas ensayada por triplicado. Los datos de la PCR sin procesar se analizaron usando el programa informático ABI Sequence Detector. Los valores de expresión del gen diana se normalizados a la expresión de 18S antes de calcular las unidades de expresión relativas (UER).

RESULTADOS

Cromatografía de intercambio aniónico

5 Para extraer satisfactoriamente los GAG de las muestras MX, es necesario retirar otras proteínas de la matriz que pueden contaminar la muestra. Dado que los GAG constituyen las moléculas cargadas más negativamente en la MEC, esto se realiza de un modo más eficaz con cromatografía de intercambio aniónico.

10 Las muestras se alteraron usando tampón de Urea 8 M/CHAPS y se cargaron en la columna de intercambio aniónico. La proteína no deseada y los restos de MEC se lavaron de la columna y los GAG cargados negativamente se eluyeron con NaCl 1 M. Un cromatograma típico (Fig. 1) muestra claramente el flujo continuo de una gran cantidad de restos no adherentes, así como la transparencia y fuerte elución de una gran cantidad de GAG de la preparación MX. Esto no solo hace que este resultado demuestre la purificación de los GAG por este método, también confirma la retención de una gran cantidad de los GAG en la MEC después del tratamiento con NH₄OH.

Desalinización

15 Prácticamente todos los métodos cromatográficos empleados para purificar y analizar los GAG a diversas fases de procesamiento requieren elución con tampones de alto contenido en sal. Dado que las condiciones de alto contenido en sal interfieren con una cromatografía basada en afinidad, es necesario desalinizar las muestras después de cada fase de procesamiento. Generalmente este proceso se completa con cromatografía de exclusión por tamaño: En estas condiciones moléculas más grandes, tales como los GAG, salen de la columna antes de las moléculas pequeñas, incluyendo la sal y los restos de GAG pequeños. La separación de los GAG de la sal contaminante puede realizarse después en el cromatograma resultante (Fig. 2) que también sirve para confirmar que las cadenas de GAG permanecen intactas durante el proceso del tratamiento.

Sistema de columna de BMP2-HBP

Preparación de la columna

30 Debido a los costes prohibitivos implicados en la creación de una columna de factor de crecimiento BMP2 con reactivos disponibles en el comercio, se utilizó en su lugar una preparación biotinilada del dominio de unión a heparina conocido de BMP2 (BMP2-HBP). Este péptido se inmovilizó en una columna HP (1 ml) Hi-Trap de Estreptavidina para retener específicamente cadenas de GAG con una afinidad por el péptido del dominio de unión a heparina específico.

35 Primero se examinó cualquier afinidad de fondo que los GAG pudiesen haber tenido por la columna de estreptavidina desnuda procesando la fracción de GAG total (tGAG) contra un lecho de columna desprovisto de BMP2-HBP (Fig. 3). Estos resultados confirman que las muestras de tGAG procedentes de MX no llevan afinidad intrínseca por la columna de estreptavidina. Adicionalmente se investigaron dos métodos distintos de exposición de los tGAG a BMP2-HBP con la finalidad de separar cadenas con una afinidad específica. El péptido se preincubó durante 30 min con 25 mg de los tGAG antes de cargar en la columna de estreptavidina, o se cargó primero, procesándose los tGAG a través del lecho de columna después de esto.

40 La pre-incubación de los tGAG con BMP2-HBP reveló la completa incapacidad del péptido para asociarse con la columna (Fig. 4), dejando solo mediar cualquier aislamiento de GAG específicos. Sin embargo, cuando el péptido se cargó en la columna solo, su asociación con la columna fue absoluta, sin elución efectivamente del péptido, incluso en condiciones salinas de 1 M (Fig. 5). Esta asociación de alta afinidad indica que la asociación de biotina-estreptavidina funciona correctamente y sugiere una posible inhibición de la unión a la columna, cuando se carga junto con los tGAG, debido a impedimento estérico.

Capacidades de carga de la columna

55 Dado que la proporción de los tGAG, que probablemente tenían una afinidad relativa por la BMP2-HBP, era desconocida, se buscó primero estandarizar las cantidades de los tGAG cargados sobre la columna peptídica en cada proceso para la separación. Se prepararon columnas Hi-Trap inmovilizando 1 mg de BMP2-HBP para la extracción de los tGAG con una afinidad específica por el sitio de unión a heparina de BMP2. Esta cantidad se seleccionó para maximizar la cantidad de péptido disponible para futuros experimentos que debe estabilizar la columna cuando se ve comprometida con el tiempo. La inestabilidad es un problema significativo con las columnas peptídicas, con impactos correspondientes en consistencia. Los primeros intentos de carga de 25 mg de los tGAG en una columna acoplada a BMP2-HBP de 1 mg dieron como resultado una sobrecarga clara, como se observa a través de la absorbancia a 323 nm en el flujo continuo (Fig. 6). Aunque se observó un pico de elución significativo, los tGAG con afinidad por el HBP se perdieron en el flujo continuo debido a una sobrecarga. Esto se examinó reprocesando el flujo continuo a través de la columna peptídica (Fig. 7). Esto dio como resultado un pico (elución) de GAG+ significativo, lo que indica que el proceso previo había saturado la columna.

65

La optimización adicional condujo a cargar rutinariamente no más de 6 mg de los tGAG sobre una columna de BMP2-HBP de 2 mg. Esto, como se pone en evidencia a través del pico de flujo continuo (Fig. 8) y la ausencia de fracción de unión positiva (Fig. 9), impide la sobrecarga de la columna. La extracción de estos tGAG con una afinidad por BMP2-HBP de cada conjunto de muestras en un solo paso permite, a su vez, separar fracciones GAG+ y GAG- más eficazmente.

Análisis de dominio de GAG

Especificidad de la cadena de GAG+

Con el establecimiento de un protocolo estandarizado, se pudieron aislar, de manera reproducible, fracciones de GAG+ aisladas para análisis posterior.

Dada la estructura del dominio del heparán sulfato que media la especificidad de unión de proteínas, es probable que las cadenas de GAG multidominio que se unen a la columna estén realmente formadas por una gran proporción de cadena con poca o ninguna afinidad específica por BMP2. De manera similar, es posible que las cadenas GAG- que aparecen pueden contener realmente dominios que llevan alguna afinidad por BMP2-HBP. Para examinar estas posibilidades, fue necesario degradar las cadenas de GAG en sus dominios componente para un examen más amplio.

La enzima heparinasa III (heparinasa I) escinde cadenas de HS principalmente en aquellas áreas que flanquean regiones altamente sulfatadas, liberando así dominios de asociación a proteína, altamente cargados, que unen factores de crecimiento susceptibles, en este caso, la BMP2-HBP. Tanto las fracciones GAG+ como GAG- se expusieron a digestión con heparinasa, aunque ninguna fracción mostró ningún cambio en su afinidad por la BMP2-HBP (Fig. 10).

La digestión con heparinasa III de las dos fracciones GAG+ y GAG- de longitud completa se realizó posteriormente, y ambos conjuntos de muestras digeridas se cargaron posteriormente en la columna de BMP2-HBP para evaluar la afinidad de retención.

La eficacia de la digestión con heparinasa se validó por el aumento de la absorbancia relativa de muestras del mismo peso seco después de digestión enzimática, como se muestra en las Figuras 10 y 12. Dado que el control de las cadenas de GAG a 232 nm es mediante la propia cadena de azúcar y, en particular, enlaces insaturados, cualquier escisión a lo largo de la longitud de la cadena por la heparinasa III, da como resultado enlaces insaturados de fragmentos HS lo que conduce a un aumento de absorbancia.

Curiosamente, la digestión de cadenas de GAG- de longitud completa con heparinasa produjo fracciones no portadoras de ninguna afinidad notable por la BMP2-HBP (Fig. 11). Sin embargo, de manera similar, la digestión de muestras GAG+ de longitud completa dio como resultado fracciones que no carecían de afinidad por BMP2-HBP (Fig. 12). Este resultado sugiere que todas las cadenas de GAG de unión a BMP que se producen contienen repeticiones de dominio que tienen una afinidad específica por el HBP. Como alternativa, el HBP puede no ser capaz de producir una discriminación suficiente entre los dominios GAG+ con diversa afinidad en estas condiciones minimalistas.

Composición de GAG+

Medición de GAG+ de longitud completa

Para examinar la composición de las fracciones de GAG+ de la columna de BMP2-HBP, primero se examinó su tamaño medio. Esto se hizo para tener la certeza de que realmente se estaban separando cadenas de GAG de longitud razonable, en lugar de fragmentos pequeños que no llevaban ninguna afinidad específica. Aunque cualquier medición de las cadenas de GAG es problemática, debido a su conformación de tipo varilla relativamente rígida, pudo realizarse un conjunto de suposiciones invocando al radio de Stoke y a la esfericidad aparente.

Las muestras de GAG+ de longitud completa se cargaron en columnas de filtración en gel Biogel P10 (1 cm x 120 cm) con un límite de exclusión de entre 20 kDa y 1,5 kDa. La absorbancia medida a 232 nm indicó una gran proporción si las moléculas de GAG+ tenían un tamaño aparente global mayor de 20 kDa (Fig. 13).

Se ha propuesto que, las cadenas de azúcar deben ser más largas de aproximadamente 10-14 anillos para potenciar la actividad biológica significativa para la familia de mitógenos de FGF. En cuanto al peso molecular aparente, una cadena 14 disacáridos completamente sulfatados corresponde a aproximadamente 8,7 kDa. Dado que la mayoría de las cadenas encontradas en las muestras de GAG+ muestran un peso molecular aparente > 20 kDa, es razonable suponer que la interacción que llevan por la BMP2-HBP tenga alguna afinidad específica y no sea el resultado de una interacción inespecífica general.

Especies de azúcar de GAG+

Hay cinco familias de azúcares de glucosaminoglucano principales: hialuronano, queratán sulfato, dermatán sulfato, condroitín sulfato y heparán sulfato. De estas cinco, solo el heparán sulfato, el condroitín sulfato y el dermatán sulfato tienen la capacidad de generar dominios variablemente sulfatados que pueden codificar interacciones específicas con citocinas particulares tales como la BMP2. La identificación del tipo de especies de azúcar aisladas usando la columna de BMP2-HBP fue de importancia crucial para este estudio y se determinó usando una determinación de degradaciones químicas y enzimáticas de diagnóstico. En particular, el heparán sulfato, uno de los principales candidatos de GAG para la interacción con BMP2, puede degradarse completamente en sus componentes disacáridos en presencia de ácido nitroso.

Por tanto, las muestras GAG retenidas por HBP se incubaron con ácido nitroso durante 20 min antes de la separación en una columna de calibre P10 de Biogel. El examen del cromatograma resultante reveló una degradación casi completa de todas las muestras de azúcar GAG+, medida por absorbancia a 232 nm y 226 nm (Fig. 14).

Este resultado sugiere contundentemente que las cadenas de azúcar de longitud completa aisladas específicamente contra la BMP2-HBP constan principalmente de heparán sulfato, ya que otras cadenas de azúcar no se ven afectadas por la despolimerización con ácido nitroso.

No obstante, aunque casi todas las cadenas GAG+ pudieron degradarse de esta manera, se observó un pico pequeño a pesos moleculares más altos (>20 kDa). Puede suponerse que consta de condroitín sulfato, de los que el CS-B (dermatán sulfato) y el CS-E (condroitín-4,6-sulfato) demuestran complejidad de sulfatación similar a la de los heparán sulfatos.

*Análisis de especies de GAG*GAG específicos de BMP2-HBP (especies alternativas)

La degradación de cadenas GAG+ de longitud completa por exposición a ácido nitroso indica claramente que la mayoría de las cadenas de azúcar GAG+ consiste en especies de azúcar de heparán sulfato (Fig. 14). Sin embargo, la degradación de la muestra GAG+ no fue completa como se observó por el pico remanente en la región de alto peso molecular. La presencia de este pico apunta contundentemente a la posibilidad de otras especies de cadenas de azúcar, tales como condroitín o dermatán sulfato. Se buscó después examinar la posible afinidad que los otros dos tipos de azúcar podían tener con esta citocina examinando primero una variedad de azúcares de condroitín y dermatán disponibles en el comercio con respecto a su afinidad con la columna de BMP2-HBP.

Se ensayó el condroitín-4-sulfato (C4S), el condroitín-6-sulfato (C6S) y el dermatán sulfato (DS) cargando, en cada caso, 6 mg del azúcar en la columna de BMP2-HBP en las mismas condiciones que las usadas para aislar cadenas de GAG+ de muestras de matriz de MC3T3.

Los cromatogramas que ilustran la afinidad de cada uno de los 3 tipos de cadenas de azúcar mostraron que solo el C4S (Fig. 15) tenía alguna afinidad significativa por el péptido. Esta afinidad junto con la ausencia de afinidad por la columna de BMP2-HBP observada tanto para el C6S (Fig. 16) como para el DS (Fig. 17), parece indicar que el C4S tiene una interacción particular, posiblemente significativa, con el sitio de unión a heparina de BMP2.

Como aún no se ha caracterizado bien ninguna posible interacción entre el condroitín sulfato y la BMP2, estos resultados condujeron a cuestionar la validez de la cromatografía en columna como un control preciso de la interacción entre BMP2/heparán. Para explorar adicionalmente la especificidad de la dinámica de interacción, se ensayaron diversas especies de azúcar disponibles en el comercio para determinar su afinidad por la columna. Éstas incluían heparán sulfato, heparina de bajo peso molecular (Heparina-BPM), heparina de alto peso molecular (Heparina-APM) y Heparina-APM tratada con heparinasa I.

Curiosamente, ninguna de estas especies de GAG disponibles en el comercio parecía demostrar ninguna interacción específica con la columna peptídica. El heparán sulfato de riñón bovino tenía una afinidad muy pequeña (Fig. 18), un comportamiento que se confirmó adicionalmente por su incapacidad de aumentar positivamente la proliferación celular mediada por FGF2 (datos no mostrados), como se observa en presencia de HS2. Esta capacidad reducida de esta muestra de GAG para unirse a la columna puede ser como resultado de que se comercialice en una forma relativamente no sulfatada.

Ninguna de las muestras de heparina ensayadas mostró la más mínima afinidad por la columna. Esto es de particular interés ya que la propia BMP2 se aisló históricamente por primera vez usando columnas de heparina. Para confirmar este resultado, se ensayó la heparina tanto de BPM (Fig. 19) como la de APM (Fig. 20); ninguna de ellas mostró afinidad alguna apreciable por la columna.

Como se supuso que el péptido BMP2-HBP relativamente pequeño podía haber tenido dificultades para mantener su asociación con las moléculas de heparina mucho más grandes, a continuación las muestras de heparina-APM se sometieron a una digestión previa usando heparinasa I. Estos fragmentos de heparina-APM más pequeños se procesaron después sobre la columna de BMP2-HBP; sin embargo, este tratamiento no pareció mejorar la capacidad de ninguna de las muestras de heparina para unirse a la columna peptídica (Fig. 21).

Esta incapacidad de la columna peptídica de mostrar ninguna interacción específica con ninguna de las diversas preparaciones de heparina fue algo inesperada, debido a que la BMP2 se estaba aislando convencionalmente por afinidad a heparina. Sin embargo, es posible, que esto pueda ser como resultado de la inversión del orden de interacción del “receptor-ligando”; en este caso BMP2-HBP representaba el “receptor” fijo a diferencia de la heparina que representaba el “ligando”, o que las concentraciones de BMP2-HBP o heparina soluble favorecen un estado disociado que anula rápidamente cualquier afinidad bajo un estrés de flujo/sal.

CONCLUSIONES

El uso de un sustrato de MEC derivado de preosteoblastos, proporciona un modelo útil para simular la actividad de los GAG asociados con la MEC, originalmente secretados, en relación con dicha osteoinducción. A través de numerosos estudios previos se ha examinado el papel que tiene esta interacción original modulando la actividad de BMP2, esto se ha realizado normalmente a nivel de la citocina, en lugar de con miras a explorar la especificidad de secuencia de los GAG biomoduladores.

Por tanto, en este documento se buscaba aprovechar la disponibilidad de los GAG originalmente secretados en el sustrato MX y su posibilidad para dirigir la interacción, específica de secuencia y la modulación de la participación de mioblastos C2C12 inducida por BMP2 con el linaje osteogénico.

Intercambio aniónico

El uso de este protocolo particular, convencional y bien caracterizado, proporcionó una prueba concluyente de la accesibilidad del GAG a partir del sustrato MX tratado con NH_4OH . Las preocupaciones iniciales se centraron en el duro tratamiento químico usado para producir la lisis de los componentes celulares de la MEC y esto puede también haber dado como resultado la separación de la mayoría de los GAG de la MEC. Sin embargo, el pico significativo, de alta afinidad, observado en la cromatografía de intercambio aniónico ilustra claramente la retención de una gran cantidad de GAG en el sustrato MX. Si bien esta metodología particular no permite la identificación de especies de GAG individuales, sí ofrece pruebas concluyentes de su presencia en la muestra debido a que están entre las moléculas cargadas más negativamente secretadas por las células.

Sistema de la columna de BMP2-HBP

Las investigaciones previas realizadas en cuanto al papel funcional del péptido de unión a heparina BMP2 proporcionaron una herramienta útil para investigar la interacción, posiblemente específica, que la BMP2 tenía con los GAG. Esta cadena sencilla de aminoácidos, localizada en el extremo N de cada monómero de BMP2, parecía ser la única responsable de la mediación de la afinidad de BMP2 por GAG.

Se investigó por tanto el uso de esta región de la molécula de BMP2 como un ligando “cebo” en intentos de retener aquellas cadenas de GAG que llevaban afinidad relativa por la citocina. De esta manera, el uso de BMP2-HBP dio como resultado una retención significativa del HS con la columna peptídica (GAG+).

Preparación de la columna

Usando una HBP biotinilada N terminal se preparó una columna de cromatografía de afinidad de BMP2-HBP y se pudieron retener satisfactoriamente las muestras de GAG que eran candidatas para controlar al homodímero BMP2 nativo. Preparaciones iniciales de la columna destacaban algunos problemas interesantes. Preparaciones de BMP2-HBP marcadas con biotina que se mezclaron previamente con los tGAG mostraron una incapacidad de unirse a la columna. Como los últimos ensayos demostraron que la BMP2-HBP se unía fácilmente a la columna de estreptavidina cuando se cargaba sobre sí misma, este resultado indicó que los GAG interferían con la capacidad del sitio de biotinilación del péptido para asociarse con la columna de estreptavidina. Los propios tGAG no llevan afinidad por la estreptavidina, lo que indica que la interacción directa con la BMP2-HBP, posiblemente mediante impedimento estérico, fue responsable de esto.

Optimización de la columna

Sin ninguna información directa que permitiese estimar las capacidades de unión de los azúcares de GAG+ en las muestras, era preciso optimizar la columna peptídica para garantizar que la carga excesiva de muestra no condujese a saturar la columna y la consiguiente pérdida de muestra. Esto implicaba inicialmente saturar de un modo intencionado la columna para examinar la capacidad de unión de una cantidad conocida de BMP2-HBP. Incluso con una gran cantidad de tGAG el péptido podría retener la mayoría de las cadenas de azúcar GAG+. En estas

condiciones tan solo 1 mg de BMP2-HBP pudo retener completamente todas las cadenas de GAG+ en dos ciclos. Así pues, la columna pareció “simular” una columna de factor de crecimiento de BMP2 verdadero y proporcionar una manera extremadamente eficaz de extracción de muestras de GAG+.

5 La optimización de las columnas basadas en péptidos para el aislamiento específico de GAG es un procedimiento complejo que varía enormemente dependiendo del tamaño y de las características químicas individuales de la proteína usada. Estudios previos, utilizando columnas de FGF-1 y 2 de factor de crecimiento (Turnbull y Nurcombe, personal communication), también mostraron una necesidad significativa del mantenimiento continuo de la columna y una vida útil corta de la columna viable. Estos estudios demuestran la laboriosa naturaleza de trabajar con
10 columnas peptídicas y el cuidado que debe tenerse para optimizar correctamente esta manera de sistema. Desgraciadamente, aunque existen otros sistemas para el análisis de interacciones específicas entre el GAG y las proteínas, generalmente estos carecen de la capacidad de aislar cantidades suficientes de los GAG para el análisis posterior, haciéndolos inapropiados para la trayectoria del estudio deseada.

15 Análisis de dominios de GAG

Los patrones de sulfatación del GAG están, particularmente en el caso del heparán sulfato (HS), frecuentemente concentrados en dominios de alta sulfatación que se intercalan con regiones de poca sulfatación. Esta agrupación de sitios de sulfatación en dominios es lo que proporciona la unión específica de región de ligandos con la cadena de GAG, lo que permite que una sola molécula de azúcar se una posiblemente a una variedad de dianas diferentes y estabilizar la interacción entre éstos, como se observa en el sistema de FGF. Las excepciones a este modelo propuesto para las interacciones entre el HS y el ligando incluyen la interacción entre el interferón gamma (IFN γ) y el heparán sulfato. En este caso, la interacción entre el GAG y el IFN γ conduce a una fuerza aumentada de la citocina. El IFN γ que queda disociado de los GAG locales se procesa rápidamente en una forma inactiva, lo que impide su señalización en áreas inapropiadas después de la difusión. El IFN γ también muestra cuatro dominios de unión a heparina distintos, cada uno con una secuencia diferente, un hallazgo no inusual para las proteínas de unión a heparina. Sin embargo, solo dos dominios que se encontraban inmediatamente en el extremo C de la proteína habían mostrado mediar las características de unión de la heparina con los IFN γ . Es importante destacar, que el análisis de secuencias de la secuencia del HS con afinidad específica para estos dos sitios de unión a heparina con
20 IFN γ revelan una diferencia interesante en comparación con el modelo normalmente observado de interacción entre el HS y su ligando. En este caso, la secuencia de HS responsable de la unión del IFN γ se encontró que estaba compuesta por una región predominantemente *N*-acetilada, que llevaba poca sulfatación. Esta región estaba flanqueada por dos pequeñas regiones *N*-sulfatadas. Esto difiere significativamente del sistema observado en el FGF, donde los patrones de sulfatación en dominios NS no son responsables de mediar la interacción entre el FGF y el HS. En los últimos años, este tipo de interacción se ha observado en muchos otros sistemas, tales como el PDGF, la IL-8 y la endostatina. El descubrimiento de este tipo de interacción con el HS, como se observa en estas citocinas, puede explicar la bioactividad observada en el hialurano, que no lleva patrones de sulfatación en ningún punto a lo largo de su cadena y sin embargo tiene la capacidad de modular la actividad de factores tales como NF-KB.

40 Estas interacciones observadas entre los ligandos y los GAG, en particular la del IFN γ , difieren significativamente del modo de interacción, propuesto y observado, entre el HS y la BMP2. El dominio de unión a heparina N-terminal de una sola BMP2 no muestra estructura secundaria y parece interactuar exclusivamente con HS en base a la carga. Aunque no se realizó un análisis de secuencia en profundidad del HS que se unía a esta secuencia peptídica, la necesidad de eluirse en condiciones de NaCl de aproximadamente 300 mM condujo a sospechar la presencia de un grado de sulfatación moderado, colocando por lo tanto esta interacción dentro del modelo convencional de patrones de sulfatación que media interacciones específicas.

Especificidad de cadena del GAG+

50 La asignación de patrones de sulfatación en dominios que dan al HS su capacidad para estabilizar interacciones proteómicas también da como resultado la posibilidad de que una cadena de azúcar de GAG+ de longitud y complejidad suficiente pueda llevar varios dominios que de por sí no tengan afinidad directa por la BMP2-HBP, debido a que llevan una secuencia de sulfatación diferente. Por el contrario, también es posible que algunas cadenas de azúcar de longitud completa que se identificaron como que tenían poca afinidad por la BMP2-HBP
55 (GAG-) puedan contener algunos dominios crípticos que lleven dicha afinidad.

En los últimos años, se han publicado numerosos informes que proporcionan pruebas contundentes de un “código de sulfatación” dentro de estas cadenas complejas de carbohidratos. Si bien los detalles de este “código de sulfatación” siguen siendo difíciles de aclarar y la secuenciación de largas cadenas de carbohidratos sulfatadas es un proceso complejo y lento, se han propuesto diversos modos de interacción específica posibles entre los GAG y los ligandos. En particular, una observación ha llevado a la caracterización de numerosos modelos de GAG- ligando; a la agrupación de la sulfatación en regiones, o “dominios”, distintas(os), a lo largo de la longitud de muchos tipos de GAG, tales como el heparán sulfato. Curiosamente no se ha observado ningún molde para este fenómeno, y parece ser principalmente un resultado de la actividad temporal de las enzimas sulfotransferasas responsables de esta fase
60 de síntesis de GAG.

65

Herramientas particularmente útiles en el estudio de secuencias de GAG específicas son diversas heparín liasas que pueden usarse para examinar la despolimerización diana de cadenas de carbohidratos complejos, proporcionando así una idea de su estructura. Una heparán liasa particular, la heparinasa III (heparitinasa), escinde cadenas de heparán sulfato en sitios que flanquean los dominios altamente sulfatados que pueden producirse en las cadenas de heparán sulfato. Por tanto, usando esta enzima, es posible liberar estas regiones posiblemente activas de las cadenas de azúcar de longitud completa y separarlas, si funcionan como dominios sencillos, a través de cromatografía de afinidad, de regiones sin afinidad específica por la BMP2-HBP.

Es importante señalar que, en el caso de las interacciones entre el GAG y el ligando, la afinidad por la secuencia no es necesariamente garantía de bioactividad. El modo de la actividad mediada por los GAG durante su asociación con sus diversos ligandos difiere dependiendo en gran medida del sistema. En algunos casos en los que la cadena de azúcar es la responsable de la prolongación de la interacción entre proteína-proteína mediante la estabilización de estructuras de proteína terciaria, tal como se encuentra entre el FGF y su receptor, y la interacción entre el HGF/SF y Met, regiones de sulfatación distintas múltiples pueden estar implicadas en la mediación de la bioactividad que se pretende de la cadena de azúcar. En dichos casos, el aislamiento de dominios individuales sulfatados de una cadena de carbohidrato de longitud completa puede, de hecho, dar como resultado una inhibición de la bioactividad del azúcar dado que a través de cada "fragmento de dominio" aún se une a su diana que es capaz de mediar el efecto biológico deseado de una cadena de carbohidrato de longitud completa combinada.

Curiosamente, esta característica particular de interacciones entre el GAG y el ligando es precisamente lo que hace que este tipo de enfoque sea útil para modular la actividad de BMP2. El modelo propuesto para la modulación de la bioactividad de BMP2 del GAG implica la inmovilización de la citocina en los GAG en la MEC o en las superficies celulares. En este tipo de sistema, la aplicación de GAG exógenos específicos para el dominio de unión a heparina de BMP2 impediría esta interacción, aumentando a corto plazo la señalización mediada por BMP2, similar al efecto observado durante la adición de heparina soluble. Si bien existe cierta indicación de que esta forma de interacción continuaría protegiendo a la citocina de la degradación proteolítica, la deslocalización de BMP2 de su región de bioactividad esperada, tiene la posibilidad de afectar negativamente a la eficacia de las citocinas a largo plazo.

Los ensayos de control de las cadenas de GAG+ y GAG- de longitud completa produjeron perfiles similares a los observados durante su separación primaria. Sin embargo, el análisis de las cadenas de GAG+ y GAG- después del tratamiento con heparinasa III, produjo resultados sorprendentes. La digestión de las cadenas de GAG+ no parecía generar fragmentos separables basados en la afinidad simple por BMP2-HBP. Por otra parte la digestión de cadenas de GAG- de longitud completa no produjo la liberación de dominios positivos de las cadenas de azúcar negativas. Hay alguna posibilidad de que la digestión enzimática no llegase hasta el final. Sin embargo, el cromatograma resultante mostró claramente un gran aumento en la absorbancia a 232 nm en comparación con las cadenas de GAG de longitud completa. Como una gran proporción de la absorbancia de los glucosaminoglucanos a 232 nm está mediada a través de la absorbancia de enlaces insaturados, tales como los formados durante la despolimerización enzimática, esto indica contundentemente que la digestión enzimática era, de hecho, satisfactoria.

Las implicaciones de este resultado son algo inusuales. Estos datos sugieren que las cadenas de GAG no son únicamente sintetizadas por células que interactúan específicamente con BMP2, sino que, en el caso de células MC3T3, estas cadenas de azúcar llevan un número de repeticiones de secuencias específicas para aspectos de metabolismo de BMP2. El hecho de que la BMP2 sea un factor extremadamente fuerte puede ofrecer una explicación de esta observación. Los efectos de la BMP2 sobre la osteoinducción de células progenitoras mesenquimales están bien documentados, así como su capacidad para inducir la formación de hueso ectópico en células que están incluso más alejadas del linaje osteogénico. Dada esta fuerza, se sabe que la señalización aberrante de BMP2 tiene consecuencias perjudiciales tanto para la curación como para el desarrollo. Es posible diseñar numerosas repeticiones de la secuencia de interacción BMP2-HBP en los GAG pre-osteoblásticos para garantizar una unión máxima, y por tanto la modulación, de esta capacidad de la citocina para inducir un destino celular alterado. Por el contrario, las concentraciones extremadamente bajas de la BMP2 producida *in vivo* también pueden requerir este tipo de producción de la cadena de azúcar con el fin de asegurar la retención de una concentración local suficiente, una observación confirmada por las concentraciones extremadamente altas de BMP2 necesarias *in vitro* para inducir la diferenciación osteogénica de células de mioblastos C2C12.

De particular interés es el hecho de que esta repetición de dominios de unión a BMP2 se produce mediante una ruta de síntesis para la cual aún no se ha aclarado ningún mecanismo molde o de temporización. La precisión y reproducibilidad de los dominios de secuencia específicos dentro de una sola cadena de azúcar (a diferencia de la agrupación aleatoria de dichos dominios con aquellos contra otros ligandos) sugiere contundentemente que estas células tienen, efectivamente, la capacidad de dirigir la generación de secuencias de azúcar específicas. La comprensión actual de la estructura del HS implica la "edición" post-síntesis progresiva de la cadena de carbohidratos en la generación de regiones específicas de secuencia, con observaciones que apuntan hacia algún tipo de "molde" enzimático, por lo que las concentraciones locales de sulfotransferasas particulares, así como de otras moléculas que interactúan, se usan para controlar directamente la generación de secuencias de azúcar específicas. La comprensión actual de este modo de síntesis específica se formula en gran parte basada en numerosos estudios, incluyendo los de Lindahl *et al.* que investigaron la alta interacción de afinidad entre la antitrombina III y la heparina, y los de Esko *et al.* en los que participaban mutantes de células de ovario de hámster

chino (CHO) con rutas de síntesis de GAG alteradas. Estos estudios, si bien varían significativamente en sus enfoques con el análisis de GAG, todo apunta hacia un sistema altamente conservado de la síntesis específica de GAG, para la modulación dirigida de citocinas y la actividad del receptor. Es importante destacar que estos estudios también sirven para explicar la posible generación de dichas repeticiones de BMP2 como las observadas en este estudio.

Constitución de GAG+

Tamaño de GAG+ de longitud completa

La bioactividad de las cadenas de GAG individuales por los FGF está muy relacionada con la longitud de cadena del carbohidrato. Una estrategia común para evaluar la bioactividad del GAG es ensayar fragmentos de dominio sulfatados incluso más cortos y determinar así la secuencia posible más corta necesaria para mediar la actividad observada.

Usando esta estrategia primero se examinaron las cadenas de azúcar GAG+ de longitud completa, y se determinó que tenían un tamaño >20 KDa, suficientemente largo para llevar múltiples dominios con afinidad por BMP2. Curiosamente, esta observación refuerza la observación inicial de que las muestras de GAG+ tratadas con heparinasa 3 mostraron repeticiones múltiples de segmentos de la cadena de carbohidrato con una afinidad específica por BMP2, dado que una cadena de azúcar de ese tamaño, variablemente sulfatada, tiene la capacidad de llevar numerosos dominios sulfatados.

Especies de azúcares de GAG+

Con la mayoría de los cinco tipos de glucosaminoglucanos que constituyen el "glucoma" capaz de codificar las interacciones específicas observadas con BMP2, fue necesario aclarar cuáles de estos tipos de GAG podrían estar involucrados en esta asociación específica. Aunque el primer candidato para esta interacción es un heparán sulfato, también se han identificado interacciones de factores de crecimiento análogos para el condroitín y dermatán sulfato.

