

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 152**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

A61K 31/727 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

C07K 14/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2009 E 09784536 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2334786**

54 Título: **Aislamiento e identificación de glucosaminoglucanos**

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:
26.06.2015

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 2 539 152 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

Aislamiento e identificación de glucosaminoglucanos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al aislamiento e identificación de glucosaminoglucanos capaces de unirse con proteínas que tienen un dominio de unión a heparina, así como al uso de los glucosaminoglucanos aislados en el crecimiento y/o desarrollo de tejido.

10

Antecedentes de la invención

Los glucosaminoglucanos (GAG) son macromoléculas de carbohidratos complejas responsables de realizar y regular un amplio número de funciones celulares esenciales.

15

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

20

Hay un número cada vez mayor de factores de crecimiento de unión a heparina identificados, añadiéndose a los cientos ya conocidos, la mayoría de los cuales se han modificado por cromatografía de afinidad de heparina. Estos incluyen la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) extensiva, los PDGF y las pleiotropinas hasta la superfamilia de citocinas de TGF- β . Esta última familia de factores abarca la subfamilia de proteína morfogenética del hueso (BMP) osteo-inductora, llamada así por su capacidad para inducir la formación de hueso ectópico.

25

La naturaleza y efecto de la interacción de GAG y factores de crecimiento siguen sin estar claros. Aunque se ha mostrado que la interacción entre FGF2 y secuencias de sacáridos particulares halladas dentro de la heparina es de alta afinidad, sigue sin estar claro en general si la asociación entre otros factores de crecimiento y heparán implica una interacción de unión específica o de alta afinidad entre un epítipo de secuencia de aminoácidos en el factor de crecimiento de proteínas y una secuencia de sacárido incluida en el GAG, o si la asociación está mediada por interacciones no específicas, de menor afinidad, entre el GAG y el factor de crecimiento de proteínas.

30

35

Si las interacciones entre GAG y proteínas residentes en, o secretadas a, la matriz extracelular son específicas, es necesario identificar los compañeros de unión para determinar las interacciones y entender cómo pueden usarse estas interacciones o modularse para proporcionar nuevos tratamientos.

40

Una cuestión importante que surge es, por lo tanto, si hay secuencias de sacáridos incluidas en las cadenas de moléculas de GAG que coinciden con secuencias de aminoácidos primarias dentro de la cadena principal polipeptídica de factores de crecimiento controlando de este modo su asociación, y de este modo la bioactividad, con especificidad absoluta, o al menos relativa.

45 **Sumario de la invención**

Se ha ideado un método para responder a esta cuestión que implica enriquecer con respecto a moléculas de glucosaminoglucanos que muestran unión con polipéptidos particulares que tienen un dominio de unión a heparina. Después pueden identificarse moléculas y/o mezclas de GAG aislados y ensayarse con respecto a su capacidad para modular el crecimiento y diferenciación de células y tejidos que expresan una proteína que contiene el dominio de unión a heparina. Por primera vez, esto permite el análisis controlado del efecto de secuencias de sacáridos GAG particulares en el crecimiento y diferenciación de células y tejidos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

50

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para aislar glucosaminoglucanos capaces de unirse con proteínas que tienen un dominio de unión a heparina/heparán en el que el polipéptido es o comprende SEC ID N°: 1, comprendiendo el método:

55

- (i) proporcionar un soporte sólido que tiene moléculas polipeptídicas que son, o comprenden, SEC ID N°: 1 adheridas al soporte, en el que el polipéptido comprende un dominio de unión a heparina;
- (ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprende glucosaminoglucanos de modo que se permita la formación de 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.

60

65

En otro aspecto de la presente invención se identifican glucosaminoglucanos aislados por su capacidad para

modular el crecimiento o diferenciación de células o tejidos. Se proporciona un método para identificar glucosaminoglucanos capaces de estimular o inhibir el crecimiento y/o diferenciación de células y/o tejidos, comprendiendo el método:

- 5 (i) proporcionar un soporte sólido que tiene moléculas polipeptídicas que son, o comprenden, SEC ID N°: 1 adheridas al soporte, en el que el polipéptido comprende un dominio de unión a heparina;
- (ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprende glucosaminoglucanos de modo que se permita la formación de complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
- 10 (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 está presente una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina;
- 15 (vii) medir uno o más de: proliferación de las células, diferenciación de las células, expresión de uno o más marcadores de proteínas.

En realizaciones de la presente invención la mezcla que comprende GAG pueden contener glucosaminoglucanos sintéticos. Sin embargo, en realizaciones preferidas se usan GAG obtenidos de células o tejidos. Por ejemplo, la mezcla puede contener matriz extracelular en la que el material de matriz extracelular se obtiene raspando tejido vivo *in situ* (es decir directamente del tejido en el cuerpo del ser humano o animal del que se obtiene) o raspando tejido (vivo o muerto) que se ha extraído del cuerpo del ser humano o animal. Como alternativa, el material de matriz extracelular puede obtenerse de células que han crecido en cultivo. El material de matriz extracelular puede obtenerse de tejido conectivo o células del tejido conectivo, por ejemplo hueso, cartílago, músculo, grasa, ligamento o tendón.

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

30 Las mezclas de GAG pueden contener una mezcla de diferentes tipos de glucosaminoglucano, que pueden incluir dextrán sulfatos, condroitín sulfatos y heparán sulfatos. En realizaciones preferidas la mezcla de GAG que entra en contacto con el soporte sólido se ha enriquecido con respecto a uno de estos tipos de glucosaminoglucano, más preferentemente con respecto a heparán sulfato. Una fracción de GAG enriquecida con heparán sulfato, condroitín sulfato o dextrán sulfato puede obtenerse realizando cromatografía en columna en la mezcla de GAG, por ejemplo cromatografía de intercambio aniónico débil, medio o fuerte, así como cromatografía líquida de alta presión fuerte (SAX-HPLC), con selección de la fracción apropiada.

40 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 normalmente altamente compleja, y, teniendo en cuenta las técnicas analíticas disponibles en la actualidad, no son posibles en la mayoría de los casos determinaciones exactas de la estructura de secuencia de GAG.

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

50 También puede determinarse el patrón de sulfatación del GAG y usarse para determinar la estructura de GAG. Por ejemplo, para heparán sulfato el patrón de sulfatación en azúcares amino en las posiciones C2, C3 y C6 puede usarse para caracterizar el heparán sulfato.

55 Puede usarse análisis de disacáridos, análisis de tetrasacáridos y análisis de sulfatación junto con otras técnicas analíticas tales como HPLC, espectrometría de masas y RMN que pueden proporcionar cada una espectros únicos para el GAG. En combinación, estas técnicas pueden proporcionar una caracterización estructural definitiva del GAG.

60 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 sacárido específica que contribuye a la interacción de unión de alta afinidad. Una etapa adicional puede comprender la determinación de la secuencia de sacáridos completa o parcial del GAG, o la parte clave del GAG, implicada en la interacción de unión.

65 En una realización los complejos de GAG-polipéptido pueden someterse a tratamiento con un agente que lisa las cadenas de 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 la retirada de la liasa,

por ejemplo después de una etapa de lavado, la molécula de GAG que permanece unida al polipéptido representa el compañero de unión específico ("ligando de GAG") del polipéptido. Debido a la menor complejidad de moléculas de GAG más cortas, después de la disociación y recogida del ligando de GAG, puede esperarse un mayor grado de caracterización estructural del ligando de GAG. Por ejemplo, la combinación de cualquiera de las secuencias de

5 sacáridos (es decir, la secuencia primaria (lineal) de monosacáridos contenida en el ligando de GAG), el patrón de sulfatación, análisis de la digestión de disacáridos y/o tetrasacáridos, espectros de RMN, espectros de espectrometría de masas y espectros de HPLC pueden proporcionar un alto nivel de caracterización estructural del ligando de GAG.

10 Se describe un GAG que tiene alta afinidad de unión por BMP2. Más preferentemente, el GAG es un heparán sulfato (HS). El HS se aisló de una mezcla de GAG obtenida de la matriz extracelular de osteoblastos siguiendo la metodología de la presente invención en la que un polipéptido que comprende el dominio de unión a heparina de BMP2 (SEC ID N°: 1) se unió con un soporte sólido y se permitió que se formaran complejos de GAG-polipéptido. La disociación del componente de GAG de los complejos de GAG-polipéptido condujo al aislamiento de un HS único

15 denominado en el presente documento "HS/BMP2".

En consecuencia, se describe en el presente documento HS/BMP2. HS/BMP2 puede proporcionarse en forma aislada o purificada. Se describen medios de cultivo que comprenden HS/BMP2.

20 En otro aspecto más descrito en el presente documento hay una composición farmacéutica o medicamento que comprende HS/BMP2 opcionalmente en combinación con un vehículo, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas o medicamentos pueden comprender además proteína BMP2. Se describen composiciones farmacéuticas o medicamentos que comprenden HS/BMP2 para su uso en la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad. También se describe el uso de HS/BMP2 en la fabricación de un

25 medicamento para la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad.

En un aspecto adicional descrito en el presente documento, se describe un método para prevenir o tratar lesión o enfermedad en un paciente que necesite tratamiento del mismo, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de HS/BMP2 al paciente. El HS/BMP2 administrado puede formularse en una composición farmacéutica adecuada o medicamento y puede comprender además un vehículo, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición farmacéutica o medicamento también pueden comprender proteína

30 BMP2.

En otro aspecto se describe en el presente documento un método para promover o inhibir la osteogénesis (la formación de células del hueso y/o tejido del hueso) que comprende administrar HS/BMP2 a células precursoras de hueso o células madre de hueso.

35

En otro aspecto se describe en el presente documento un método para promover o inhibir la formación de tejido de cartílago (condrogénesis), que comprende administrar HS/BMP2 a células precursoras de cartílago o células madre de cartílago.

40

Los métodos para estimular o inhibir la osteogénesis o formación de tejido de cartílago pueden realizarse *in vitro* poniendo en contacto células madre o precursoras de hueso o cartílago con HS/BMP2, opcionalmente en presencia de proteína BMP2 añadida de forma 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 implantación en un paciente humano o animal.

45

En consecuencia, como se describe en el presente documento, hay tejido conectivo en el que el tejido conectivo se obtiene por 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 exógeno). El tejido conectivo puede ser hueso, cartílago, músculo, grasa, ligamento o tendón.

50

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

55

En pacientes que tienen un deterioro de uno de estos tejidos, puede usarse la administración de HS/BMP2 al sitio de deterioro 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 de, el 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, posibilitando de este modo el reemplazo/la regeneración del tejido dañado y el tratamiento de la lesión.

60

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

65

Se describe en el presente documento una composición farmacéutica, que contiene células madre, preferentemente células madre mesenquimales, y HS/BMP2. La administración, por ejemplo inyección, de la composición en el sitio de lesión, enfermedad o deterioro posibilita la regeneración de tejido en el sitio.

- 5 En consecuencia, HS/BMP2 es útil en la curación de heridas *in vivo*, incluyendo reparación, regeneración y/o reemplazo tisular (por ejemplo curación de tejido cicatricial o un hueso roto) efectuada por la aplicación directa de HS/BMP2, opcionalmente en combinación con BMP2 y/o células madre, al paciente que requiere tratamiento. HS/BMP2 también es útil en la generación *in vitro* de tejido adecuado para implantación en un paciente que necesite reparación, regeneración y/o reemplazo tisular.

10

Descripción de realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a GAG, y especialmente a métodos para enriquecer mezclas de compuestos que contienen uno o más GAG que se unen con un polipéptido que corresponde al dominio de unión a heparina de una proteína que se une con heparina/heparán (un "factor de unión a heparina"). El enriquecimiento conduce al aislamiento de GAG, bien como una mezcla que contiene diferentes GAG o una población de GAG que son estructural o funcionalmente idénticos (o sustancialmente idénticos). La mezcla enriquecida preferentemente tiene un efecto de modulación en el factor de unión a heparina.

15

- 20 Se describen en el presente documento mezclas de compuestos enriquecidas con uno o más GAG que poseen un efecto modulador en un factor de unión a heparina/heparán, y métodos para usar dichas mezclas.

Se describen en el presente documento moléculas de GAG que potencian (por ejemplo agonizan) la actividad de BMP-2 y por lo tanto su capacidad para estimular la proliferación de células madre y la formación del hueso.

25

Como se usa en el presente documento, los términos "enriquecer", "enriquecimiento", "enriquecido", etc. describen un proceso (o estado) por el que la composición relativa de la mezcla se altera (o se ha alterado) de tal manera que la fracción de esa mezcla dada por una o más de esas entidades aumente, mientras que la fracción de esa mezcla dada por una o más entidades diferentes se reduzca.

30

Los GAG aislados por enriquecimiento pueden ser puros, es decir contener sustancialmente solamente 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 con el dominio de unión a heparina en relación con la mezcla de partida.

35

Los GAG identificados por la presente invención son preferentemente GAG que muestran un efecto funcional cuando se ponen en contacto con células o tejidos en los que se expresa o está contenida una proteína que contiene el dominio de unión a heparina. El efecto funcional puede ser un efecto modulador o potenciador.

40

El efecto funcional puede ser para promover (estimular) o inhibir la proliferación de las células de un cierto tipo o la diferenciación de un tipo celular a otro, o la expresión de uno o más marcadores proteicos. 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 celulares especializados (por ejemplo, células madre mesenquimales en tejido conectivo), promover o inhibir la expresión de marcadores proteicos indicativos de la multipotencia o estado de diferenciación de las células (por ejemplo marcadores tales como actividad de fosfatasa alcalina, detección de RUNX2, osterix, colágeno I, II, IV, VII, X, osteopontina, osteocalcina, BSP11, SOX9, Aggrecano, ALBP, CCAAT/proteína de unión a potenciador- α (C/EBP α) proteína de unión a lípidos de adipocitos (ALBP), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína del hueso 2 (BSP11), Colágeno2a1 (Coll2a) y SOX9).

45

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

55

El efecto modulador puede ser un efecto potenciador. Se entiende que la expresión "efecto potenciador" 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 en una segunda entidad, aumentando dicho efecto la potencia de esa segunda entidad en otro proceso o procesos. En una realización preferida adicional de la presente invención, se entiende que el efecto potenciador significa el efecto de GAG aislados en un factor de unión a heparina, en el que dicho efecto aumenta la potencia de dicho factor de unión a heparina.

60

El efecto potenciador puede ser un aumento en la biodisponibilidad del factor de unión a heparina. El efecto potenciador puede ser un aumento en la biodisponibilidad de BMP2. Un método para medir un aumento en la biodisponibilidad del factor de unión a heparina es mediante la determinación de un aumento en la concentración local del factor de unión a heparina.

65

El efecto potenciador puede ser proteger el factor de unión a heparina de la degradación. El efecto potenciador

puede ser proteger BMP-2 de la degradación. Un método para determinar una reducción en la degradación del factor de unión a heparina es mediante la medición de un aumento en la semivida del factor de unión a heparina.

5 El efecto potenciador puede ser secuestrar factores de unión a heparina lejos de los receptores celulares. El efecto potenciador puede ser estabilizar la interacción del ligando-receptor.

10 El efecto potenciador (por ejemplo modulación del crecimiento o diferenciación) puede determinarse mediante el uso de ensayos apropiados. Por ejemplo, el efecto que tiene un HS en la estabilidad de BMP-2 puede determinarse por ELISA. El efecto que tiene un HS en 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 alizarin y von Kossa.

15 Como se usa en el presente documento, el proceso de "poner en contacto" implica aproximar físicamente de forma estrecha dos o más entidades discretas. El proceso de "poner en contacto" implica aproximar de forma estrecha dos o más entidades discretas durante un tiempo, y en condiciones, suficientes para permitir que una parte de esas dos o más entidades discretas interaccionen a un nivel molecular. Preferentemente, como se usa en el presente documento, el proceso de "poner en contacto" implica aproximar de forma estrecha la mezcla de compuestos que poseen 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 el polipéptido es suficiente para que se formen complejos, que pueden ser covalentes pero son preferentemente no covalentes, entre GAG y polipéptidos que muestran alta afinidad entre sí.

25 El polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos primaria de longitud completa o longitud casi completa de una proteína seleccionada que tiene un dominio de unión a heparina. Debido al plegamiento que puede producirse en polipéptidos más largos que conduce al posible enmascaramiento 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 opcionalmente incluyendo uno o más aminoácidos en uno o cada uno de los extremos N y C terminales de los péptidos. Estos péptidos adicionales pueden permitir la adición de moléculas enlazadoras o de unión al polipéptido que se requieren para unir el polipéptido con el soporte sólido.