El heparán sulfato puede despolimerizarse totalmente en sus componentes disacáridos con ácido nitroso. Esta característica particular, compartida con la heparina y el queratán sulfato, es esencial para el análisis de poblaciones de GAG específicas. En el caso de este análisis de los constituyentes de carbohidratos de las muestras de GAG+, la degradación debida al ácido nitroso fue diagnóstica del heparán sulfato. Esta probabilidad se debe principalmente al grado de patrón de carga más elevado del heparán sulfato por sulfatación en comparación con la heparina o el queratán sulfato. En última instancia, este patrón de carga es responsable de la interacción específica de la BMP2 con el HS.

El análisis de los autores de la invención, que utilizan el protocolo del ácido nitroso, mostró una degradación completa del conjunto de muestras de GAG+, lo que indicaba que la mayoría de los azúcares en el conjunto de muestras de GAG+ estaban realmente, 1,3-ligados y, por tanto, eran heparán sulfato. Este resultado confirma las numerosas observaciones con respecto a la especificidad de las interacciones de la citocina con el heparán sulfato, particularmente la interacción que muestra BMP2 con la heparina y con el HS.

Análisis de especies de GAG

GAG específicos de BMP2-HBP (especies alternativas)

El pequeño pico remanente que se observó después de la degradación de las muestras de GAG+ por ácido nitroso confirmó la posibilidad de que en el conjunto de muestras de GAG+ podían encontrarse otros GAG sulfatados portadores de alguna afinidad específica por BMP2. Dado el entendimiento actual del papel de la sulfatación en la mediación de la interacción entre los GAG y la BMP2, las condroitinas y los dermatanes son los azúcares más probablemente alternativos que muestran una interacción específica con BMP2 ya que éstos muestran la más alta diversidad posible en los patrones de sulfatación.

Una metodología empleada con frecuencia en los análisis de GAG incluye examinar la función de posiciones de sulfatación individuales en las interacciones ligando-GAG. Este método de análisis proporciona una indicación de la importancia de las posiciones de sulfatación individuales en el mantenimiento de la interacción entre la cadena de GAG y su diana específica. Además, dado que las diferentes especies de GAG solo tienen la posibilidad de llevar patrones de sulfatación específicos para su especie, esto puede ayudar a reducir los posibles candidatos de glucosaminoglucanos que pueden mostrar una afinidad por un ligando específico.

Para esta finalidad se examinó la afinidad por BMP2-HBP llevada por cadenas de CS variablemente sulfatadas, C4S y C6S, y el DS convencional. Curiosamente, solo C4S llevaba una afinidad significativa por BMP2-HBP. Estos datos indican que probablemente la 4-O-sulfatación es necesaria para que el CS interaccione con BMP2-HBP. Curiosamente, el dermatán sulfato no mostró ninguna afinidad por BMP2-HBP. Esta observación es de interés dado que el DS es la única especie de CS que demuestra diversidad en la sulfatación similar a la del HS. Además, las

observaciones de los autores de la invención indican una posibilidad de que la epimerización de GlcA con IdoA en DS compromete la capacidad de este tipo de azúcar para unirse a BMP2-HBP. Tanto el C4S como el DS son capaces de llevar una 4-*O*-sulfatación, incluso solo en pequeñas cantidades de DS cuando se retiene en la columna en comparación con el C4S. Como alternativa, esta ausencia de afinidad puede deberse simplemente a este lote particular de DS que no lleva suficiente 4-*O*-sulfatación para mediar eficazmente en la unión con BMP2-HBP. Curiosamente, estas observaciones particulares parecen demostrar una interacción entre BMP2 y CS que lleva 4-*O*-sulfatación. Aunque estudios anteriores han investigado el uso de interacciones entre CS-BMP2 en sistemas de administración de fármacos, no se sabe mucho sobre ninguna interacción específica de secuencia entre especies de CS individuales y BMP2. Sin embargo, dado que las cadenas de HS están compuestas de unidades de disacáridos 1,4-ligadas, la 4-*O*-sulfatación observada responsable de las interacciones entre CS-BMP2 no se encuentra en las interacciones entre HS- BMP2, lo que apunta a una interacción específica de secuencia no encontrada en CS. Por tanto es probable que el pico remanente observado después del tratamiento con ácido nitroso puede contener pequeñas cantidades de C4S o CD portadores de 4-*O*-sulfato.

Investigaciones adicionales revelaron que ni la heparina ni el HS comercial poseían ninguna afinidad significativa por la columna peptídica. Los HS utilizados para este ensayo se adquirieron en el comercio de Sigma-Aldrich y procedían de riñón de bovino. Teniendo en cuenta lo que se sabe acerca de la especificidad de tejido del HS es posible que este HS disponible en el comercio, aislado de fuentes de riñón bovino, llevase secuencias de carbohidratos despreciables necesarias para mediar específicamente una interacción con BMP2. Del mismo modo, ni la heparina de BPM ni la de APM mostraron ninguna afinidad por la columna peptídica. La heparina utilizada para este análisis también se adquirió en Sigma-Aldrich y procedía de mucosa intestinal porcina.

Aunque la interacción de la heparina con la antitrombina III se había caracterizado bien, y a pesar de su papel versátil en el aislamiento de moléculas susceptibles, la interacción de la heparina con factores de crecimiento, no se considera, en general, que es específica debido a su sulfatación uniforme. Sin embargo, dado que la heparina se usaba habitualmente para aislar BMP2, resulta algo sorprendente que ninguna de las muestras de heparina interaccionen con la columna peptídica a ningún grado significativo.

Otra posibilidad de esta ausencia de interacción entre la columna peptídica y la heparina se debe a la diferencia en los pesos moleculares entre las dos moléculas. La BMP2-HBP pequeña unida a la columna puede tener dificultades para mantener su asociación con la cadena de heparina fuertemente sulfatada, más grande. Sin embargo, la incapacidad de la heparina escindida de heparinasa para unirse a la columna, parecía indicar que los efectos estéricos de la utilización de la heparina de longitud completa en la columna no eran los únicos responsables de la interrupción de la posible interacción entre los azúcares y la BMP2-HBP. No hay ninguna razón inmediatamente obvia de esta incapacidad de la heparina comercial para asociarse con la columna de la BMP2-HBP, aunque puede postularse que la separación espacial adicional de la BMP2-HBP de su perla asociada mediante cadenas espaciadoras puede ayudar a mejorar este problema.

RESUMEN

En este estudio los autores de la invención han demostrado el uso de cromatografía de afinidad para aislar a un subconjunto de glucosaminoglucanos portadores de una afinidad específica por la BMP2-HBP, y han mostrado el potencial de este procedimiento para producir resultados reproducibles. Durante esta parte de la investigación sobre la interacción entre los GAG basados en la matriz y la BMP2 se han realizado diversas observaciones con respecto tanto al tipo de GAG implicados en la mediación de esta asociación como de su estructura.

Los resultados de los autores de la invención han implicado al heparán sulfato para mediar la mayoría de la afinidad que tiene la BMP2 por los preosteoblastos de la MEC, una interacción que se reconoce cada vez más como responsable de la modulación de la actividad de BMP2. Además, la investigación realizada por los autores de la invención, sobre la estructura probable de los GAG residentes en la MEC aislados en base a su afinidad por el sitio de unión a heparina BMP2 ha producido un resultado sorprendente.

Los resultados de los autores de la invención indican que las cadenas de longitud completa de GAG+ BMP2 no constan de dominios individuales con afinidad específica por BMP2 intercaladas con regiones de poca o ninguna afinidad por el factor. En su lugar, los estudios de los autores implican que estas cadenas de GAG+ constan de repeticiones múltiples de dominios de unión a BMP2. Este resultado es sorprendente a varios niveles. En primer lugar, la repetición requerida para cumplir con esta observación sobre la longitud completa de una cadena de carbohidrato de >20 kDa apunta a la presencia de algún tipo de molde sintético. En efecto, aunque estudios anteriores no han podido obtener un molde para el ensamblaje de cadenas de GAG específicas de tejido, el hecho mismo de que existe tal especificidad confirma la presencia de un sistema basado en moldes. Aunque para este proceso no se ha esclarecido ningún molde genómico, existe alguna posibilidad de un molde proteómico, quizá enzimático.

En segundo lugar, esta observación proporciona algunas pruebas en cuanto a la importancia de la interacción entre la BMP2 y los GAG. Pueden ser necesarias repeticiones múltiples del sitio de afinidad por BMP2 en toda la longitud de la cadena de carbohidrato para garantizar la unión máxima de BMP2 con la MEC. Se ha demostrado que esta

asociación particular alarga significativamente la semivida del factor, así como probablemente es responsable de mantener una concentración local significativa para mantener la señalización. Como alternativa, algunos estudios han propuesto un modelo en el que la BMP2 está espacialmente inhibida de la interacción con sus receptores debido a las interacciones con los GAG a base de MEC. En este escenario particular, la repetición de las secuencias de afinidad de BMP2 garantizaría una unión máxima del factor, reduciendo así la posibilidad de la interacción con sus receptores.

Los resultados acumulados de los autores de la invención, indican que este sistema para el aislamiento de los GAG de la MEC es viable y probablemente produce cadenas de GAG que tienen una afinidad específica por la BMP2.

Este estudio confirma resultados anteriores en lo que respecta a la interacción entre los GAG y la BMP2. Aunque la prevención de la BMP2 de asociarse con la MEC *in vitro* mediante la adición de GAG+ exógeno parece aumentar la señalización de BMP2 y regular positivamente la expresión génica osteogénica, también se informa de observaciones contrarias. En estos estudios, el examen *in vivo* de la modulación de BMP2 a través de la HBP mostraron una clara mejora en la osteogénesis a largo plazo cuando se aumentó la asociación con los GAG de la MEC. Es posible que esta interacción juegue un papel importante en el mantenimiento de concentraciones locales impidiendo que el factor se difunda lejos de sus lugares de actividad primaria. A la luz de estos estudios y de las propias observaciones de los autores de la invención, estos proponen que la actividad de BMP2 está regulada tanto positiva como negativamente por su asociación con los GAG. La regulación negativa se puede producir con precisión a través del modelo propuesto por Katagiri y colaboradores, por lo que la retención de la BMP2 en la MEC, lejos de sus receptores, conduce a una regulación negativa de la señalización de BMP2. Sin embargo, las células que requieren la señalización por este factor, posiblemente pueden secretar diversas enzimas para remodelar cadenas de azúcar extracelulares, tales como sulfatasas y heparinasas, con el fin de "mantener lejos" los GAG que conservan BMP2 en la MEC, por lo tanto liberando el factor y permitiendo que señale, lo que conduce a la interacción entre BMP2-MEC, convirtiéndose finalmente en un mantenimiento positivo de la actividad de la citocina. Como alternativa, la regulación negativa de BMP2 por los GAG de la superficie celular, puede ser a través de la internalización de las cadenas de GAG con sus moléculas de BMP2 asociadas, como han observado Jiao y colaboradores.

Estos estudios previos, junto con las propias observaciones de los autores de la invención, han llevado a la conclusión de que la interfaz específica de secuencias entre la BMP2 y el heparán sulfato representa un mecanismo de control complicado que tiene la capacidad de regular tanto positiva como negativamente la señalización de BMP2. Fisiológicamente esta interacción es responsable de forzar respuestas dependientes de contexto contra esta fuerte citocina en relación con muchas facetas del desarrollo embrionario, compromiso de precursores y curación de heridas.

Ejemplo 2 – Purificación de HS específico del péptido BMP2

Se usó un péptido que tenía propiedades de unión a heparina de la secuencia de BMP2 madura para identificar nuevos HS que se uniesen al péptido.

Secuencia de aminoácidos de BMP2 madura:

**QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHL
NSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTELSAISMPLYLDENEKVV LKNYQDMVVEGCG
CR [SEC ID N°: 5]**

Secuencia de aminoácidos del péptido de unión a heparina:

QAKHKQRKRLKSSCKRHP [SEC ID N°: 1]

Para reproducir la presentación natural del sitio de unión a heparina el péptido se biotiniló en su extremo C y se reservó la prolina (P) para mejorar la flexibilidad/accesibilidad del péptido una vez unido a la columna de estreptavidina.

Aislamiento de HS específico del péptido BMP2

Los materiales usados incluyeron una columna de Estreptavidina acoplada al péptido BMP2, una Columna Desalinazadora HiPrep (GE Healthcare), PBS 20 mM + NaCl 150 mM (Tampón de bajo contenido en sal), PBS 20 mM + NaCl 1,5 M (Tampón de alto contenido en sal), Agua de calidad HPLC (Sigma), sistema de Cromatografía Biológico-Duoflow (Bio-Rad) y un liofilizador.

La columna se equilibró con tampón de Bajo contenido en Sal y 1 mg de HS Sigma (H9902) se disolvió en tampón de bajo contenido en sal y se hizo pasar a través de la columna de Estreptavidina-BMP2. Los componentes del

medio no unidos se retiraron de la columna lavando con tampón de bajo contenido en sal (PBS 20 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM) hasta que la absorbancia del efluente a 232 nm volvía casi a cero. El HS unido a la matriz se eluyó con tampón de alto contenido en sal (PBS 20 mM, pH 7,2, NaCl 1,5 mM). Las fracciones pico se agruparon y se liofilizaron durante 48 h.

5 Se aplicó 1 mg de HS a la columna y se lavó con tampón PBS 20 mM que contenía una concentración baja de NaCl (150 mM). Después de lavar con tampón de bajo contenido en sal, el HS unido se eluyó con tampón PBS 20 mM que contenía una concentración alta de NaCl (1,5 M). Los picos que representaban las fracciones retenidas (controlados a 232 nm) se recogieron y se sometieron a desalinización posterior.

10 Después de liofilizar se obtuvieron 6 mg de HS positivo (GAG+) y 1,8 mg de HS negativo (GAG-).

Ejemplo 3 – Evaluación de heparán sulfatos específicos de BMP2

15 Las células C2C12 son células madres mesenquimales de ratón que normalmente presentan diferenciación miogénica pero que pueden dirigirse en el linaje osteogénico con complementación de BMP2 en el pase 3. Las células C2C12 en el pase 3 se mantuvieron en DMEM con glucosa 1000 g/l (bajo contenido en glucosa), 10 % de FCS, 1 % de P/S y sin L-glutamina (medio de mantenimiento).

20 Como medio de diferenciación se usó con DMEM con glucosa 1000 g/l (bajo contenido en glucosa), 5 % de FCS, 1 % de P/S y sin L-glutamina.

Efecto de BMP2 sobre la osteogénesis

25 Se evaluaron los efectos de la BMP2 exógena sobre la osteogénesis midiendo los niveles de expresión de marcadores osteogénicos (osteocalcina, osterix, Runx2).

30 A través del ensayo se observó el efecto de la adición de diferentes cantidades (100 ng/ml y 300 ng/ml) de BMP2 a las células, hubo una disminución significativa el día 5 en la expresión de osterix, osteocalcina y Runx2 en células que tenían BMP2 100 ng/ml en comparación con la adición de BMP2 300 ng/ml (Figs. 27-29). Por tanto se escogió este momento para ensayos futuros, ya que pueden observarse fácilmente muchos cambios.

Materiales y Métodos

35 Se usaron células C2C12 en pase 3. Las células se conservaron en Nitrógeno líquido en Pase 3 con 1×10^6 células/vial. Una vez que las células se sacaron del Nitrógeno líquido, se añadieron 500 μ l de medio de cultivo, se pipeteó hacia arriba y hacia abajo para recongelar las células e inmediatamente se añadieron 15 ml de medio de cultivo.

40 El medio de cultivo fue DMEM con glucosa 1000 g/l (bajo contenido en glucosa), 10 % de FCS, 1 % de P/S y sin L-glutamina. El medio de tratamiento fue DMEM con glucosa 1000 g/l (bajo contenido en glucosa), 5 % de FCS, 1 % de P/S y sin L-glutamina.

45 Se dejó que las células C2C12 crecieran hasta una confluencia del 75 % antes de recoger (normalmente 2 a 3 días) en medio de cultivo.

50 El recuento de las células se realizó de la siguiente manera. Primero, el medio se aspiró/desechó; se añadieron 15 ml de PBS, se desechó el PBS y se añadieron 3 ml de tripsina, se incubó a 37 °C durante 5 min para elevar las células del matraz. Se añadieron 9 ml de medio de cultivo para neutralizar la tripsina. Para determinar la cantidad de células para la siembra celular posterior sobre placas experimentales se usó GUAVA. Por ejemplo, para 3 conjuntos de placas de 12 pocillos 30.000 células x 36 pocillos x 3,7 cm² = 4.000.000 de células. Las células se diluyeron de la reserva y se añadió la cantidad deseada de medio de cultivo para la siembra celular (necesitando cada pocillo 500 μ l de medio con 30.000 células).

55 Para preparar la reserva de BMP2 se resuspendieron 10 μ g de rhBMP2 (Proteína Morfogenética Ósea 2) en 100 μ l de HCl 4 mM / BSA al 0,1 %.

60 Se usó el siguiente protocolo de extracción de ARN. Para la lisis celular se usaron 350 μ l de tampón RA1. Las células se congelaron con RA1 a -80 °C durante un día después del cual se descongelaron y se filtró el lisado durante 1 min a 11.000 g. El filtrado se mezcló con 350 μ l de etanol al 70 % en tubos de 1,5 ml y se centrifugó durante 30 s a 11.000 g. Se añadieron 350 μ l de tampón MDB y la mezcla se centrifugó durante 1 min a 11.000 g. Se añadieron 95 μ l de mezcla de reacción Dnasa y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante al menos 15 min. Después se lavó con 200 μ l de tampón RA2 (para desactivar la Dnasa) y se centrifugó durante 30 s a 11.000 g. Se lavó con 600 μ l de tampón RA3, se centrifugó durante 30 segundos a 11.000 g. Se lavó con 250 μ l de tampón RA3, se centrifugó durante 2 min a 11.000 g. Se eluyó el ARN con 60 μ l de H₂O sin Rnasa, se centrifugó durante 1

min a 11.000 g. La concentración se midió usando Nanodrop (unidades en ng/μl).

Se realizaron experimentos de RT (transcripción inversa) de la siguiente manera. En un tubo de PCR se mezcló lo siguiente: Cebador al Azar (0,1 μl), DNTP (1 μl), ARN (250/500 ng), H₂O sin Rnasa (rellenado a un volumen final de 13 μl). Se incubó a 65 °C durante 5 min. Se incubó en hielo durante al menos 1 min. Se recogió el contenido y se centrifugó brevemente antes de añadir: Tampón de 1ª Cadena (4 μl), DTT (1 μl), RnasaOUT (1 μl), SSIII Inversa (1 μl). Se rellenó a un volumen final de 20 μl. Se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se incubó a 50 °C durante 60 min. Se inactivó la reacción a 70 °C durante 15 min.

Se realizaron experimentos de transcripción inversa dos veces en días distintos y los productos de la PCR se agruparon y se diluyeron a una concentración final de 2,5 ng/μl para realizar PCR en Tiempo Real posterior.

La PCR en Tiempo Real se realizó usando una mezcla maestra de PCR Universal Fast TaqMan® (2X) (Applied Biosystem). Mezcla maestra de PCR (10 μl), sonda ABI (1 μl), ADNc (1 μl), ddH₂O (8 μl). Como genes de control se usaron GAPDH y Beta actina frente a las dianas experimentales OSX (osterix), OCN (Osteocalcina) y Runx2.

Efecto del GAG+ HS específico de BMP2 sobre la osteogénesis

Se evaluaron los efectos del HS específico de BMP2 (GAG+) aislado en el Ejemplo 2 sobre la osteogénesis midiendo los niveles de expresión de los marcadores osteogénicos (osterix, Runx2, fosfatasa alcalina y BspII) por reacción en cadena la polimerasa cuantitativa (cPCR). Se preparó una cinética para comparar la expresión de los marcadores durante un ciclo de 10 días para comparar el control con una dosis baja y alta de BMP2, siendo la dosis alta las condiciones óptimas para inducir la diferenciación de las células.

Materiales y métodos

Las células se sembraron a 30.000 células/cm² en medio de mantenimiento y se dejó que se uniesen durante toda la noche. Al día siguiente los medios de diferenciación se cambiaron con:

- Sin aditivos
- BMP-2 (control positivo) 100 ng/ml
- BMP-2 100 ng/ml + -GAG (GAG neg) 30 μg/ml
- BMP-2 100 ng/ml + +GAG (GAG pos) 30 μg/ml
- BMP-2 100 ng/ml + Heparina (Sigma N° H3149) 30 μg/ml
- BMP-2 100 ng/ml + Heparán Sulfato Total (Sigma N° H9902 – HS antes del fraccionamiento) 30 μg/ml de

Los carbohidratos y la BMP2 se mezclaron en el menor volumen posible y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la adición de los medios y en las células.

Después de 5 días, se extrajo el ARN usando el kit Macherey-Nagel y se realizó la Transcripción Inversa.

Como se muestra en las Figs. 30-33, el Heparán sulfato de mucosa porcina (HS Total) puede aumentar la actividad de BMP2 (mostrada a través de aumentos inducidos por GAG+ en la expresión de Fosfatasa Alcalina, osterix, BspII y Runx2) y esta actividad estaba incluida dentro de la fracción que se une a BMP2 (GAG Pos). Esto significa que la fracción potenciadora de BMP puede aislarse de un HS comercial haciéndola pasar sobre la columna peptídica BMP-HBD.

Ejemplo 4

Se expandieron células preosteoblásticas MC3T3-E1 (s14) (una línea de células de fibroblastos de cráneo embrionario de ratón establecida del cráneo de un embrión) en medio αMEM complementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y Penicilina/Estreptomicina cada 72 horas hasta generar células suficientes para la siembra en placas. Las células se diferenciaron sembrando en placa a 5 x 10⁴ células/cm² en medio αMEM complementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 25 μg/ml, β-glicerol fosfato 10 mM y Penicilina/Estreptomicina. El medio se cambió cada 72 horas durante 8 días, momento en el cual se recogieron las células y los medios. El medio se conservó y se depuró mediante centrifugación a alta velocidad y filtración a través de un filtro de 0,4 μm. La capa celular se alteró usando un raspador celular y un tampón de extracción que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ ni Mg²⁺), CHAPS al 1 %, Urea 8 M y NaN₃ al 0,02 %.

En todas las fases (a menos que se indique otra cosa), las muestras se depuraron antes de cargar en los sistemas de columna. Este proceso incluía centrifugación a alta velocidad a 5000 g durante 30 min, y filtración a través de un filtro de jeringa de 0,4 μm. Las muestras siempre se depuraron directamente antes de cargar a través del sistema de columna para impedir la formación de precipitados en soluciones inactivas.

Se usó cromatografía de intercambio aniónico para aislar las fracciones de proteoglicosaminoglucano (PGAG) tanto de los medios como de las muestras de la capa celular. En cada caso, los medios o las muestras de la capa celular se procesaron a través de una columna de Pharmacia XK 26 (56-1053-34) rellena con Perlas de Intercambio Aniónico Capto Q (Biorad) a un caudal de 5 ml/min en un sistema Biologic DuoFlow (Biorad) usando un detector de UV-Vis QuadTec. Las muestras se cargaron en un tampón de bajo contenido en sal que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}), NaCl 100 mM, NaN_3 al 0,02 % a pH 7,3. Las muestras se eluyeron en un tampón de alto contenido en sal que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}), NaCl 850 mM y NaN_3 al 0,02 % a pH 7,3. Las fracciones relevantes se recogieron y se agruparon en una sola muestra de PGAG y se liofilizó en la preparación para la desalinización.

La muestra de PGAG se desalinizó a través de cuatro columnas de Pharmacia HiPre™ 26/10 (17-5087-01) secuencialmente unidas a un caudal de 10 ml/min en un sistema Biologic Duo Flow (Biorad) usando un detector de UV-Vis QuadTec. Las fracciones relevantes se recogieron y se agruparon en un solo conjunto de muestras y se liofilizó en la preparación para su tratamiento posterior.

En la cuarta etapa, el conjunto de muestras de PGAG obtenido del procedimiento de desalinización se sometió a un tratamiento con pronasa y neuraminidasa para retirar por digestión proteínas núcleo y posteriormente liberar las cadenas de GAG. En este sentido, las muestras de PGAG liofilizadas se resuspendieron en un volumen mínimo de acetato sódico 25 mM (pH 5,0) y se depuró por filtración a través de un filtro de jeringa de 0,4 μm . El volumen de muestra total se dispensó en tubos de vidrio de 10 ml en alícuotas de 500 μl . A esta alícuota se añadieron 500 μl de neuraminidasa de 1 mg/ml antes de incubar la mezcla durante 4 horas a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 5 ml de Tris-acetato 100 mM (pH 8,0) a cada muestra. Se añadieron 1,2 ml adicionales de pronasa 10 mg/ml, reconstituídos en Tris-acetato 500 mM y acetato cálcico 50 mM (pH 8,0), a cada muestra antes de incubar la mezcla durante 24 horas a 36 °C. Después de este tratamiento, todos los volúmenes se combinaron y se prepararon para cromatografía de intercambio aniónico por centrifugación y filtración.

En una quinta etapa, la muestra de GAG aislada después de la escisión de proteína se eluyó a través de una columna de Pharmacia XK 26 (56-1053-34) rellena con Perlas de Intercambio Aniónico Capto Q (Biorad) a un caudal de 5 ml/min en un sistema Biologic DuoFlow (Biorad) usando un detector de UV-Vis QuadTec. En este sentido, la muestra se cargó en un tampón de bajo contenido en sal que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) y NaN_3 al 0,02 % a pH 7,3. La muestra se eluyó en un tampón de alto contenido en sal que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}), NaCl 850 mM y NaN_3 al 0,02 % a pH 7,3. Las fracciones relevantes se agruparon, se liofilizaron y se desalinizaron siguiendo el protocolo anteriormente mencionado para desalinizar la muestra de PGAG.

El péptido biotilado N terminal (1 mg), que corresponde al dominio de unión a heparina de BMP2, y que comprendía una secuencia de aminoácidos representada por QAKHKQRKRLKSSCKRH [SEC ID N°: 6], se mezcló con tampón de bajo contenido en sal que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}). La mezcla se eluyó a través de una columna rellena con una matriz de resina recubierta con estreptavidina. Después, la columna se expuso a un tampón de alto contenido en sal que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}), NaCl 850 mM y NaN_3 al 0,02 % a pH 7,3 para determinar si, en estas condiciones, el péptido se había unido fijamente a la matriz. No se observó pérdida sustancial de péptido de la columna. Posteriormente la columna se lavó con el tampón de bajo contenido en sal en la preparación para la carga de muestra.

La mezcla de GAG (2 mg), se aisló usando el procedimiento indicado en el Ejemplo 1, se suspendió en tampón fosfato sódico de bajo contenido en sal (1 ml) y se cargó en la columna peptídica del Ejemplo 2. La muestra se eluyó con un tampón de bajo contenido en sal que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Se observó un pico correspondiente a los GAG con afinidad despreciable por BMP2 en el indicador del detector de UV-Vis. Las fracciones de columna responsables de dar lugar a este pico se combinaron. Estas fracciones se conocen como 'GAG-' significando el signo menos la ausencia de afinidad con la columna. Cuando se puso de manifiesto a partir del detector de UV-Vis que el indicador se había nivelado hasta la línea basal, y que no se eluía más oligosacárido, el disolvente eluyente se cambió a un tampón de alto contenido en sal que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}), NaCl 850 mM y NaN_3 al 0,02 % a pH 7,3. Después de este cambio en el disolvente de elución, se observó un pico correspondiente a los GAG específicos de BMP2 en el indicador del detector de UV-Vis. Las fracciones de columna responsables de dar lugar a este pico se combinaron. Estas fracciones se conocen como 'GAG+' significando el signo más la presencia de afinidad con la columna. En el caso de los compuestos de GAG obtenidos de células preosteoblásticas, la fracción de GAG+ representa el 10 % de la mezcla de GAG global.

Ejemplo 5

La adición de BMP2 tuvo una capacidad claramente definida para inducir la diferenciación osteogénica en mioblastos C2C12. De manera similar, la pre-incubación de BMP2 con heparina ha demostrado ampliar tanto la semivida de las citocinas como su fuerza inmediata *in vitro*. En este caso se examinó la capacidad de las fracciones de GAG+ y GAG+ para aumentar la osteoinducción de las células C2C12 *in vitro* por BMP2.

La muestra GAG+ del Ejemplo 4 (0, 10, 100, 1000 ng/ml) se añadió a mioblastos C2C12 *in vitro* en presencia de BMP-2 (0, 50, 100 ng/ml). La medición de la expresión relativa del gen de la osteocalcina indicó que la muestra GAG+ podía potenciar la BMP2 para efectuar la expresión del gen de la osteocalcina a niveles de BMP-2 muy por debajo de los normalmente usados en terapia (300 ng/ml). Los resultados de este ensayo (incluyendo los valores de *p* calculados y los errores) se representan gráficamente en la Figura 34 en la que las condiciones experimentales de cada 'condición de cultivo' fueron las siguientes:

1. Células control, sin BMP-2 añadido, sin GAG añadido
2. BMP-2 a 50 ng/ml
3. BMP-2 a 50 ng/ml, GAG+ a 10 ng/ml
4. BMP-2 a 50 ng/ml, GAG+ a 100 ng/ml
5. BMP-2 a 50 ng/ml, GAG+ a 1000 ng/ml
6. BMP-2 a 100 ng/ml
7. BMP-2 a 100 ng/ml, GAG+ a 10 n/ml
8. BMP-2 a 100 ng/ml, GAG+ a 100 ng/ml
9. BMP-2 a 100 ng/ml, GAG+ a 1000 ng/ml

Curiosamente, aunque con 1000 ng/ml de GAG+ se pudo aumentar significativamente la expresión de la osteocalcina mediada por BMP2, la adición de concentraciones de GAG+ por debajo de 1000 ng/ml parecía inhibir progresivamente esta expresión. Además, la adición de GAG+ suficiente también logró conducir la inducción de la osteocalcina con 50 ng/ml de BMP2 por encima de 100 ng/ml de BMP2 en sí mismo, indicando la fuerza de esta interacción.

El análisis basado en el cultivo de células demostró que la adición de GAG+ a cultivos osteogénicos C2C12 junto con BMP2 produjo una regulación positiva significativa de la expresión de la osteocalcina lo que indica un aumento en la eficacia de la señalización de BMP2. Este resultado confirma la asociación específica de las cadenas de GAG+ con BMP2, bloqueando de este modo al BMP2-HBP e impidiendo su asociación con los PGAG basados en matriz. La regulación positiva resultante de la expresión génica osteogénica es comparable a la observada en estudios previos que utilizan heparina para conseguir un efecto similar. Curiosamente, la adición de concentraciones de GAG+ que se encuentran por debajo de 1000 ng/ml parece tener un efecto inicialmente antagonista sobre la señalización de BMP2.

Una posible hipótesis para explicar esta observación gira alrededor de la capacidad de un número determinado de moléculas de GAG+ que se unen a un determinado número de moléculas de BMP2. En condiciones en las que no se añade GAG+ exógeno al sistema de cultivo la mayoría de las moléculas de BMP2 podrán asociarse con la MEC, localizándose por lo tanto fuera de sus receptores afines y permitiendo iniciar inmediatamente la señalización. La disociación posterior de BMP2 de la MEC, tanto espontáneamente como por alteración enzimática dirigida de sus cadenas de GAG+ asociadas, tuvo la capacidad de inducir la señalización de BMP2 prolongada. La adición de un gran número de moléculas de GAG+ a este sistema, como es el caso de las muestras complementadas con 1000 ng/ml de GAG+, permite que la mayoría de las moléculas de BMP2 permanezcan en solución donde están libres de mediar la dimerización del receptor e inducen la señalización aguas abajo. Estos dos procesos de interacción citocina/receptor probablemente requieren umbrales de concentración particulares para mantener un nivel de señalización eficaz. En condiciones de cultivo que contienen 50 ng/ml de BMP2, la adición de bajas concentraciones de GAG+ permite que una parte de la citocina disponible permanezca soluble mientras que la parte restante se asocia con la MEC. En estas condiciones solo una pequeña cantidad de BMP2 permanece soluble pero, debido a su baja concentración, se vuelve altamente difusa en el medio conduciendo a una señalización despreciable. De manera similar, debido a una parte del resto de BMP2 solubilizada, una cantidad reducida de BMP2 puede encontrarse en la MEC, dando como resultado una disminución en la señalización de BMP2 liberada de la MEC por actividad celular directa. Sin embargo, en condiciones de cultivo que contienen 100 ng/ml de BMP2 los efectos combinados de la BMP2 soluble y basada en MEC son, con la adición de 100 ng/ml de GAG+, suficientes para inducir la señalización de BMP2 similar a los niveles de control. Sin embargo, sin estudios adicionales, la dinámica implicada en la señalización de BMP2/GAG+ no está clara. Futuros estudios que utilizan resonancia de plasmón superficial pueden ayudar a aclarar la eficacia de las interacciones BMP2/GAG+ y pueden ayudar a poner en claro estas observaciones.

Ejemplo 6

La enzima heparanasa 3 se usó para escindir las cadenas de azúcar GAG+ y GAG- del Ejemplo 4 de acuerdo con el siguiente método. Cada uno de GAG+ y GAG- se trataron por separado a una concentración de 4 mg/ml, con heparanasa 3 (250 mU de enzima por 100 µg de oligosacárido) durante 16 horas a 37 °C. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 5 minutos a 70 °C para inactivar la heparanasa 3. Cada una de las mezclas de GAG+ y GAG- digeridas se sometió a la columna peptídica por separado. El indicador del detector de UV-Vis de cada proceso cromatográfico indicó que el material digerido mostraba la misma afinidad por la columna que el material no digerido.

Ejemplo 7Acoplamiento del péptido biotinilado a la columna de estreptavidina

5 Método: El péptido BMP2 HB – se disolvió en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM (Tampón de bajo contenido en sal), a una concentración de 1 mg/ml. La solución peptídica se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de estreptavidina (1 ml) equilibrada en tampón de bajo contenido en sal usando una cromatografía líquida a baja presión (sistema de cromatografía Biologic-Duoflow de Bio-Rad). El medio se cargó a un caudal de 0,2 ml/min y la columna se lavó con el mismo tampón hasta que la línea basal llegó a cero. Para comprobar que el péptido realmente estaba unido a la columna, la columna se eluyó con un gradiente en etapas de NaCl 1,5 M (tampón de alto contenido en sal) y volvió a equilibrarse con tampón de bajo contenido en sal.

10 Se sintetizó la secuencia (5 mg) del sitio de unión a heparina de BMP2 (QAKHKQRKRLKSSCKRHP-NHET biotina (SEC ID N^o: 1)) y se acopló a la columna de estreptavidina de 1 ml (GE Healthcare). El cromatograma (Figura 36) muestra que todos los péptidos se unían fuertemente a las perlas de estreptavidina.

Purificación de Heparán Sulfato específico de BMP2

20 Método. Se disolvió HS Celsus en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM (Tampón de bajo contenido en sal) a una concentración de 1 mg/ml. La solución peptídica se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de estreptavidina (1 ml) equilibrada en tampón de bajo contenido en sal usando una cromatografía líquida a baja presión (sistema de cromatografía Biologic-Duoflow de Bio-Rad). El medio se cargó a un caudal de 0,2 ml/min y la columna se lavó con el mismo tampón hasta que la línea basal llegó a cero. El HS específico de BMP2 unido se eluyó con un gradiente en etapas de NaCl 1,5 M (tampón de alto contenido en sal), se recogieron las fracciones pico, y la columna se volvió a equilibrar con tampón de bajo contenido en sal. El pico de elución (BMP2+vo) y el pico de flujo continuo (BMP2-vo) de HS se recogieron por separado, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C.

25 El cromatograma (Figura 37) muestra que una pequeña parte (~15 – 20 %) del HS se unió específicamente a la columna y que eluía en el tampón de alto contenido en sal.

Desalinización del HS unido a la columna peptídica de BMP2

30 Método: el HS específico de BMP2 se disolvió en agua destilada 10 ml. Las muestras se sometieron a cromatografía de desalinización en una columna de desalinización Hi-prep (10 ml) equilibrada en agua destilada usando una cromatografía líquida a baja presión (sistema de cromatografía Biologic-Duoflow de Bio-Rad). El HS se cargó a un caudal de 10 ml/min y la columna se lavó con agua destilada. Las fracciones de HS puras se recogieron, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C.

35 El cromatograma (Figura 38) muestra una clara separación del HS puro específico de BMP2 (pico de absorbancia) y el tampón salino (pico de conductancia).

Desalinización del HS no unido a la columna peptídica de BMP2

40 Método: el HS no específico de BMP2 se disolvió en agua destilada 10 ml. Las muestras se sometieron a cromatografía de desalinización en una columna de desalinización Hi-prep (10 ml) equilibrada en agua destilada usando una cromatografía líquida de baja presión (sistema de cromatografía Biologic-Duoflow de Bio-Rad). El HS se cargó a un caudal de 10 ml/min y la columna se lavó con agua destilada. Las fracciones de HS puras se recogieron, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C.

45 El cromatograma (Figura 39) muestra una clara separación del HS no unido (pico de absorbancia) y el tampón salino (pico de conductancia).

Análisis de disacáridos por SAX-HPLC – HS positivo a BMP2

50 Método: se disolvieron muestras (100 µg) en acetato sódico 100 mM/acetato cálcico 0,2 M, pH 7,0. Se usó heparinasa y heparitinasa I y II, todas ellas a una concentración de 10 mU/ml en el mismo tampón. Cada muestra se digirió secuencialmente para una recuperación de disacáridos por análisis SAX-HPLC; para ello las muestras se sometieron a digestión a 37 °C de la siguiente manera: heparinasa durante 2 h, heparitinasa I durante 1 h, heparitinasa II durante 18 h y finalmente una parte alícuota de cada lisa durante 6 h. Las muestras se procesaron en una columna P-2 de BioGel (1 x 120 cm) equilibrada con NH₄HCO₃ 0,25 M. El pico de disacárido se liofilizó y después se disolvió en agua acidificada (pH 3,5 con HCl). Esto se hizo pasar sobre una columna de SAX-HPLC PA-1 de ProPac (Dionex, Estados Unidos), unida a un sistema de cromatografía líquida a alta presión y los disacáridos de HS se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 0,1 M de NaCl, pH 3,5, durante 60 min a un caudal de 1 ml/min. Los picos se identificaron usando patrones de disacáridos de HS (Seikagaku, Tokio, Japón e Iduron) controlados a A₂₃₂ nm.

El HS retenido en la columna de afinidad del péptido BMP2 se sometió a un análisis de disacáridos enzimático exponiéndolo a una combinación de heparín liasas (heparinasa, heparitinasa I y II) hasta el final y después sometiendo los fragmentos disacáridos resultantes a HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC). Los picos en el cromatograma (Figura 40) permiten calcular las proporciones relativas de cada uno de los disacáridos componentes dentro de la población de unión de HS. El análisis muestra que en la población de HS del péptido de unión a BMP2, una mayor proporción de disacáridos tiene una glucosamina *N*-sulfatada.

Análisis de disacáridos por SAX-HPLC – HS negativo a BMP2

El HS que no quedó retenido en la columna de afinidad del péptido BMP2 se sometió a un análisis de disacáridos enzimático exponiéndolo a una combinación de heparín liasas (heparinasa, heparitinasa I y II) hasta el final y después sometiendo los fragmentos disacáridos resultantes a HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC). Los picos en el cromatograma (Figura 41) permiten calcular las proporciones relativas de cada uno de los disacáridos componentes dentro de la población HS. El análisis muestra que en la población de HS de flujo continuo una mayor proporción de disacáridos tiene una glucosamina *N*-sulfatada.

Perfil de disacáridos por SAX-HPLC de HS Total Celsus

El HS Total adquirido en Celsus como material de partida también se sometió a un análisis de disacáridos enzimático exponiéndolo a una combinación de heparín liasas (heparinasa, heparitinasa I y II) hasta el final y después sometiendo los fragmentos disacáridos resultantes a HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC). Los picos del cromatograma (Figura 42) permiten calcular las proporciones relativas de cada uno de los disacáridos componentes dentro de la población de HS.

Análisis por RPS de HS positivo a BMP2 y negativo a BMP2

Método: Se disolvió HS +vo y –vo a BMPS (10 mg/ml) en 1 ml de MES 0,1 M, pH 5,5 y 300 µl de MES 0,1 M, pH 5,5, que contenía biotina-LC-hidrazida 2 mg/ml (Pierce), EDC (7 mg) se añadieron a la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h antes de la adición de otros 7 mg de EDC. Después de 2 h de incubación adicionales, la biotina no incorporada se retiró con una columna desalinizadora (Amersham Pharmacia). Se ensayó la capacidad del HS +vo y –vo a BMP2 para unirse a BMP2 soluble. Se realizó análisis de unión en tiempo real usando RPS, en el que se usaron microplacas detectoras de oro recubiertas con biotina-tiol como una plataforma para inmovilizar la estreptavidina. Usando un puente de biotina-estreptavidina-biotina, el HS biotinilado puede inmovilizarse en la microplaca detectora. Después se añadió el factor de crecimiento (200 nM) a la solución bañando el HS inmovilizado e incubando durante 20 min. La unión en tiempo real se controló midiendo el cambio del ángulo de reflectancia mínimo (θ) a lo largo del tiempo.

La Figura 44 muestra el análisis de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) de las interacciones entre la proteína y el azúcar. Como se observa en las curvas, que reflejan la avidéz de la constante de “asociación” (K_a), la BMP2 no se une tan ávidamente al HS “de flujo continuo”, como se pone de manifiesto mediante desplazamiento de ángulo más pequeño, como al HS que se une a BMP2.

Capacidad de unión a BMP2 de preparaciones de HS Celsus de BMP2 +vo y BMP2 –vo recubiertas sobre una placa de Unión a Heparina/GAG de Iduron

Método: La BMP2 se disolvió en Solución de Bloqueo (gelatina al 0,2 % en SAB) a una concentración de 3 µg/ml y se establecieron series de dilución de 0-3 µg/ml en Solución de Bloqueo. Se dispensaron 200 µl de cada dilución de BMP2 en pocillos por triplicado de Placas de Unión a Heparina/GAG previamente cubiertas con heparina; se incubó durante 2 h a 37 °C, se lavó cuidadosamente tres veces con SAB y se añadieron 200 µl de anti-BMP2 biotinilado 250 ng/ml a la Solución de Bloqueo. Se incubó durante una hora a 37 °C, se lavó cuidadosamente tres veces con SAB, se añadieron 200 µl de Estreptavidina-AP 220 ng/ml en Solución Bloqueante, se incubó durante 30 min a 37 °C, se lavó con cuidado tres veces con SAB y golpeó para retirar el líquido residual, se añadieron 200 µl de Reactivo de Desarrollo (*p*-nitrofenil fosfato de SigmaFAST). Se incubó a temperatura ambiente durante 40 minutos y se realizó una lectura a 405 nm al cabo de una hora.

La superficie de la placa preparada especialmente (Iduron) adsorbe los GAG sin modificación al mismo tiempo que conserva sus características de unión a la proteína. La unión se produce a la temperatura ambiente de los tampones fisiológicos. Los resultados (Figura 45) demuestran la mayor afinidad de las preparaciones de HS seleccionadas por BMP2 para la BMP2 sobre el flujo continuo o sobre las preparaciones nativas. BMP2 actuó como control.

Actividad ALP de HS positivo y negativo a BMP2 en células C2C12

Métodos: Ensayo ALP. Las células C2C12 se sembraron en placa a 20.000 células/cm² en una placa de 24 pocillos en DMEM (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) que contenía FCS al 10 % (Lonza Group Ltd., Suiza) y antibióticos (Penicilina al 1 % y Estreptomicina al 1 %) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) a 37 °C/CO₂ 5 %. Después de 24

horas, el medio de cultivo se cambió a medio sérico con bajo contenido en FCS al 5 % que contenía diferentes combinaciones de BMP2 100 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), HS Celsus 3 mg/ml y diversas concentraciones de preparaciones de HS Celsus específicas (HS +vo) y no específicas (HS -vo) para BMP2. La lisis celular se realizó después de 3 días usando tampón RIPA que contenía Triton X-100 al 1 %, NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, Igepal al 0,5 % (NP40), dodecil sulfato sódico (SDD) al 0,1 % y Conjunto de Cóctel Inhibidor de Proteasa III al 1 % (Calbiochem, Alemania). El contenido proteico de lisado celular se determinó usando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). La actividad ALP en los lisados celulares se determinó después incubando los lisados celulares con sustrato de *p*-nitrofenilfosfato (Invitrogen, Carlsbad, CA). La lectura se normalizó a cantidad de proteína total y se presentó como cantidad relativa con respecto al grupo que contenía solo tratamiento con BMP2.

La Figura 46 muestra que la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) inducida por BMP-2 se potenció con el HS específico de BMP-2 (HS +vo) a un grado mayor en comparación con el HS no específico (HS -vo). Se introdujo BMP-2 a 100 ng/ml solo o en combinación con HS Celsus 30 µg/ml o diversas concentraciones de HS específico y no específico. El HS específico e no específico se introdujo solo a 30 µg/ml.

Tinción con ALP

Método: Tinción con ALP. Se cultivaron células C2C12 como se ha descrito anteriormente. Después de 3 días de tratamiento, la capa celular se lavó en PBS y se tiñó usando el Kit de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En resumen, la capa celular se fijó en acetona al 60 % tamponada con citrato y se tiñó en una mezcla con colorante alcalino que contenía Naftol AS-Fosfatasa Alcalina MX y sal de diazonio. La tinción nuclear se realizó usando solución de Hematoxilina de Mayer.

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) inducida por BMP-2 se potenció con HS específico de BMP-2 (HS +vo) a un grado mayor en comparación con el HS no específico (-vo) cuando se evaluó histoquímicamente (Figura 47). Se introdujo BMP-2 a 100 ng/ml en combinación con 0, 0,3, 3 y 30 µg/ml de GAG.

Estabilidad de BMP2

Método: Fosforilación con Smad 1/5/8. Células C2C12 se sembraron en placa a 20.000 células/cm² en una placa de 24 pocillos en DMEM (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) que contenía FCS al 10 % (Lonza Group Ltd., Suiza) y antibióticos (Penicilina al 1 % y Estreptomicina al 1 %) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) a 37 °C/CO₂ al 5 %. Después de 24 horas, el medio de cultivo a medio sérico con bajo contenido en FCS al 5 %. Las condiciones de tratamiento que contenían BMP2 100 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) en presencia/ausencia de 3 mg/ml de heparina (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) o HS Celsus específico de BMP2 (HS +vo) se añadieron 24 horas después de que las células se hubiesen equilibrado en medio con bajo contenido en suero. El lisado celular se recogió en tampón de Laemmli 1x a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas. El lisado se separó en Gel Bis-Tris al 4-12 % Novex NuPAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se analizó con transferencia de western usando anticuerpos contra Phospho-Smad 1/5/8 (Cell Signaling, Danvers, MA) y Smad 1/5/8 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA).

La capacidad del HS para unirse a BMP2, es decir HS3, para prolongar los efectos de BMP2 sobre las células (supuestamente en parte protegiendo la proteína contra la degradación proteolítica) se comparó con los efectos de la heparina comercial. Células C2C12 se expusieron a nada, solo s BMP2, BMP2 + Heparina o BMP2 + HS3 durante 72 horas y los niveles de fosforilación de la molécula de señalización intracelular específica de BMP2 Smad 1/5/8 se controlaron por inmunotransferencia (Figura 55). Los resultados demuestran que el HS3 puede prolongar la señalización de BMP2 a niveles que igualan o superan a los de la heparina.

Ejemplo 8

Este experimento se diseñó para investigar si el HS3 podía acelerar la reparación ósea prolongada cuando se combinaba con el gel JAX™ relleno de cavidades óseas de Smith y Nephew + estrellas de fosfato tri-cálcico (TCP).

En el cúbito de conejos adultos se crea un defecto crítico sin unión, las estrellas se colocan en el defecto, se cierra la herida y la reparación se controla después de 4 y 8 semanas con una combinación de histología y formación de imágenes.

Biomateriales

JAX™ es un sustituto de hueso sintético de β-fosfato tricálcico (TCP) fabricado por Smith y Nephew Orthopaedics Ltd, Estados Unidos. JAX™ consta de gránulos de seis brazos, que se entrelazan para proporcionar una porosidad intergranular al 55 % en un sitio con defecto, lo que permite la infiltración celular y vascular. La indicación clínica es para defectos óseos de 4-5 cm que no soportan carga. JAX™ también incluye un componente de hidrogel.

Estudio *in vitro*

La liberación de heparina a altas o bajas concentraciones (como un sustituto de HS) de las mezclas de gel Jax/TCP *in vitro* se evaluó marcándola primero con colorante Alexa Fluor 488 y después controlando su liberación en PBS en placas de cultivo. La liberación en ambos casos fue rápida y explosiva.

Marcaje fluorescente de heparina. Para ensayos *in vitro* no biológicos, la heparina, un miembro hipersulfatado de la familia de glucosaminoglucanos de HS, se conjugó con Alexa Fluor 488 (A488, Molecular Probes, RU), usando un método publicado previamente por nuestro grupo (E.V. Luong, L. V. Nurcombe, S. Cool. *In vitro* biocompatibility and bioactivity of microencapsulated heparan sulfate Biomaterials 2007; 28: 2127-2136). En resumen, 3 mg de heparina (H-3149) se disolvieron en 300 µl de solución tampón de ácido 4-morfolinoetanosulfónico (MES, M3671) 0,1 M, tampón (pH 4,5) y se combinó con 50 µl de una solución de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, Fluka 03449) al 10 % en tampón MES 0,1 M. Posteriormente, se añadió una solución de A488 al 1 % (50 µl) en tampón MES 0,1 M a la solución de heparina/EDC. La mezcla se protegió de la luz y se incubó durante una noche a temperatura ambiente. La heparina conjugada con fluorescencia se eluyó en una columna desalinizadora PD10 de Amersham. La eficacia del marcaje fue de aproximadamente 1,3 mol A488/mol de heparina.

Perfil de liberación. Se cargaron tres gránulos de JAX™ con 17 o 170 µg de heparina-A488 (50 µl en hidrogel 100 µl), protegido de la luz, y se colocó en 1 ml de PBS a 37 °C durante 48 h. A las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 y 48 h, se recogieron 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) acondicionada para el muestreo y se sustituyó por PBS reciente. La concentración de la heparina-A488 liberada se cuantificó por fluorometría y se indicó una liberación acumulativa de heparina-A488 como porcentaje de concentración de carga (Figura 57).

Estudio *in vivo*

Diseño experimental. (Véase la Figura 56). Veinte conejos Blancos de Nueva Zelanda macho (con un peso de 2-2,5 kg) recibieron defectos bilaterales de cúbito. Cada defecto se asignó al azar a uno de tres grupos experimentales. Cada defecto recibió 18 gránulos JAX™ y 150 µl de hidrogel que contenía uno de los siguientes tratamientos: HS 30 µg, HS 100 µg o un mismo volumen de PBS (50 µl). Después de 4 y 8 semanas del implante, los conejos se sacrificaron y se extrajeron los cúbitos. Se evaluaron cuatro cúbitos por tratamiento de manera no destructora usando rayos X 2D y tomografía micro-computerizada (micro-CT) para la formación mineral a ambos momentos. Posteriormente, estos cúbitos se procesaron para su histología e inmunohistoquímica. A la semana 8, se incluyeron tres muestras adicionales por tratamiento para evaluar mediante ensayo de torsión. Algunos defectos se dejaron vacíos para servir como controles internos para asegurarse de que el modelo era realmente un modelo sin unión.

Monitorización con rayos X y formación de hueso nuevo en sitios con defecto

El HS3 se aplicó en gel Jax a dos concentraciones diferentes (30 y 100 ug – denominado HS30 y HS100) y se evaluó la formación de hueso nuevo en comparación con ningún tratamiento durante 0, 4 y 8 semanas. Los animales tratados con HS mostraron una señal clara de formación de hueso nuevo sobre los controles.

Análisis radiográfico. Los gránulos de JAX™ son radio-opacos y por lo tanto difíciles de diferenciar de hueso nuevo en el sitio con defecto con rayos x 2D. Sin embargo, en los primeros momentos, las cavidades entre los gránulos e inmediatamente adyacentes al radio son claramente visibles y el progreso de la formación de hueso en estos espacios puede controlarse (S.A. Clarke, N.L. Hoskins, G.R. Jordan, D.R. Marsh. Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX™, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. Bone 2007; 40: 939-947). Se usó un Sistema Radiográfico de Formación de Imágenes (MUX-100, Shimadzu) para capturar imágenes 2D de los defectos del cúbito inmediatamente después de la cirugía y a las 4 y 8 semanas. Se tomaron micrografías digitales de los rayos X. Los rayos X se realizaron con anestesia general. Las micrografías de rayos X se muestran en las Figuras 52, 53 y 58.

Control con Micro CT de formación de hueso nuevo en sitios con defecto

El HS3 proporcionado a dosis de 30 y 100 ug (HS30 y HS100) en el momento de la cirugía se comparó con controles solo con estrellas y PBS usando formación de imágenes micro CT (tomografía computerizada) (Figuras 52, 53 y 59).

Análisis Micro-CT. A las 4 y 8 semanas, los cúbitos extraídos se exploraron con un escáner de micro CT (Skyscan 1076; Skyscan, Bélgica). La exploración se realizó con una resolución a 35 µm y un ancho de exploración de 68 mm. El escáner se ajustó a una tensión de 104 kV y a una corriente de 98 µA. Se usó un programa informático A Sasov (Skyscan) de reconstrucción CT de Haz de Cono para convertir los datos de cortes isotrópicos obtenidos en imágenes 2D. Para esta reconstrucción, se asumió que los valores de umbral inferior y superior para el hueso eran unidades de -315 y 543 Hounsfield. Después se analizaron los datos y se remodelaron usando el programa informático asociado CTAn (Skyscan) para la cuantificación y el programa informático Mimics 11.1 (Materialise, Bélgica) para realizar imágenes 3D. Una región de interés cilíndrica (RDI, concéntricamente colocada en sitio del

defecto) y el número total de cortes (correspondientes a la longitud del defecto) se mantuvieron constantes en todas las muestras. Se midió el volumen total de hueso recién formado en la RDI asignando umbrales predeterminados para el contenido de hueso total, hueso cortical (JAX™ y radios) y hueso trabecular (o hueso recién formado). Los datos se presentan como volumen óseo/volumen total (%).

5 El HS3 (a dosis tanto de 30 µg como de 100 µg) aumentó significativamente la proporción VO/VT (%) en comparación con los controles. No hubo diferencias significativas entre los cúbitos tratados con HS30 y tratados con HS100 (Figura 60).

10 Histología

Después de diseñar los periodos experimentales, se extrajo el hueso, se fijó, se descalcificó, se seccionó y se montó para su tinción con diversos colorantes.

15 Las Figuras 61 y 62 muestran una tinción con H y E (véase más adelante) para los 3 grupos de tratamiento durante 4 y 8 semanas. El tratamiento con HS3 muestra claramente infiltración de más tejido en el defecto que en los controles.

20 Micrografías teñidas con H y E a mayor aumento (Figura 62) revelaron que se depositaba hueso nuevo inmediatamente adyacente a las estrellas Jax (las islas más claras), con mayores cantidades de hueso, médula ósea y tejido cartilaginoso aparente en los animales tratados con HS. A la semana 8, en los cúbitos tratados con HS, hubo una remodelación y maduración de hueso nuevo.

25 *Análisis histológicos.* Los cúbitos extraídos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % durante 1 semana al vacío, y se descalcificaron en EDTA al 15 %, pH 7,2, durante 4 semanas a temperatura ambiente. Después, los cúbitos se procesaron usando un procesador de infiltración al vacío (Sakura Finetek, Japón) con un programa de 14 h. Después de la deshidratación y limpieza, los huesos se incluyeron en cera de parafina Paraplast (Thermo Scientific) y los bloques de parafina se seccionaron longitudinalmente a 5 µM usando un microtomo giratorio (Leica Microsystems, Alemania). Las secciones de parafina se colocaron en portaobjetos para microscopio cargados positivamente, se secaron, se tiñeron con Hematoxilina/Eosina y Tetrachrome Modificado y finalmente se examinaron con un estereomicroscopio Olympus (SZX12) y microscopio de fluorescencia vertical (BX51).

35 Las figuras 63 y 64 muestran la tinción con Tetrachrome de Ralis (Z.A. Ralis, G. Watkins. Modified tetrachrome method for osteoid and defectively mineralized bone in paraffin sections. Biotech and Histochem 1992; 67: 339-345) (véase más adelante) para los 3 grupos de tratamiento durante 4 y 8 semanas. Los defectos tratados con HS muestran claramente infiltración de más tejido en el defecto que en los controles.

40 Micrografías teñidas con Tetrachrome de Ralis de mayor aumento (Figura 64) revelan que el nuevo hueso se deposita inmediatamente adyacente a las estrellas Jax (las islas más claras), con mayores cantidades de hueso reticular, médula ósea y capilares aparentes en los animales tratados con HS3. A la semana 8, en los cúbitos tratados con HS, hubo remodelación y maduración de hueso nuevo.

Inmunotinción

45 Después de diseñar los periodos experimentales, se recogió el hueso, se fijó, se descalcificó, se seccionó y se montó para su tinción con diversos colorantes. La Figura 65 muestra la inmunotinción para el marcador osteogénico tradío, la osteocalcina (véase más adelante) para los 3 grupos de tratamiento durante las 4 y 8 semanas. Los especímenes tratados con HS3 mostraron claramente tinción más positiva (color marrón) rellenando los defectos en comparación con los controles.

50 Un mayor aumento (Figura 66) de la tinción con osteocalcina reveló que el hueso nuevo se depositaba inmediatamente adyacente a las estrellas Jax (las islas más claras), con mayores cantidades de cavidades de cavidades en remodelación que consistían en médula ósea, capilares y bordes revestidos de osteoblastos.

55 *Análisis inmunohistoquímico.* Las secciones desparafinadas se lavaron con PBS, se incubaron con Proteasa XXIV (BioGenex, San Ramon, Estados Unidos) durante 10 min para la recuperación del antígeno, seguido de incubación con peróxido de hidrógeno al 0,3 % en agua durante 20 min a temperatura ambiente. Después de lavar, las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5 % en PBS durante 30 min. Las secciones de tejido se incubaron con concentraciones apropiadas de anticuerpos primarios: osteocalcina (ab13420, 1:150, Abcam, RU) o con la misma concentración de IgG de ratón (MG100, Caltage Lab, Estados Unidos; como controles negativos) en el tampón de bloqueo durante una noche a 4 °C. Las secciones se lavaron tres veces con PBS y después se incubaron con anti-IgG de ratón marcado con biotina absorbido en rata (Vector Lab Inc, Estados Unidos) durante 1 h. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con solución de complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (kit de tinción de peroxidasa ABC Immunopure, Vector Lab. Inc) durante 1 h. La actividad peroxidasa se detectó usando tetraclorhidrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB; DAKO, Estados Unidos). Las secciones se lavaron, se montaron y se examinaron al microscopio de campo brillante usando un estereomicroscopio Olympus SZX12.

Ensayo de torsión

Después de diseñar los periodos experimentales, se ensayó la resistencia mecánica de los huesos. La Figura 67 muestra configuraciones de ensayo de torsión.

5 *Ensayo de torsión.* Después de sacrificar a los conejos, 8 semanas después de la cirugía, los cúbitos se recuperaron, se envolvieron en una gasa impregnada con PBS para mantenerlos húmedos y se congelaron a -20 °C hasta realizar el ensayo de torsión. Después de descongelar, las epífisis de los cúbitos se conservaron en polimetilmetacrilato (Meliodent Rapid Repair, Heraeus Kulzer), se incluyeron en bloques de plástico diseñados a medida y se dejaron solidificar para permitir la fijación estable. Posteriormente los cúbitos se montaron en un sistema de ensayo MTS 858 Mini Bionix II (MTS, Eden Prairie, MN). Antes de realizar el ensayo se retiraron cuidadosamente los bloques de polímero y la gasa. Después, cada espécimen se ensayó con respecto a la rotura de torsión y se registraron las curvas de desplazamiento angular del par de torsión resultante. La velocidad de rotación usada fue de 1 grado por segundo hasta alcanzar 35 grados y los datos se recogieron a 100 Hz. En cada espécimen se registró la rigidez, el par de torsión máximo y el ángulo de rotura, midiéndose la rigidez como la pendiente de la parte lineal de la curva de desplazamiento angular del par de torsión (M. Bostrom, J.M. Lane, E. Tomin, M. Browne, W. Berberian, T. Turek, J. Smith, J. Wozney, T. Schildhauer. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar non-union model. Clin Orthop Relat Res 1996; 327: 272-282).

20 *Análisis estadísticos.* Se obtuvieron datos cuantitativos por triplicado y se indicaron como media \pm desviación típica. Los análisis estadísticos se realizaron usando el ensayo de la t de Student (programa informático GraphPad), y un valor de p menor de 0,05 se consideró significativo.

25 *Cuantificación de la rigidez y del par de torsión máximo evaluada a partir de cúbitos tratados con control y con HS.* La rigidez mejoró notablemente en los huesos tratados con HS. Dado que las estrellas ocupaban la proporción más grande del defecto, lo que se convirtió en una barrera física para la infiltración de hueso nuevo, esto produjo mejoras que solo eran notables (al contrario de significativas) – véase la Figura 68.

30 **Ejemplo 9 – Evaluación de la generación ósea en un defecto de tamaño crítico inducido por esponjas de colágeno cargadas con HS3**

En un segundo estudio se usó la misma estrategia general que la del Ejemplo 8, con la excepción de que las estrellas de TCP y Jax se sustituyeron por esponjas de colágeno autorizadas por la FDA.

35 *Biomateriales.* Las esponjas de colágeno se adquirieron en Integra Life Sciences (HELISTAT, Integra Life Sciences Corp, Estados Unidos) y medían 7 x 21 x 5 mm. Estas esponjas se procesaron de tendón de músculo flexor profundo de bovino, son bioabsorbibles y apirógenas.

40 La morfología de las esponjas se evaluó usando Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Resumiendo, las esponjas de colágeno se recubrieron con oro pulverizado y después se examinaron usando MEB (Jeol JSM 5310 LV) a una tensión de aceleración de 10 kV.

45 *Biomoléculas.* Los heparán sulfatos (HS) ensayados en este estudio eran HS específicos de la proteína morfogenética ósea (BMP), también conocidos como HS3.

Estudio *in vivo*

50 El estudio usó HS3 cargado a 30 μ g por esponja (HS30) y BMP-2 cargado a 10 μ g por esponja (BMP2-10). Se crearon defectos de cúbito bilaterales y se trataron con HS30, BMP2-10 o HS30+BMP2-10 o con controles de PBS.

El HS3 (30 μ g) se aplicó en las esponjas de colágeno solo o en combinación con BMP2 (10 μ g) y se evaluó la formación de hueso nuevo en comparación con ningún tratamiento durante 0, 4 y 8 semanas. Estas se evaluaron frente al control con esponjas de colágeno negativas y el control de BMP2 positivo.

55 *Diseño Experimental.* Veinte conejos Blancos de Nueva Zelanda macho (con un peso de 2-2,5 kg) recibieron defectos bilaterales de cúbito. Cada defecto se asignó al azar a uno de los tres grupos experimentales. Cada defecto recibió 1 esponja de colágeno impregnada con uno de los siguientes tratamientos (300 μ l total, en PBS): HS 30 μ g, BMP-2 10 μ g (algunas veces denominado BMP10), HS 30 μ g + BMP-2 10 μ g o el mismo volumen de PBS. Después de 4 y 8 semanas del implante, los conejos se sacrificaron y se extrajeron los cúbitos. Se evaluaron cuatro cúbitos por tratamiento de manera no destructora usando rayos X 2D y microtomografía computerizada (micro-CT) para la formación mineral en ambos momentos. Posteriormente, estos cúbitos se procesaron para histología e inmunohistoquímica. A la semana 8, se incluyeron tres muestras más por tratamiento para su evaluación mediante ensayo de torsión. Algunos defectos se dejaron vacíos para servir como controles internos para asegurarse que el modelo era realmente sin unión.

65

Procedimientos Quirúrgicos. El protocolo de investigación para realizar osteotomías bilaterales de cúbito en conejos lo aprobó el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales, siguiendo todas las directrices apropiadas. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron con anestesia general y en condiciones asépticas. La anestesia consistía en una combinación de inyecciones de ketamina (75 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) así como de isoflurano mediante una cámara de inducción y una máscara facial para el mantenimiento. Se realizó una incisión en la piel de 6 cm y las capas de músculos subyacentes se separaron hasta que la longitud del cúbito quedó expuesta. Se creó un defecto longitudinal de 1,5 cm en la diáfisis central usando un Acculan.

Análisis Radiográfico. Se usó un Sistema Radiográfico de Formación de Imágenes (MUX-100, Shimadzu, Japón) para capturar imágenes 2D de los defectos del cúbito inmediatamente después de la cirugía y a las 4 y 8 semanas. Después, se tomaron micrografías digitales (Figura 69-70) de los rayos X. Los rayos X se realizaron con anestesia general. Las esponjas de colágeno no eran radio-opacas; por tanto fue fácil identificar el nuevo hueso en el sitio de defecto con rayos X 2D.

El control con rayos X después de 4 semanas reveló un relleno de hueso nuevo significativo en los sitios con defecto en todos los casos de tratamiento en comparación con los controles negativos (Figura 70).