30 En realizaciones preferidas, 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 %.

35 Para adherir polipéptidos a la superficie de un soporte sólido los polipéptidos se modifican preferentemente para incluir un marcador molecular, y la superficie del soporte sólido se modifica para incorporar una sonda molecular correspondiente que tenga alta afinidad por el marcador molecular, es decir el marcador molecular y la sonda forman un par de unión. En realizaciones preferidas el marcador y/o la sonda se seleccionan de uno cualquiera de: un anticuerpo, un receptor celular, un ligando, biotina, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otra estructura para cuya unión o asociación de otro modo con especificidad pueda diseñarse o configurarse una sonda. Un par de unión preferido adecuado para su uso como
45 marcador y sonda es biotina y avidina.

50 El polipéptido deriva preferentemente de una proteína de interés. Por "deriva de" se entiende que el polipéptido se elige, se selecciona o se prepara porque contiene la secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a heparina que está presente en una proteína de interés. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina puede modificarse de la que aparece en la proteína de interés, por ejemplo para investigar el efecto de cambios en la secuencia de dominio de unión a heparina en la unión con GAG.

55 La proteína de interés puede ser cualquier proteína que se una con heparina, y por lo tanto tiene un dominio de unión a heparina. Las proteínas preferidas incluyen las expresadas en la matriz extracelular, en particular en la matriz extracelular de tejido conectivo (por ejemplo hueso, cartílago, músculo, tendones, ligamentos, grasa).

Se exponen a continuación proteínas preferidas y sus dominios de unión a heparina:

| Proteína | Secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina | SEC ID N° |
|----------|--|-----------|
| BMP2 | QAKHKQRKRLKSSCKRHP | 1 |
| BMP4 | SPKHHSQRARKKNKNCRRH | 2 |
| FGF2 | TYRSRKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPGQK | 3 |

| Proteína | Secuencia de aminoácidos del dominio de unión a heparina | SEC ID N° |
|--------------|--|-----------|
| SHH | GKRRHPKCLTPLAYKQ | 4 |
| VEGF 189 | KCECRPKKDRARQEK <u>KSVRGKGGKQKRKRKKSRYKSW</u> S | 5 |
| FGFR1 | APYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVK | 6 |
| VITRONECTINA | RPSLAKKQRFRRHRNRKGYRSQRGHSRGRNQNSRR | 7 |
| PDGF B | RVRRPPKGGKHKFKHHTH | 8 |
| HB-EGF | HGKRKKKGGKGLGKKRDPCLRKYK | 9 |
| FGFR3 | APYWTRPERMDKKLLAVPAANTVR | 10 |
| FIBRONECTINA | TLENVSPRRARV | 11 |
| LAMININA | RYVVLPRPVCFEKGMNYTVR | 12 |
| N-CAM | IWKHKGRDVILKDVRFI | 13 |

Los expertos en la materia entienden que variaciones pequeñas en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido particular pueden permitir que se mantenga la funcionalidad inherente de esa parte. También se entiende que la sustitución de ciertos restos de aminoácidos dentro de un péptido con otros restos de aminoácidos que son isostéricos y/o isoelectrónicos puede mantener o mejorar ciertas propiedades del péptido no sustituido. Estas variaciones también están abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el aminoácido alanina puede en ocasiones sustituir al aminoácido glicina (y viceversa) manteniendo 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 restos que son isostéricos a temperaturas moderadamente elevadas son los grupos de isopropilo 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 de la misma pKa, o una similar.

En realizaciones de la presente invención, 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 con la que puedan unirse las moléculas, directa o indirectamente, mediante enlaces covalentes o no covalentes. El soporte sólido puede incluir cualquier material de sustrato que sea capaz de proporcionar soporte físico para las sondas que se unen con la superficie. Puede ser un soporte de matriz. El material es capaz en general de soportar condiciones relacionadas con la unión de las sondas con la superficie y cualquier tratamiento, manipulación o procesamiento posterior encontrado durante la realización de un ensayo. Los materiales pueden ser de origen natural, sintéticos o una modificación de un material de origen natural. El soporte sólido puede ser un material plástico (incluyendo polímeros, tales como, por ejemplo, poli(vinil cloruro), copolímeros de ciclo-olefina, poliacrilamida, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(etilen tereftalato), politetrafluoroetileno (PTFE o Teflon[®]), nylon, poli(vinil butirato)), etc., bien usados por sí solos o junto con otros materiales. Pueden considerarse materiales rígidos adicionales, tales como vidrio, que incluye sílice e incluye además, por ejemplo, vidrio que está 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 sea capaz de tener uno o más grupos funcionales, tales como cualquiera de un grupo funcional amino, carboxilo, tiol o hidroxilo, por ejemplo, incorporado en su superficie.

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 por perlas empaquetadas en el espacio central de la columna.

El polipéptido puede inmovilizarse en el soporte sólido. Los ejemplos de métodos de inmovilización abarcados dentro del alcance de la presente invención incluyen: adsorción, unión covalente, atrapamiento y confinamiento en membrana. 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 convenientemente inerte para cromatografía de intercambio iónico. En una realización preferida, el polipéptido está unido con la superficie del soporte sólido. Se entiende que un experto en la materia tendría una gran serie de opciones para elegir para unir química y/o físicamente dos entidades entre sí. Estas opciones están abarcadas todas dentro del alcance de la presente invención. En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido se adsorbe en un soporte sólido mediante la interacción de biotina con estreptavidina. En un ejemplo representativo de esta realización particular, una molécula de biotina se une covalentemente con el polipéptido, tras lo cual el conjugado de biotina-polipéptido se une con estreptavidina, que a su vez se ha unido covalentemente con un soporte sólido. En otra realización de la presente invención, puede

usarse un resto espaciador o enlazador para conectar la molécula de biotina con el polipéptido, y/o la estreptavidina con la matriz.

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

10 En la presente invención, se entiende que ciertos oligosacáridos pueden interactuar de una manera no específica con el polipéptido. En ciertas realizaciones, el oligosacárido que interactúa con el polipéptido de una manera no específica puede incluirse en, 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 no específica es el confinamiento temporal dentro de un bolsillo de una molécula de tamaño y/o forma adecuados. Además se entiende que estos oligosacáridos pueden eluir más lentamente que los oligosacáridos que no presentan interacción con el péptido en absoluto. Además se entiende que los compuestos que se unen de forma no específica pueden no requerir el aporte del mismo estímulo externo para hacerlos eluir que para los compuestos que se unen de una manera específica (por ejemplo mediante una interacción iónica). La presente invención es capaz de separar una mezcla de oligosacáridos en los componentes de esa mezcla que: se unen de una manera específica con el polipéptido; los que se unen de una manera no específica con el polipéptido; y los que no se unen con el polipéptido. Estas designaciones se definen de forma operativa para cada par de péptido-GAG.

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

30 Pueden obtenerse en consecuencia GAG que tengan una alta afinidad de unión por una proteína de interés y/o el dominio de unión a heparina de la proteína de interés. La afinidad de unión (K_d) puede elegirse entre 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.

Los GAG obtenidos por los métodos de la invención pueden ser útiles en una serie de aplicaciones, *in vitro* y/o *in vivo*. Los GAG pueden proporcionarse para su uso en estimulación o inhibición del crecimiento celular o tisular y/o proliferación y/o diferenciación bien en cultivo celular o bien en tisular *in vitro*, o en células o tejido *in vivo*.

35 Los GAG pueden proporcionarse como una formulación para dichos fines. Por ejemplo, pueden proporcionarse medios de cultivo que comprenden un GAG obtenido por el método de la presente invención.

40 Las células o tejidos obtenidos de cultivo celular o tisular *in vitro* en presencia de GAG obtenidos por el método de la presente invención pueden recogerse e implantarse en un paciente humano o animal que necesite tratamiento. Se puede proporcionar por lo tanto un método de implantación de células y/o tejidos, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) cultivar células y/o tejidos *in vitro* en contacto con GAG obtenidos por el método de la presente invención;
- (b) recoger las células y/o tejidos;
- 45 (c) implantar las células y/o tejidos en un sujeto humano o animal que necesite tratamiento.

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

Como se describe en el presente documento, los GAG pueden formularse para su uso en un método de tratamiento médico, incluyendo la prevención o tratamiento de lesión o de enfermedad. Puede proporcionarse una composición farmacéutica o medicamento que comprende los GAG y un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas o medicamentos puede proporcionarse para la prevención o el tratamiento de lesión o enfermedad. También se proporciona el uso de un GAG obtenido por el método de la presente invención en la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedad o lesión. Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de acuerdo con la presente invención también pueden contener la proteína de interés que tiene el dominio de unión a heparina con el que se une el GAG. En realizaciones adicionales las composiciones farmacéuticas y medicamentos pueden comprender además células madre, por ejemplo células madre mesenquimales.

65 El tratamiento de lesión o enfermedad puede comprender la reparación, la regeneración o el 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 medicamento que comprende el GAG puede administrarse directamente al sitio de lesión o enfermedad para estimular el crecimiento, la proliferación y/o la diferenciación de nuevo tejido para efectuar una reparación de la lesión o para curar o aliviar (por ejemplo proporcionar alivio a los

síntomas de) la afección de enfermedad. La reparación o regeneración del tejido puede mejorarse combinando células madre en la composición farmacéutica o medicamento.

Para el reemplazo de tejido, pueden ponerse en contacto GAG con células y/o tejido durante el cultivo *in vitro* de las células y/o el tejido para generar células y/o tejido para implantación en el sitio de lesión o enfermedad en el paciente. Puede usarse la implantación de células o tejido para efectuar una reparación del tejido lesionado o enfermo en el paciente mediante reemplazo del tejido lesionado o enfermo. Esto puede implicar la escisión de tejido lesionado/enfermo e implantación de nuevo tejido preparado por cultivo de células y/o tejido en contacto con un GAG obtenido por el método de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas y medicamentos de acuerdo con la presente invención pueden comprender por lo tanto uno de:

- (a) GAG obtenidos por el método de la invención;
- (b) GAG obtenidos por el método de la invención en combinación con células madre;
- (c) GAG obtenidos por el método de la invención en combinación con una proteína que contiene el dominio de unión a heparina unido con el GAG;
- (d) GAG obtenidos por el método de la invención en combinación con células madre y una proteína que contiene el dominio de unión a heparina unido con el GAG;
- (e) tejidos o células obtenidos de cultivo de células o tejidos en contacto con GAG obtenidos por el método de la invención.

Pueden usarse GAG aislados de acuerdo con el método de la presente invención en la reparación o regeneración de tejido corporal, especialmente regeneración de hueso, regeneración neural, construcción de tejido esquelético, la reparación de lesiones cardiovasculares y la expansión y autorrenovación de células madre embrionarias y de adultos. En consecuencia, los GAG pueden usarse para prevenir o tratar una amplia serie de enfermedades y lesiones, incluyendo osteoartritis, reemplazo de cartílagos, huesos rotos de cualquier tipo (por ejemplo tratamientos de fusión de disco intervertebral, roturas de huesos largos, defectos craneales), regeneración de defectos de hueso críticos o no de unión.

El uso de GAG descrito en el presente documento en la reparación, regeneración o reemplazo de tejido puede implicar el uso en curación de heridas, por ejemplo aceleración de la curación de heridas, curación de tejido cicatricial o de hueso e injerto tisular.

En otro aspecto se describe en el presente documento un armazón biológico que comprende GAG aislados por el método de la presente invención. En algunas realizaciones, los armazones biológicos de la presente invención pueden usarse en aplicaciones ortopédicas, vasculares, prostéticas, cutáneas y corneanas. Los armazones biológicos proporcionados por la presente invención incluyen dispositivos de suministro de fármaco de liberación prolongada, válvulas tisulares, laminillas de válvulas tisulares, estents de elución de fármacos, injertos vasculares, injertos de curación de heridas o cutáneos y prótesis ortopédicas tales como hueso, ligamento, tendón, cartílago y músculo. En una realización preferida de la presente invención, el armazón biológico es un catéter en el que la superficie interna (y/o externa) comprende uno o más compuestos de GAG unidos al catéter.

En otro aspecto, se describen en el presente documento uno o más GAG aislados por el método de la presente invención para su uso como un adyuvante. El adyuvante puede ser un adyuvante inmunitario.

En otro aspecto, se describen formulaciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una mezcla de compuestos que comprenden uno o más GAG, enriqueciéndose dicha mezcla con respecto a GAG que modulan un factor de unión a heparina. En otro aspecto, se describen en el presente documento formulaciones farmacéuticamente aceptables que comprenden:

- (i) una mezcla de compuestos que comprenden uno o más GAG, enriqueciéndose dicha mezcla con respecto a GAG que modulan un factor de unión a heparina; y
- (ii) el factor de unión a heparina,

para administración separada, simultánea o secuencial. En una realización preferida la formulación comprende la mezcla de compuestos que comprenden uno o más GAG, enriqueciéndose dicha mezcla con respecto a GAG que modulan un factor de unión a heparina y el factor de unión a heparina en mezcla íntima, y se administra de forma simultánea a un paciente que necesite tratamiento. En una realización adicional de la invención, la formulación comprende la mezcla de compuestos que comprende uno o más GAG, enriqueciéndose dicha mezcla con respecto a GAG que modulan BMP-2 y BMP-2 en mezcla íntima, y se administra simultáneamente a un paciente que necesite tratamiento.

En otro aspecto se describe un kit para su uso en la reparación, o regeneración de tejido, comprendiendo dicho kit (i) una cantidad predeterminada de un GAG que tiene alta afinidad por una proteína que tiene un dominio de unión a heparina, y (ii) una cantidad predeterminada de la proteína que tiene dicho dominio de unión a heparina.

En realizaciones preferidas el GAG es HS/BMP2 y la proteína que tiene el dominio de unión a heparina es BMP2.

Los compuestos de las mezclas enriquecidas 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, amonio y alquilamonio. Se describen en el presente documento sales catiónicas, por ejemplo las sales sódicas o potásicas.

Se apreciará que los compuestos de las mezclas enriquecidas que portan un grupo de ácido carboxílico pueden suministrarse en forma de un profármaco administrable, en el que el resto ácido está esterificado (para tener la forma CO₂R'). El término "profármaco" se refiere específicamente a la conversión del grupo -OR' a un grupo -OH, o un anión carboxilato del mismo, *in vivo*. En consecuencia, los profármacos de la presente invención pueden actuar para potenciar la adsorción de fármaco y/o el suministro de fármaco a 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 hidrólisis de éster *in vivo*.

Pueden formularse medicamentos y composiciones farmacéuticas para administración por varias vías, incluyendo pero sin limitación, inyección en el sitio de enfermedad o lesión. Los medicamentos y composiciones pueden formularse en forma fluida o sólida. Pueden formularse formulaciones fluidas para administración por inyección a una región seleccionada del cuerpo humano o animal.

La administración es preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y ciclo temporal de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de la lesión o enfermedad que se trate. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los practicantes generales y otros doctores en medicina, y normalmente tiene en cuenta el trastorno para tratar, la condición del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los practicantes. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20^a Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

En esta memoria descriptiva un paciente para tratar puede ser cualquier animal o ser humano. El paciente puede ser un mamífero no humano, pero es más preferentemente un paciente humano. El paciente puede ser hombre o mujer.

Los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*, como se indica. Se entiende que en la expresión "*in vitro*" abarca procedimientos con células en cultivo mientras que se entiende que la expresión "*in vivo*" abarca procedimientos con organismos multicelulares intactos.

Células madre

Las células que pueden ponerse en contacto con GAG obtenidos por el método de la presente invención incluyen células madre, siempre que cuando sean células madre humanas no sean células madre embrionarias.

Las células madre cultivadas y descritas en el presente documento pueden ser células madre de cualquier tipo. Pueden ser totipotenciales o multipotenciales (pluripotenciales). Pueden ser células madre embrionarias o adultas de cualquier tejido y pueden ser células madre hematopoyéticas, células madre neurales o células madre mesenquimales. Preferentemente son células madre adultas. Más preferentemente son células madre mesenquimales adultas, por ejemplo, capaces de diferenciarse en tejido conectivo y/o células del hueso tales como condrocitos, osteoblastos, miocitos y adipocitos. Las células madre pueden obtenerse de cualquier animal o ser humano, por ejemplo animales no humanos, por ejemplo conejo, cobaya, rata, ratón u otro roedor (incluyendo células de cualquier animal en el orden Rodentia), gato, perro, cerdo, oveja, cabra, vaca, caballo, primate no humano u otro organismo vertebrado no humano; y/o animales mamíferos no humanos; y/o ser humano. Opcionalmente no son humanos.

En esta memoria descriptiva, se entiende por célula madre cualquier tipo celular que tenga la capacidad de dividirse (es decir, autorrenovarse) y permanecer multipotencial (pluripotencial) y dar lugar a células especializadas si se desea.