El control con rayos X después de 8 semanas reveló la obtención de la unión del hueso en todos los tratamientos, pero no en el control negativo (Figura 71). Sorprendentemente, la administración solo de HS3 dio como resultado la unión de hueso precisamente tan buena como la observada para la BMP2, el HS3 en combinación con BMP2 no aceleró este efecto debido a que ya era máximo.

Análisis micro-CT. A las 4 y 8 semanas, los cúbitos extraídos se exploraron con un escáner μ CT (Skyscan 1076; Skyscan, Bélgica). La exploración se realizó con una resolución de 35 μ m y un ancho de exploración de 68 mm. El escáner se ajustó a una tensión de 104 kV y a una corriente de 98 μ A. Se usó un programa informático A Sasov (Skyscan) de reconstrucción CT de Haz de Cono para convertir los datos de cortes isotrópicos obtenidos en imágenes 2D. Para esta reconstrucción, se asumió que los valores de umbral inferior y superior para el hueso eran unidades de -315 y 543 Hounsfield. Después se analizaron los datos y se remodelaron usando el programa informático asociado CTAn (Skyscan) para la cuantificación y el programa informático Mimics 11.1 (Materialise, Bélgica) para realizar imágenes 3D. Una región de interés cilíndrica (RDI, concéntricamente colocada en sitio de defecto) y el número total de cortes (correspondientes a la longitud del defecto) se mantuvieron constantes en todas las muestras. Se midió el volumen total de hueso recién formado en la RDI asignando umbrales predeterminados para el contenido de hueso total, hueso cortical (radios) y hueso trabecular (o hueso recién formado). Los datos se presentan como volumen óseo/volumen total (%) - véase la Figura 72.

La cuantificación micro-CT del porcentaje del volumen óseo respecto al volumen total (VO/VT) para los grupos de tratamiento después de 4 y 8 semanas confirmó que los efectos del HS3 en solitario eran más que comparables con los de la BMP2 autorizada por la FDA (Figura 72).

Ensayo de torsión. Después del sacrificio a las 8 semanas de la cirugía, los cúbitos de los conejos se recuperaron, se envolvieron en una gasa impregnada con PBS para mantener la humedad y se congelaron a -20 °C hasta realizar el ensayo de torsión. Después de descongelar, las epífisis de los cúbitos se conservaron en polimetilmetacrilato (Meliodent Rapid Repair, Heraeus Kulzer), se incluyeron en bloques de plástico diseñados a medida y se dejaron solidificar para permitir la fijación estable. Posteriormente los cúbitos se montaron en un sistema de ensayo MTS 858 Mini Bionix II (MTS, Eden Prairie, MN). Antes de realizar el ensayo se retiraron cuidadosamente los bloques de polímero y la gasa. Después, cada espécimen se ensayó con respecto a la rotura de torsión y se registraron las curvas de desplazamiento angular del par de torsión resultante. La velocidad de rotación usada fue de 1 grado por segundo hasta alcanzar 35 grados y los datos se recogieron a 100 Hz. En cada espécimen se registró la rigidez, el par de torsión máximo y el ángulo de rotura, midiéndose la rigidez como la pendiente de la parte lineal de la curva de desplazamiento angular del par de torsión (M. Bostrom, J.M. Lane, E. Tomin, M. Browne, W. Berberian, T. Turek, J. Smith, J. Wozney, T. Schildhauer. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar non-union model. Clin Orthop Relat Res 1996; 327: 272-282).

Análisis estadísticos. Se obtuvieron datos cuantitativos por triplicado y se indicaron como media \pm desviación típica. Los análisis estadísticos se realizaron usando el ensayo de la t de Student (programa informático GraphPad), y un valor de p menor de 0,05 se consideró significativo.

Cuantificación de la rigidez y del par de torsión máximo evaluada a partir de cúbitos tratados con control, con BMP2 y con HS. Tanto la rigidez como el par de torsión máximo mejoraron significativamente en los grupos de tratamiento. Cabe destacar que, el tratamiento solo con HS3 dio como resultado propiedades mecánicas que eran similares a las del tratamiento con BMP2 y hueso intacto a la semana 8 (Figura 73).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Agency for Science Technology and Research cool, Simon M Nurcombe, Victor Dombrowski, Christian

5 <120> Glucosaminoglucanos

<130> AY/YF/cgc/2009.4572

10 <150> US 61/096.274
<151> 11-09-2008

<150> GB 0818255.2
<151> 06-10-2008

15 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
1 5 10 15

His Pro

30 <210> 2
<211> 396
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys
20 25 30

Phe Ala Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu
35 40 45

Val Leu Ser Glu Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser Met Phe Gly Leu Lys
50 55 60

Gln Arg Pro Thr Pro Ser Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr Met Leu
65 70 75 80

Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp
85 90 95

35 **His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe**

ES 2 537 347 T3

			100						105				110				
His	His	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Thr	Ser	Gly	Lys	Thr		
		115					120					125					
Thr	Arg	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Leu	Ser	Ser	Ile	Pro	Thr	Glu	Glu	Phe		
	130					135					140						
Ile	Thr	Ser	Ala	Glu	Leu	Gln	Val	Phe	Arg	Glu	Gln	Met	Gln	Asp	Ala		
145					150					155					160		
Leu	Gly	Asn	Asn	Ser	Ser	Phe	His	His	Arg	Ile	Asn	Ile	Tyr	Glu	Ile		
				165					170					175			
Ile	Lys	Pro	Ala	Thr	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Pro	Val	Thr	Arg	Leu	Leu		
			180					185					190				
Asp	Thr	Arg	Leu	Val	Asn	Gln	Asn	Ala	Ser	Arg	Trp	Glu	Ser	Phe	Asp		
		195					200					205					
Val	Thr	Pro	Ala	Val	Met	Arg	Trp	Thr	Ala	Gln	Gly	His	Ala	Asn	His		
	210					215					220						
Gly	Phe	Val	Val	Glu	Val	Ala	His	Leu	Glu	Glu	Lys	Gln	Gly	Val	Ser		
225					230					235					240		
Lys	Arg	His	Val	Arg	Ile	Ser	Arg	Ser	Leu	His	Gln	Asp	Glu	His	Ser		
				245					250					255			
Trp	Ser	Gln	Ile	Arg	Pro	Leu	Leu	Val	Thr	Phe	Gly	His	Asp	Gly	Lys		
			260					265					270				
Gly	His	Pro	Leu	His	Lys	Arg	Glu	Lys	Arg	Gln	Ala	Lys	His	Lys	Gln		
		275					280					285					
Arg	Lys	Arg	Leu	Lys	Ser	Ser	Cys	Lys	Arg	His	Pro	Leu	Tyr	Val	Asp		
	290					295					300						
Phe	Ser	Asp	Val	Gly	Trp	Asn	Asp	Trp	Ile	Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr		
305					310					315					320		
His	Ala	Phe	Tyr	Cys	His	Gly	Glu	Cys	Pro	Phe	Pro	Leu	Ala	Asp	His		
				325					330					335			
Leu	Asn	Ser	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	Val	Asn	Ser	Val		
			340					345					350				
Asn	Ser	Lys	Ile	Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Leu	Ser	Ala		
		355					360					365					
Ile	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Asp	Glu	Asn	Glu	Lys	Val	Val	Leu	Lys	Asn		

ES 2 537 347 T3

370

375

380

Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg
385 390 395

5 <210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia consenso

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1, 4, 6)
<223> xaa es un resto hidropático (por ejemplo Ala, Gly, Tyr, ser)

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2, 3, 5)
<223> Xaa es un resto básico (por ejemplo Lys, Arg, His)

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

25 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia consenso

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1, 5, 6, 8)
<223> xaa es un resto hidropático (por ejemplo Ala, Gly, Tyr, Ser)

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2..4, 7)
<223> xaa es un resto básico (por ejemplo Lys, Arg, His)

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

45 <210> 5
<211> 114
<212> PRT
50 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
 1 5 10 15

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile
 20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
 35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln
 50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu
 85 90 95

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
 100 105 110

Cys Arg

<210>6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
 1 5 10 15

His

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición de heparán sulfato aislada o purificada en la que el componente de heparán sulfato es al menos 97 % de heparán sulfato HS/BMP2 que puede unirse específicamente a la SEC ID N^o: 1 o 6, o a la BMP2, en la que después de la digestión con heparín liasas (heparinasa, heparitinasa I y II) hasta el final y después de someter los fragmentos de disacárido resultantes a HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC), el heparán sulfato HS/BMP2 tiene una composición de disacáridos que comprende:

- UA-GlcN 8,2 % (\pm 3 %);
- UA-GlcNAc 17,5 % (\pm 3 %);
- UA-GlcN,6S 3,7 % (\pm 3 %);
- UA,2S-GlcN 4,5 % (\pm 3 %);
- UA-GlcNS 16,2 % (\pm 3 %);
- UA,2S-GlcNS,6S 0,5 % (\pm 3 %);

en la que la digestión se realiza disolviendo una muestra de HS/BMP2 (100 μ g) en acetato sódico 100 mM / acetato cálcico 0,2 M (pH 7,0); digiriendo secuencialmente la muestra con heparinasa (10 mU/ml) a 37 °C durante 2 horas, seguido de heparitinasa I (10 mU/ml) a 37 °C durante 1 hora, seguido de heparitinasa II (10 mU/ml) a 37 °C durante 18 horas, seguido de una alícuota de cada dicha liasa a 37 °C durante 6 horas, en la que después de la digestión las muestras se procesan en una columna de BioGel P-2 (1 x 120 cm) equilibrada con NH₄HCO₃ 0,25 M, en la que el pico que comprende los disacáridos se liofiliza y después se disuelve en el agua acidificada (pH 3,5 con HCl) y después se hace pasar sobre una columna ProPac PA-1 de SAX-HPLC, en la que los disacáridos se eluyen con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1,0 M (pH, 3,5) durante 60 minutos a un caudal de 1 ml/min.

2. La composición de heparán sulfato aislada o purificada de la reivindicación 1, en la que el HS/BMP2 se une a la SEC ID N^o: 1 con una K_D inferior a 100 μ M.

3. La composición de heparán sulfato aislada o purificada de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el HS/BMP2 está N-sulfatado y/o 6-O-sulfatado.

4. La composición de heparán sulfato aislada o purificada de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el heparán sulfato HS/BMP2 se obtiene por un método que comprende:

- (i) proporcionar un soporte sólido que tenga las moléculas polipeptídicas adheridas al soporte, en el que el polipéptido comprenda un dominio de unión a heparina que tenga la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o: 1 o 6;
- (ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una fracción de heparán sulfato obtenida durante el aislamiento de la heparina de la mucosa intestinal de cerdo de tal manera que los complejos de polipéptido – heparán sulfato puedan formarse;
- (iii) separar los complejos de polipéptido-heparán sulfato del resto de la mezcla;
- (iv) disociar los glucosaminoglucanos de los complejos de polipéptido-heparán sulfato;
- (v) recoger el heparán sulfato disociado.

5. Una composición que comprende la composición de heparán sulfato aislada o purificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y la proteína BMP2, células madre mesenquimales o BMP2 y células madre mesenquimales.

6. Un implante o prótesis biocompatible que comprende un biomaterial y una composición de heparán sulfato aislada o purificada en la que el componente de heparán sulfato es al menos 97 % de heparán sulfato HS/BMP2 que puede unirse específicamente a la SEC ID N^o: 1 o 6, o a la BMP2, en la que después de la digestión con heparín liasas (heparinasa, heparitinasa I y II) hasta el final y después de someter los fragmentos de disacárido resultantes a HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC), el heparán sulfato HS/BMP2 tiene una composición de disacáridos que comprende:

- UA-GlcN 8,2 % (\pm 3 %);
- UA-GlcNAc 17,5 % (\pm 3 %);
- UA-GlcN,6S 3,7 % (\pm 3 %);
- UA,2S-GlcN 4,5 % (\pm 3 %);
- UA-GlcNS 16,2 % (\pm 3 %);
- UA,2S-GlcNS,6S 0,5 % (\pm 3 %);

en la que la digestión se realiza disolviendo una muestra del HS/BMP2 (100 μ g) en acetato sódico 100 mM/acetato cálcico 0,2 M (pH 7,0); digiriendo secuencialmente la muestra con heparinasa (10 mU/ml) a 37 °C durante 2 horas, seguido de heparitinasa I (10 mU/ml) a 37 °C durante 1 hora, seguido de heparitinasa II (10 mU/ml) a 37 °C durante 18 horas, seguido de una alícuota de cada dicha liasa a 37 °C durante 6 horas, en la que después de la digestión las

muestras se procesan en una columna de BioGel P-2 (1 x 120 cm) equilibrada con NH_4HCO_3 0,25 M, en la que el pico que comprende los disacáridos se liofiliza y después se disuelve en agua acidificada (pH 3,5 con HCl) y después se hace pasar sobre una columna ProPac PA-1 de SAX-HPLC, en la que los disacáridos se eluyen con un

5 7. El implante o la prótesis de la reivindicación 6, en el que el implante o la prótesis se reviste o impregna con dicha composición, y de manera opcional se reviste o impregna adicionalmente con la proteína BMP2 y/o con células madre mesenquimales.

10 8. Un método para formar un implante o una prótesis biocompatible, comprendiendo el método la etapa de revestir o impregnar un biomaterial con una composición de heparán sulfato aislada o purificada, en la que el componente de heparán sulfato es al menos 97 % de heparán sulfato HS/BMP2 que puede unirse específicamente a la SEC ID N°: 1 o 6, o a la BMP2, en la que después de la digestión con las heparín liasas (heparinasa, heparitinasa I y II) hasta el final y después de someter los fragmentos de disacárido resultantes a HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC), el heparán sulfato HS/BMP2 tiene una composición de disacáridos que comprende:

- 15 ▪ UA-GlcN 8,2 % (± 3 %);
- UA-GlcNAc 17,5 % (± 3 %);
- 20 ▪ UA-GlcN,6S 3,7 % (± 3 %);
- UA,2S-GlcN 4,5 % (± 3 %);
- UA-GlcNS 16,2 % (± 3 %);
- UA,2S-GlcNS,6S 0,5 % (± 3 %);

25 comprendiendo el método opcionalmente además recubrir o impregnar el biomaterial con uno o ambos de proteína BMP2 y células madre mesenquimales, en el que la digestión se realiza disolviendo una muestra del HS/BMP2 (100 μg) en acetato sódico 100 mM/acetato cálcico 0,2 M (pH 7,0); digiriendo secuencialmente la muestra con heparinasa (10 mU/ml) a 37 °C durante 2 horas, seguido de heparitinasa I (10 mU/ml) a 37 °C durante 1 hora, seguido de: heparitinasa II (10 mU/ml) a 37 °C durante 18 horas, seguido de una alícuota de cada dicha liasa a 37 °C durante 6

30 equilibrada con NH_4HCO_3 0,25 M, en el que el pico que comprende los disacáridos se liofiliza y después se disuelve en agua acidificada (pH 3,5 con HCl) y después se hace pasar sobre una columna ProPac PA-1 de SAX-HPLC, en la que los disacáridos se eluyen con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1,0 M (pH, 3,5) durante 60 minutos a un caudal de 1 ml/min.

35 9. Medios de cultivo que comprenden una composición de heparán sulfato aislada o purificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

40 10. El uso de una composición de heparán sulfato aislada o purificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un cultivo celular *in vitro*, preferentemente para el cultivo de tejido conectivo *in vitro*.

11. Un método para cultivar tejido conectivo *in vitro* que comprende cultivar células madre mesenquimales en contacto con la composición de heparán sulfato aislada o purificada añadida de manera exógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

45 12. Un método *in vitro* para promover la osteogénesis, comprendiendo el método administrar una composición de heparán sulfato aislada o purificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a células precursoras óseas o a células madre óseas, comprendiendo opcionalmente el método poner en contacto las células precursoras óseas o las células madre óseas con la proteína BMP2 simultáneamente con HS/BMP2.

50 13. El método de la reivindicación 12 en el que las células precursoras óseas o células madre óseas son células madre mesenquimales.