Pueden obtenerse células madre cultivadas como se describe en el presente documento o derivarse de cultivos existentes o directamente de cualquier tejido adulto, no humano embrionario o fetal, incluyendo sangre, médula ósea, piel, epitelio o cordón umbilical (un tejido que normalmente se descarta).

La multipotencialidad de las células madre puede determinarse mediante el uso de ensayos adecuados. Dichos ensayos pueden comprender detectar uno o más marcadores del pluripotencialidad, por ejemplo actividad fosfatasa alcalina, detección de RUNX2, osterix, colágeno I, II, IV, VII, X, osteopontina, Osteocalcina, BPSII, SOX9, Aggrecano, ALBP, CCAAT/proteína de unión a potenciador- α (C/EBP α), proteína de unión a lípidos de adipocitos (ALBP), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína del hueso 2, (BSPII), Colágeno2a1 (Coll2a) y SOX9.

- Las células madre mesenquimales o células madre del estroma de la médula ósea humana se definen como células progenitoras pluripotenciales (multipotenciales) con la capacidad para generar cartílago, hueso, músculo, tendón, ligamento y grasa. Estos progenitores primitivos existen de forma posnatal y muestran características de células madre, concretamente baja incidencia y potencial de renovación extensivo. Estas propiedades en combinación con su plasticidad del desarrollo han generado un enorme 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 trasplantarse al sitio lesionado o después sembrarse en/sobre armazones para generar construcciones de tejido apropiadas.
- Por lo tanto, un enfoque alternativo para reparación esquelética, muscular, de tendón y de ligamentos es la selección, expansión y modulación de las células progenitoras apropiadas tales como células osteoprogenitoras en el caso de hueso en combinación con un armazón conductivo o inductivo para soportar y guiar la regeneración junto con selección juiciosa de factores de crecimiento tisular 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 para repoblación de la médula. Estos marcadores de superficie celular solamente se encuentran en la superficie celular de células madre mesenquimales y son un indicio de la pluripotencialidad de las células.
- Se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende células madre generadas por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, o fragmentos o productos de los mismos. La composición farmacéutica es útil en un método de tratamiento médico. Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden comprender además un vehículo, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- Las células madre generadas por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en un método de tratamiento médico, preferentemente, un método de tratamiento médico que comprende administrar a un individuo que necesite un tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho medicamento o composición farmacéutica.
- Las células madre obtenidas mediante métodos y técnicas de cultivo de acuerdo con la presente divulgación pueden usarse para diferenciar en otro tipo celular para su uso en un método de tratamiento médico. Por lo tanto, el tipo celular diferenciado puede derivar de, y puede considerarse un producto de, una célula madre obtenida por los métodos y técnicas de cultivo descritos que se ha permitido posteriormente que se diferencie. Pueden proporcionarse composiciones farmacéuticas que comprenden dichas células diferenciadas, opcionalmente junto con un vehículo, 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 la gran colección de moléculas que comprenden un oligosacárido, en las que uno o más de los sacáridos unidos poseen un sustituyente amino, o un derivado del mismo. Son ejemplos de GAG condroitín sulfato, keratín 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 extiende para abarcar las moléculas que son conjugados de GAG. Un ejemplo de conjugado de GAG es un proteoglucosaminoglucano (PGAG, proteoglucano) en el que un componente peptídico se une covalentemente con un componente oligosacárido.
- En la presente invención, se entiende que hay un gran número de fuentes de compuestos de GAG, incluyendo naturales, sintéticas o semisintéticas. Una fuente preferida de GAG es el tejido biológico. Una fuente preferida de GAG es una célula madre. Una fuente especialmente preferida de GAG es una célula madre capaz de diferenciarse en una célula que corresponde a un tejido que será el objeto de tratamiento. Por ejemplo, los GAG pueden obtenerse de preosteoblastos para su uso en regeneración de hueso o construcción de tejido esquelético. En una realización especialmente preferida de la presente invención, los GAG pueden obtenerse de una línea celular inmortalizada. En una realización preferida adicional de la presente invención, los GAG pueden obtenerse de una línea celular inmortalizada que se cultiva en un biorreactor. Otra fuente preferida de GAG es una fuente sintética. A este respecto, los GAG pueden obtenerse de la elaboración sintética de materiales de partida disponibles en el mercado a una forma química más complicada mediante técnicas conocidas, o concebibles, por un experto en la materia. Un ejemplo de dicho material de partida disponible en el mercado es glucosamina. Otra fuente preferida de GAG es una fuente semisintética. A este respecto, la elaboración sintética, de un material de partida natural, que posee mucha de la complejidad del material deseado, se elabora de forma sintética usando técnicas conocidas, o concebibles, por un experto en la materia. Son ejemplos de dicho material de partida natural quitina y dextrano, y son ejemplos de los tipos de etapas sintéticas que pueden elaborar ese material de partida, a una mezcla de GAG adecuada para su uso en la presente invención, hidrólisis de enlaces amida, oxidación y sulfatación. Otro ejemplo de una vía semisintética a 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)

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

Los proteoglucanos de heparán sulfato (HSPG) representan un subgrupo altamente diverso de proteoglucanos y están compuestos por cadenas laterales de glucosaminoglucano de heparán sulfato unidas covalentemente con una
10 cadena principal proteica. La proteína central 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 la mayoría de las matrices extracelulares. Hay otras proteínas tales como agrina, o la proteína precursora amiloide, en las que una cadena de HS puede unirse a núcleos hallados menos habitualmente.

15 “Heparán Sulfato” (“heparán sulfato” o “HS”) se sintetiza inicialmente en el aparato de Golgi como polisacáridos consistentes 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 GlcNAc, epimerización C5 de GlcA a ácido idurónico (IdoA), *O*-sulfatación en C2 de IdoA y GlcA, *O*-sulfatación en C6 de *N*-sulfoglucosamina (GlcNS) y ocasional *O*-sulfatación en C3 de 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, solamente se modifica una fracción de los sustratos potenciales, dando como resultado una considerable diversidad de secuencia. Esta complejidad estructural de HS
20 ha hecho difícil determinar su secuencia y entender la relación entre la estructura y función del HS.

Las cadenas laterales de heparán sulfato consisten en *D*-ácido glucurónico o *L*-ácido idurónico dispuestos de forma alterna y *D*-glucosamina, unidos mediante enlaces glucosídicos (1→4). La glucosamina está con frecuencia *N*-acetilada o *N*-sulfatada y tanto el ácido urónico como la glucosamina pueden estar adicionalmente *O*-sulfatados. La
30 especificidad de un HSPG particular para un compañero de unión particular se crea por el patrón específico de grupos carboxilo, acetilo y sulfato unidos con la glucosamina y el 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 se unen con un resto de serina de la proteína central mediante una región de enlace de tetrasacárido (-glucuronosil(1→3)-galactosil-β-((1→3)-galactosil-β-((1→4)-xilosil-β-1-*O*-(Serina)).

35 Tanto las cadenas de heparán sulfato como la proteína central pueden experimentar una serie de modificaciones que pueden en última instancia influir en su actividad biológica. Se ha considerado que la complejidad de 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 especies de HS surge de la síntesis de secuencias no aleatorias, altamente sulfatadas de restos de azúcares que se separan por regiones no sulfatadas de disacáridos que contienen glucosamina *N*-acetilada. La conversión inicial de *N*-acetilglucosamina a *N*-sulfoglucosamina crea un centro para otras modificaciones, incluyendo epimerización de ácido glucurónico a ácido idurónico y un patrón complejo de *O*-sulfataciones en glucosamina o ácidos idurónicos. Además, dentro de las secuencias *N*-acetiladas no modificadas, poco sulfatadas, los restos de hexuronato permanecen como glucuronato, mientras que en las regiones *N*-sulfatadas altamente sulfatadas, el epímero C-5 iduronato predomina. Esto limita el número de variantes disacáridas potenciales posibles en cualquier cadena dada pero no la abundancia de cada una. La mayoría de las modificaciones suceden en los dominios *N*-sulfatados, o directamente adyacentes a ellos, de modo que en la cadena madura haya regiones de alta sulfatación separadas por dominios de baja sulfatación (Brickman *et al.* (1998), *J. Biol. Chem.* 273(8), 4350-4359, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

50 Se plantea la hipótesis de que las cadenas de heparán sulfato altamente variables desempeñan papeles claves en la modulación de la acción de un gran número de ligandos extracelulares, incluyendo regulación y presentación de factores de crecimiento y adhesión a la célula, mediante una combinación complicada de bucles de retroalimentación autocrinos,uxtacrinos y paracrinos, controlando de este modo la señalización intracelular y por lo tanto la diferenciación de células madre. Por ejemplo, incluso aunque pueden describirse genéticamente glucosaminoglucanos de heparán sulfato (Alberts *et al.* (1989) Garland Publishing, Inc, Nueva York y Londres, pp. 804 y 805), las especies de glucosaminoglucanos de heparán sulfato aisladas de una única fuente pueden diferir en su actividad biológica. Como se muestra en Brickman *et al.*, 1998, *Glycobiology* 8, 463, dos grupos separados de glucosaminoglucanos de heparán sulfato obtenidos de células neuroepiteliales podrían activar específicamente bien FGF-1 o bien FGF-2, dependiendo del estado mitogénico. De forma similar, la capacidad de un heparán sulfato (HS) para interactuar con FGF-1 o FGF-2 se describe en el documento WO 96/23003. De acuerdo con la presente solicitud de patente, un HS respectivo capaz de interactuar con FGF-1 puede obtenerse de células murinas el día embrionario de aproximadamente 11 a aproximadamente 13, mientras que un HS capaz de interactuar con FGF-2 puede obtenerse el día embrionario de aproximadamente 8 a aproximadamente 10.

65 Como se ha indicado anteriormente la estructura de HS es altamente compleja y variable entre HS. De hecho, se

considera que la variación de la estructura de HS desempeña un papel importante en la contribución a la actividad diferente de cada HS en la promoción del crecimiento celular y dirección de la diferenciación celular. Se considera que la complejidad estructural sobrepasa la de los ácidos nucleicos y aunque la estructura de HS puede caracterizarse como una secuencia de unidades disacáridas repetidas que tienen patrones de sulfatación específicos y únicos en el momento presente no está disponible ninguna técnica de secuenciación convencional equivalente a las disponibles para secuenciación de ácido nucleico para determinar la estructura de secuencia de HS. En ausencia de métodos sencillos para determinar una estructura de secuencia de HS definitiva las moléculas de HS se identifican positivamente y se caracterizan estructuralmente por trabajadores expertos en el campo por varias técnicas analíticas. Estas incluyen uno o una combinación de análisis de disacáridos, análisis de tetrasacáridos, HPLC y determinación de peso molecular. Los expertos en la materia conocen bien y usan estas técnicas analíticas.

Dos técnicas para la producción de di y tetrasacáridos de HS incluyen digestión con ácido nitroso y digestión con liasa. Se proporciona posteriormente una descripción de un modo de realizar estas técnicas de digestión, únicamente como ejemplo, no limitando dicha descripción el alcance de la presente invención.

Digestión con ácido nitroso

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

Por ejemplo, puede prepararse ácido nitroso 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 agita vorticialmente antes de centrifugar para retirar el precipitado de sulfato de bario. Se añadieron 125 μ l de HNO_2 a muestras de GAG resuspendidas en 20 μ l de H_2O , y se agitó vorticialmente antes de incubar durante 15 min a 25 °C con mezclado ocasional. Después de incubar, se añadió Na_2CO_3 1 M a la muestra para llevarla a pH 6. A continuación, se añadieron 100 μ l de $NaBH_4$ 0,25 M en $NaOH$ 0,1 M a la muestra y la mezcla se calentó a 50 °C durante 20 min. La mezcla se enfrió después a 25 °C y se añadió ácido acético glacial acidificado para llevar la muestra a pH 3. La mezcla se neutralizó después con $NaOH$ 10 M y el volumen se redujo por liofilización. Se procesan muestras finales en una columna de Bio-Gel P-2 para separar di y tetrasacáridos para verificar el grado de degradación.

Digestión con liasa

La Heparinasa III escinde cadenas de azúcares en enlaces glucuronídicos. La serie de enzimas de Heparinasa (I, II y III) presenta cada una actividad relativamente específica despolimerizando ciertas 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 de HS. Esto conduce a la alteración de los dominios sulfatados. La Heparinasa III despolimeriza HS con los dominios NA, dando como resultado la separación de la cadena de carbohidrato en dominios sulfatados individuales. La Heparinasa II escinde principalmente en los dominios de "hombro" NA/NS de cadenas HS, en los que se encuentran patrones de sulfatación variantes. Nota: La cadena principal de disacárido repetida del polímero de heparán es un ácido urónico conectado al azúcar amino glucosamina. "NS" significa que el azúcar amino porta un sulfato en el grupo amino que permite la sulfatación de otros grupos en C2, C6 y C3. "NA" indica que el grupo amino no está sulfatado y permanece acetilado.

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

Se pueden eluir di y tetrasacáridos por cromatografía en columna.

Dominios de unión a heparina

Cardin y Weintraub (Molecular Modeling of Protein-Glycosaminoglycan Interactions, Arteriosclerosis Vol. 9 N° 1 Ene/Feb 1989 p.21-32), incorporado en el presente documento en su totalidad por referencia, describe secuencias consenso para dominios de unión a heparina polipeptídicos. La secuencia consenso tiene un tramo de restos di o tribásicos separados por dos o tres restos hidropáticos terminados en uno o más restos básicos. Se han identificado dos secuencias consenso particulares: XBBXB [SEC ID N°: 15] y XBBBXXBX [SEC ID N°: 16] en las que B es un resto básico (por ejemplo lisina, arginina, histidina) y X es un resto hidropático (por ejemplo alanina, glicina, tirosina, serina). Se ha indicado que los dominios de unión a heparina son abundantes en los aminoácidos Asn, Ser, Ala, Gly, Ile, Leu y Tyr y tienen una baja aparición de aminoácidos Cys, Glu, Asp, Met, Phe y Trp.

Estas secuencias consenso pueden usarse para buscar secuencias de aminoácidos proteicas o polipeptídicas para identificar secuencias de aminoácidos de dominio de unión a heparina candidatas que pueden sintetizarse y ensayarse con respecto a unión con GAG de acuerdo con la presente invención.

El documento WO 2005/014619 A2 también desvela numerosos péptidos de unión a heparina. Los contenidos del documento WO 2005/014619 A2 se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia.

Proteínas que contienen dominios de unión a heparina

5 Se sabe que las siguientes proteínas contienen dominios de unión a heparina, y pueden usarse polipéptidos derivados de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas para la identificación de GAG de acuerdo con la presente invención.

10 *Mitógenos/morfógenos/quimiocinas*

Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9) así como los receptores FGF FGFR1 , FGFR2, FGFR3; HGF (factor de crecimiento de hepatocitos); VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular); Activinas; BMP (proteína morfogenética del hueso, por ejemplo BMP-2, BMP-4); 15 TGF-β (factor de crecimiento transformante); PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas); OPG (osteoprotegerina); HB-GAM (moléculas asociadas al crecimiento de unión a heparina); Pleiotropinas; GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos); Interferón-γ; NT4/5 (Neurotofina); GDNF (factor neurotrófico derivado de células gliales); Wnts Hedgehog.

20 *Antagonistas*

Noggin, Cordina, Esclerostina, CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo), Folistatina, Gremlina.

Glucoproteínas adhesivas

25 Fibronectina, Vitronectina, Laminina, Colágenos, Trombospondina, Tenascina, Factor de vonWillebrand, NCAM (Molécula de Adhesión de Células Neurales), N-cadherina.

Enzimas

30 Lipoproteína Lipasa, Lipasa Hepática, Fosfolipasa, Apolipoproteína B, Apolipoproteína E.

Inhibidores de serina proteasa

35 Antitrombina III, Cofactor de Heparina II, Nexinas de Proteasa

Otros factores

40 Superóxido Dismutasa, Elastasa, Factor de Plaquetas 4, N-CAM, Factores de Transcripción, ADN Topoisomerasa, ARN Polimerasa, Factor de Necrosis Tumoral.

La invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritos excepto cuando dicha combinación sea claramente no permisible o se evite expresamente.

45 Los encabezamientos de sección usados en el presente documento son para fines de organización solamente y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Breve descripción de las figuras

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

Figura 1. Cromatografía de intercambio aniónico de muestras de MX alteradas usando tampón de urea 8 M/CHAPS. Se observa un pico de GAG grande después de elución de NaCl 1 M.