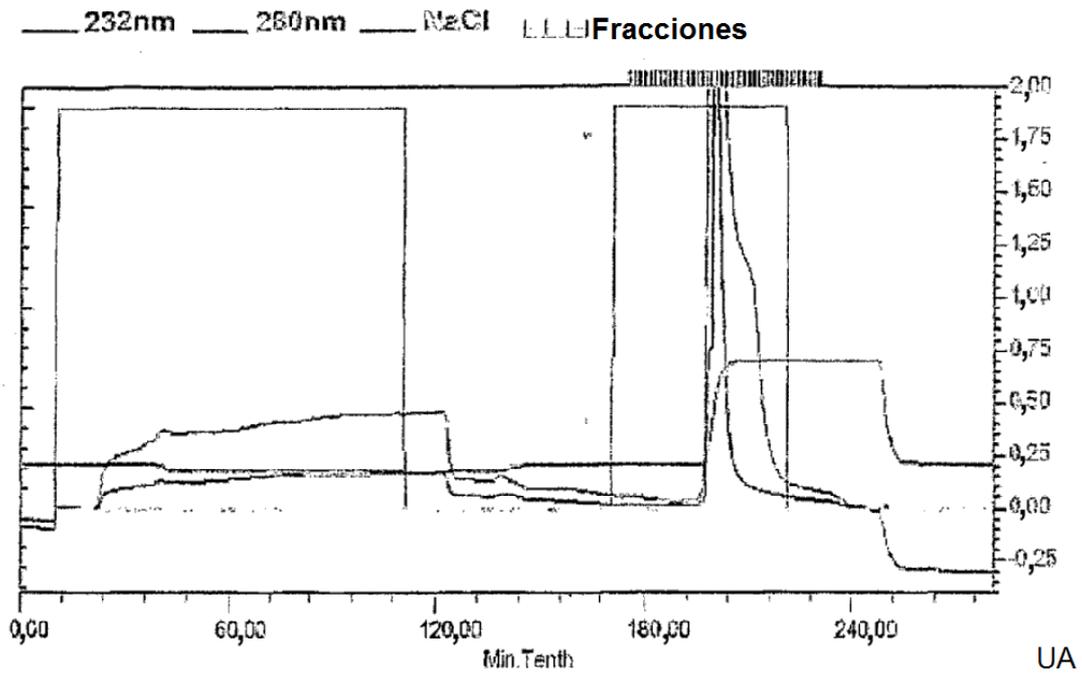


Figura 1

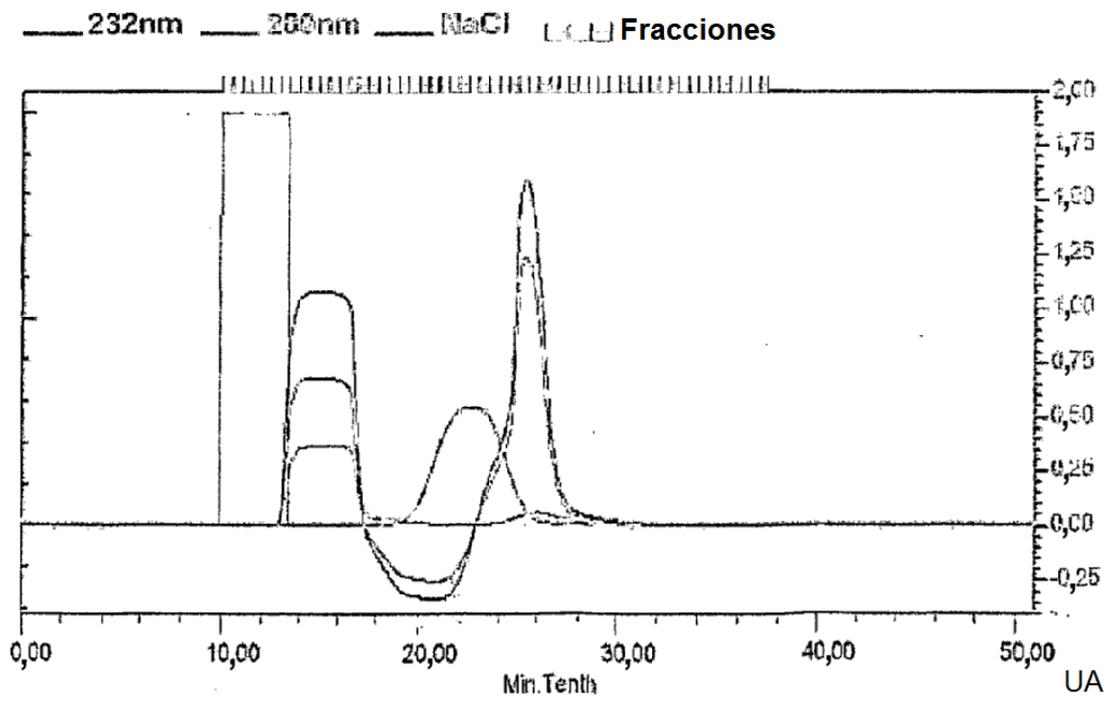


Figura 2

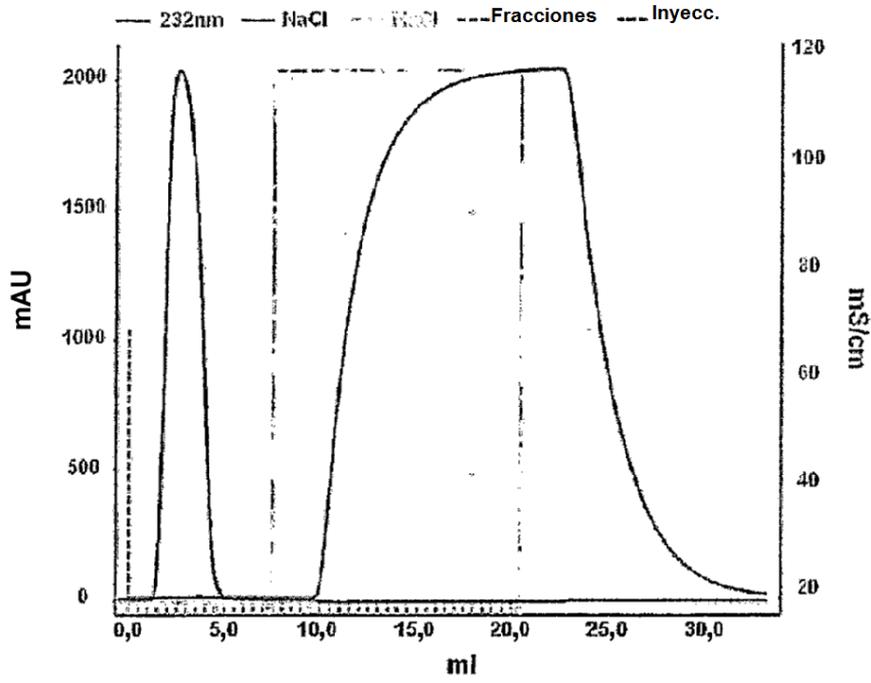


Figura 3

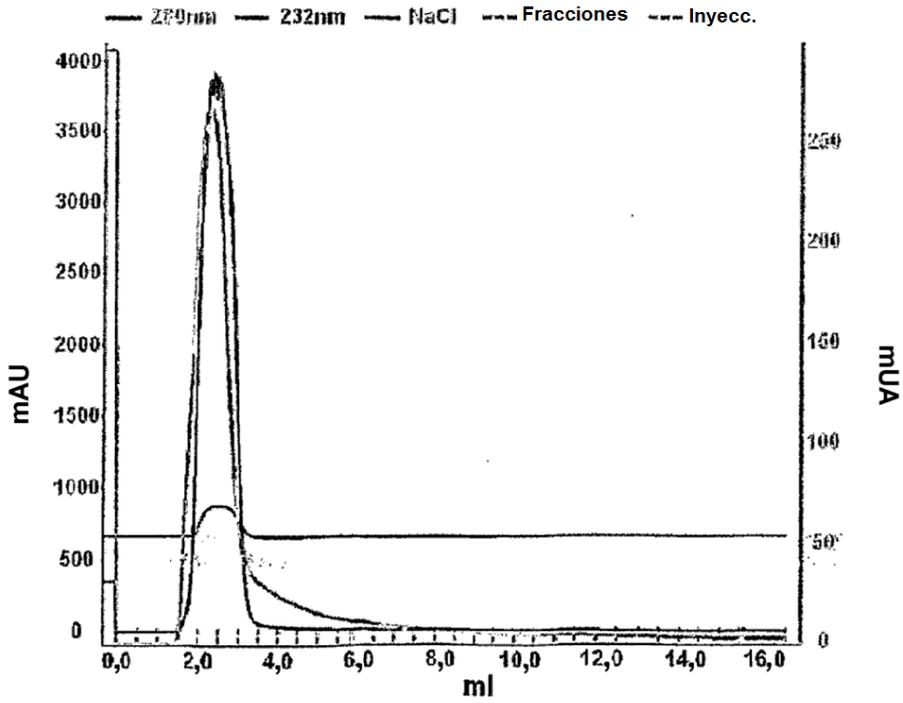


Figura 4

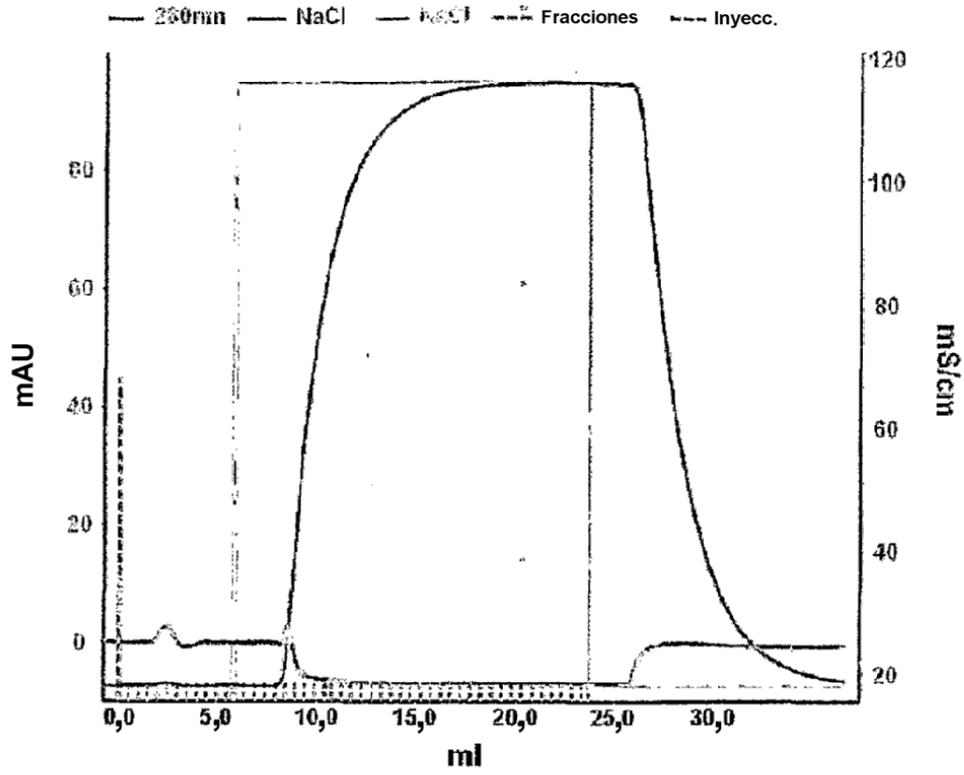


Figura 5

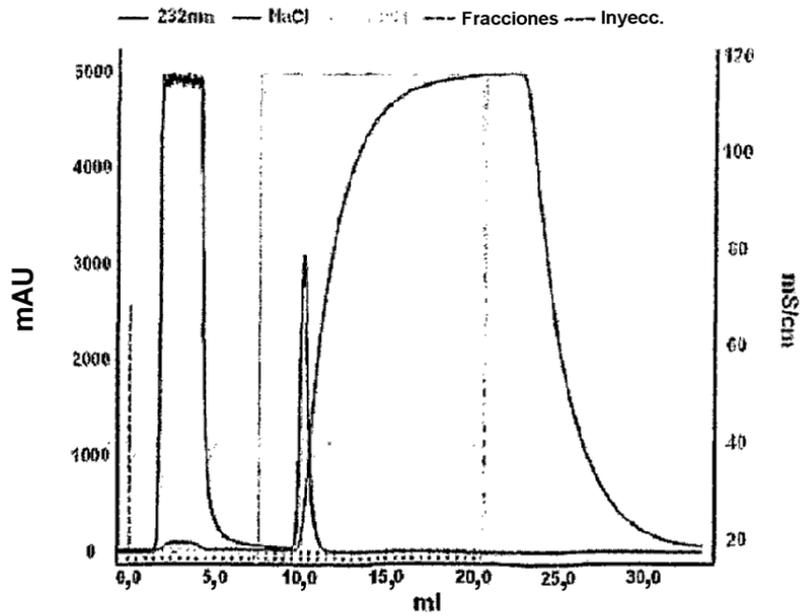


Figura 6

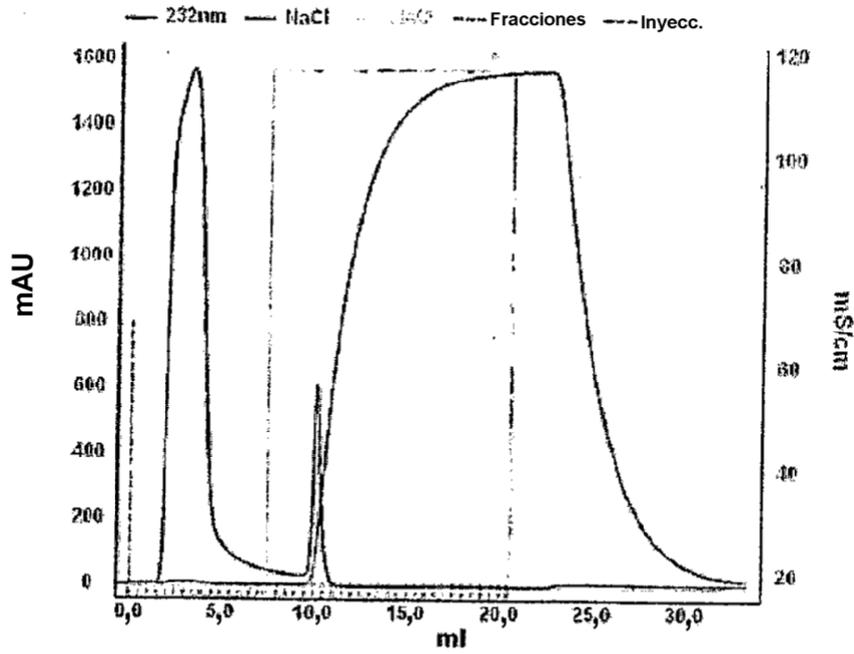


Figura 7

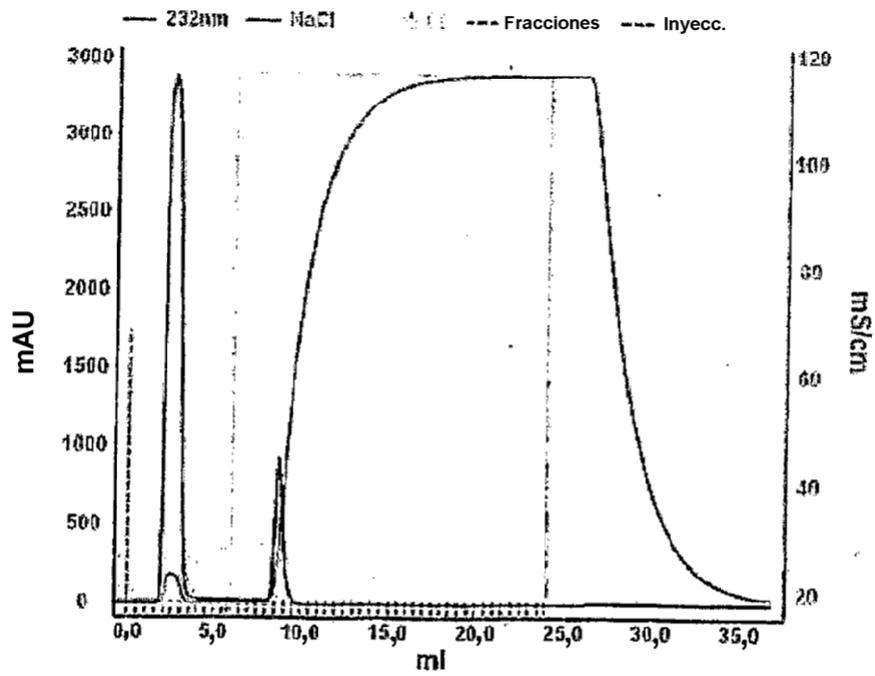


Figura 8

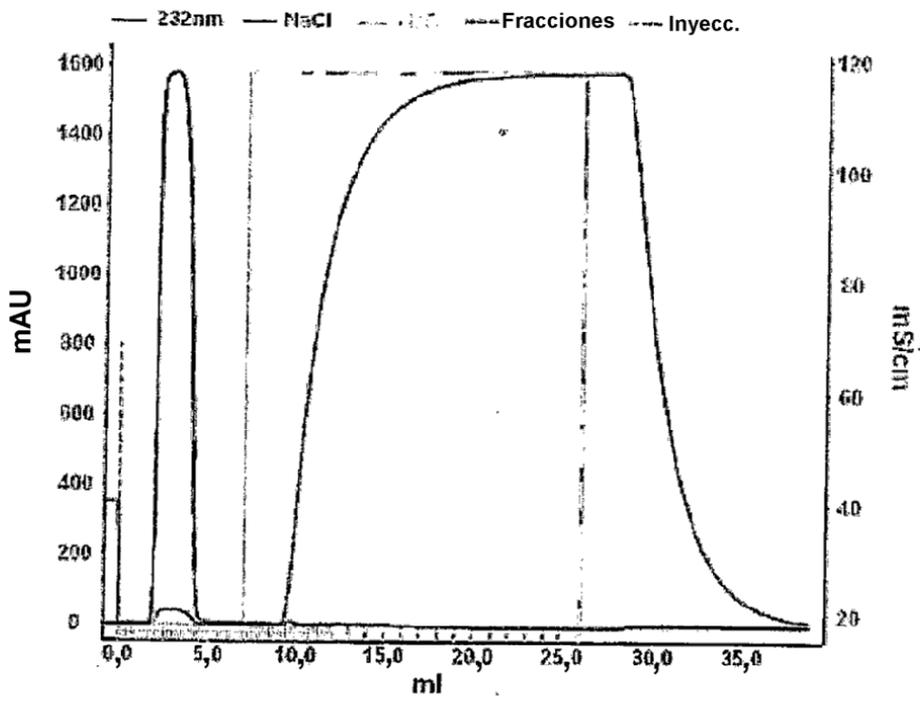


Figura 9

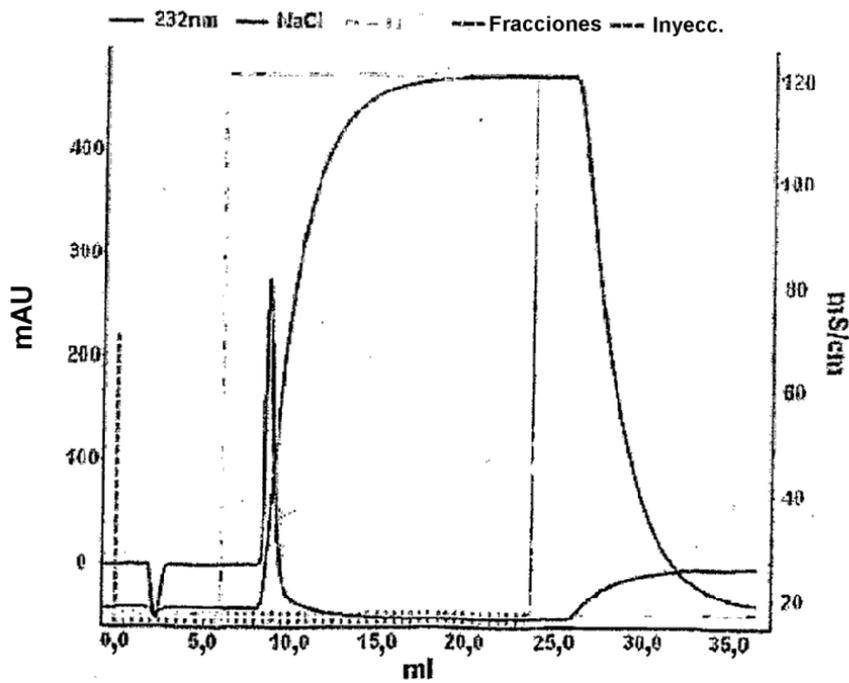


Figura 10

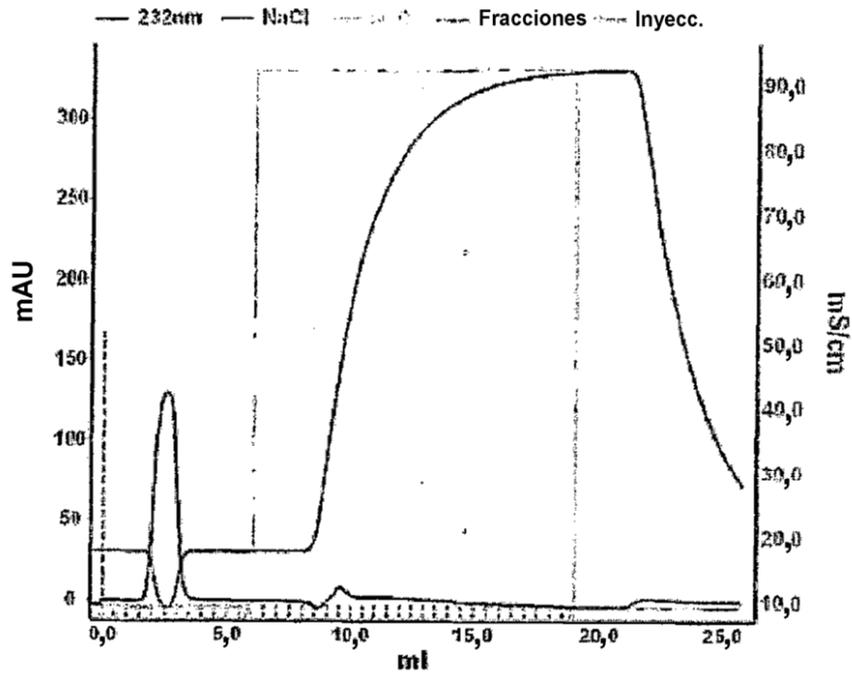


Figura 11

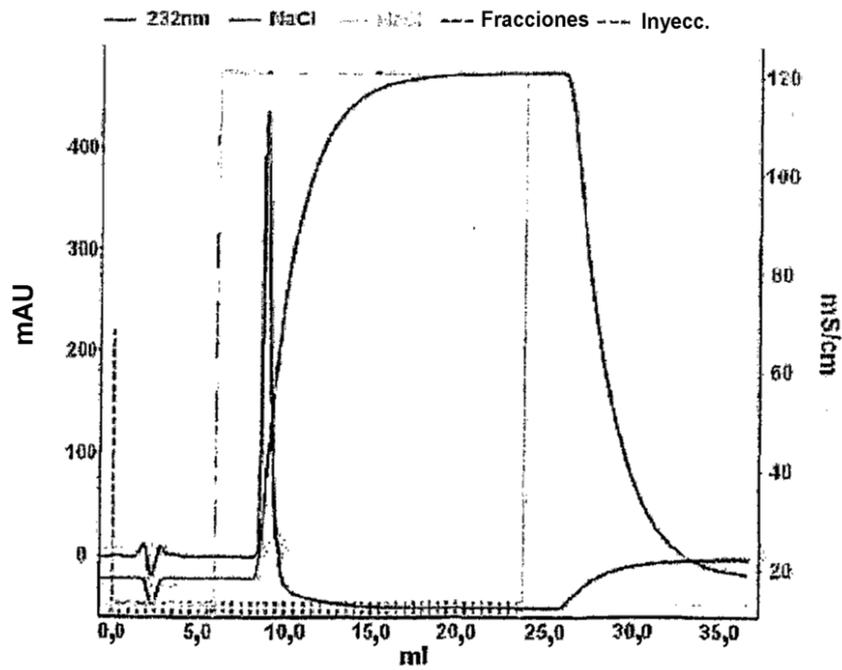


Figura 12

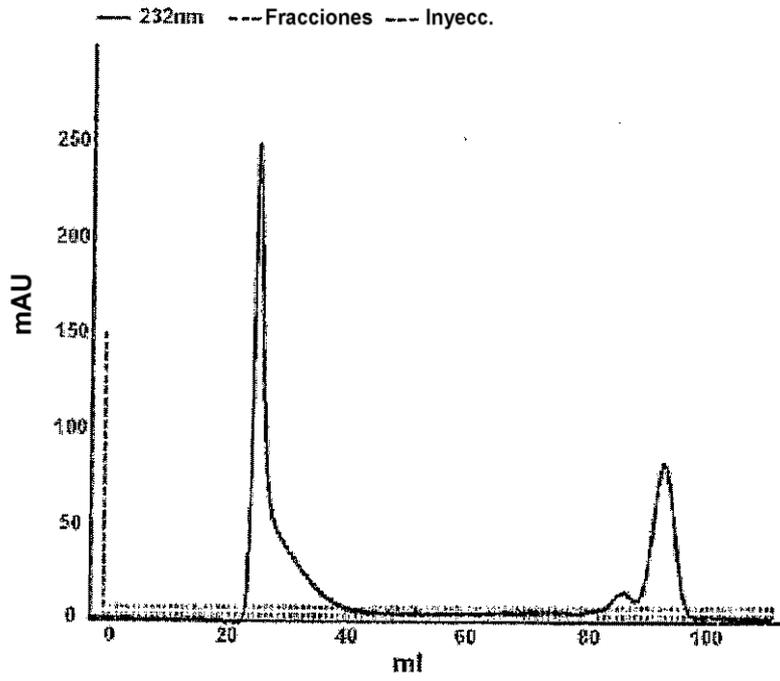


Figura 13

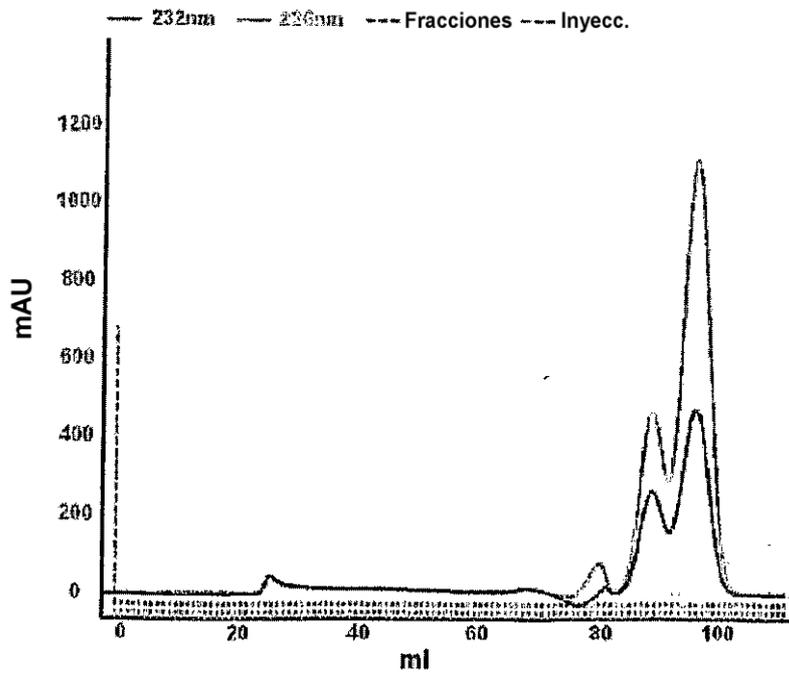


Figura 14

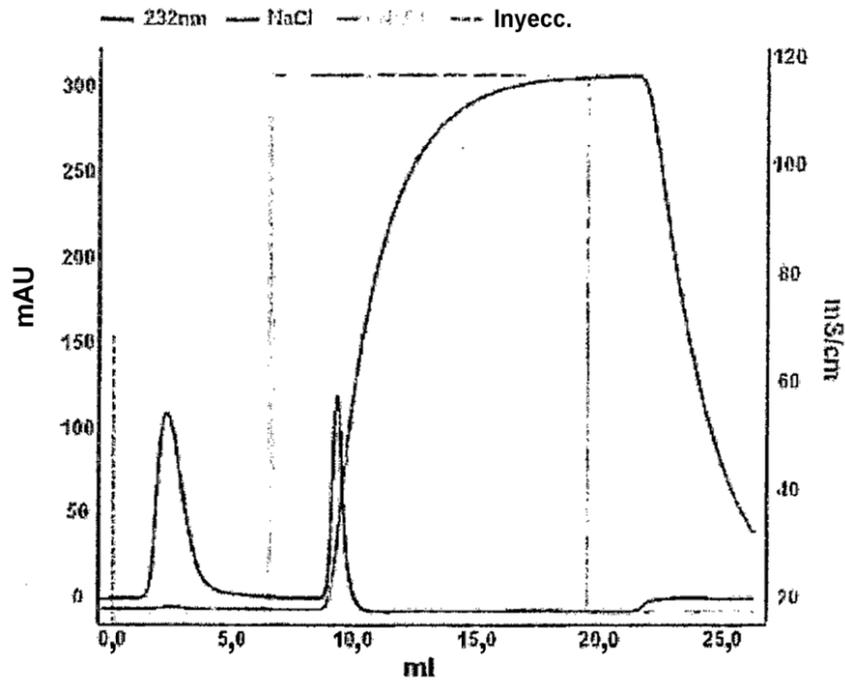


Figura 15

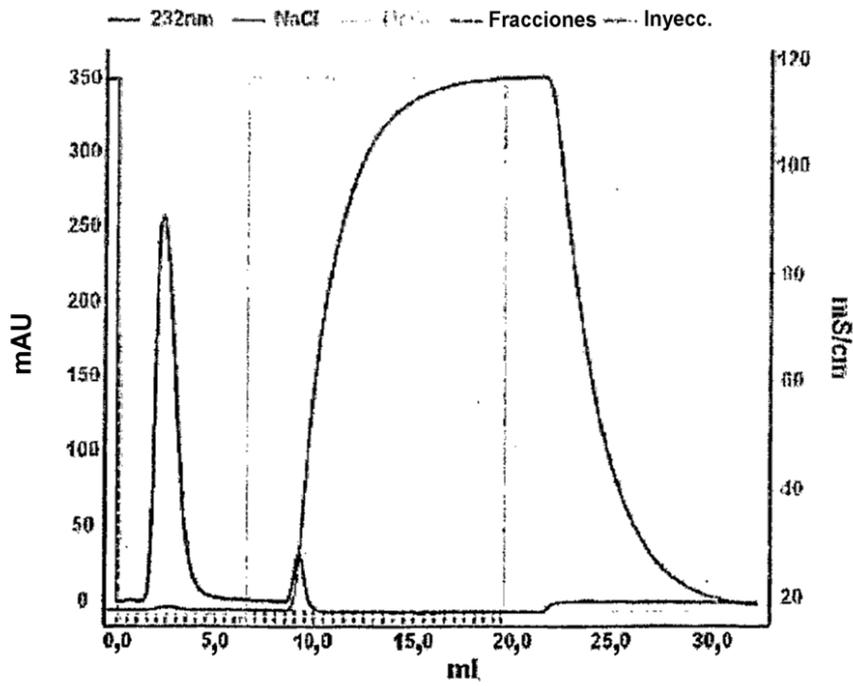


Figura 16

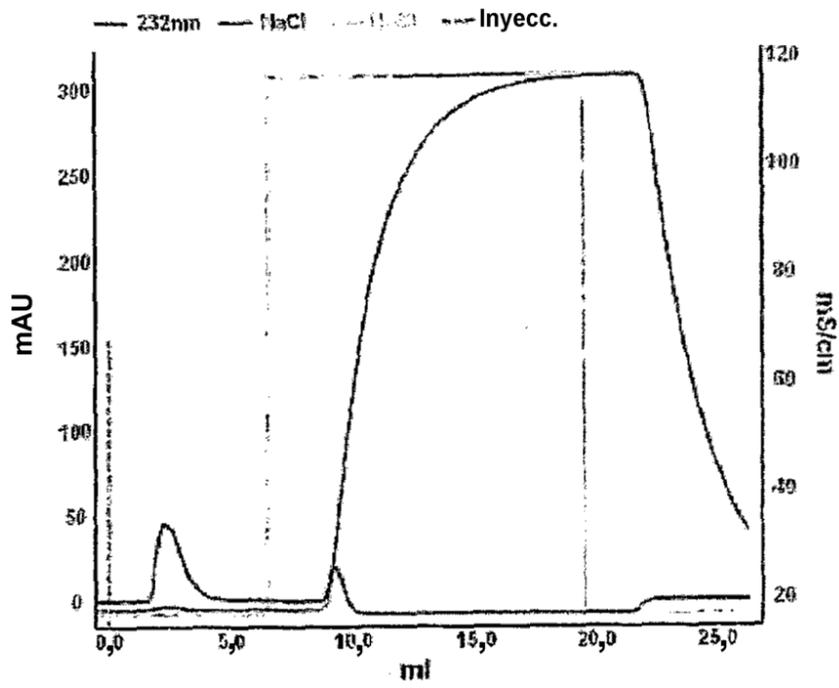


Figura 17

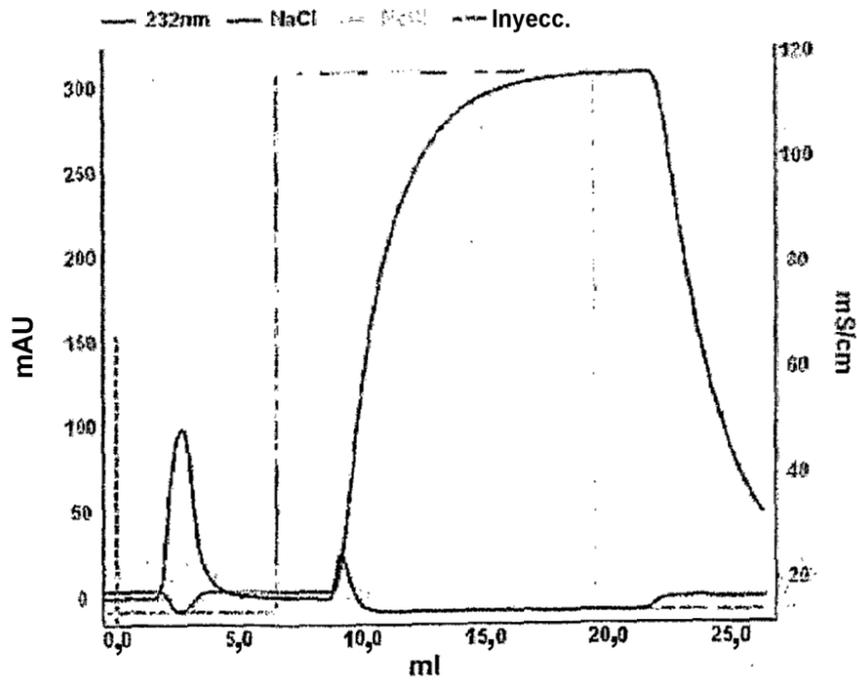


Figura 18

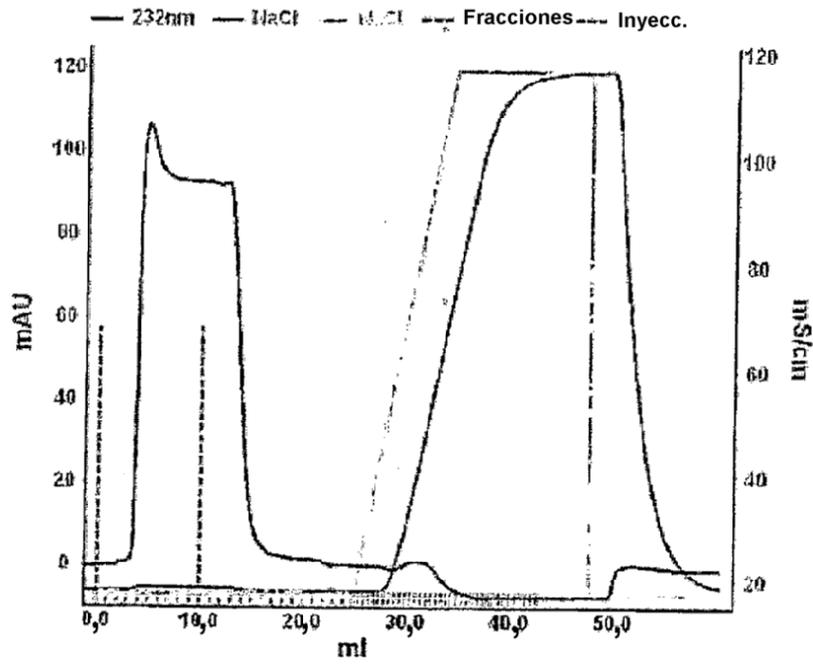


Figura 19

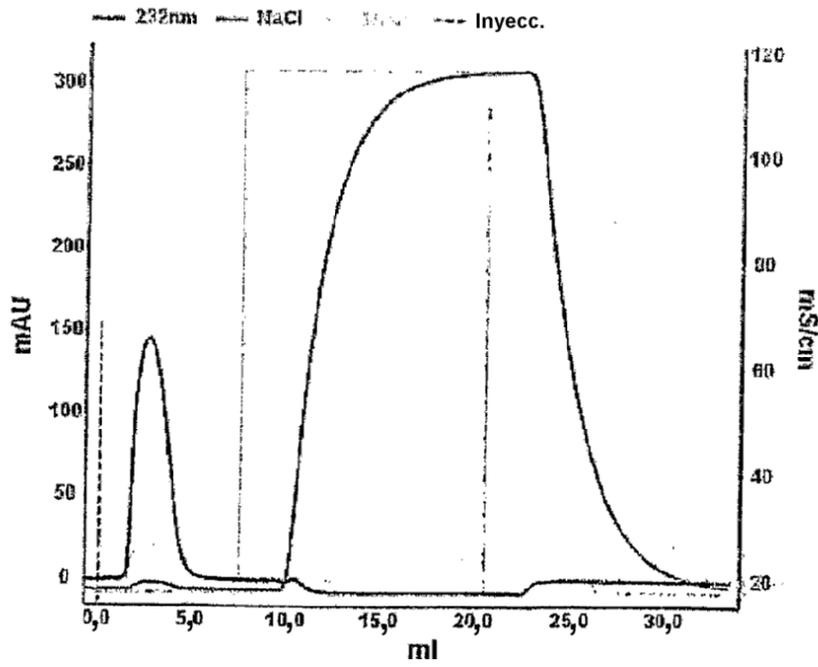


Figura 20

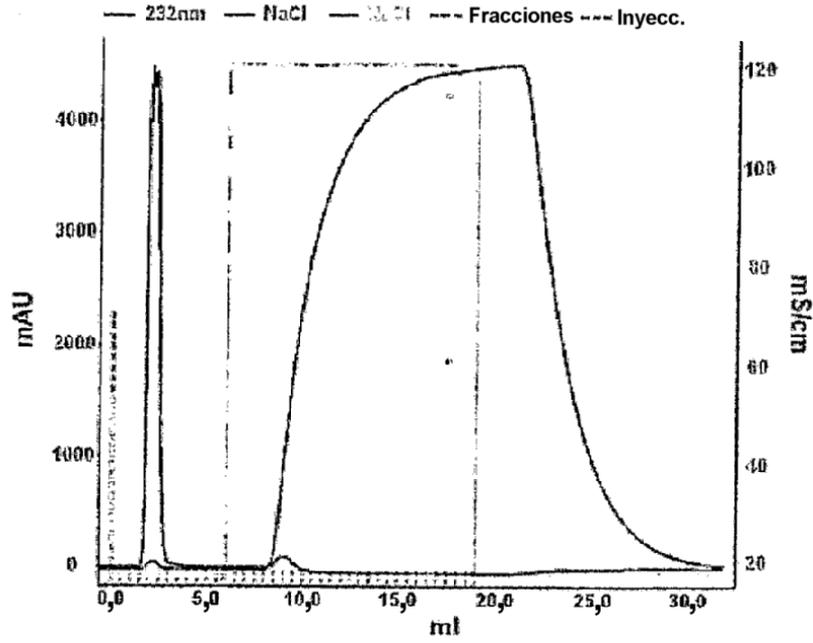


Figura 21

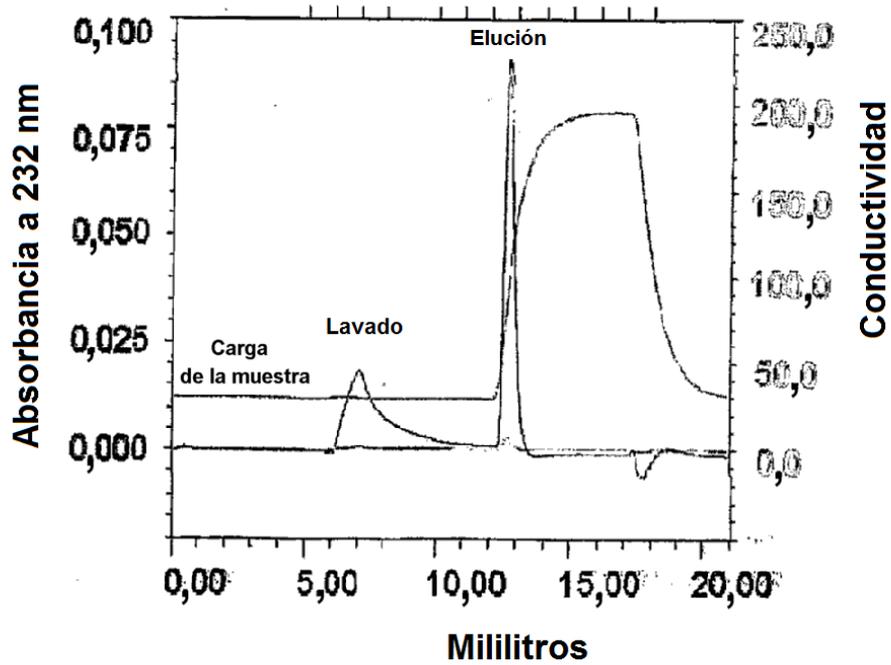


Figura 22

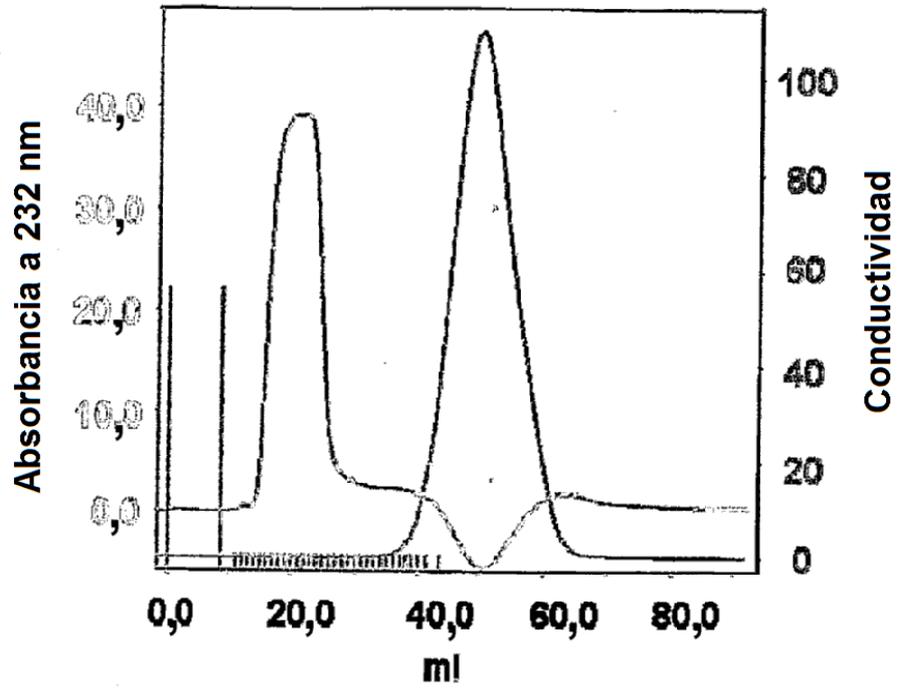


Figura 23

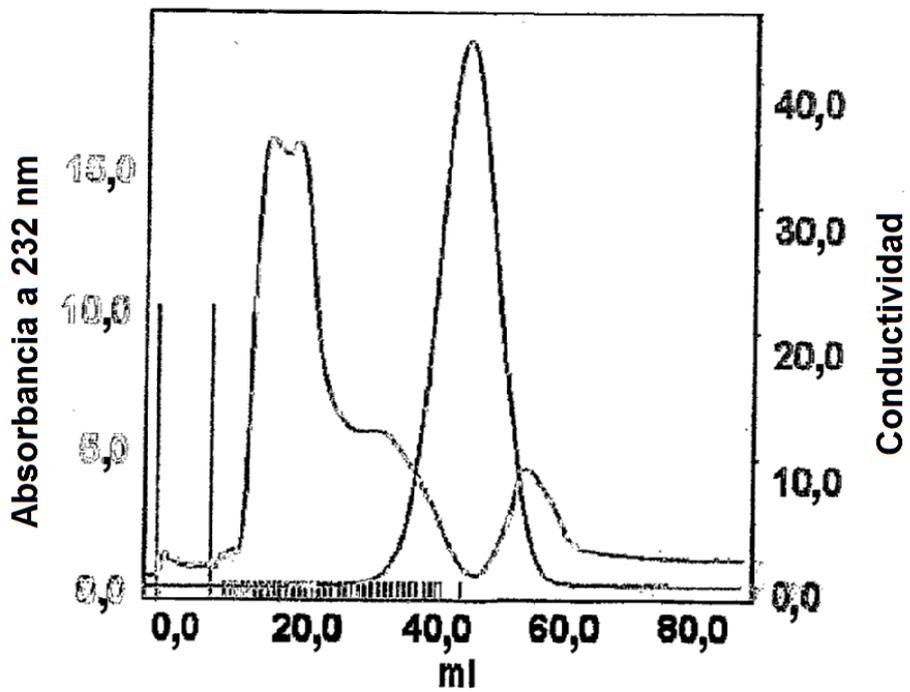


Figura 24

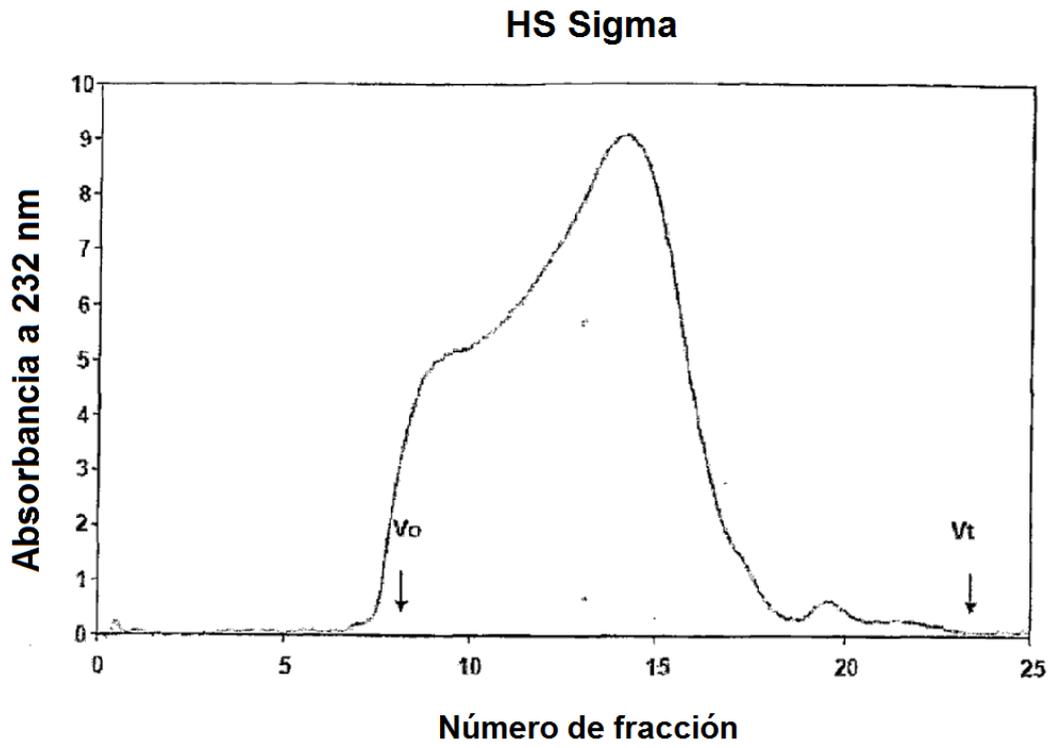


Figura 25

HS específico del péptido BMP2

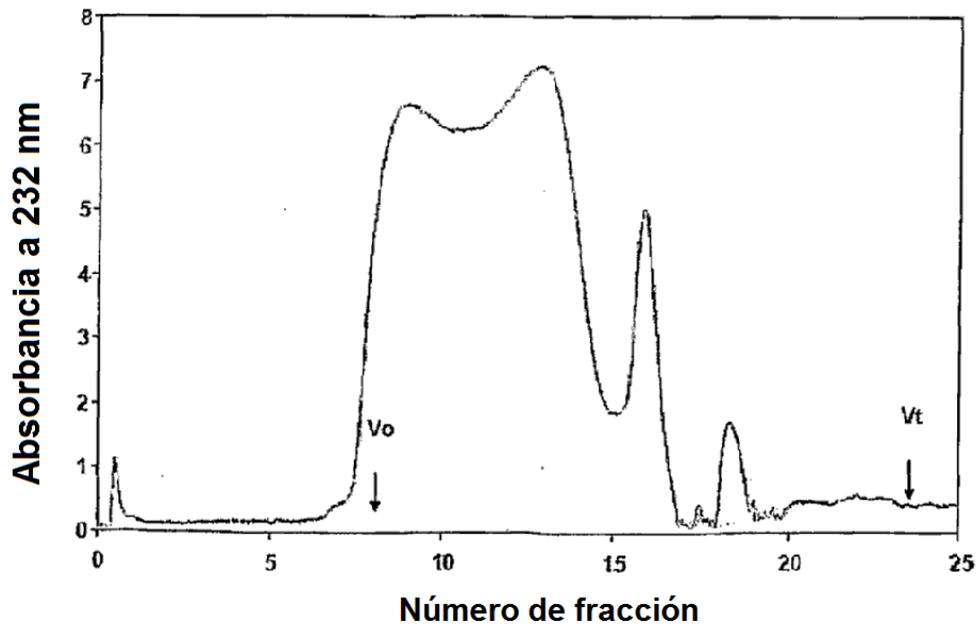


Figura 26

Expresión de Osterix

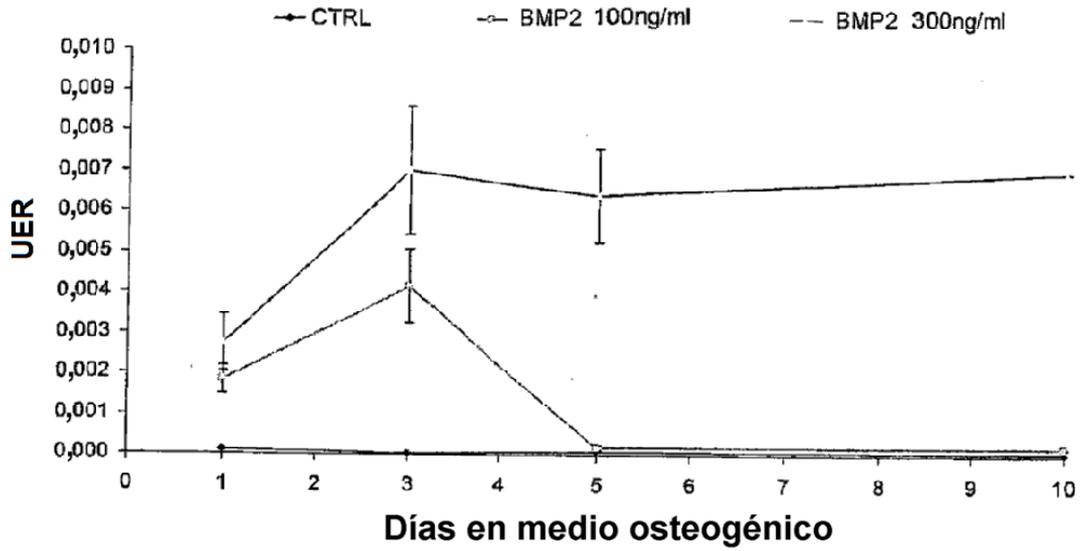


Figura 27

Osteocalcina

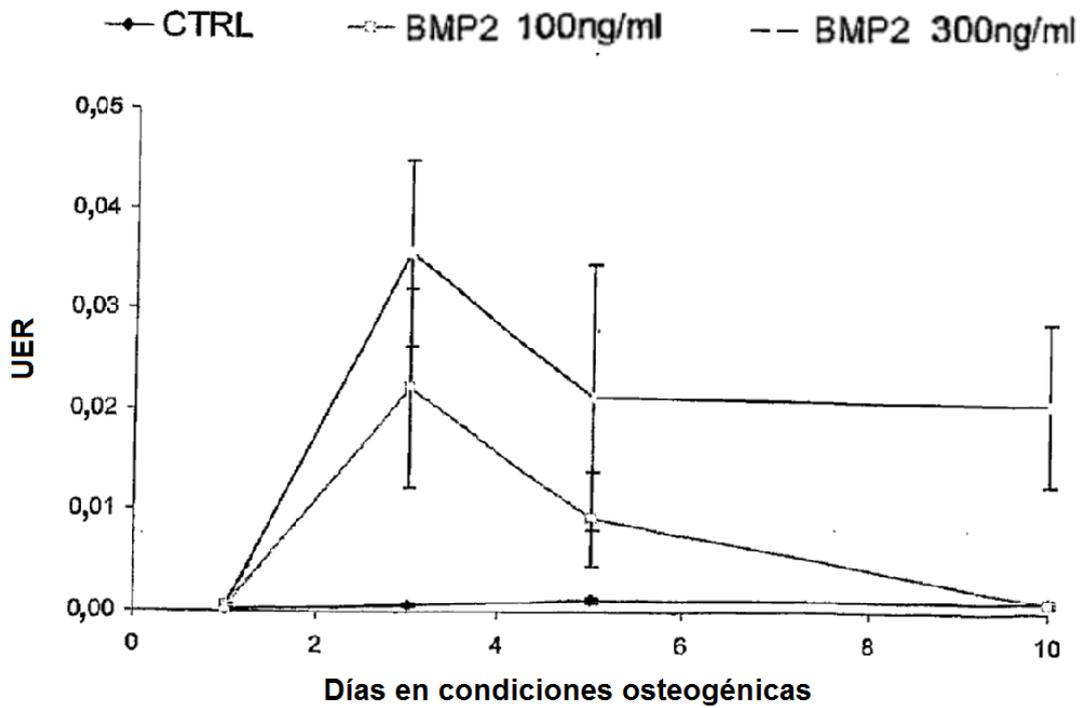


Figura 28

Expresión de Runx2

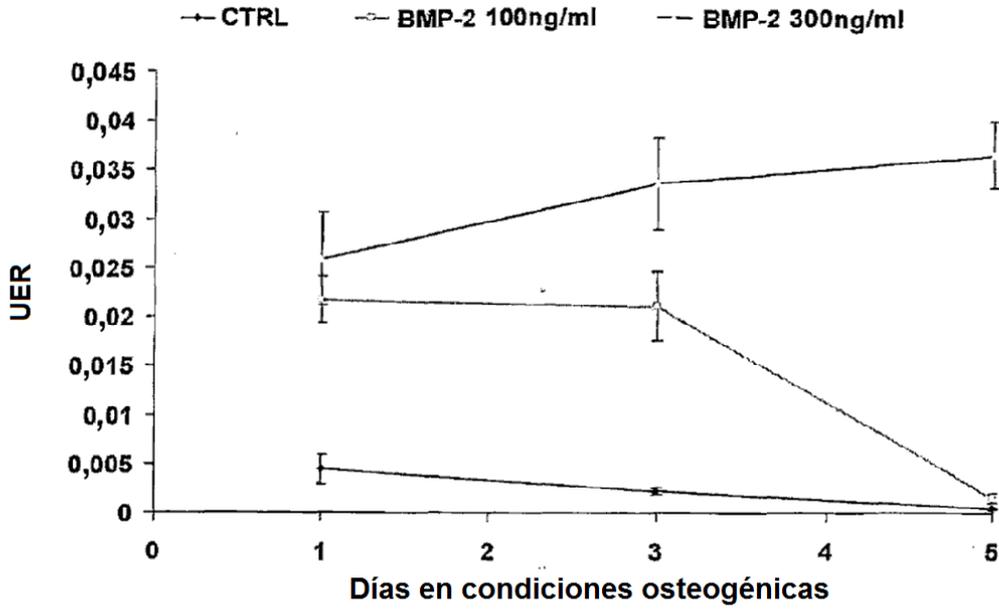


Figura 29

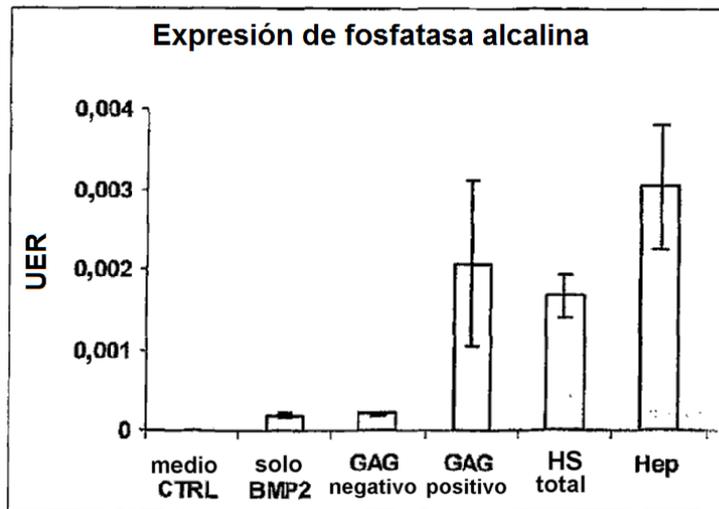


Figura 30