55 **Figura 2.** Cromatograma representativo del sistema de desalación durante la purificación de GAG derivados de MX. El pico inicial (12-18 min) representa cadenas de GAG de longitud completa. El pico de conductividad y pico de residuos (19-30 min) representan elución de sal y residuos de GAG.

60 **Figura 3.** tGAG (2,5 mg) cargados en una columna de estreptavidina Hi-Trap no derivatizada. Todos los GAG eluyen de la columna en el flujo continuo, lo que indica que no hay unión “de fondo” de GAG con la columna.

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

65 **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 alta salinidad; por lo tanto hubo acoplamiento exitoso del péptido biotinilado con el enlazador de estreptavidina.

Figura 6. BMP2-HBP (1 mg) acoplado con columna cargada con 25 mg de 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.

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

Figura 8. Columna acoplada a BMP2-HBP (2 mg) cargada con tGAG (6 mg). El cromatograma (232 nm) muestra claramente la ausencia de sobrecarga de la columna, y la presencia de una subpoblación de GAG con una afinidad relativa por el BMP2-HBP.

Figura 9. Nuevo procesamiento de GAG (flujo continuo) del procesamiento previo (Figura 8). La ausencia de un pico de elución GAG+ indica que los sitios de unión de BMP2-HBP disponibles no estaban saturados en el ciclo previo, lo que permitió la extracción eficaz de azúcares GAG+ en un único ciclo.

Figura 10. La re-aplicación de fracciones GAG+ de longitud completa aisladas (2 mg) no muestra cambios en la afinidad por la columna de BMP2-HBP (2 mg) antes de la digestión con heparinasa III. Una re-aplicación de fracciones GAG- contra la columna de BMP2-HBP tampoco mostró ningún cambio en afinidad, saliendo todos los GAG de la columna en el flujo continuo esencialmente como en la Figura 9.

Figura 11. Fracciones GAG- (1 mg) digeridas con heparinasa III antes de cargar en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) claramente muestra que no permanecían unidas ninguna muestra de GAG a la columna, sino que salían en el flujo continuo. Esto indica la ausencia de cualquier dominio GAG+ en las cadenas GAG- de longitud completa.

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

Figura 13. Cadenas GAG+ de longitud completa separadas usando una columna de Biogel P10 con un límite de exclusión de entre 1,5 kDa y 20 kDa. El cromatograma muestra que una gran proporción de las cadenas de muestra tienen un peso molecular general de más de 20 kDa.

Figura 14. Cadenas de azúcares GAG+ de longitud completa tratadas con ácido nitroso durante 20 min para degradar de forma diagnóstica especies de heparán sulfato. El cromatograma, generado a partir de una columna de separación por tamaño de Biogel P10, muestra una degradación casi completa de todas las cadenas GAG+ en comparación con la Figura 13, lo que indica que las cadenas aisladas GAG+ consisten principalmente en heparán sulfato.

Figura 15. Condroitín-4-sulfato (6 mg) cargado en una columna BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma ilustra claramente una proporción significativa de las cadenas GAG que tienen una afinidad por el péptido, a medida que eluyen a una concentración salina similar a las muestras GAG+.

Figura 16. Condroitín-6-sulfato (6 mg) cargado en una columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma indica que pocas de las cadenas de GAG C6S tienen alguna afinidad por la columna peptídica.

Figura 17. Dermátán sulfato (6 mg) cargado en la columna de afinidad de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma indica que pocas de las cadenas de GAG DS tienen alguna afinidad por el péptido, eluyéndose solo una pequeña proporción de los GAG a una concentración salina similar a muestras GAG+.

Figura 18. Heparán sulfato bovino (2,5 mg) cargado en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) revela solamente una pequeña fracción de los GAG que se unen a la columna.

Figura 19. Heparina-LMW (50 mg) cargada en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) revela que no se unió casi GAG al péptido.

Figura 20. Heparina-HMW (28 mg) cargada en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) revela que no se unió casi GAG al péptido.

Figura 21. Se cargó heparina-HMW (25 mg) predigerida con heparinasa I en la columna de BMP2-HBP (2 mg). El cromatograma (232 nm) revela que muy pocos fragmentos de GAG se unieron con el péptido.

5 **Figura 22.** Cromatograma que muestra etapas en el aislamiento de HS específico de péptido BMP-2 por cromatografía de afinidad.

Figura 23. Cromatograma que muestra la elución de HS específica de péptido BMP-2 (GAG+) por cromatografía de afinidad.

10 **Figura 24.** Cromatograma que muestra la elución de HS no específica de péptido BMP-2 (GAG-) por cromatografía de afinidad.

Figura 25. Cromatograma que muestra la elución del patrón de HS Sigma (H9902) con cromatografía de exclusión por tamaño en columna Superdex 75.

15 **Figura 26.** Cromatograma que muestra la elución de HS específica de péptido BMP-2 (GAG+) con cromatografía de exclusión por tamaño en columna Superdex 75.

20 **Figura 27.** Gráfica que muestra la expresión de Osterix en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP2 100 ng/ml y BMP2 300 ng /ml.

Figura 28. Gráfica que muestra la expresión de Osteocalcina en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP2 100 ng/ml y BMP2 300 ng /ml.

25 **Figura 29.** Gráfica que muestra la expresión de Runx2 en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP2 100 ng/ml y BMP2 300 ng /ml.

30 **Figura 30.** Gráfica que muestra la expresión de fosfatasa alcalina como se mide por PCR cuantitativa en células C2C12 en respuesta a medios de control, BMP-2, GAG Negativo (GAG-), GAG positivos (GAG+), HS total y heparina (Hep).

35 **Figura 31.** Gráfica que muestra la expresión de Osterix como se mide 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. Gráfica que muestra la expresión de Bsp11 como se mide 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).

40 **Figura 33.** Gráfica que muestra la expresión de Runx2 como se mide 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).

45 **Figura 34.** Gráfica que muestra la expresión de Osteocalcina en células C2C12 en respuesta a BMP y GAG+ (+ BMP-2) aislado de células MC3T3-E1.

Descripción detallada de la invención

50 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta a continuación incluyendo detalles específicos del mejor modo contemplado por los inventores para llevar a cabo la invención, como ejemplo. Resultará evidente para un experto en la materia que la presente invención puede practicarse sin limitación a estos detalles específicos.

55 Los inventores han investigado el potencial de los GAG para aumentar las actividades de la proteína morfogenética del hueso 2 (BMP2). La actividad altamente osteoinductora de BMP2 para la línea celular miogénica murina C2C12 se han caracterizado bien. Los estudios tanto en esta línea celular como *in vivo*, han implicado un papel para los glucosaminoglucanos en la modulación de esta actividad.

60 La afinidad de BMP2 por la heparina se ha caracterizado bien de forma similar. Se han realizado numerosos estudios que han intentado examinar la interacción dinámica entre BMP2 y GAG. Algunos han propuesto que la interacción es inhibitoria, y por lo tanto responsable de secuestrar la citocina lejos del receptor o inducir su asociación con sus numerosos inhibidores, tales como noggina, que se ha mostrado, de forma similar, que tienen afinidad por heparina. Hallazgos alternativos implican que la interacción entre BMP2 y GAG es una de mantenimiento de una concentración local de la citocina en torno a células que requieren su señalización para diferenciarse en el linaje osteoblástico.

65

Estos hallazgos también sugieren que la asociación actúa para alargar significativamente la semivida del homodímero, permitiendo de este modo que siga activo en la ECM durante períodos más largos. Como sucede con la mayoría de los sistemas, el papel real de esa interacción probablemente sea una mezcla de algunos, o todos los anteriores.

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

Los inventores buscan aislar un glucosaminoglucano específico de secuencia que pueda modular la actividad de BMP2 mediante una interacción directa con la citocina.

15 **Ejemplo 1**

MATERIALES Y MÉTODOS

20 Preparación de tampón

La preparación de todos los tampones para extracción y análisis de GAG se realiza prestando 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 desgasifiquen para impedir la obstrucción de columnas con precipitados o burbujas. La formación de burbujas, en particular, puede ocasionar grave daño a las columnas, y en el caso de columnas prefabricadas, selladas, conduce a que se hagan inutilizables.

Todos los tampones usados se filtraron con PBS 1x sin Ca^{2+} o Mg^{2+} (NaCl 150 mM), o se destilaron doblemente (ddH₂O) para preparar las soluciones finales.

30 Tampón de disrupción

El tampón de disrupción de Urea 8 M/CHAPS consistía en PBS (NaCl 150 mM) con CHAPS al 1 %, Urea 8 M y NaN₃ al 0,02 % para evitar la contaminación de crecimiento microbiano durante el almacenamiento. Esta solución se usó para alterar muestras de matriz (MX), de modo que no se desgasificaran o filtraran.

Tampón de baja salinidad de intercambio aniónico PGAG (250 mM)

40 El tampón de intercambio aniónico PGAG de baja salinidad comprendía PBS (NaCl 150 mM) con NaCl 100 mM adicional. El tampón se equilibró a pH 7,3 con NaOH y NaN₃ 0,02 %. La solución se desgasificó después con presión negativa y agitación constante hasta que no se liberaron más burbujas antes de filtrarse a través de un filtro de 0,4 μm.

45 Tampón de alta salinidad de intercambio aniónico PGAG (1 M)

El tampón de intercambio aniónico PGAG de alta salinidad comprendía PBS (NaCl 150 mM) con una NaCl 850 mM adicional. El tampón se equilibró a pH 7,3 con NaOH y se añadió NaN₃ 0,02 %. La solución se desgasificó después con presión negativa y con agitación constante antes de filtrarse a través de un filtro de 0,4 μm.

50 Tampón de reconstitución de pronasa/neuraminidasa PGAG

Este tampón se usó para reconstituir muestras de PGAG desaladas después de intercambio aniónico para prepararlas para digestión enzimática de las proteínas centrales asociadas. Consistió en acetato sódico 25 mM (CH₃COONa). El tampón se equilibró a pH 5,0 con ácido acético glacial (CH₃COOH). Las enzimas tanto pronasa como neuraminidasa se reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tampón de baja salinidad de cromatografía de afinidad de GAG (150 mM)

60 Se preparó tampón de intercambio aniónico GAG de baja salinidad usando PBS (NaCl 150 mM) sin ninguna sal adicional. El tampón se equilibró a pH 7,3 con NaOH y NaN₃ 0,02 %. La solución se desgasificó con presión negativa y con agitación constante hasta que no se liberaron más burbujas antes de filtrarse a través de un filtro de 0,4 μm.

Tampón de alta salinidad de cromatografía de afinidad de GAG (1 M)

65 Se preparó tampón de intercambio aniónico de GAG de alta salinidad usando PBS (NaCl 150 mM) con NaCl 850 mM adicional. El tampón se equilibró a pH 7,3 con NaOH y se añadió NaN₃ 0,02 %. Después se desgasificó la

solución y se filtró a través de un filtro de 0,4 µm.

Solución de desalación

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

Preparación de muestras

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

15 Preparación y uso de columna

La elección y preparación de los tipos de columnas para usar para cada etapa secuencial en el aislamiento y caracterización de GAG es de gran importancia para el éxito del protocolo. Fue vital que en cada etapa las columnas se equilibraran y se limpiaran con gran cuidado.

20

Columnas de intercambio aniónico

- 25 Debido a las cantidades relativamente grandes de sustrato MX usado para la extracción de GAG, y la alta carga que esto pone en el sistema de columna, fue necesario empaquetar y preparar una columna de intercambio aniónico grande manualmente, específicamente para este estudio. Se empaquetaron perlas de intercambio aniónico Capto Q (Pharmacia) una columna Pharmacia XK 26 (Pharmacia) para producir una columna con una capacidad de carga máxima de 500 ml de lisado de MX por ciclo.

- 30 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 Baja Salinidad de Intercambio Aniónico de PGAG (250 mM) durante 30 min hasta que todos los canales de absorbancia permanecieron estables. El lisado de células clarificado se pasó después a través de la columna que se aclaró de nuevo en 500 ml de tampón de baja salinidad para retirar cualquier residuo unido de forma no específica. Los PGAG se eluyeron después usando 250 ml de Tampón de Alta Salinidad de Intercambio Aniónico de PGAG (1 M) y se liofilizaron antes de su desalación. La columna se aclaró después en tampón de baja salinidad y se devolvió a 4 °C para almacenamiento.

35

Protocolo de desalación

- 40 Después del aislamiento de PGAG/GAG fue necesario retirar la alta 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 columnas de desalación Pharmacia HiPrep™ 26/10 4x. Antes de su uso, tanto las columnas como todas las soluciones se equilibraron a temperatura ambiente durante 30 min antes de lavar y equilibrar la columna en Solución de Desalación durante 30 min hasta que todos los canales de absorbancia alcanzaron la estabilidad. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron en Solución de Desalación en el volumen mínimo posible que dio como resultado una solución transparente. Esta combinación de columnas permitió la carga de hasta 60 ml de muestra. Las fracciones que se eluían de la columna en primer lugar se liofilizaron y se conservaron para separación o aplicación a cultivo celular adicional. Las columnas se aclararon después en Solución de Desalación y se devolvieron a 4 °C para almacenamiento.

45

50 Preparación de columna de BMP2-HBP

- El aislamiento de los GAG que portaban afinidades relativas por BMP2 se realizó usando una columna de BMP2-HBP. Se prepararon aproximadamente 2 mg de BMP2-HBP biotinilado en un 1 ml del tampón de Baja Salinidad de Cromatografía de Afinidad de GAG (150 mM). Esta cantidad se cargó en una columna de Estreptavidina HP HiTrap (Pharmacia) y se permitió que se uniera a la columna durante 5 min. La columna se sometió después a un ciclo de procesamiento completo en ausencia de GAG. La columna se lavó en 13 ml de tampón de baja salinidad a un caudal de 0,5 ml/min antes de someterse a 10 ml de tampón de alta salinidad de GAG a 1 ml/min. Finalmente la columna se aclaró con 10 ml de tampón de baja salinidad. Durante este proceso los datos se controlaron cuidadosamente para asegurar que no se observaba ninguna elución de péptidos o degradación de columna.

60

Aislamiento de muestras GAG+

- Una vez que se hubo preparado la columna de BMP2-HBP y se hubo ensayado con respecto a estabilidad en condiciones de procesamiento normales, estaba lista para su uso 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 baja salinidad de afinidad de GAG (150 mM) y se inyectó en un bucle estático para cargarlo en la columna. Antes del uso tanto la columna de

65

BMP2-HBP como todos los tampones se equilibraron a temperatura ambiente durante 30 min antes de lavar y equilibrar la columna en tampón de baja salinidad durante 30 min hasta que todos los canales de absorbancia eran estables. La muestra se cargó después en la columna a 0,5 ml/min y la columna y la muestra se aclararon en 10 ml de tampón de baja salinidad a 0,5 ml/min. Las muestras GAG+ retenidas se recuperaron posteriormente por elución con 10 ml de tampón de alta salinidad (1 M) y se liofilizaron para desalar. La columna se aclaró después en 10 ml de tampón de baja salinidad y se almacenaron a 4 °C.

Tratamiento con pronasa/neuraminidasa

Para aislar cadenas de GAG de sus proteínas centrales, se digirieron usando pronasa y neuraminidasa. Se resuspendieron muestras de PGAG liofilizadas en un volumen mínimo de acetato sódico 25 mM (pH 5,0) y se clarificaron por filtración a través de un filtro de jeringa de 0,4 µm. El volumen de muestras totales se distribuyó 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 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, se reconstituyeron en Tris-acetato 500 mM, acetato cálcico 50 mM (pH 8,0), a cada muestra 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 GAG

El análisis de GAG, incluyendo sus tamaños de dominio sulfatado y niveles de sulfatación relativos, se llevó a cabo usando protocolos establecidos incluyendo degradación por ácido nitroso o liasas.

Digestión con ácido nitroso

La despolimerización basada en ácido nitroso de heparán sulfato conduce a la degradación eventual de la cadena de carbohidratos en sus componentes disacáridos individuales cuando se lleva hasta su compleción. Se preparó ácido nitroso enfriando 250 µl de H₂SO₄ 0,5 M y Ba(NO₂)₂ 0,5 M por separado en hielo durante 15 min. Después de enfriar, el Ba(NO₂)₂ se combinó con el H₂SO₄ y se agitó vorticialmente antes de centrifugar para retirar el precipitado de sulfato de bario. Se añadieron 125 µl de HNO₂ a muestras de GAG resuspendidas en 20 µl de H₂O, y se agitó vorticialmente antes de incubarse durante 15 min a 25 °C con mezcla ocasional. Después de la incubación, se añadió Na₂CO₃ 1 M a la muestra para llevarla a pH 6. A continuación, se añadieron 100 µl de NaBH₄ 0,25 M en NaOH 0,1 M a la muestra y la mezcla se calentó a 50 °C durante 20 min. La mezcla se enfrió después a 25 °C y se acidificó con ácido acético glacial a pH 3 en la campana extractora de humos. La mezcla se neutralizó después con NaOH 10 M y el volumen se redujo después por liofilización. Las muestras finales se procesaron en una columna Bio-Gel P-2 para separar di- y tetrasacáridos para verificar la degradación.