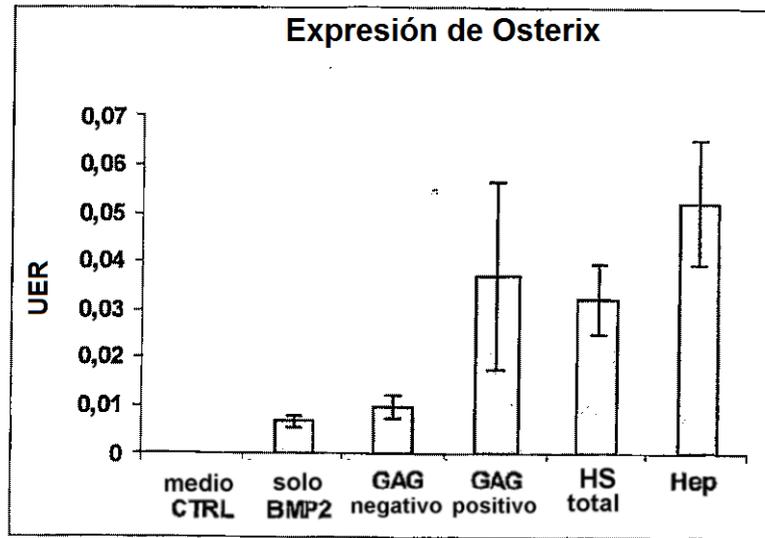


Figura 31

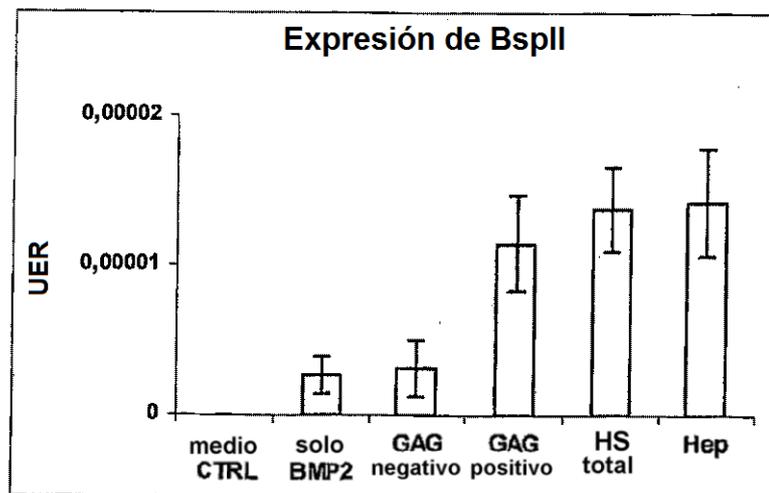


Figura 32

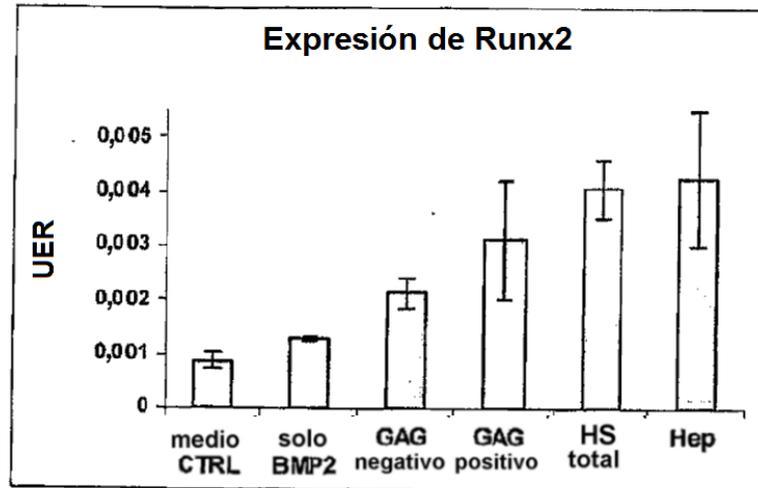


Figura 33

Aumento de la expresión del gen de osteocalcina

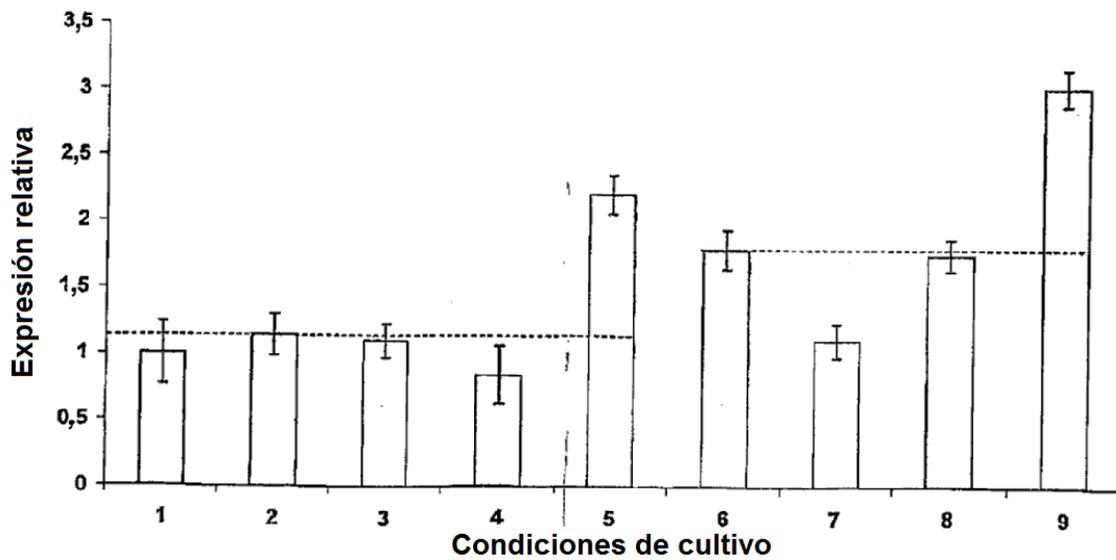


Figura 34

1	MVAGTRC	LLA	LLLPQV	LLGG	AAGL	VP	ELGR	RKFA	AA	SSGR	PSSQ	PS	DEVL	SEFEL	RLLSM
61	FGLK	QR	PTPS	RD	AV	PP	YML	DLYR	RH	SGQP	GSP	AP	DH	RLE	RA
121	LP	ET	SG	KT	TR	R	FF	NL	SSIP	TE	E	F	T	S	A
181	T	A	N	S	K	F	P	V	T	R	L	D	T	R	L
241	K	R	H	V	R	I	S	R	S	L	H	Q	D	E	H
411	L	Y	V	D	F	S	D	V	G	W	N	D	W	I	V
361	C	V	P	T	E	L	S	A	I	S	M	L	Y	L	D

ENEKV VLKNYQDMVV EGGGCR
 FPLADHLNST NHAIVQTLVN SVNSKIPKAC
 KRQAKHKQRK RLKSSCKRHP
 GKGHPLHKRE
 HANHGFWVEV AHLEEKQGV
 PAVMRWTAQG
 LGNSSFHHR INIYEIKPA
 ASRWESFDVT
 GSPAPDHRLE RAASRANTVR SFHHEESLEE
 DLYRRHSGQP
 RKFAAASSGR PSSQPSDEVL SEFELRLLSM

Figura 35

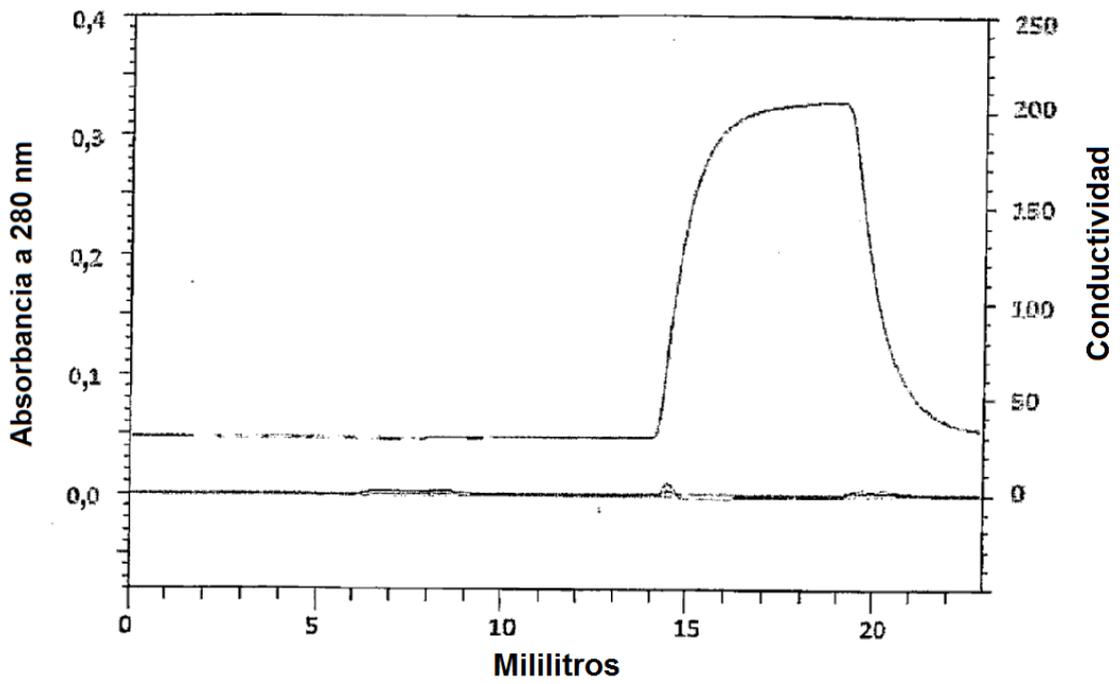


Figura 36

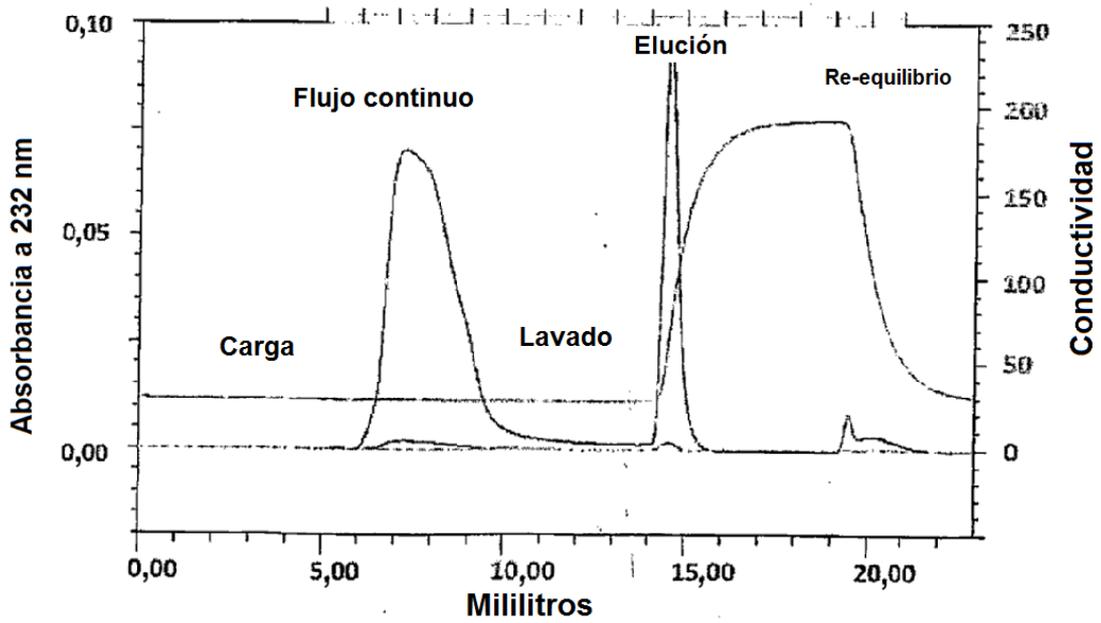


Figura 37

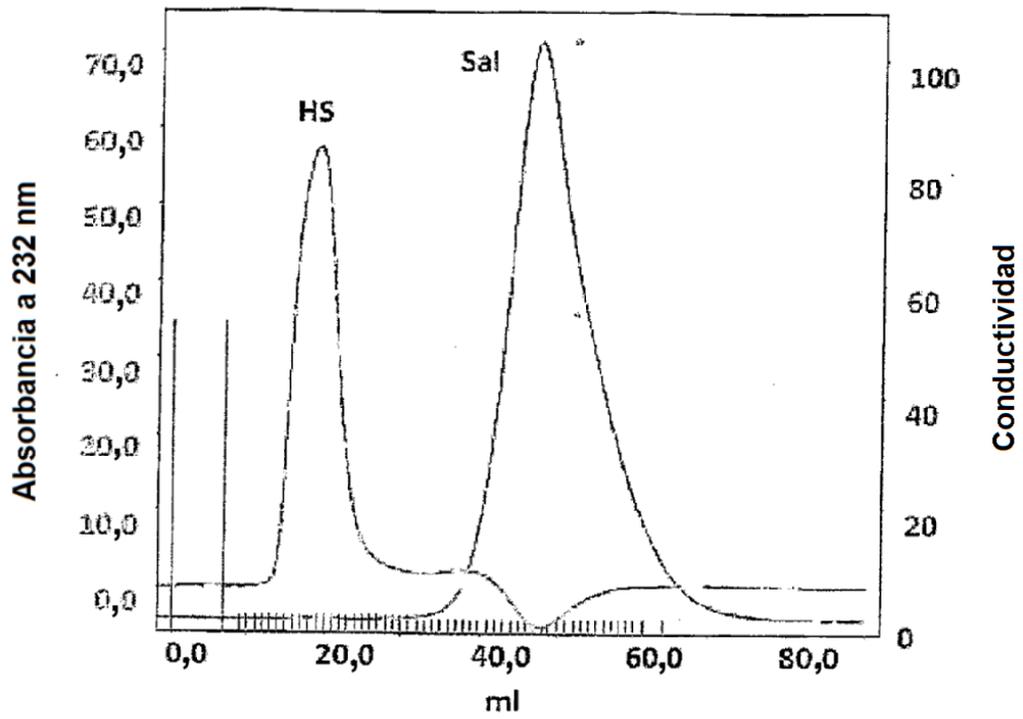


Figura 38

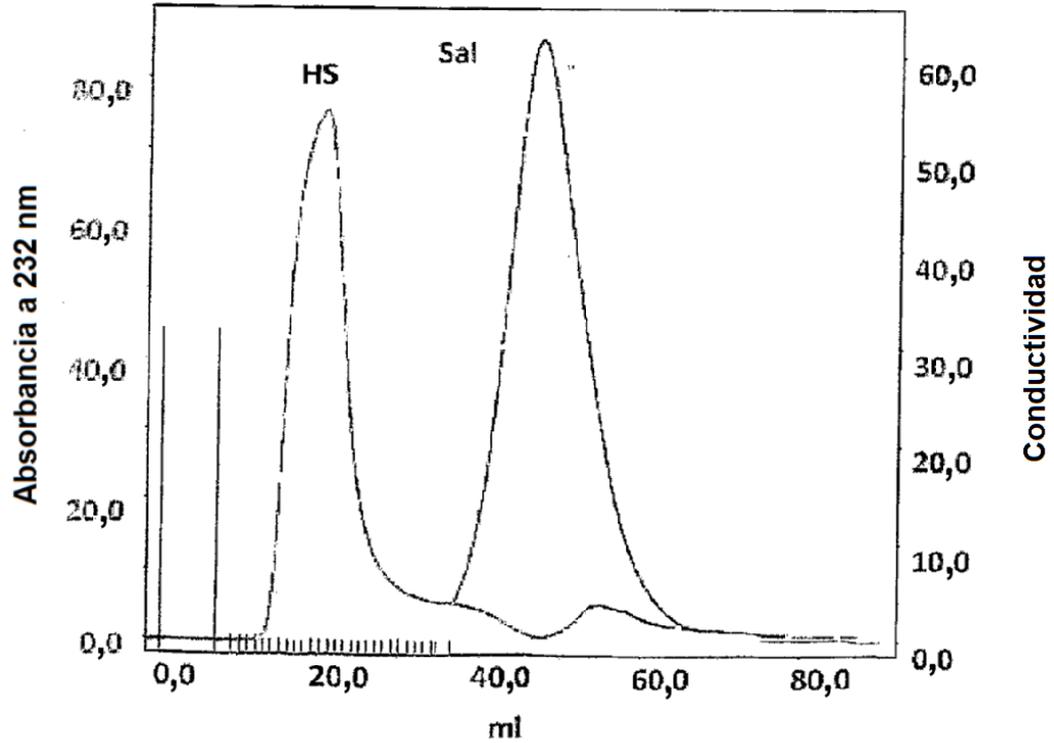
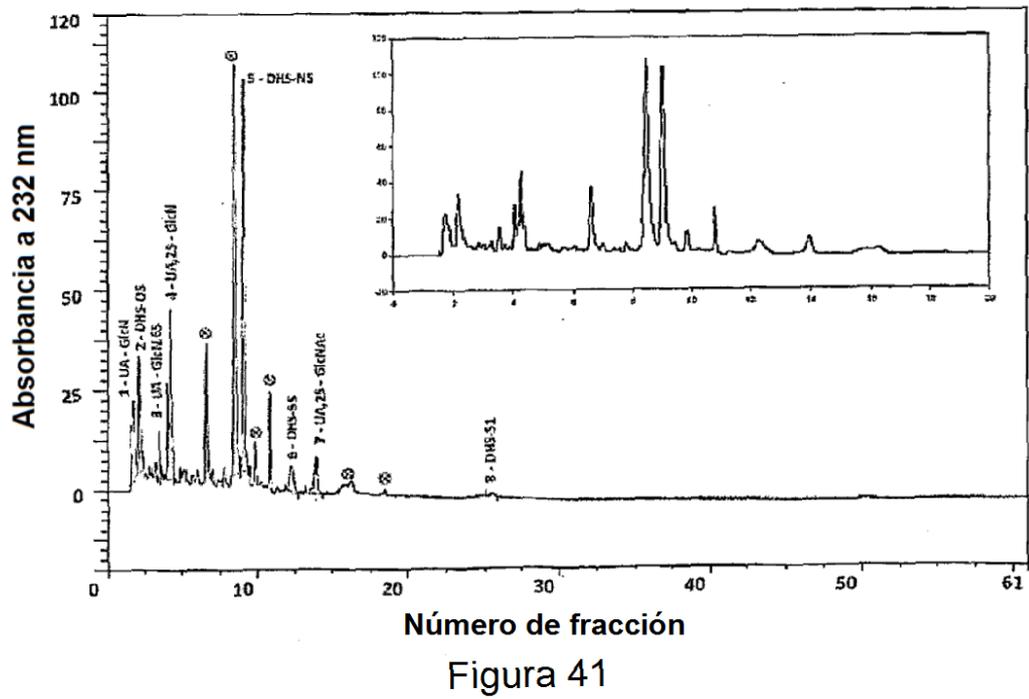
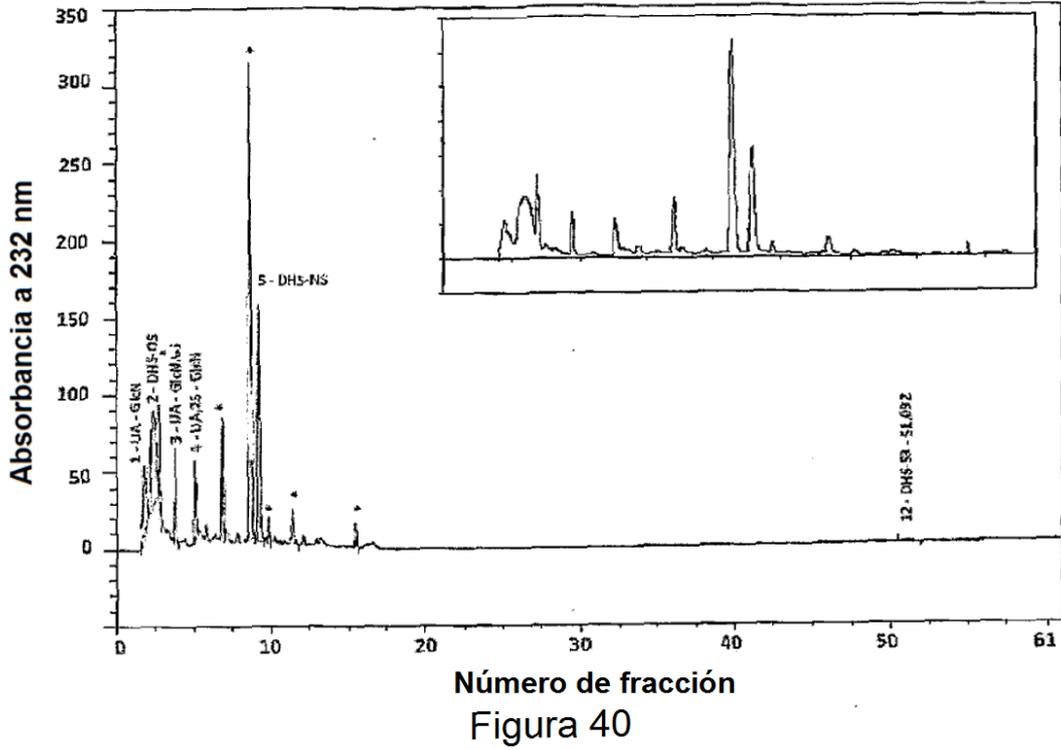


Figura 39



Perfil de disacáridos de HS Celsus por SAX-HPLC

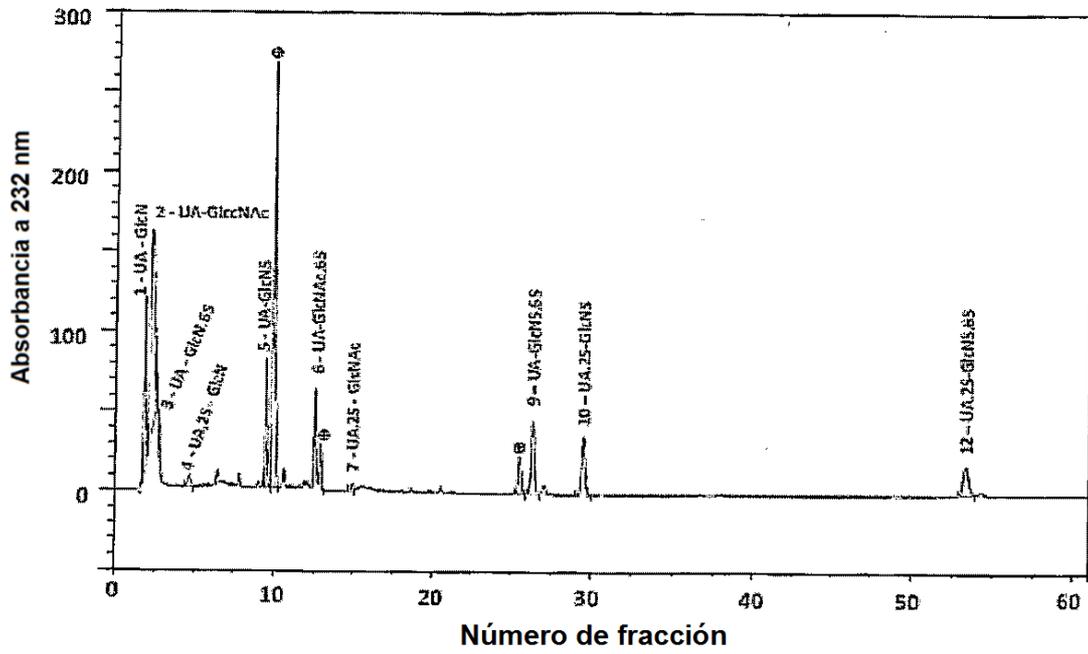


Figura 42

S.NO.	Patrones HS	HS específico de BMP2 (% composición)	HS no específico de BMP2 (% composición)	HS - Celsus (% de composición)
1	UA - GlcN	8,2	6,5	9,2
2	UA - GlcNAc	17,5	6,1	27,5
3	UA - GlcN,6S	3,7	1,8	1,0
4	UA,2S - GlcN	4,5	11,8	1,5
5	UA - GlcNS	16,2	21,5	7,1
6	UA - GlcNAc,6S	--	3,3	5,4
7	UA,2S - GlcNAc	--	3,3	0,5
8	UA,2S - GlcN,6S	--	--	--
9	UA - GlcNS,6S	--	0,4	7,1
10	UA,2S - GlcNS	--	--	6,1
11	UA,2S - GlcNAc,6S	--	--	--
12	UA,2S - GlcNS,6S	0,5	--	4,6
	Desconocido	49,4	45,3	30,0