Digestión con Heparinasa III

La Heparinasa III es una enzima que escinde las cadenas de azúcares enlaces glucuronídicos. La serie de enzimas heparinasa (I, II y III) presentan cada una, una actividad relativamente específica despolimerizando ciertas secuencias de heparán sulfato en particular sitios de reconocimiento de sulfatación. La Heparinasa I escinde cadenas de HS dentro de regiones NS a lo largo de la cadena. Esto conduce a la alteración de los dominios sulfatados que se cree que portan la mayoría de la actividad biológica del HS. La Heparinasa III despolimeriza HS dentro de los dominios NA, dando como resultado la separación de la cadena de carbohidratos en dominios sulfatados individuales. Finalmente, la Heparinasa II escinde principalmente los dominios de "hombro" de NA/NS de cadenas HS, donde se encuentran los patrones de sulfatación variantes.

Para aislar dominios activos potenciales los inventores se han centrado en la despolimerización de regiones NA GAG+. Tanto la enzima como las muestras de HS liofilizadas se prepararon en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, BSA 0,1 mg/ml y CaCl₂ 4 mM a pH 7,5. La concentración de heparinasa III añadida a cada muestra está gobernada por la cantidad relativa de componentes de HS en la muestra. El análisis de los inventores, mediante despolimerización de ácido nitroso, ha indicado que las muestras GAG+ consistían predominantemente en HS; por lo tanto la enzima se usó a 5 mU por cada 1 µg de HS. La muestra se incubó a 37 °C durante 16 h antes de detenerse la reacción calentando a 70 °C durante 5 min. La muestra se aplicó después al sistema de columna apropiado para análisis adicional.

Cultivo celular

Producción de GAG

Para aislar especies GAG representativas del desarrollo de osteoblastos, las células MC3T3 se cultivaron en condiciones osteogénicas durante 8 días. El componente celular se retiró mediante incubación en una solución diluida de hidróxido de amonio (NH₄OH) 0,02 M a 25 °C durante 5 min. Después de 5 min, se retiró NH₄OH por inversión de las superficies de cultivo. Se permitió que los cultivos tratados se secaran en una cabina de flujo laminar

durante una noche. Al día siguiente los cultivos tratados se lavaron tres veces con PBS estéril y se permitió que se secaran en la cabina de flujo laminar. Los cultivos de matriz preparados se almacenaron después en condiciones estériles en 4 °C hasta que se liberaron proteoglicanos primarios mediante el tratamiento con tampón de disrupción y cromatografía de intercambio aniónico.

5

Bioactividad de GAG específica de BMP2

Se subcultivaron mioblastos de C2C12 cada 48 h, hasta un máximo de 15 pases, sembrando a $1,3 \times 10^4$ células/cm² en placas 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 %, concentraciones nominadas de proteína morfogénica del hueso 2 humana recombinante (rhBMP2) y fracciones de glucosaminoglucanos con una afinidad positiva o negativa por rhBMP2 (GAG+ y GAG- respectivamente). Se preincubaron fracciones de rhBMP2 y GAG durante 30 min a 25 °C antes de la adición de sus cultivos de C2C12 correspondientes. Se permitió que los cultivos crecieran en esas condiciones durante 5 días, cambiándose los medios para cada condición cada 48 h, antes de extraer y prepararse las muestras de ARNm para análisis de RQ-PCR. Se realizó PCR en tiempo real para expresión de osteocalcina usando el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7000® (PerkinElmer Life Sciences). Se diseñaron cebadores y sondas usando el software Primer Express (v2.1, PE Applied Biosystems). La sonda diana se rediseñó para incorporar bases de LNA y se marcó con BHQ-1 (Sigma-Proligo). El gen de la subunidad ribosómica 18S (VIC/TAMRA) se usó como un control endógeno, consistiendo cada condición en tres repeticiones, cada una ensayada por triplicado. Los datos de PCR sin procesar se analizaron usando el software Detector de Secuencias ABI. Los valores de expresión del gen diana se normalizaron a expresión de 18S antes del cálculo de las unidades de expresión relativas (UER).

10

15

20

RESULTADOS

25

Cromatografía de intercambio aniónico

Para extraer con éxito GAG de muestras MX, es necesario retirar otras proteínas de la matriz que pueden contaminar la muestra. Como los GAG constituyen las moléculas con mayor carga negativa en la ECM, esto se consigue más eficazmente con cromatografía de intercambio aniónico.

30

35

Las muestras se alteraron usando tampón de Urea 8 M/CHAPS y se cargaron en la columna de intercambio aniónico. Se lavó la proteína no deseada y los residuos de la ECM de la columna y los GAG con carga negativa se eluyeron con NaCl 1 M. Un cromatograma típico (Fig. 1) muestra claramente el flujo continuo de una gran cantidad de residuos no adherentes, así como la elución limpia y ajustada de una gran cantidad de GAG de la preparación de MX. Por lo tanto, este resultado no solamente demuestra la purificación de GAG por este método, sino que también confirma la conservación de una gran cantidad de GAG en la ECM después del tratamiento con NH₄OH.

Desalinización

40

45

Prácticamente todos los métodos de cromatografía empleados para purificar y analizar los GAG en diversos estadios de procesamiento requieren elución con tampones de alta salinidad. Como las condiciones de alta salinidad interfieren con la cromatografía basada en afinidad, es necesario desalar muestras después de cada estadio de procesamiento. Este proceso se contempla en general con cromatografía de exclusión por tamaño. En estas condiciones moléculas mayores, tales como GAG, salen de la columna antes que las moléculas pequeñas, incluyendo la sal y pequeños residuos de GAG. La separación de GAG de la sal contaminante puede seguirse en el cromatograma resultante (Fig. 2) que también sirve para confirmar que las cadenas de GAG permanecieron intactas durante el proceso del tratamiento.

50

Sistema de columna de BMP2-HBP

Preparación de columna

Debido a los costes prohibitivos implicados en la creación de una columna de factores de crecimiento BMP2 con reactivos disponibles en el mercado, los inventores han utilizado en su lugar una preparación biotilada del dominio de unión a heparina conocido de BMP2 (BMP2-HBP). Este péptido se inmovilizó en una columna de Estreptavidina HP Hi-Trap (1 ml) para conservar específicamente cadenas de GAG con una afinidad por el péptido del dominio de unión a heparina específico.

60

65

En primer lugar se examinó cualquier afinidad de fondo que pudieran tener los GAG por la columna de estreptavidina desnuda procesando la fracción de GAG total (tGAG) frente a un lecho de columna desprovisto de BMP2-HBP (Fig. 3). Los resultados de los inventores han confirmado que las muestras de tGAG derivadas de MX no portaban ninguna afinidad inherente por la columna de estreptavidina. Los inventores han investigado adicionalmente dos métodos separados para exponer tGAG al BMP2-HBP para el fin de separar cadenas con una afinidad específica. El péptido se preincubó durante 30 min con 25 mg de tGAG antes de cargarlo en la columna de estreptavidina, o se cargó primero, procesándose los tGAG a través del lecho de columna a continuación.

La pre-incubación de tGAG con el BMP2-HBP reveló la incapacidad completa del péptido para asociarse con la columna (Fig. 4), mucho menos para mediar en cualquier aislamiento de GAG específicos. Cuando el péptido se cargó en la columna solo, sin embargo, su asociación con la columna fue absoluta, con efectivamente ninguna elución de péptido, incluso en condiciones de sal 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 con la columna, cuando se carga junto con tGAG, debido a impedimento estérico.

Capacidades de carga en columna

Como la proporción de tGAG que era probable que tuviera una afinidad relativa por BMP2-HBP se desconocía, se buscó en primer lugar normalizar las cantidades de tGAG cargados en la columna peptídica en cada ciclo para separación. Se prepararon columnas de Hi-Trap inmovilizando 1 mg del BMP2-HBP para la extracción de 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 experimentos futuros si se comprometería la estabilidad de la columna a lo largo del tiempo. La inestabilidad es un problema significativo con las columnas peptídicas, con influencia correspondiente en la consistencia. Los intentos iniciales de cargar 25 mg de tGAG en una columna acoplada con BMP2-HBP de 1 mg dieron como resultado una clara sobrecarga, como se observó mediante la absorbancia a 232 nm en el flujo continuo (Fig. 6). Aunque se observó un pico de elución significativo, tGAG con afinidad por el HBP se perdió en el flujo continuo debido a la sobrecarga. Esto se examinó volviendo a procesar el flujo continuo a través de la columna peptídica (Fig. 7). Esto dio como resultado un pico de GAG+ significativo (elución), lo que indica que el ciclo previo había saturado la columna.

La optimización adicional condujo a carga rutinaria de no más de 6 mg de tGAG en una columna de BMP2-HBP de 2 mg. Esto, como se demostró por el pico de flujo continuo (Fig. 8) y la ausencia de una fracción de unión positiva (Fig. 9), detuvo la sobrecarga de la columna. La extracción de los tGAG con una afinidad por el BMP-HBP de cada conjunto de muestras en un único pase permitió a los inventores, a su vez, separar fracciones GAG+ y GAG- más eficazmente.

Análisis de dominio de GAG

Especificidad de la cadena GAG+

Con el establecimiento de un protocolo normalizado, los inventores fueron capaces de aislar de forma reproducible fracciones GAG+ para análisis adicional.

Dada la estructura de dominio del heparán sulfato que media en la especificidad de unión por proteínas, es probable que las cadenas de GAG multidominio que se unen con la columna estén compuestas de hecho de una gran proporción de cadena con poca o ninguna afinidad específica por BMP2. De forma similar, es posible que las cadenas que aparecían GAG- pudieran de hecho contener dominios que portaran alguna afinidad por el BMP2-HBP. Para examinar estas posibilidades, fue necesario descomponer las cadenas de GAG en sus dominios componentes para un examen más exhaustivo.

La enzima heparinasa III (heparitinasa I) escinde cadenas de HS principalmente en las áreas que flanquean regiones altamente sulfatadas, liberando de este modo los dominios de asociación a proteínas, altamente cargados, que unen factores de crecimiento susceptibles, en este caso, el BMP2-HBP. Las fracciones tanto GAG+ como GAG- se expusieron a digestión por heparinasa, aunque ninguna de las fracciones mostró ningún cambio en su afinidad por el BMP2-HBP (Fig. 10).

Se realizó posteriormente digestión por heparinasa III de fracciones tanto GAG- como GAG+ de longitud completa, y ambos conjuntos de muestras digeridas se cargaron posteriormente en la columna BMP2-HBP para evaluar la afinidad de retención.

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

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

*Composición GAG+*Calibrado de GAG+ de longitud completa

5 Para examinar la composición de las fracciones GAG+ de la columna de BMP2-HTA, se examinó en primer lugar su tamaño promedio. Esto fue para asegurar que se estaban separando de hecho cadenas de GAG de longitud razonable, en lugar de pequeños fragmentos que no portaban ninguna afinidad específica. Aunque cualquier calibrado de las cadenas de GAG es problemática, debido a su conformación de tipo vara relativamente rígida, pueden realizarse varias suposiciones basándose en el radio de Stoke y la aparente esfericidad.

10 Se cargaron muestras GAG+ de longitud completa 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 que una gran proporción de moléculas GAG+ tenían un tamaño general aparente mayor de 20 kDa (Figura 13).

15 Se ha postulado que las cadenas de azúcares deben ser más largas de aproximadamente 10-14 anillos para potenciar una actividad biológica significativa para la familia de FGF de mitógenos. Con respecto al peso molecular aparente, una cadena de 14 disacáridos completamente sulfatados corresponde a aproximadamente 8,7 kDa. Como la mayoría de cadenas halladas en las muestras GAG+ muestran un peso molecular aparente > 20 kDa, es razonable suponer que la interacción que portan para el BMP2-HBP tiene alguna afinidad específica y no es el resultado de una interacción no específica general.

Especies de azúcar GAG+

25 Hay cinco familias de azúcares glucosaminoglucanos importantes: hialurano, queratán sulfato, dermatán sulfato, condroitín sulfato y heparán sulfato. De estas cinco, solamente el heparán sulfato, condroitín sulfato y dermatán sulfato tienen la capacidad de generar dominios sulfatados de forma variable que pueden codificar interacciones específicas con citocinas particulares tales como BMP2. La identificación del tipo de especies de azúcares aisladas usando la columna de BMP2-HBP fue de importancia crucial para este estudio, y se determinó usando una combinación 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.

30 Por lo tanto, las muestras de GAG retenidas en HBP de los inventores se incubaron con ácido nitroso durante 20 min antes de la separación en una columna de calibración de Biogel P10. El examen del cromatograma resultante reveló una degradación casi completa de todas las muestras de azúcares GAG+, lo como se midió por absorbancia a 232 nm y 226 nm (Figura 14). Este resultado sugiere fuertemente que las cadenas de azúcar de longitud completa aisladas específicamente contra el BMP2-HBP consisten principalmente en heparán sulfato, ya que otras cadenas de azúcares no están afectadas por despolimerización de ácido nitroso.

40 Aunque casi todas las cadenas GAG+ podrían degradarse de esta manera, se observó no obstante un pico pequeño a pesos moleculares mayores (> 20 kDa). Puede postularse que consiste en condroitín sulfatos, de los que CS-B (dermatán sulfato) y CS-E (condroitín-4,6-sulfato) demuestran complejidad de sulfatación similar a heparán sulfatos.

Análisis de especie de GAG

45 GAG específicos de BMP2-HBP (especies alternativas)

50 La degradación de cadenas GAG+ de longitud completa por exposición a ácido nitroso indicó claramente que la mayoría de las cadenas de azúcares GAG+ consistían en la especie de azúcares de heparán sulfato (Figura 14). La degradación de la muestra GAG+ no fue, sin embargo, completa como se observó por el pico restante en la región de alto peso molecular. La presencia de este pico apunta fuertemente a la posibilidad de otras especies de cadenas de azúcares, tales como condroitín o dermatán sulfato. Se buscó a continuación examinar la posible afinidad que los otros dos tipos de azúcares pueden tener por esta citocina examinando en primer lugar diversos azúcares de condroitina y dermatán disponibles en el mercado con respecto a su afinidad por la columna de BMP2-HBP.

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

60 Los cromatogramas que ilustran la afinidad de cada uno de los 3 tipos de cadenas de azúcares mostraron que solamente C4S (Figura 15) tenía alguna afinidad significativa por el péptido. Esta afinidad tomada junto con la falta de afinidad por la columna de BMP2-HBP observada para muestras tanto de C6S (Figura 16) como de DS (Figura 17), parece indicar que C4S tiene una interacción potencialmente significativa con el sitio de unión a heparina de BMP2.

65 Como cualquier interacción potencial entre condroitín sulfato y BMP2 aún no se ha caracterizado bien, estos

resultados han conducido a los inventores a cuestionar la validez de la cromatografía en columna como un control preciso de la interacción de BMP2/heparán. Para explorar adicionalmente la especificidad de la dinámica de interacción, se han ensayado varias especies de azúcares disponibles en el mercado con respecto a su afinidad con la columna. Estas incluyeron heparán sulfato, heparina de bajo peso molecular (heparina-LMW), heparina de alto peso molecular (heparina-HMW) y heparina-HMW tratada con heparinasa I.

Resulta interesante que ninguna de estas especies de GAG disponibles en el mercado parecía demostrar ninguna interacción específica con la columna peptídica. El heparán sulfato de riñón bovino tuvo muy poca afinidad (Figura 18), un comportamiento que se ha confirmado adicionalmente por su incapacidad para aumentar positivamente la proliferación celular mediada por FGF2 (datos no mostrados), como se observa en la presencia de HS2. Esta capacidad reducida de esta muestra de GAG para unirse con la columna puede ser como resultado de venderse en una forma relativamente no sulfatada.

Ninguna de las muestras de heparina ensayadas ha mostrado incluso una afinidad menor por la columna. Esto es de particular interés ya que el BMP2 en sí mismo se aisló históricamente por primera vez usando columnas de heparina. Para confirmar este resultado, se ensayaron heparinas tanto LMW (Figura 19) como HMW (Figura 20); ninguna mostró ninguna afinidad apreciable por la columna.