Figura 43

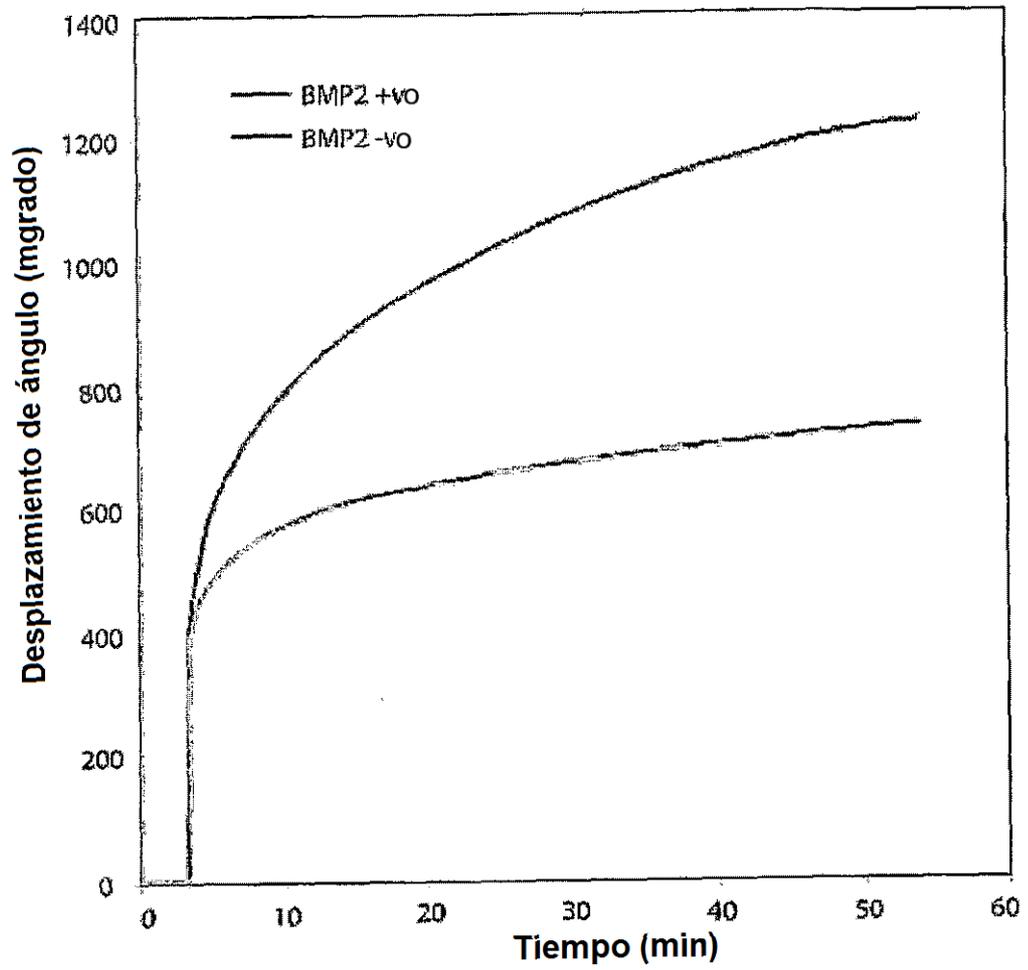


Figura 44

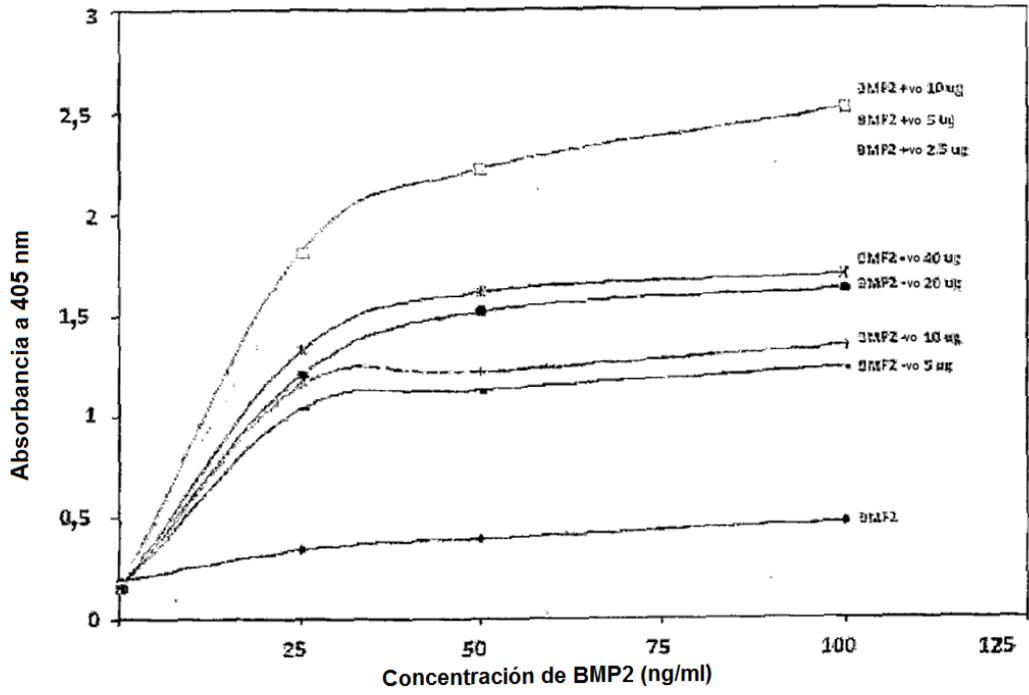


Figura 45

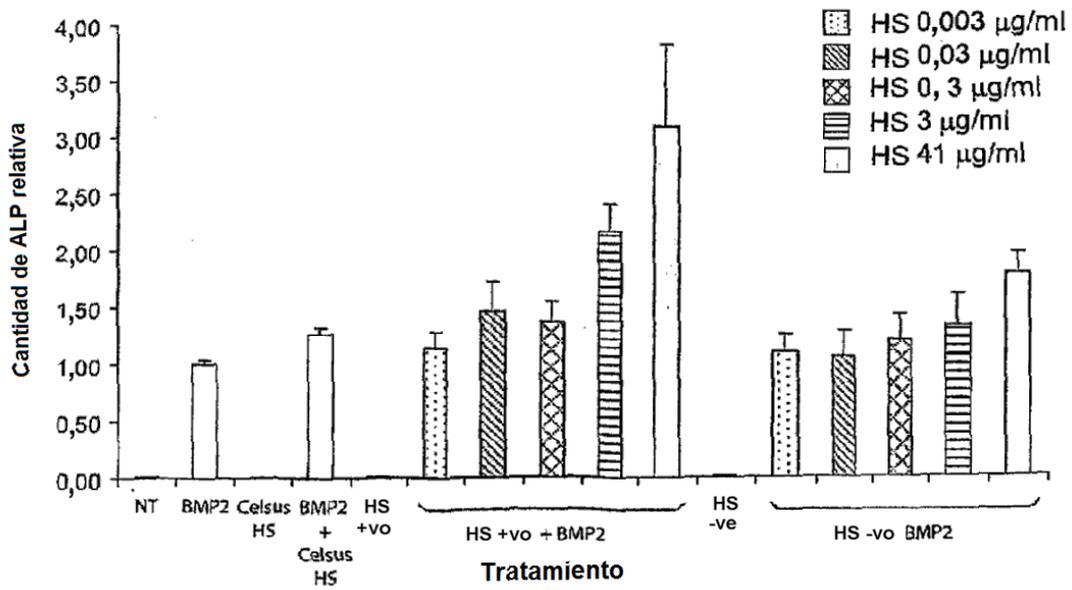


Figura 46

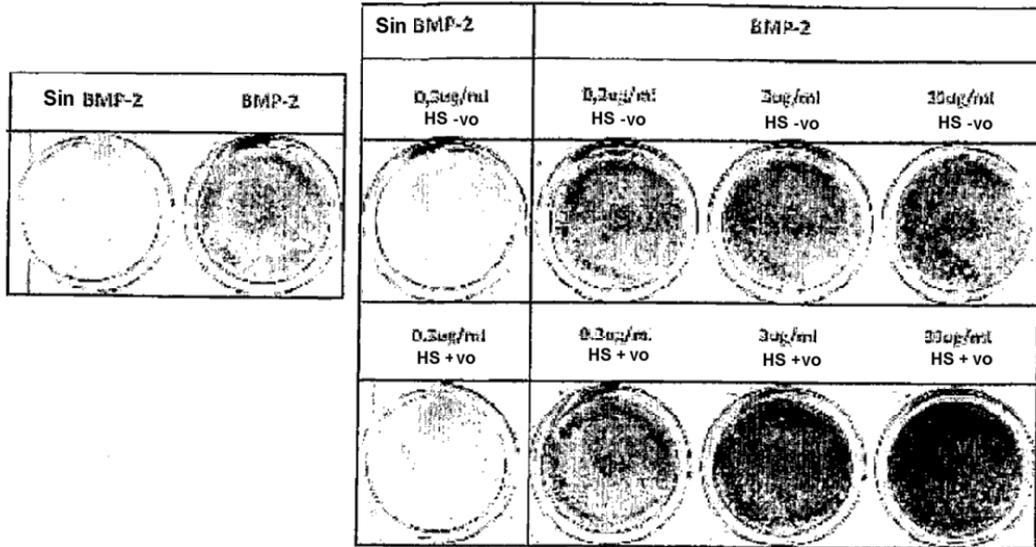


Figura 47

Figura 48

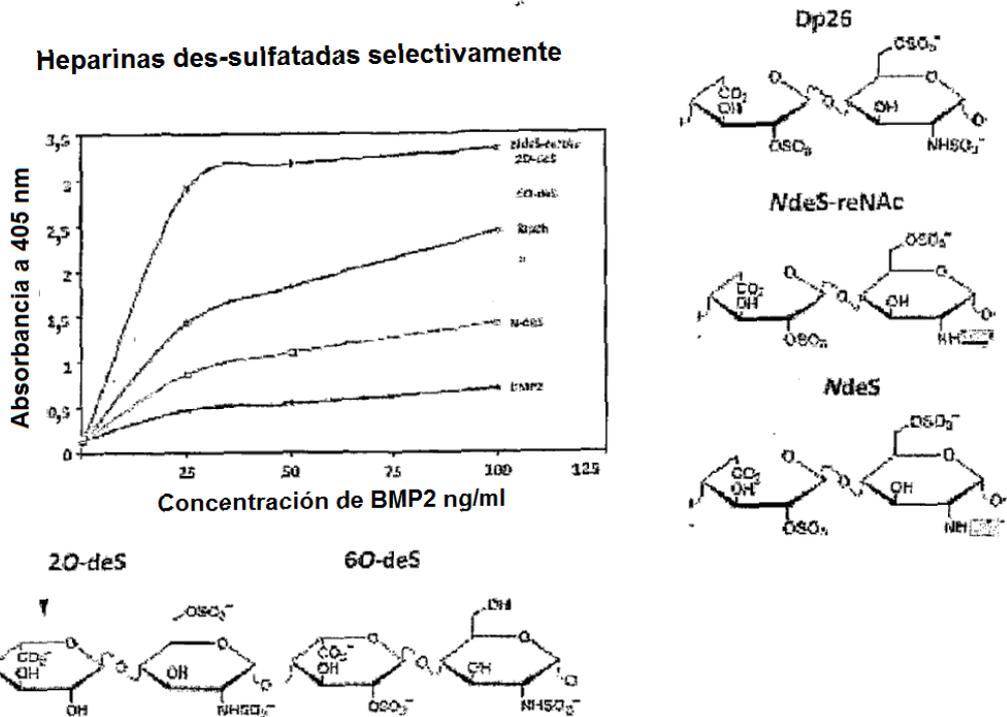


Figura 49

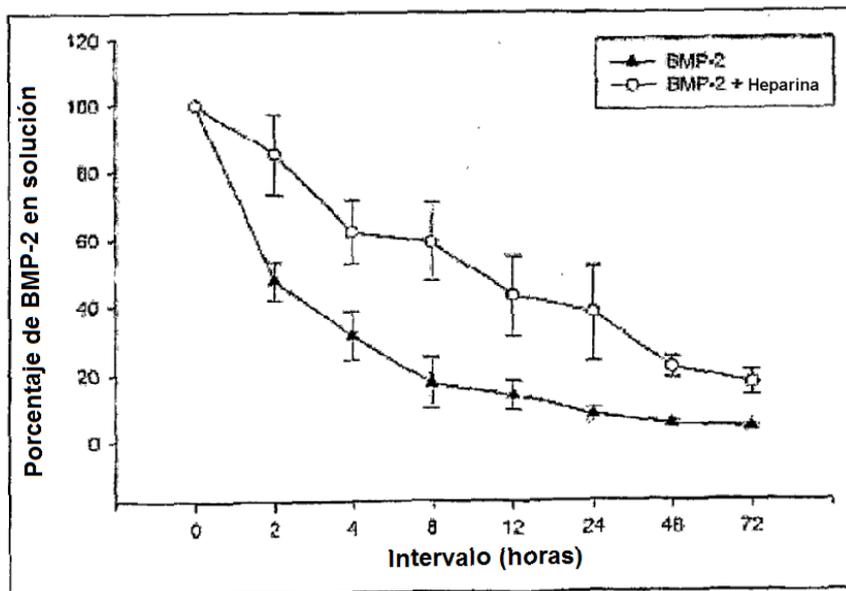
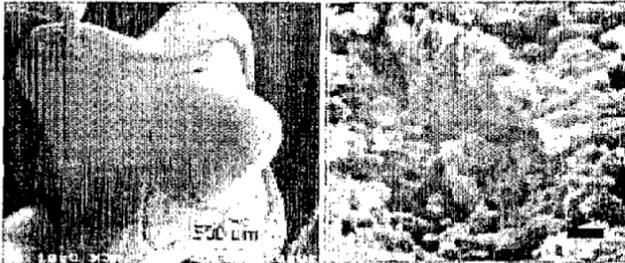


Figura 50

MEB

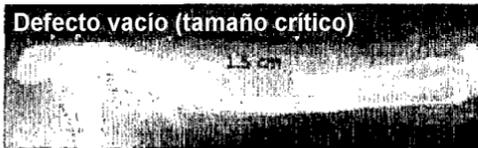


β fosfato tricálcico

+

30 μ g de azúcar en 200 μ l de hidrogel
agua (en exceso de 88 %), glicerol,
carboximetil celulosa sódica

Rayos X



Modelo de defecto de cúbito de conejo

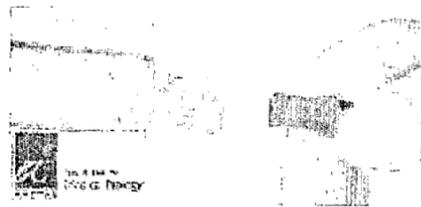


Figura 51

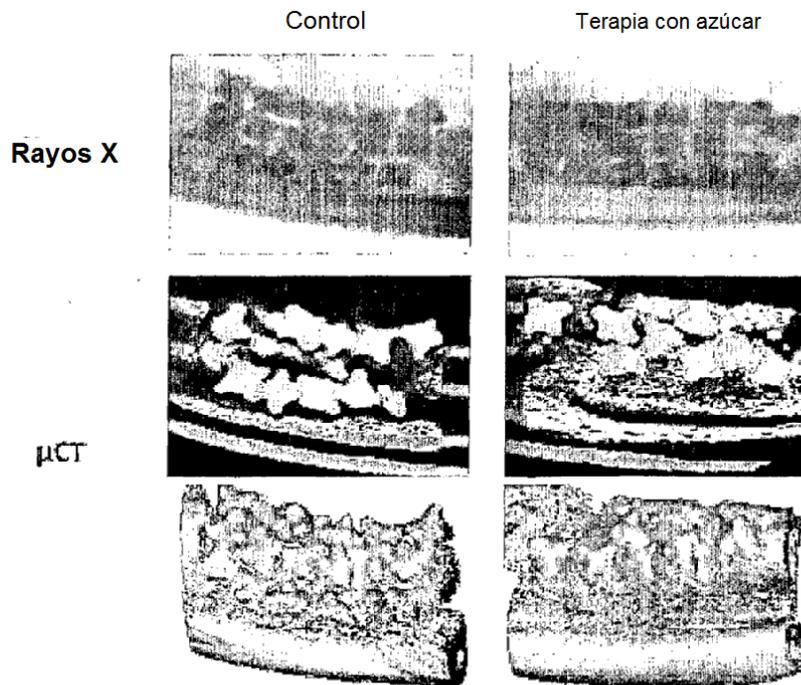


Figura 52

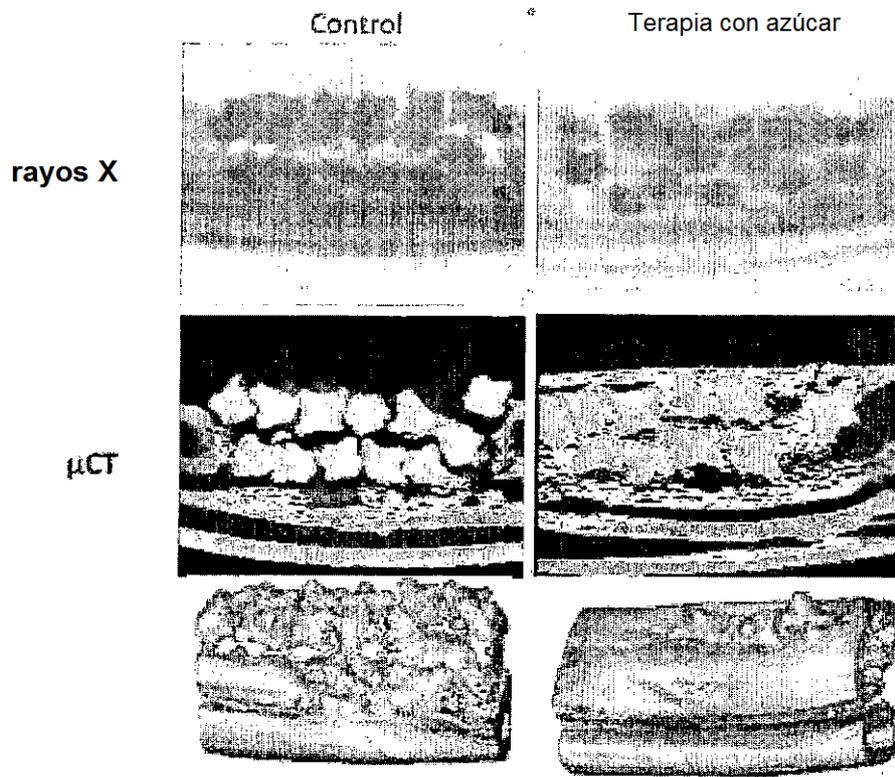
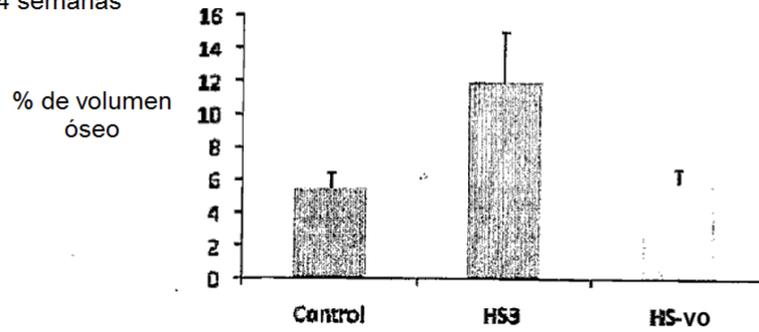


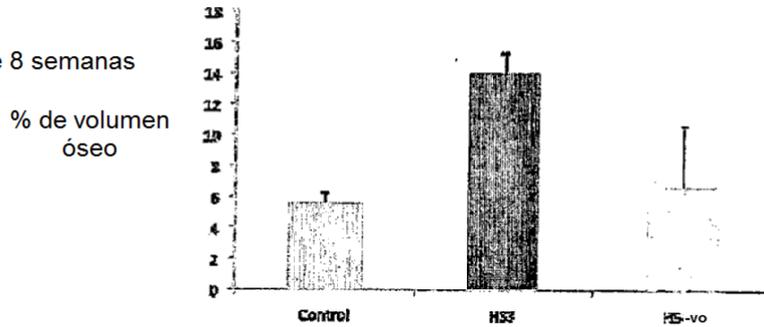
Figura 53

Datos de μ CT de 4 semanas



A

Datos de μ CT de 8 semanas



B

Figura 54

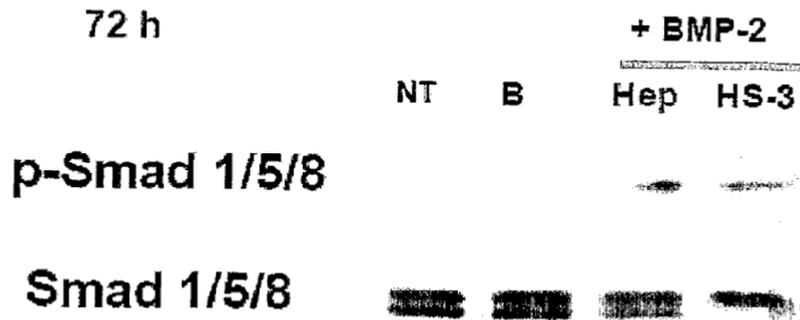


Figura 55

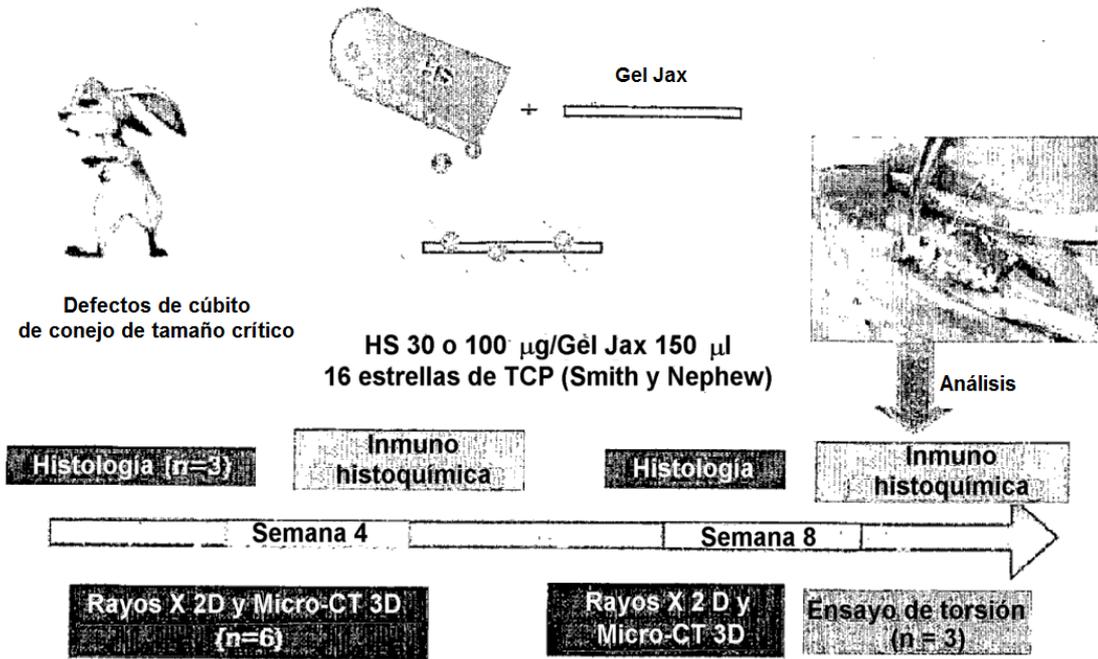


Figura 56

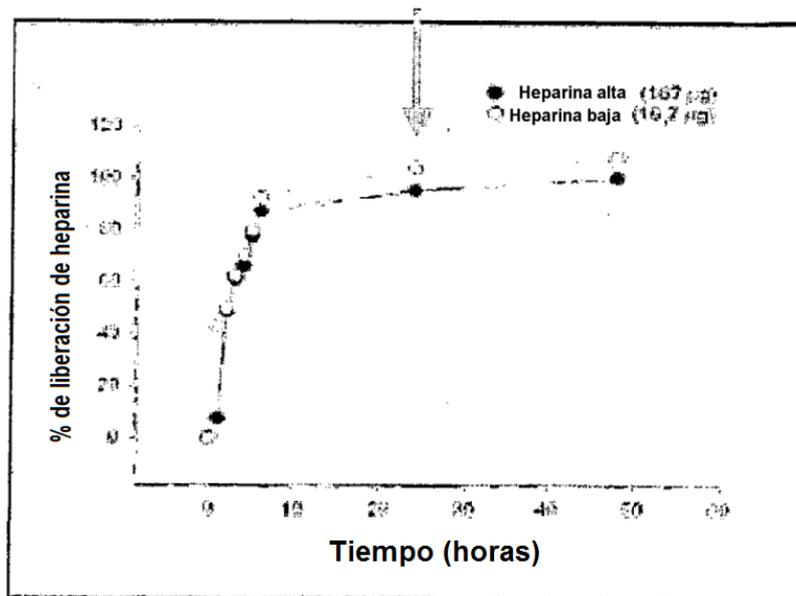


Figura 57

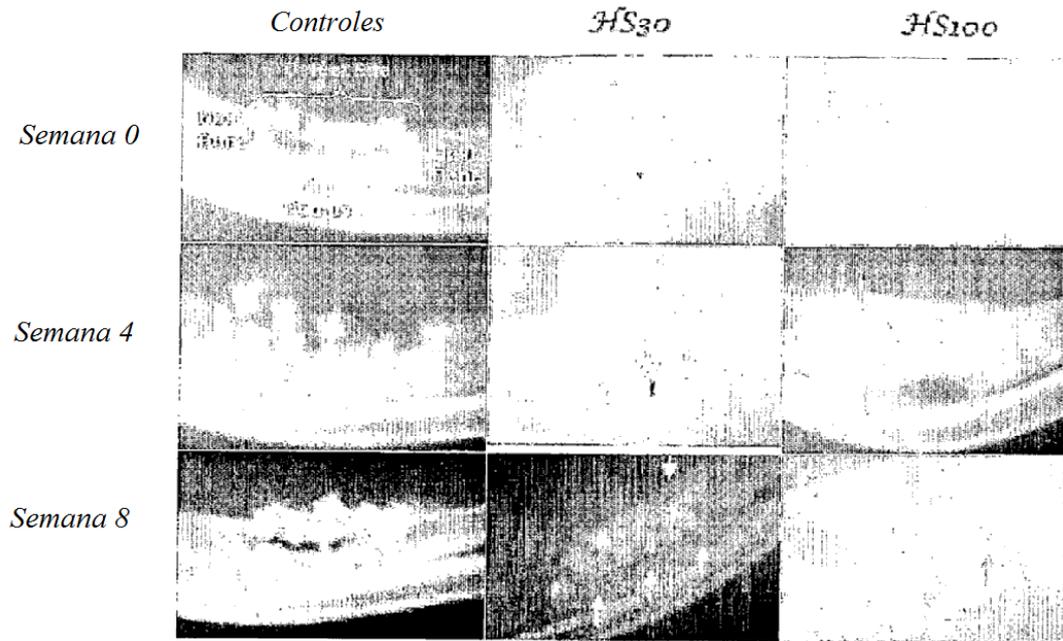


Figura 58

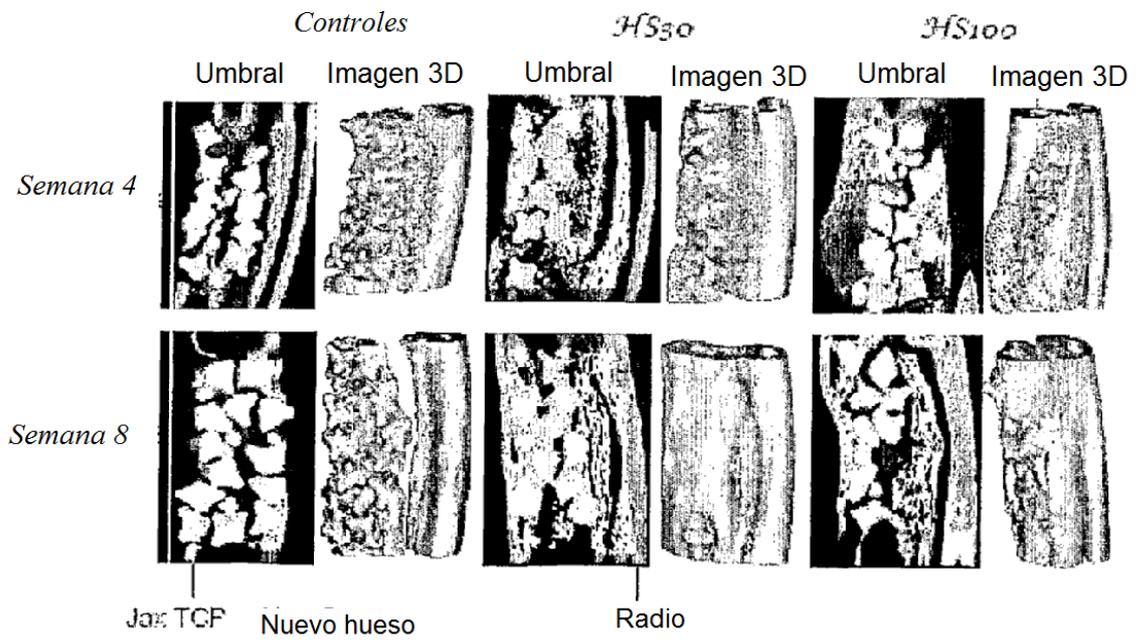


Figura 59

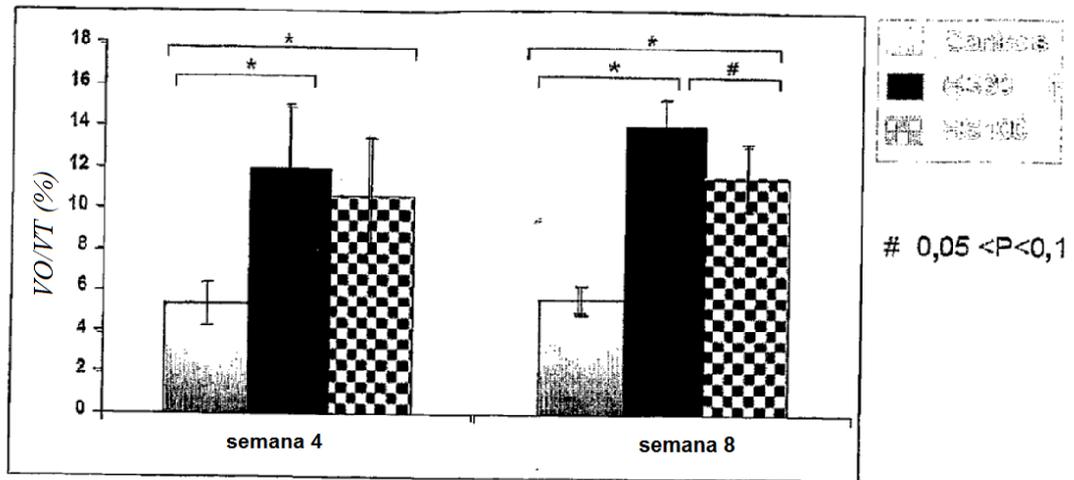
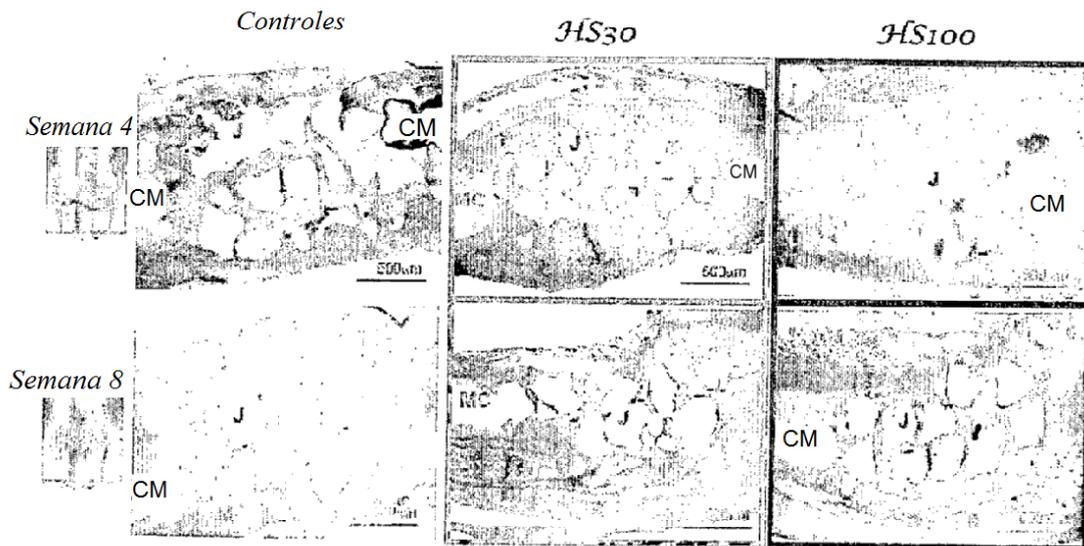