Como se ha supuesto que el péptido de BMP2-HBP relativamente pequeño puede haber tenido dificultad en el mantenimiento de su asociación con las moléculas de heparina mucho mayores, los inventores han predigerido a continuación las muestras de heparina-HMW usando heparinasa I. Estos fragmentos de heparina-HMW más pequeños se procesaron después sobre la columna de BMP2-HBP; este tratamiento no pareció mejorar, sin embargo, la capacidad de ninguna de las muestras de heparina para unirse con la columna peptídica (Figura 21).

Esta incapacidad de la columna peptídica para mostrar cualquier interacción específica con cualquiera de las diversas preparaciones de heparina era algo inesperado, debido a que el BMP2 se aislaba convencionalmente mediante afinidad por heparina. Es posible, sin embargo, que este pueda ser un resultado de la inversión del orden de interacción "receptor-ligando"; en este caso el BMP2-HBP representó 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 niega rápidamente cualquier afinidad con tensión salina/de flujo.

CONCLUSIONES

El uso de un sustrato de ECM derivado de preosteoblasto proporcionó a los inventores un modelo útil para simular la actividad de GAG asociados con ECM, secretados de forma nativa, en relación con dicha osteoinducción. Aunque numerosos estudios previos han examinado el papel que esta interacción nativa tiene en la modulación de la actividad de BMP2, esto se ha realizado habitualmente al nivel de la citocina, en lugar de con la intención de explorar la especificidad de secuencia de los GAG biomoduladores.

Por lo tanto se ha buscado aprovechar la disponibilidad de GAG secretado de forma nativa en el sustrato de MX y su potencial de interacción directa, específica de secuencia y modulación de compromiso de mioblastos C2C12 inducidos por BMP2-al linaje osteogénico.

Intercambio aniónico

El uso de este patrón particular y protocolo bien caracterizado proporcionó a los inventores pruebas concluyentes de la accesibilidad de GAG del sustrato de MX tratado con NH₄OH. Las preocupaciones iniciales de los inventores se centraron en torno al tratamiento químico riguroso usado para lisar los componentes celulares de la ECM, y que esto también puede haber dado como resultado la separación de la mayoría de GAG de la ECM. Sin embargo, el pico de alta afinidad, significativo, observado en la cromatografía de intercambio aniónico ilustra claramente la retención de una gran cantidad de GAG dentro del sustrato de MX. Aunque 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 está entre las moléculas con más carga negativa secretadas por células.

Sistema de columna de BMP2-HBP

Investigaciones previas sobre el papel funcional del péptido de unión a heparina de BMP2 ha proporcionado a los inventores una herramienta útil para investigar la interacción potencialmente específica que BMP2 tiene con los GAG. Esta cadena individual de aminoácidos, localizada en el extremo N-terminal de cada monómero BMP2, parece ser únicamente responsable de la mediación de la afinidad de BMP2 por GAG.

Los inventores han investigado por lo tanto el uso de esta región de la molécula de BMP2 como un "cebo" de ligando en intentos de retener esas cadenas de GAG que portaban afinidad relativa por la citocina. El uso del BMP2-HBP dio como resultado de esta manera una retención significativa de HS en la columna peptídica (GAG+).

Preparación de columna

Usando un HBP biotinilado N-terminal los inventores prepararon una columna de cromatografía de afinidad de BMP2-HBP, y fueron capaces de retener con éxito muestras de GAG que eran candidatas al control del homodímero de BMP2 nativo. Las preparaciones iniciales de la columna destacaron algunos problemas interesantes. Las preparaciones de BMP2-HBP biotinilado que se premezclaron con tGAG mostraron una incapacidad para unirse con la columna. Como ensayos posteriores han mostrado que el BMP2-HBP se unía fácilmente con la columna de estreptavidina cuando se cargaba por sí sola este resultado indicó que los GAG interferían con la capacidad del sitio de biotinilación del péptido para asociarse con la columna de estreptavidina. Los tGAG en sí mismos no portaban ninguna afinidad por la estreptavidina, lo que indica que la interacción directa con el BMP2-HBP, posiblemente mediante impedimento estérico, era responsable de esto.

Optimización de columna

Sin ninguna información directa que permitiera a los inventores estimar las capacidades de unión de azúcares GAG+ en sus muestras, era necesario optimizar la columna peptídica para asegurar que la carga de muestra excesiva no conduciría a saturación de columna y posterior pérdida de muestras. Esto implicó inicialmente la saturación intencionada de la columna para examinar la capacidad de unión de una cantidad conocida de BMP2-HBP. Incluso con una gran cantidad de tGAG el péptido era capaz de conservar la mayoría de cadenas de azúcares GAG+. En estas condiciones tan poco como 1 mg de BMP2-HBP fue capaz de conservar completamente todas las cadenas GAG+ en un periodo de dos ciclos. La columna parecía por lo tanto "simular" una verdadera columna de factor de crecimiento de BMP2 y proporcionar un modo extremadamente eficaz de extraer las muestras GAG+.

La optimización de columnas basadas en péptidos para el aislamiento de GAG específico es un procedimiento complejo que varía en gran medida dependiendo del tamaño y las características químicas individuales de la proteína usada. Estudios previos, que utilizan columnas de factor de crecimiento FGF-1 y 2 (Turnbull y Nurcombe, comunicación personal), también han mostrado una necesidad significativa de mantenimiento de columna continuo y tiempos de vida de columna viables cortos. Estos estudios demuestran la naturaleza laboriosa del trabajo con columnas peptídicas y el cuidado que debe tenerse en optimizar correctamente este modo de sistema. Desafortunadamente, aunque existen otros sistemas para el análisis de interacciones de proteína-GAG específicas, estos carecen en general de la capacidad para aislar suficientes cantidades de GAG para análisis adicional, haciéndolos inapropiados para el ciclo de estudio pretendido por los inventores.

Análisis de dominio de GAG

Los patrones de sulfatación de GAG, se concentran frecuentemente, particularmente en el caso del heparán sulfato (HS), en dominios de alta sulfatación que están intercalados por regiones de poca sulfatación. Este agrupamiento 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 única molécula de azúcar se una potencialmente a diversas dianas diferentes, y que establezca la interacción entre estas, como se ve en el sistema de FGF. Las excepciones a este modelo propuesto para interacciones de HS-ligando incluyen la interacción entre interferón gamma (IFN γ) y heparán sulfato. En este caso la interacción entre el GAG e IFN γ conduce a una potencia aumentada de la citocina. IFN γ que permanece disociado de GAG locales se procesa rápidamente en una forma inactiva, evitando de este modo su señalización en áreas inapropiadas después de la difusión. IFN γ también presenta cuatro dominios de unión a heparina separados, cada uno con una secuencia diferente, un hallazgo no poco habitual para proteínas de unión a heparina. Sin embargo, se ha mostrado que solo dos dominios hallados inmediatamente en el extremo C-terminal de la proteína median en las características de unión a heparina de los IFN γ . Resulta importante que el análisis de secuencia de la secuencia de HS con afinidad específica por estos dos sitios de unión a heparina de IFN γ reveló una diferencia interesante en comparación con el modelo observado habitualmente de interacción de HS-ligando. En este caso, se descubrió que la secuencia de HS responsable de la unión con IFN γ estaba compuesta de una región predominantemente N-acetilada, que portaba poca sulfatación. Esta región se flanqueó por dos regiones N-sulfatadas pequeñas. Esto difiere significativamente del sistema observado en FGF, en el que los patrones de sulfatación en dominios de NS son responsables de la mediación en la interacción entre FGF y HS. En años recientes, este tipo de interacción se ha observado en numerosos otros sistemas, tales como PDGF, IL-8 y endostatina. El descubrimiento de este tipo de interacción con HS, como se observa en estas citocinas, puede ser capaz de explicar la bioactividad observada en hialuronano, que no porta patrones de sulfatación en ningún punto a lo largo de su cadena y aun así tiene la capacidad de modular la actividad de factores tales como NF-KB.

Estas interacciones observadas entre ligandos y GAG, en particular del IFN γ , difieren significativamente con el modo de interacción propuesto, y el observado por los inventores, entre HS y BMP2. El dominio de unión a heparina N-terminal, individual de BMP2 no muestra ninguna estructura secundaria y parece interactuar con HS solamente basándose en la carga. Aunque no se ha realizado un análisis de secuencia en profundidad de HS que se une con esta secuencia peptídica, su necesidad de eluirse en condiciones de NaCl aproximadamente 300 mM condujo a los inventores a sospechar la presencia de un grado moderado de sulfatación, colocando de este modo esta interacción dentro del modelo convencional de patrones de sulfatación que median en interacciones específicas.

Especificidad de cadena GAG+

La disposición de patrones de sulfatación en dominios que dan a HS su capacidad para estabilizar interacciones proteómicas también da como resultado la posibilidad de que una cadena de azúcar GAG+ de suficiente longitud y complejidad pueda portar varios dominios que no tengan afinidad directa por el BMP2-HBP por sí mismos, debido a que portan una secuencia de sulfatación diferente. Por el contrario, también es posible que algunas cadenas de azúcares de longitud completa que se identificaba que tenían poca afinidad por el BMP2-HBP (GAG-) pudieran contener algunos dominios crípticos que sí portaban dicha afinidad.

En años recientes, se han publicado numerosos informes que proporcionan fuertes pruebas de un "código de sulfatación" dentro de estas cadenas de carbohidratos complejas. Aunque los detalles de este "código de sulfatación" siguen siendo difíciles de dilucidar, y la secuenciación de cadenas largas de carbohidratos sulfatados es un proceso complejo y que consume tiempo, se han propuesto varios modos posibles de interacción específica entre GAG y ligandos. Una observación en particular ha conducido a la caracterización de numerosos modelos de GAG-ligando; el agrupamiento de sulfatación en regiones discretas, o "dominios", a lo largo de la longitud de muchos tipos de GAG, tales como heparán sulfato. Resulta interesante que no se ha observado aún ningún molde para este fenómeno, y parece ser principalmente un resultado de la actividad temporal de las enzimas sulfotransferasas responsables de esta fase de síntesis de GAG.

Son herramientas particularmente útiles en el estudio de secuencias de GAG específicas varias heparina liasas que pueden usarse para examinar la despolimerización diana de cadenas de carbohidratos complejas, proporcionando de este modo información acerca de su estructura. Una heparán liasa particular, heparinasa III (heparitinasa), escinde cadenas de heparina sulfato en sitios que flanquean los dominios altamente sulfatados que pueden aparecer en cadenas de heparán sulfato. Por lo tanto, usando esta enzima, es posible liberar estas regiones potencialmente activas de las cadenas de azúcar de longitud completa y separarlas, si actúan como dominios individuales, mediante cromatografía de afinidad, de regiones sin afinidad específica por el BMP2-HBP.

Es importante observar que, en el caso de interacciones de GAG-ligando, la afinidad por secuencia no garantiza necesariamente la bioactividad. El modo de actividad mediado por GAG durante su asociación con sus diversos ligandos difiere en gran medida dependiendo del sistema. En algunos casos en los que la cadena de azúcar es responsable de la prolongación de interacción proteína-proteína mediante estabilización de estructuras proteicas terciarias, tales como las que se encuentran entre FGF y su receptor, y la interacción entre HGF/SF y Met, pueden estar implicadas múltiples regiones de sulfatación discretas en la mediación de la bioactividad pretendida de la cadena de azúcar. En dichos casos el aislamiento de dominio sulfatados individuales de una cadena de carbohidratos de longitud completa puede, de hecho, dar como resultado una inhibición de la bioactividad de azúcar ya que aunque cada "fragmento de dominio" aún se une con su diana pretendida es incapaz de mediar en el efecto biológico pretendido de una cadena de carbohidratos de longitud completa combinada.

Resulta interesante que esta característica particular de interacciones de GAG-ligando sea precisamente lo que hace a este modo de enfoque útil para modular la actividad de BMP2. El modelo propuesto para modulación de GAG de la bioactividad de BMP2 implica la inmovilización de la citocina con GAG en la ECM o en las superficies celulares. En este tipo de sistema la aplicación de GAG exógenos específicos del dominio de unión a heparina de BMP2 evitaría esta interacción, aumentando la señalización mediada por BMP2 a corto plazo, similar al efecto observado durante la adición de heparina soluble. Aunque hay algún indicio de que esta manera de interacción continuaría protegiendo la citocina de degradación proteolítica, la deslocalización de BMP2 de su región pretendida de bioactividad tiene el potencial de influir negativamente en la eficacia de las citocinas a largo plazo.

Ensayos de control de las cadenas GAG+ y GAG- de longitud completa de los inventores dieron como resultado perfiles similares a los observados durante su separación primaria. El análisis de cadenas de GAG+ y GAG- después del tratamiento con heparinasa III, sin embargo, proporcionó resultados sorprendentes. La digestión de cadenas GAG+ no parecía generar fragmentos separables basándose en la afinidad sencilla por el BMP2-HBP. Además, la digestión cadenas GAG- de longitud completa no produjo liberación de dominios positivos de las cadenas de azúcares negativas. Existe alguna posibilidad de que la digestión enzimática no llegue a completarse. Sin embargo, el cromatograma resultante claramente mostró 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 glucosaminoglucanos a 232 nm está mediada por absorbancia de enlaces insaturados, tales como los formados durante la despolimerización enzimática, esto indica claramente que la digestión enzimática fue, de hecho, exitosa.

Las implicaciones de este resultado son algo inusuales. Estos datos sugieren que las cadenas de GAG no se sintetizan solamente por células para interactuar específicamente con BMP2, sino que, en el caso de células MC3T3, estas cadenas de azúcar portan varias repeticiones de secuencia específicas para aspectos de metabolismo de BMP2. El hecho de que BMP2 es un factor extremadamente potente puede ofrecer una explicación de esta observación. Los efectos de BMP2 en la osteoinducción de células progenitoras mesenquimales están bien documentados, como lo está su capacidad para inducir la formación de hueso ectópico en células que están aún más alejadas del linaje osteogénico. Dada esta potencia, se sabe que la señalización aberrante de BMP2 tiene consecuencias deletéreas tanto para la curación como en el desarrollo. Es posible que numerosas repeticiones de la secuencia de interacción de BMP2-HBP en GAG de pre-osteoblastos estén diseñadas para asegurar una unión máxima, y por lo tanto la modulación, de la capacidad de esta citocina para inducir un destino celular alterado. Por el

contrario, las concentraciones extremadamente bajas de BMP2 producidas *in vivo* también pueden requerir este tipo de producción de cadena de azúcar para asegurar la retención de una concentración local suficiente, una observación apoyada por las concentraciones extremadamente altas de BMP2 requeridas *in vitro* para inducir la diferenciación osteogénica de células mioblásticas C2C12.

5 Es de particular interés el hecho de que esta repetición de dominios de unión a BMP2 se produce mediante una ruta de síntesis para la que no se ha dilucidado aún ningún molde o mecanismo de temporización. La precisión y reproducibilidad de dominios específicos de secuencia dentro de una única cadena de azúcar (a diferencia del agrupamiento aleatorio de dichos dominios con los que son contra otros ligandos) sugiere en gran medida que estas
10 células tienen, de hecho, capacidad para dirigir la generación de secuencias de azúcares específicas. El entendimiento actual de la estructura de HS implica la "edición" post-síntesis progresiva de la cadena de carbohidratos en la generación de regiones específicas de secuencia, con observaciones que apuntan a algún tipo de "molde" enzimático, por el que las concentraciones locales de sulfotransferasas particulares, así como otras
15 moléculas de interacción se usan para controlar directamente la generación de secuencias de azúcares específicas. El entendimiento actual de los inventores de este modo de síntesis específica se formula en gran medida basándose en numerosos estudios incluyendo los de Lindahl *et al.* que investigaron la interacción de alta afinidad entre antitrombina III y heparina, y los de Esko *et al.* que implican mutantes de células de ovario de hámster chino (CHO) con rutas de síntesis de GAG alteradas. Estos estudios, aunque varían significativamente en sus enfoques para el
20 análisis de GAG, apuntan todos hacia un sistema altamente conservado de síntesis de GAG específico, para la modulación dirigida de la actividad de citocinas y receptores. Resulta importante que estos estudios también sirven para explicar la generación potencial de dichas repeticiones de BMP2 como se observaron en el estudio de los inventores.

Constitución de GAG+

25 Tamaño de GAG+ de longitud completa

La bioactividad de cadenas de GAG individuales para FGF está estrechamente relacionada con la longitud de cadena de carbohidratos. Un enfoque habitual para evaluar la bioactividad de GAG es ensayar fragmentos de
30 dominio sulfatado cada vez más cortos y de este modo determinar la secuencia posible más corta requerida para mediar en la actividad observada.

Usando este enfoque los inventores examinaron en primer lugar las cadenas de azúcares GAG+ de longitud completa, y determinaron que eran de >20 kDa de tamaño, lo suficientemente largas para portar múltiples dominios
35 con afinidad por BMP2. Resulta interesante, que esta observación proporcionaba apoyo para la observación anterior de que las muestras GAG+ tratadas con heparinasa 3 mostraban múltiples repeticiones de segmentos de cadena de carbohidratos con una afinidad específica por BMP2, ya que una cadena de azúcar sulfatada de forma variable de este tamaño tiene la capacidad de portar numerosos dominios sulfatados.

40 Especies de azúcar GAG+

Con la mayoría de los cinco tipos de glucosaminoglucanos que constituyen el "glucoma" capaces de codificar las interacciones específicas observadas con BMP2, fue necesario dilucidar cuáles de estos tipos de GAG podrían estar
45 implicados en esta asociación específica. Aunque el candidato principal para esta interacción es un heparán sulfato, también se han identificado interacciones de factor de crecimiento análogas identificadas para condroitín y dermatán sulfatos.

El heparán sulfato puede despolimerizarse totalmente en sus componentes disacáridos con ácido nítrico. Esta característica particular, compartida con heparín y queratán sulfato, es esencial para el análisis de poblaciones de
50 GAG específicas. En el caso del análisis de los inventores de los constituyentes de carbohidratos de sus muestras GAG+, la degradación debida a ácido nítrico fue diagnóstico de heparán sulfato. Esta probabilidad se debe principalmente al mayor grado de su heparán sulfato de realización de patrón de carga mediante sulfatación en comparación con heparín o queratán sulfato. En última instancia, este patrón de carga es responsable de la interacción específica de BMP2 con HS.

55 El análisis de los inventores utilizando el protocolo de ácido nítrico ha mostrado una degradación completa del conjunto de muestras de GAG+ lo que indica que la mayoría de los azúcares en el conjunto de muestras GAG+ tenían de hecho enlaces 1,3, y, por lo tanto, eran heparán sulfato. Este resultado apoya las numerosas observaciones con respecto a la especificidad de las interacciones de citocinas de heparán sulfato, particularmente
60 la interacción que BMP2 muestra con heparina y HS.

Análisis de especies de GAG

GAG específicos de BMP2-HBP (especies alternativas)

65 El pico restante pequeño que se observó después de la degradación de muestras GAG+ por ácido nítrico apoya la

posibilidad de que otros GAG sulfatados que portan alguna afinidad específica para BMP2 pueden encontrarse en el conjunto de muestras de GAG+. Dado su entendimiento actual del papel de la sulfatación en la mediación de la interacción entre GAG y BMP2, las condroitinas y los dermatanes son los azúcares alternativos más probables para mostrar una interacción específica con BMP2 ya que estos muestran la mayor diversidad potencial en patrones de sulfatación.

Una metodología frecuentemente empleada para análisis de GAG incluye examinar el papel de las posiciones de sulfatación individuales en interacciones de GAG-ligando. Este método de análisis proporciona un indicio 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, ya que las diferentes especies de GAG solamente tienen el potencial de portar patrones de sulfatación específicos para su especie, esto puede ayudar a restringir los posibles candidatos de glucosaminoglucanos que pueden mostrar una afinidad por un ligando específico.

Para este fin se ha examinado la afinidad por el BMP2-HBP portado por cadenas de CS sulfatadas de forma variable, C4S y C6S, y DS convencional. Resulta interesante que solamente C4S portaba alguna afinidad significativa por el BMP2-HBP. Estos datos indican que es probable que la 4-*O*-sulfatación sea necesaria para que CS interactúe con el BMP2-HBP. Resulta interesante que el dermatán sulfato no mostró ninguna afinidad por el BMP2-HBP. Esta observación es de interés ya que DS es la única especie de CS que demuestra la diversidad de sulfatación similar a la de HS. Además, las observaciones de los inventores indican una posibilidad de que la epimerización de GlcA a IdoA en DS compromete la capacidad de este tipo de azúcar para unirse con el BMP2-HBP. Tanto C4S como DS son capaces de portar 4-*O*-sulfatación, aunque se conservaron solo cantidades pequeñas de DS en la columna en comparación con C4S. Como alternativa, esta falta de afinidad puede deberse simplemente a que este lote particular de DS no porta suficiente 4-*O*-sulfatación para mediar eficazmente en la unión con el BMP2-HBP. Resulta interesante que estas observaciones particulares parecen demostrar una interacción entre BMP2 y CS que porta 4-*O*-sulfatación. Aunque estudios previos han investigado el uso de interacciones de CS-BMP2 en sistemas de suministro de fármacos, no se sabe mucho acerca de ninguna interacción específica de secuencia entre especies de CS individuales y BMP2. Sin embargo, ya que las cadenas de HS están compuestas de unidades de disacáridos con enlaces 1,4, la 4-*O*-sulfatación observada responsable de las interacciones de CS-BMP2 no se encuentra en interacciones de HS-BMP2, lo que apunta a una interacción específica de secuencia no hallada en CS. Por lo tanto, es probable que el pico restante observado después del tratamiento con ácido nitroso pueda contener pequeñas cantidades de 4-*O*-sulfato que portan C4S o DS.

La investigación adicional reveló que ni HS comercial ni heparina mantenían ninguna afinidad significativa por la columna peptídica. El HS usado para este ensayo se obtuvo comercialmente de Sigma-Aldrich y se derivó del riñón bovino. Dado lo que se conoce acerca de la especificidad tisular de HS es posible que este HS disponible en el mercado, aislado de fuentes de riñón bovino, portara secuencias de carbohidratos insignificantes requeridas para mediar específicamente en una interacción con BMP2. De forma similar ni la heparina LMW ni la HMW mostró ninguna afinidad por la columna peptídica. La heparina usada para este análisis también se obtuvo de Sigma-Aldrich y derivó de la mucosa intestinal porcina.

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

Una posibilidad adicional para esta falta de interacción entre la columna peptídica y la heparina se debe a la diferencia de los pesos moleculares entre las dos moléculas. El BMP2-HBP pequeño unido a la columna puede tener dificultad para mantener su asociación con la cadena de heparina muy sulfatada, mayor. La incapacidad de la heparina escindida por heparinasa para unirse con la columna, sin embargo, parece indicar que los efectos estéricos del uso de heparina de longitud completa de la columna no eran responsables exclusivamente de la alteración de la interacción potencial entre los azúcares y el BMP2-HBP. No hay ninguna razón inmediatamente aparente para esta incapacidad de la heparina comercial de asociarse con la columna de BMP2-HBP, aunque puede postularse que la separación espacial adicional del BMP2-HBP de su perla asociada mediante cadenas espaciadoras puede ayudar a aliviar este problema.

SUMARIO

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

Los resultados de los inventores han implicado al dermatán sulfato en la mediación de la mayoría de la afinidad que el BMP2 tiene por la ECM de preosteoblastos, una interacción que se ha reconocido crecientemente que es

responsable de la modulación de la actividad de BMP2. Además, la investigación de los inventores acerca de la estructura probable de los GAG residentes en ECM aislados basándose en su afinidad por el sitio de unión a heparina de BMP2 ha producido un resultado sorprendente.

- 5 Los datos de los inventores indican que las cadenas de BMP2 GAG+ de longitud completa no consisten en dominios individuales con afinidad específica por BMP2 intercalado con regiones de poca o ninguna afinidad por el factor. En su lugar, los resultados de los inventores implican que estas cadenas GAG+ consisten en múltiples repeticiones de dominio de unión a BMP2. Este resultado es sorprendente en varios niveles. En primer lugar, la repetición requerida para cumplir esta observación sobre la longitud completa de una cadena de carbohidratos >20 kDa apunta a la presencia de algún modo de molde sintético. De hecho, aunque estudios previos han sido incapaces de derivar un molde para el ensamblaje de cadenas de GAG específicas de tejido, el propio hecho de que exista dicha especificidad apoya la presencia de un sistema basado en molde. Aunque no se ha dilucidado ningún molde genómico para este proceso, existe alguna posibilidad de un molde proteómico, quizás enzimático.
- 10
- 15 En segundo lugar, esta observación proporciona algunas pruebas acerca de la importancia de la interacción entre BMP2 y GAG. Pueden requerirse múltiples repeticiones del sitio de afinidad de BMP2 a lo largo de la longitud de la cadena de carbohidratos para asegurar la unión máxima de BMP2 con la ECM. Se ha mostrado que esta asociación en particular alarga significativamente la semivida del factor, así como es probablemente responsable del mantenimiento de una concentración significativa para mantener la señalización. Como alternativa, algunos estudios han propuesto un modelo por el que se inhibe espacialmente la interacción de BMP2 con sus receptores debido a las interacciones con GAG basados en ECM. En este escenario en particular la repetición de las secuencias de afinidad de BMP2 asegurarían una unión máxima del factor, reduciendo de este modo la probabilidad de que interactuara con sus receptores.
- 20
- 25 Los resultados acumulados de los inventores han indicado que este sistema para el aislamiento de GAG de la ECM es viable y probablemente produzca cadenas de GAG que tengan una afinidad específica por BMP2.

Este estudio apoya hallazgos previos con respecto a la interacción entre GAG y BMP2. Aunque la prevención de la asociación de BMP2 con la ECM *in vitro* mediante la adición de GAG+ exógeno parece aumentar la señalización de BMP2 y regula positivamente la expresión de genes osteogénicos, también se han presentado observaciones que indican lo contrario. En estos estudios, el examen *in vivo* de la modulación de BMP2 mediante el HBP ha mostrado una mejora definida en la osteogénesis a largo plazo cuando se aumentó la asociación con GAG de ECM. Es posible que esa interacción desempeñe un papel importante en el mantenimiento de concentraciones locales evitando que el factor se difunda lejos de sus sitios de actividad primaria. A la luz de estos estudios y de las propias observaciones de los inventores, los inventores han propuesto que la actividad de BMP2 está regulada tanto positiva como negativamente por su asociación con los GAG. La regulación negativa puede producirse precisamente mediante el modelo propuesto por Katagiri y colaboradores, por el que la conservación de BMP2 en la ECM, lejos de sus receptores, conduce a una regulación negativa de la señalización de BMP2. Sin embargo, las células que requieren señalización por este factor pueden secretar potencialmente diversas enzimas para remodelar las cadenas de azúcar extracelulares, tales como sulfatasas y heparinasas, para "recortar" GAG que conservan BMP2 en la ECM, liberando de este modo el factor y permitiéndole que señalice, lo que conduce a que la interacción de BMP2-ECM se convierta en última instancia en una de mantenimiento positivo de la actividad de citocinas. Como alternativa, la regulación negativa de BMP2 por GAG de superficie celular, puede ser mediante la internacionalización de cadenas de GAG con sus moléculas de BMP2 asociadas, como se ha observado por Jiao y colaboradores.

30

35

40

45

Estos estudios previos, junto con las propias observaciones de los inventores, ha conducido a los inventores a concluir que la interacción específica de secuencia entre BMP2 y heparín sulfato representa un mecanismo de control intrincado que tiene la capacidad de regular tanto positiva como negativamente la señalización de BMP2. Fisiológicamente esta interacción es responsable de imponer respuestas dependientes de contexto a esta citocina potente con respecto a muchas facetas del desarrollo embrionario, el compromiso de los precursores y curación de heridas.

50

Ejemplo 2 – Purificación de HS específico de péptido BMP2

55

Los inventores han usado un péptido que tiene propiedades de unión a heparina de la secuencia de BMP2 madura para identificar un nuevo HS que se une con el péptido.

Secuencia de aminoácidos de BMP2 madura:

60

QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHL
NSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTELSAISMLYLDENEKVVLKKNYQDMVVEGCG
CR [SEC ID N°: 4]

65 Secuencia de aminoácidos del péptido de unión a heparina:

QAKHKQRKRLKSSCKRHP [SEC ID Nº: 1]

5 Para replicar la presentación natural del sitio de unión a heparina los inventores biotinilaron el péptido en su extremo C terminal y mantuvieron la prolina (P) para mejorar la flexibilidad/accesibilidad del péptido una vez que se hubo unido con la columna de estreptavidina.

Aislamiento de HS específico de péptido BMP2

10 Los materiales usados incluyeron una columna de Estreptavidina acoplada a péptido-BMP2, Columna de Desalación HiPrep (GE Healthcare), PBS 20 mM + NaCl 150 mM (Tampón Bajo en Salinidad), PBS 20 mM + NaCl 1,5 M (Tampón de Alta Salinidad), Agua de uso en HPLC (Sigma), sistema de Cromatografía Biologic-Duoflow (Bio-Rad) y un Aparato de Liofilización.

15 La columna se equilibró con tampón Bajo en Salinidad y 1 mg de HS Sigma (H9902) se disolvió en tampón de baja salinidad y se pasó a través de la columna de Estreptavidina-BMP2. Se retiraron componentes de medios no unidos de la columna lavando tampón de baja salinidad (PBS 20 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM) hasta que la absorbancia del efluente a 232 nm volvió casi a cero. Se eluyó HS unido a la matriz con tampón de alta salinidad (PBS 20 mM, pH 7,2, NaCl 1,5 mM). Se agruparon fracciones pico y se liofilizaron durante 48 h.

20 Se aplicó 1 mg de HS a la columna y se lavó con tampón de PBS 20 mM que contenía una baja concentración de NaCl (150 mM). Después de lavar con tampón de baja salinidad, el HS unido se eluyó con tampón de PBS 20 mM que contenía una alta concentración de NaCl (1,5 M). Se recogieron picos que representaban fracciones conservadas (controladas a 232 nm) y se sometieron a desalación adicional.

25 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 BMP-2

30 C2C12 son células madre mesenquimales de ratón que muestran normalmente diferenciación miogénica pero capaces de dirigirse en el linaje osteogénico con complementación de BMP-2 en el pase 3. Se mantuvieron células C2C12 en el pase 3 en DMEM con glucosa 1000 g/l (glucosa baja), FCS 10 %, P/S 1 % y sin L-glutamina (medio de mantenimiento).

35 Se usó DMEM con glucosa 1000 g/l (glucosa baja), FCS 5 %, P/S 1 % y sin L-glutamina como un medio de diferenciación.

Efecto de BMP-2 en la osteogénesis

40 Se evaluaron los efectos de BMP-2 exógeno en osteogénesis midiendo los niveles de expresión de marcadores osteogénicos (osteocalcina, osterix, Runx2).

45 Mediante el ensayo del efecto de la adición de diferentes cantidades (100 ng/ml y 300 ng/ml) de BMP2 a las células se observó una reducción 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 punto temporal para ensayos futuros, ya que cualquier cambio sería fácilmente observable.

Materiales y Métodos

50 Se usaron células C2C12 en el pase 3. Las células se mantuvieron en Nitrógeno líquido en el Pase 3 con 1×10^6 células/vial. Una vez que se tomaron células del Nitrógeno líquido, se añadieron 500 μ l de medio de cultivo, se pipetearon arriba y abajo para volver a congelar las células y se añadieron inmediatamente 15 ml de medio de cultivo.

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

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

60 Las células se contaron de la siguiente manera. El medio se aspiró/descartó en primer lugar; se añadieron 15 ml de PBS, se descartó el PBS y se añadieron 3 ml de tripsina, se incubó a 37 °C durante 5 min para despegar las células del matraz. Se añadieron 9 ml de medio de cultivo para neutralizar la tripsina. Se usó GUAVA para determinar la cantidad de células para siembra celular posterior en las placas experimentales. Por ejemplo, para 3 conjuntos de placas de 12 pocillos 30.000 células \times 36 pocillos \times 3,7 cm^2 = 4.000.000 de células. Se diluyeron las células a partir de la reserva y se añadió la cantidad deseada de medio de cultivo para siembra de células (requiriendo cada pocillo

65

500 µl de medio con 30.000 células).

Para preparar la reserva de BMP2 se resuspendieron 10 µg de rhBMP2 (Proteína Morfogenética del Hueso 2) en 100 µl de HCl 4 mM / BSA 0,1 %.

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

15 Se realizaron experimentos de RT (transcripción inversa) de la siguiente manera. Se mezcló lo siguiente en un tubo de PCR: Cebador Aleatorio (0,1 µl), DNTP (1 µl), ARN (250/500 ng), H₂O sin Rnasa (ajustado hasta un volumen final de 13 µl). Se incubó a 65 °C durante 5 min. Se incubó en hielo durante al menos 1 min. Se recogieron los contenidos y se centrifugaron brevemente antes de añadir: Tampón de 1ª Cadena (4 µl), DTT (1 µl), RnasaOUT (1 µl), SSIII Inversa (1 µl). Se ajustó hasta un volumen final de 20 µl. Se mezcló pipeteando arriba y 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.