Figura 60



CM: canal medular del cúbito, J: Jax TCP; R: radio, M: músculo

Figura 61

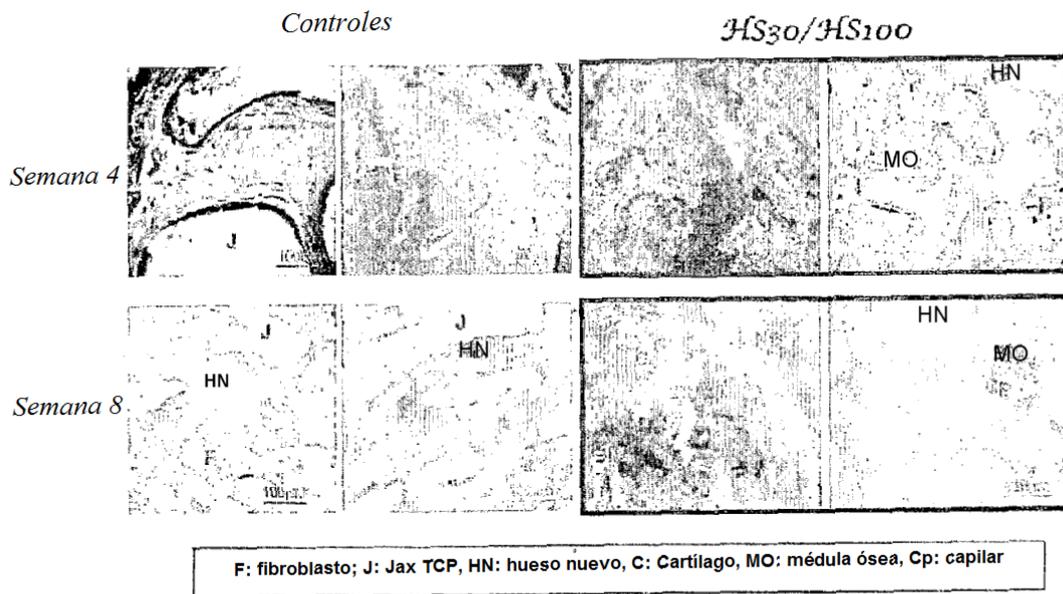


Figura 62

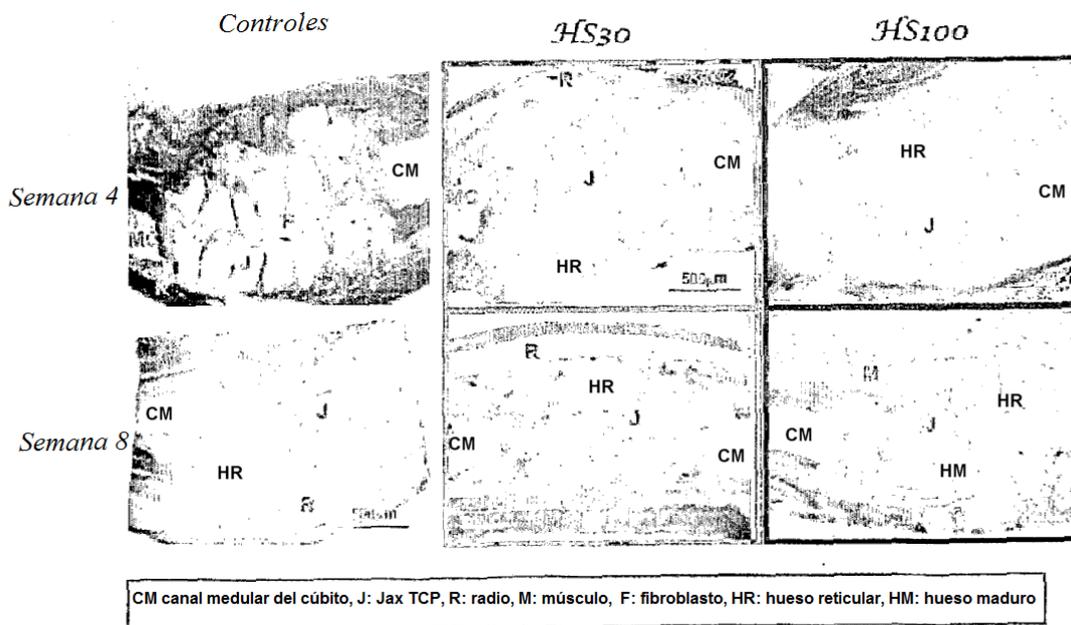


Figura 63

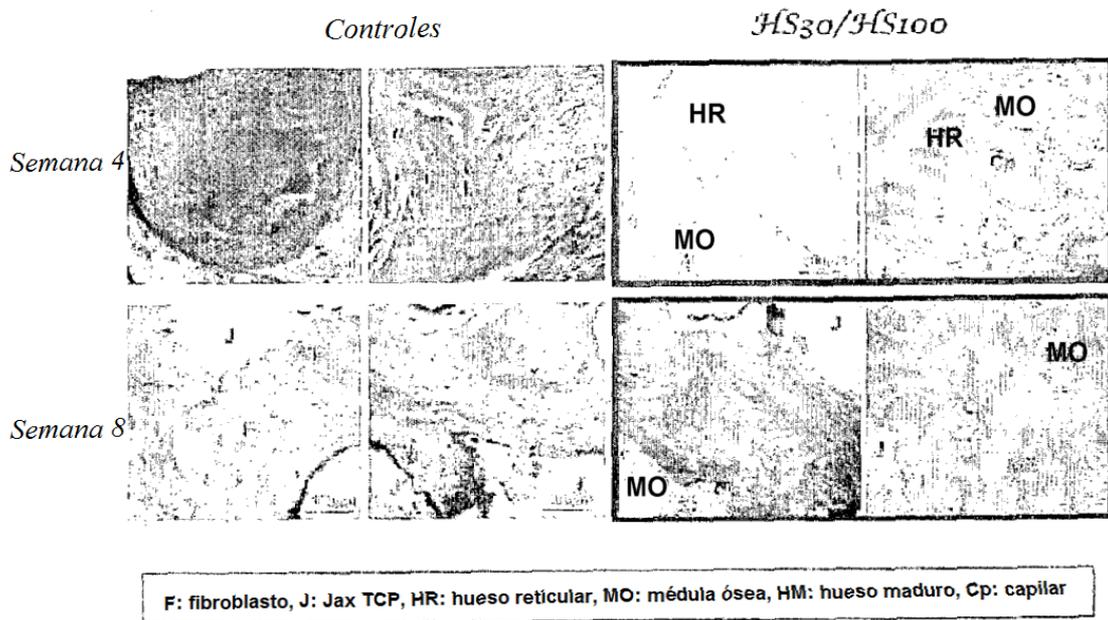


Figura 64

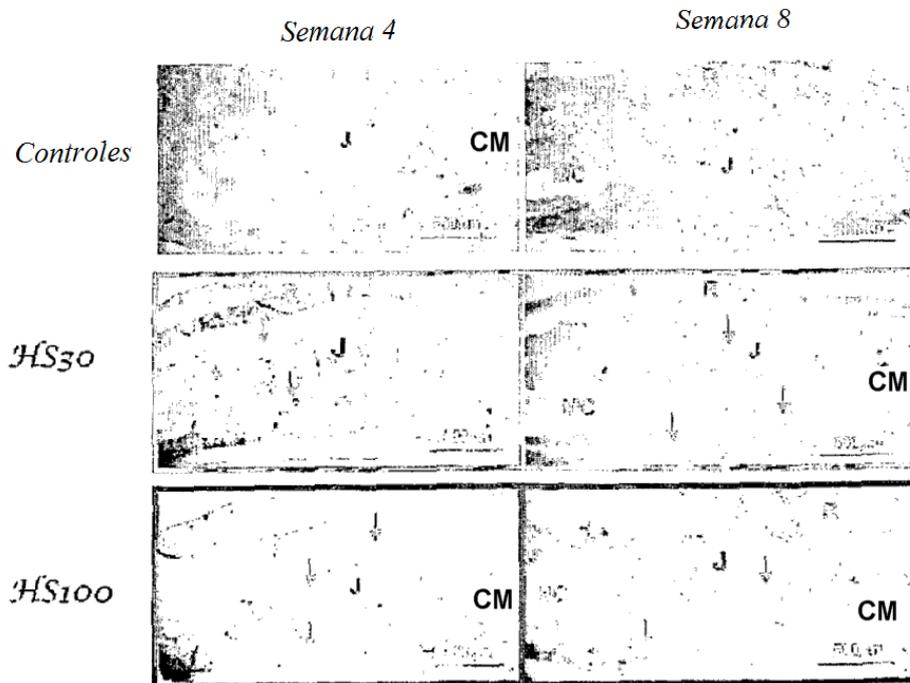


Figura 65

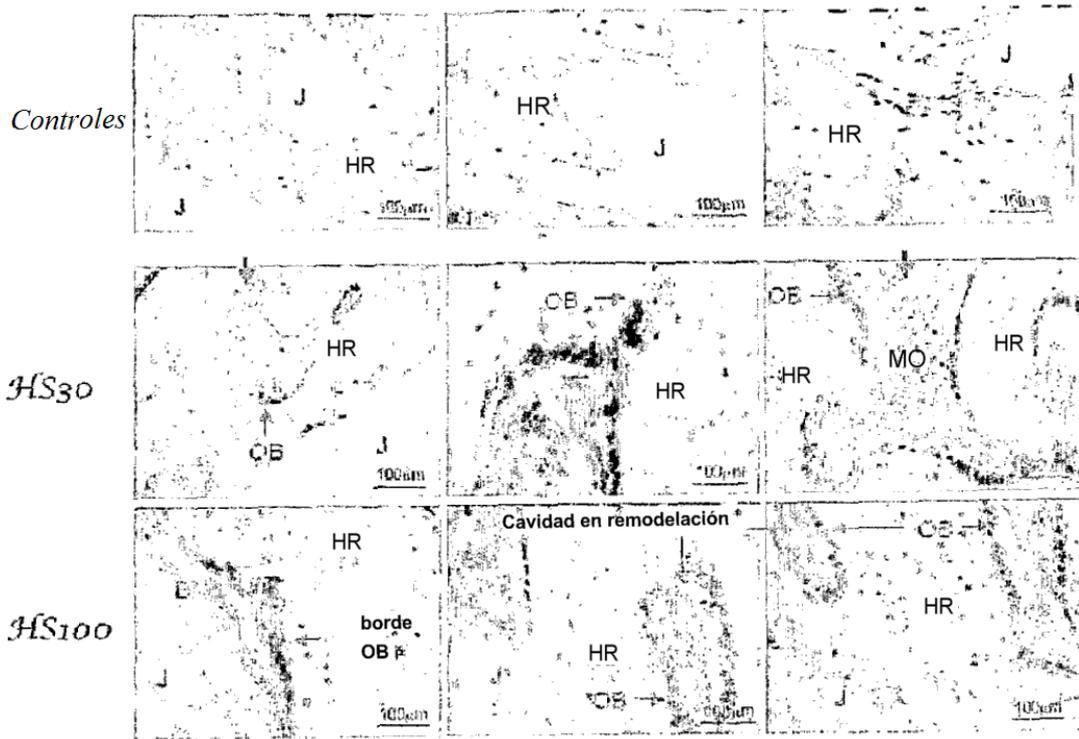


Figura 66

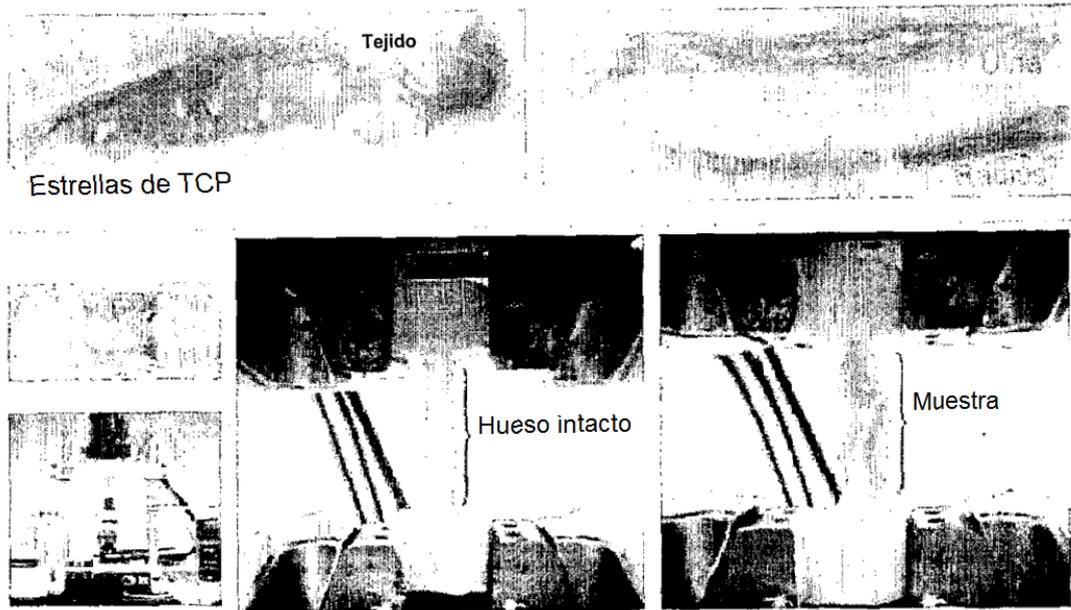


Figura 67

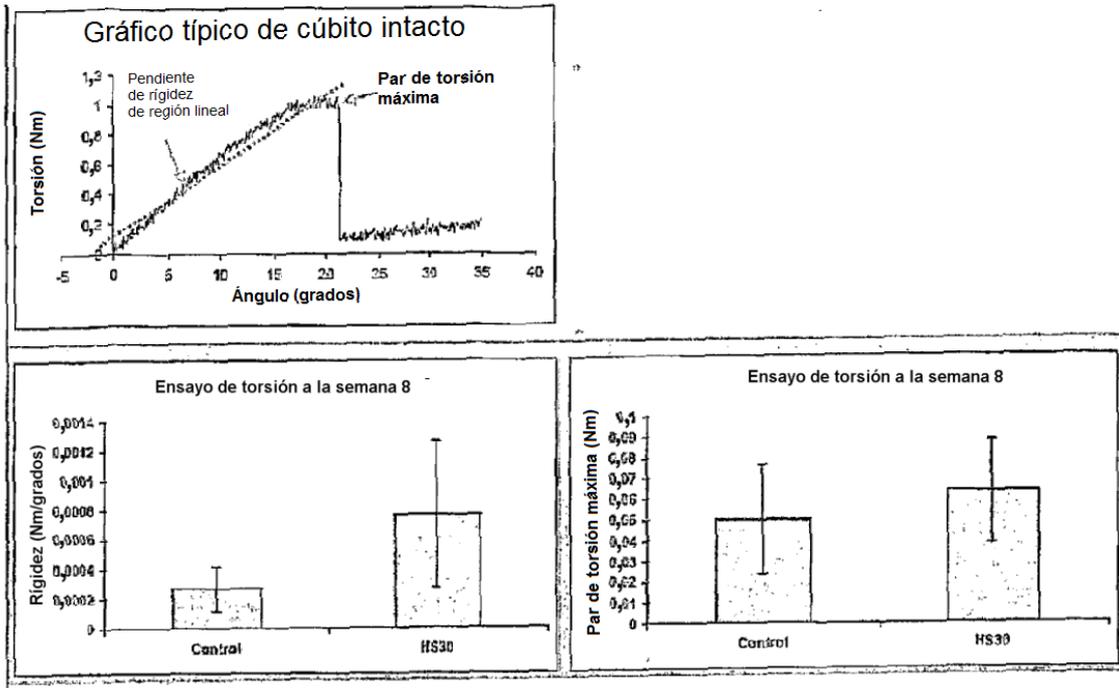


Figura 68

0 semanas

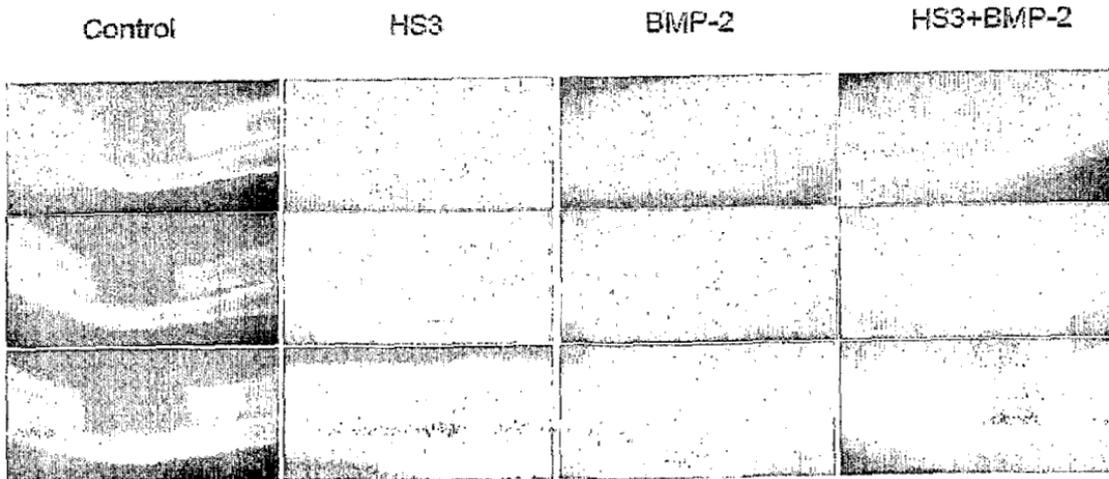


Figura 69

4 semanas

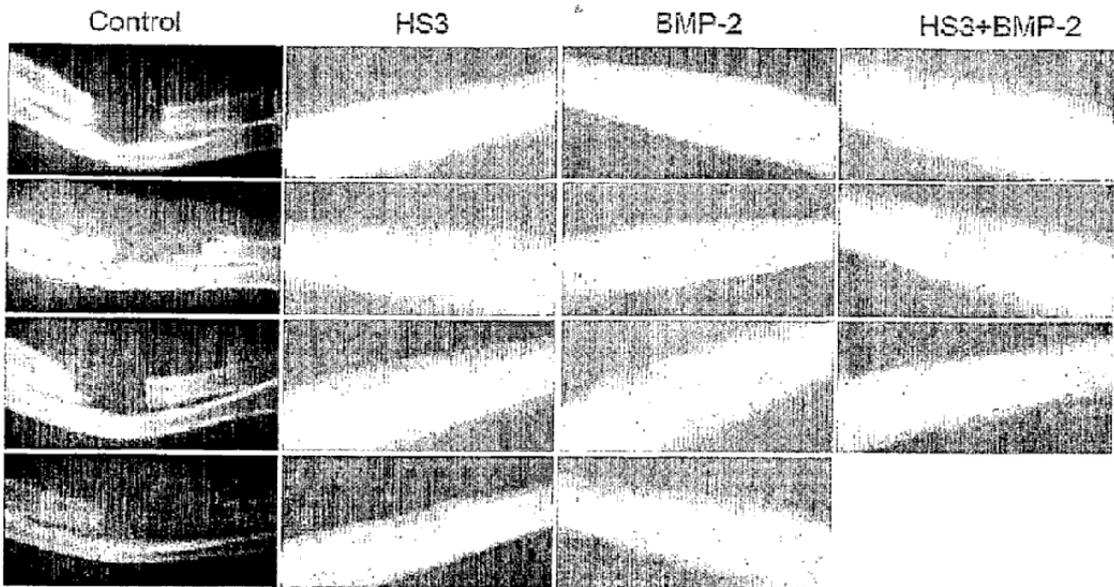


Figura 70

8 semanas

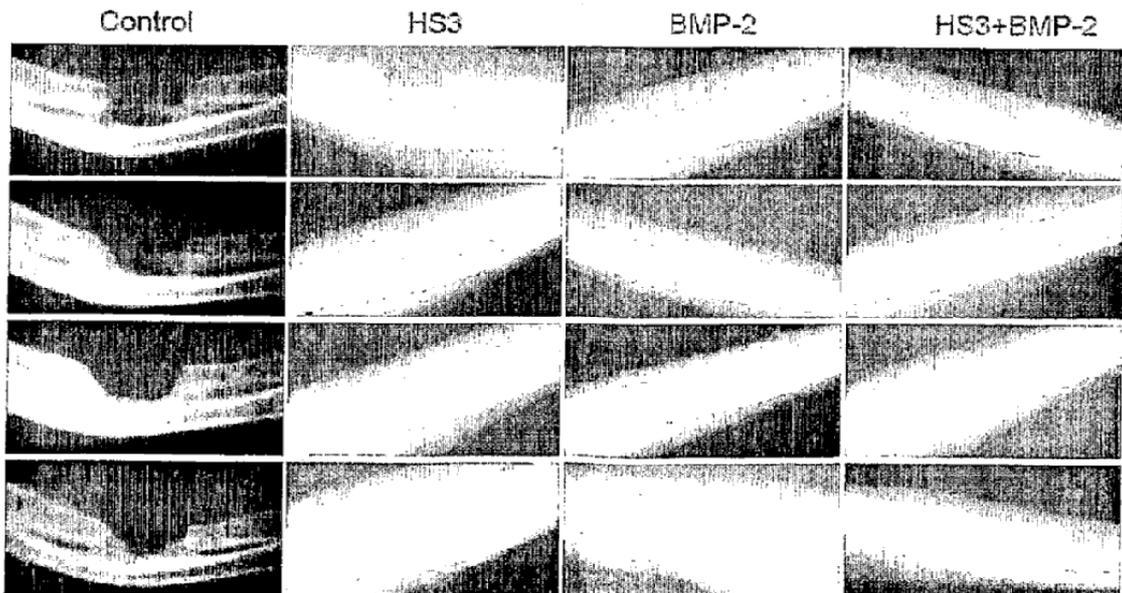


Figura 71

Análisis μ CT de HS3 en colágeno I
(Helliostat)

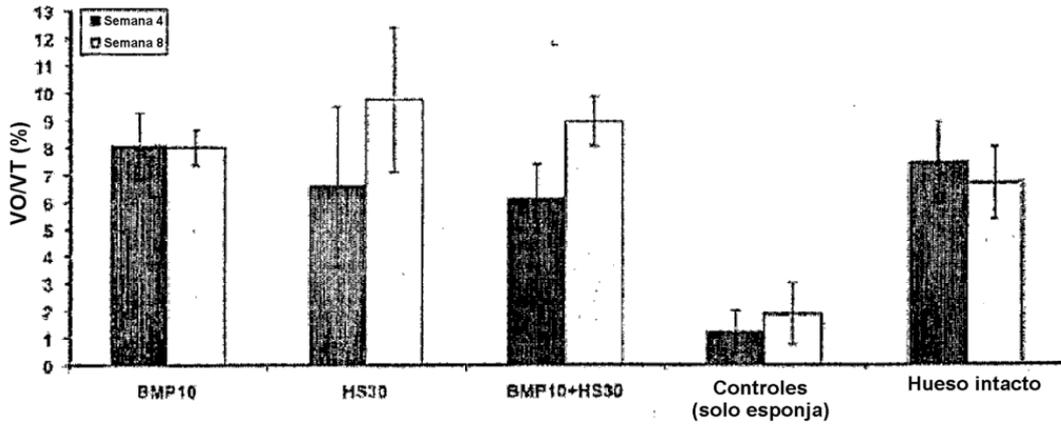


Figura 72

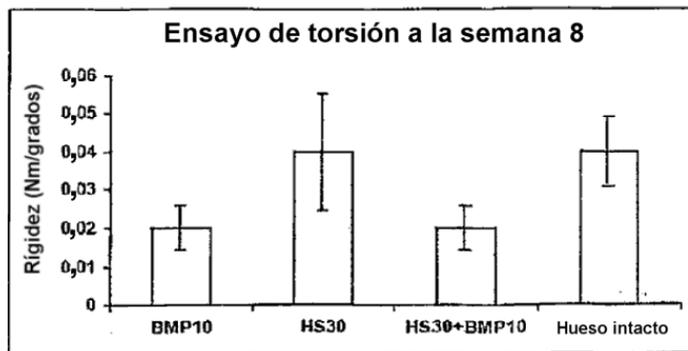
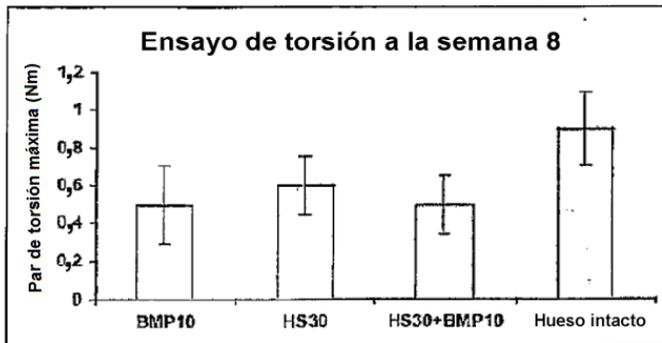


Figura 73

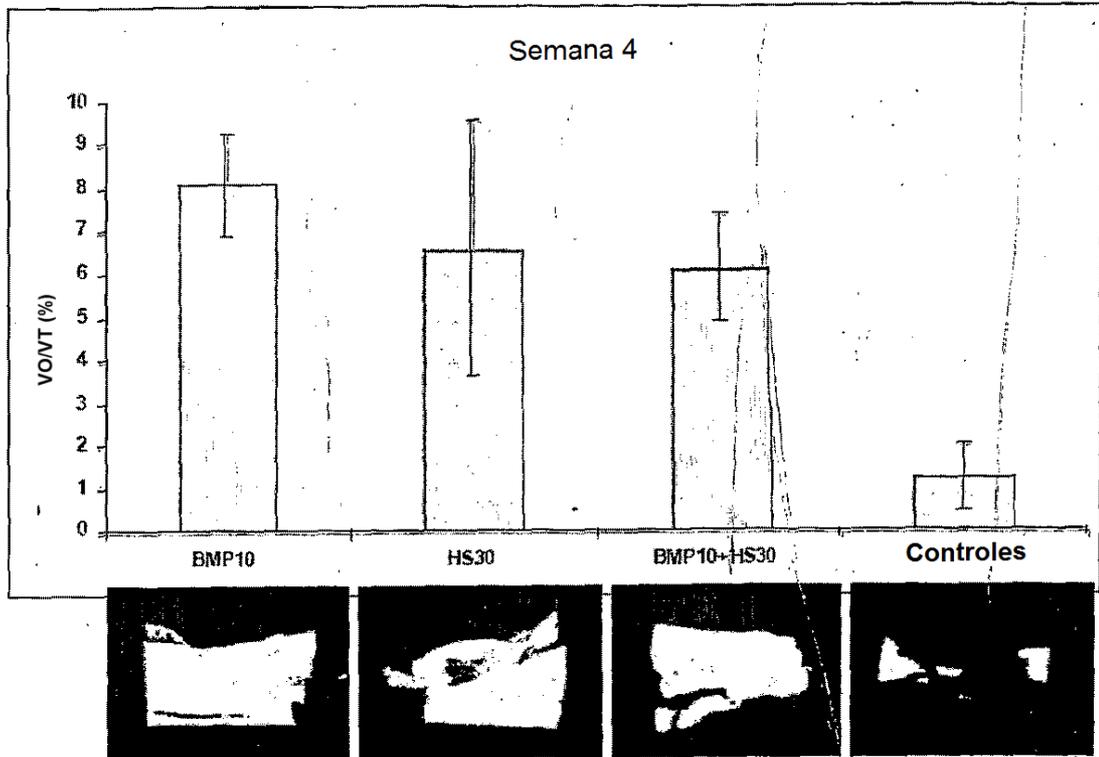


Figura 74

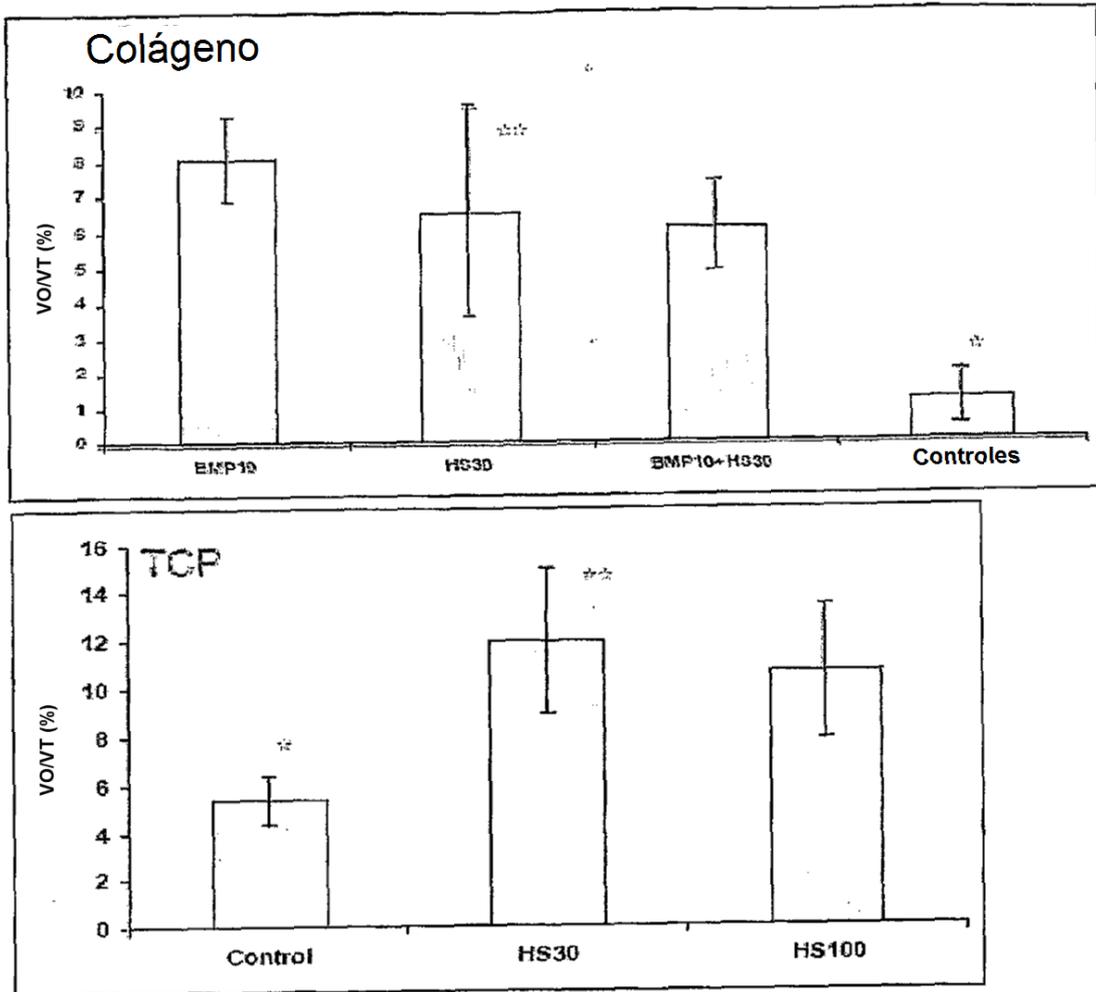


Figura 75