20 Se realizaron experimentos de transcripción inversa dos veces en días separados y los productos de PCR se agruparon entre sí y se diluyeron hasta una concentración final de 2,5 ng/µl para PCR en Tiempo Real posterior.

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

30 Efecto de HS GAG+ específico de BMP-2 en osteogénesis

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

40 *Materiales y métodos*

Se sembraron células a 30.000 células/cm² en medio de mantenimiento y se dejó que se unieran durante una noche. Al día siguiente se cambiaron a medio de diferenciación con:

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

Los hidratos de carbono y BMP2 se mezclaron entre sí en el volumen más pequeño posible y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su adición a los medios y en las células.

55 Después de 5 días, se extrajo ARN usando los kits de Macherey-Nagel y se realizó Transcripción Inversa.

Como se muestra en las Figs. 30-33, el Heparán sulfato de mucosa porcina (HS Total) puede aumentar la actividad de BMP-2 (mostrado a través de aumentos inducidos por GAG+ en la expresión de Fosfatasa Alcalina, osterix, BspII y Runx2) y esta actividad está contenida dentro de la fracción que se une a BMP2 (GAG Positivo). Esto significa que se puede aislar la fracción de potenciación de BMP de un HS comercial pasándolo en la columna peptídica BMP-HBD.

Ejemplo 4

Se expandieron células preosteoblásticas MC3T3-E1 (s14) (una línea celular de fibroblastos de calvaria de embrión

- de ratón establecida de la calvaria de un embrión) en medio α MEM complementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y Penicilina/Estreptomicina cada 72 horas hasta que se generaron suficientes células para siembra en placas. Las células se diferenciaron sembrando en placas a 5×10^4 células/cm² en medio α MEM complementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 25 μ g/ml, β -glicerol fosfato 10 mM y
- 5 Penicilina/Estreptomicina. El medio se cambió cada 72 horas durante 8 días momento en el cual se recogieron las células y el medio. El medio se conservó y se clarificó por centrifugación a alta velocidad y filtración a través de un filtro de 0,4 μ m. La capa celular se alteró usando un raspador celular y un tampón de extracción que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y Mg²⁺), CHAPS 1 %, Urea 8 M y NaN₃ al 0,02 %.
- 10 En todas los estadios (a no ser que se indique de otro modo), las muestras se clarificaron antes de cargarlas en sistemas de columna. Este proceso incluyó centrifugación a alta velocidad a 5000 g durante 30 min, y filtración a través de un filtro de jeringa de 0,4 μ m. Las muestras se clarificaron siempre directamente antes de cargar a través del sistema de columna para evitar la formación de precipitados en soluciones estancadas.
- 15 Se usó cromatografía de intercambio aniónico para aislar fracciones de proteoglicanosaminoglucano (PGAG) de las muestras tanto de medio como de capa celular. En cada caso, las muestras de medio o capa celular se procesaron a través de una columna XK 26 de Pharmacia (56-1053-34) empaquetada con Perlas de Intercambio Aniónico Cpto Q (Biorad) a un caudal de 5 ml/min en un sistema de Biologic DuoFlow (Biorad) usando un detector de UV-Vis QuadTec. Las muestras se cargaron en un tampón de baja salinidad que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y
- 20 Mg²⁺), NaCl 100 mM, NaN₃ 0,02 % a pH 7,3. Las muestras se eluyeron en un tampón de alta salinidad que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y Mg²⁺), NaCl 850 mM y NaN₃ 0,02 % a pH 7,3. Las fracciones relevantes se recogieron y agruparon en una única muestra de PGAG y se liofilizaron en preparación para desalación.
- 25 La muestra de PGAG se desaló mediante cuatro columnas Pharmacia HiPre™ 26/10 unidas secuencialmente (17-5087-01) a un caudal de 10 ml/min en un sistema Biologic DuoFlow (Biorad) usando un detector de UV-Vis QuadTec. Las fracciones relevantes se recogieron y se agruparon en un único conjunto de muestras y se liofilizaron en preparación de tratamiento adicional.
- 30 En la cuarta etapa, el conjunto de muestras de PGAG obtenido del procedimiento de desalación se sometió a un tratamiento con pronasa y neuraminidasa, para retirar por digestión proteínas centrales y para liberar posteriormente cadenas de GAG. A este respecto, se resuspendieron muestras de PGAG liofilizadas en un volumen mínimo de acetato sódico 25 mM (pH 5,0) y se clarificaron por filtración a través de un filtro de jeringa de 0,4 μ m. El volumen de muestra total se distribuyó en tubos de vidrio de 10 ml en alícuotas de 500 μ l. A esta alícuota se añadieron 500 μ l de neuraminidasa 1 mg/ml antes de incubarse la mezcla durante 4 horas a 37 °C. Después de la incubación, se
- 35 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, reconstituída 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.
- 40 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) empaquetada con Perlas de Intercambio Aniónico Cpto Q (Biorad) a un caudal de 5 ml/min en un sistema Biologic DuoFlow (Biorad) usando un detector de UV-Vis QuadTec. A este respecto, la muestra se cargó en un tampón de baja salinidad que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y Mg²⁺) y
- 45 NaN₃ 0,02 % a pH 7,3. La muestra se eluyó en un tampón de alta salinidad que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y Mg²⁺), NaCl 850 mM y NaN₃ 0,02 % a pH 7,3. Las fracciones relevantes se agruparon, se liofilizaron y se desalaron según el protocolo anteriormente mencionado para desalar la muestra de PGAG.
- 50 El péptido biotinilado en el extremo N terminal (1 mg), correspondiente al dominio de unión a heparina de BMP2, y que comprendía una secuencia de aminoácidos representada por QAKHKQRKRLKSSCKRH [SEC ID N°: 17], se mezcló con tampón de baja salinidad que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y Mg²⁺). La mezcla se eluyó a través de una columna empaquetada con una matriz de resina recubierta con estreptavidina. La columna se expuso después a un tampón de alta salinidad que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y Mg²⁺), NaCl 850 mM y NaN₃ 0,02 % a pH 7,3 para evaluar si, en esas condiciones, el péptido se había unido con seguridad a la matriz. No se observó pérdida sustancial de péptido de la columna. La columna se lavó posteriormente con el tampón de baja salinidad en
- 55 preparación de la carga de muestra.
- 60 La mezcla de GAG (2 mg), aislada usando el procedimiento perfilado en el Ejemplo 1, se suspendió en tampón de fosfato sódico de baja salinidad (1 ml), y se cargó en la columna peptídica del Ejemplo 2. La muestra se eluyó con un tampón de baja salinidad que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y Mg²⁺). Se observó un pico correspondiente a GAG con afinidad por BMP2 insignificante en la traza del detector de UV-Vis. Las fracciones de columna responsables de dar lugar a este pico se combinaron. Estas fracciones se conocen como "GAG-" indicando el signo menos la falta de afinidad con la columna. Cuando resultó evidente a partir del detector de UV-Vis que la traza se había aplanado hasta la línea basal, y que no se eluía más oligosacárido, se cambió el disolvente de elución a un
- 65 tampón de alta salinidad que contenía PBS (NaCl 150 mM sin Ca²⁺ y Mg²⁺), NaCl 850 mM y NaN₃ 0,02 % a pH 7,3. Después de este cambio en el disolvente de elución, se observó un pico correspondiente a GAG específicos de

BMP2 en la traza del detector de UV-Vis. Las fracciones de columna responsables de dar lugar a este pico se combinaron. Estas fracciones se conocen como "GAG+", indicando el signo más la presencia de afinidad con la columna. En el caso de compuestos GAG obtenidos de células preosteoblásticas, la fracción GAG+ representaba el 10 % de la mezcla de GAG general.

5

Ejemplo 5

La adición de BMP2 tiene una capacidad claramente definida para inducir diferenciación osteogénica en mioblastos C2C12. De forma similar, se ha mostrado que la pre-incubación de BMP2 con heparina extiende tanto la semivida de las citocinas como su potencia inmediata *in vitro*. En el presente documento se ha examinado la capacidad de fracciones GAG+ y GAG- para aumentar la osteoinducción de las células C2C12 *in vitro* por BMP2.

10

15

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 osteocalcina indicó que la muestra GAG+ era capaz de potenciar BMP-2 para efectuar la expresión del gen de osteocalcina a niveles de BMP-2 muy por debajo de los usados en la actualidad en la terapia (300 ng/ml). Los resultados de este ensayo (incluyendo los p valores calculados y errores) se representan gráficamente en la Figura 34 en la que las condiciones experimentales para cada "condición de cultivo" son las siguientes:

20

1. Células control, sin BMP2 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 ng/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

25

30

Resulta interesante que, aunque 1000 ng/ml de GAG+ es capaz de aumentar significativamente la expresión de osteocalcina mediada por BMP2, la adición de concentraciones de GAG+ por debajo de 1000 ng/ml parece inhibir progresivamente esta expresión. Además, la adición de suficiente GAG+ también consiguió conducir la inducción de osteocalcina por 50 ng/ml de BMP2 por encima de la de 100 ng/ml de BMP2 por sí sola, lo que indica la potencia de esta interacción.

35

40

Este análisis basado en cultivo celular demostró que la adición de GAG+ a cultivos osteogénicos C2C12 junto con BMP2 daba como resultado una regulación positiva significativa de la expresión de osteocalcina que indicaba un aumento de la eficacia de señalización de BMP2. Este resultado apoya la asociación específica de cadenas GAG+ con BMP2, bloqueando de este modo el BMP2-HBP y evitando su asociación con 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. Resulta interesante que la adición de concentraciones de GAG+ que quedan por debajo de 1000 ng/ml parece tener un efecto inicialmente antagonista en la señalización de BMP2.

45

50

55

60

65

Una posible hipótesis para explicar esta observación gira en torno a la capacidad de un número dado de moléculas de GAG+ para unirse con un cierto 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 serán capaces de asociarse con la ECM, localizándose de este modo lejos de sus receptores afines y siendo incapaces de iniciar inmediatamente la señalización. La disociación posterior de BMP2 de la ECM, tanto espontáneamente como por alteración enzimática dirigida de sus cadenas de GAG+ asociadas, tiene la capacidad de inducir señalización de BMP2 a largo plazo. La adición de un gran número de moléculas GAG+ a este sistema, como sucede en muestras complementadas con 1000 ng/ml de GAG+, permite que la mayoría de las moléculas de BMP2 permanezcan en solución donde están libres para mediar con dimerización de receptores e inducir la señalización corriente abajo. Ambos de estos procesos de interacción de citocinas/receptores requieren probablemente umbrales de concentración particulares para mantener un nivel eficaz de señalización. En condiciones de cultivo que contienen 50 ng/ml de BMP2, la adición de concentraciones bajas de GAG+ permite que una parte de la citocina disponible permanezca soluble mientras que la parte restante se asocia con la ECM. En estas condiciones solamente una pequeña cantidad de BMP2 sigue siendo soluble pero, debido a su baja concentración, se hace altamente difusa en el medio lo que conduce a señalización insignificante. De forma similar, debido a una parte del BMP2 que permanece solubilizado, puede encontrarse una cantidad reducida de BMP2 en la ECM, dando como resultado una reducción en la señalización de BMP2 liberado de la ECM por actividad celular directa. Sin embargo, en condiciones de cultivo que contienen 100 ng/ml de BMP2 los efectos combinados de BMP2 soluble y basado en ECM son, con la adición de 100 ng/ml de GAG+, suficientes para inducir la señalización de BMP2 similar a niveles de control. Sin estudios adicionales, sin embargo, la dinámica implicada en la señalización de BMP2/GAG+ sigue sin estar clara. Estudios futuros que utilizan la resonancia de plasmón superficial pueden ayudar a dilucidar la eficacia de las interacciones BMP2/GAG+ y pueden ayudar a clarificar estas observaciones.

Ejemplo 6

5 La enzima heparanasa 3 se usó para escindir cadenas de azúcares GAG+ y GAG- del Ejemplo 4 de acuerdo con el siguiente método. GAG+ y GAG- se trataron cada uno por separado a una concentración de 4 mg/ml, con heparanasa 3 (250 mU de enzima por cada 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. Las mezclas GAG+ y GAG- digeridas se sometieron cada una a la columna del péptido por separado. La traza del detector de UV-Vis de cada ciclo cromatográfico indicó que el material digerido mostraba la misma afinidad por la columna que el material no digerido.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para aislar glucosaminoglucanos capaces de unirse con una proteína que tiene un dominio de unión a heparina, en donde la proteína se **caracteriza por** o comprende SEC ID N°: 1, comprendiendo el método:
- 10 (i) proporcionar un soporte sólido que tiene moléculas polipeptídicas adheridas al soporte que se **caracterizan por**, o comprenden, SEC ID N°: 1;
(ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprende glucosaminoglucanos de modo que se permite la formación de complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
15 (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.
- 20 2. Un método para identificar glucosaminoglucanos capaces de estimular o inhibir el crecimiento y/o la diferenciación de células y/o tejidos, comprendiendo el método:
- 25 (i) proporcionar un soporte sólido que tiene moléculas polipeptídicas adheridas al soporte que se **caracterizan por**, o comprenden, SEC ID N°: 1;
(ii) poner en contacto las moléculas polipeptídicas con una mezcla que comprende glucosaminoglucanos de modo que se permite la formación de complejos de polipéptido-glucosaminoglucano;
30 (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;
35 (vi) añadir los glucosaminoglucanos recogidos *in vitro* a células o tejidos en los que una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 está presente;
(vii) medir uno o más de: proliferación de las células, diferenciación de las células, expresión de uno o más marcadores proteicos.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2 en el que la mezcla que comprende glucosaminoglucanos contiene material de matriz extracelular.
4. El método de la reivindicación 3 en el que el material de la matriz extracelular deriva de tejido conectivo o de células de tejido conectivo.
- 35 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la mezcla que comprende glucosaminoglucanos contiene uno o más de un dextrán sulfato, un condroitín sulfato, un heparán sulfato.
- 40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la mezcla que comprende glucosaminoglucanos se ha enriquecido con respecto a uno de dextrán sulfato, condroitín sulfato, heparán sulfato.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método comprende además someter los glucosaminoglucanos recogidos a análisis adicional para determinar las características estructurales del GAG.
- 45 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los complejos de glucosaminoglucano-polipéptido se ponen en contacto con una liasa.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el polipéptido consiste en SEC ID N°: 1.
- 50 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el polipéptido comprende además uno o más aminoácidos adicionales en uno o cada uno de los extremos N y C terminales del polipéptido, en donde el número de dichos aminoácidos adicionales es 1-20.

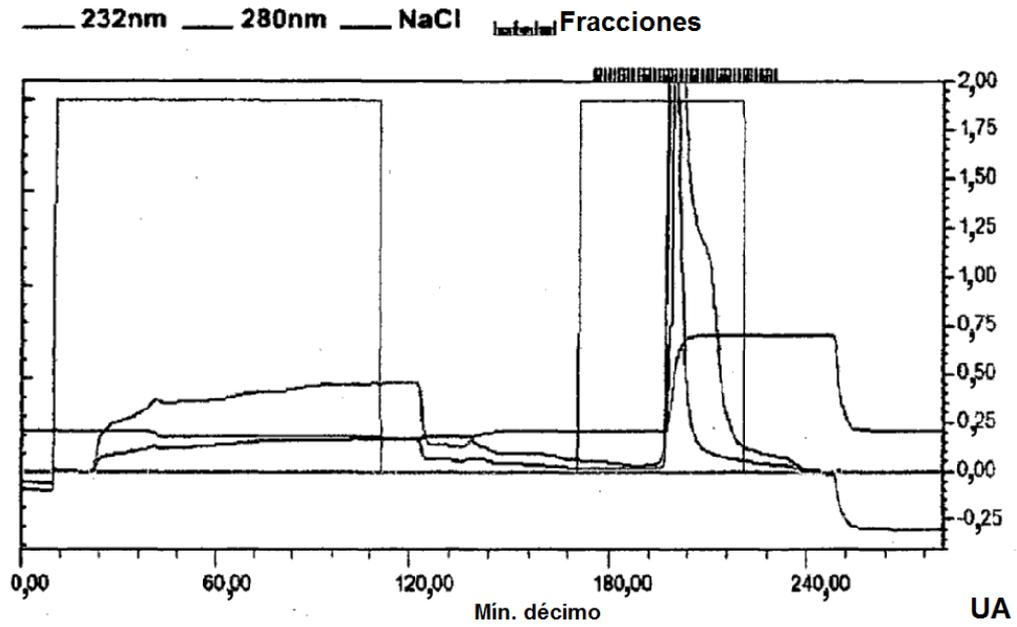


Figura 1

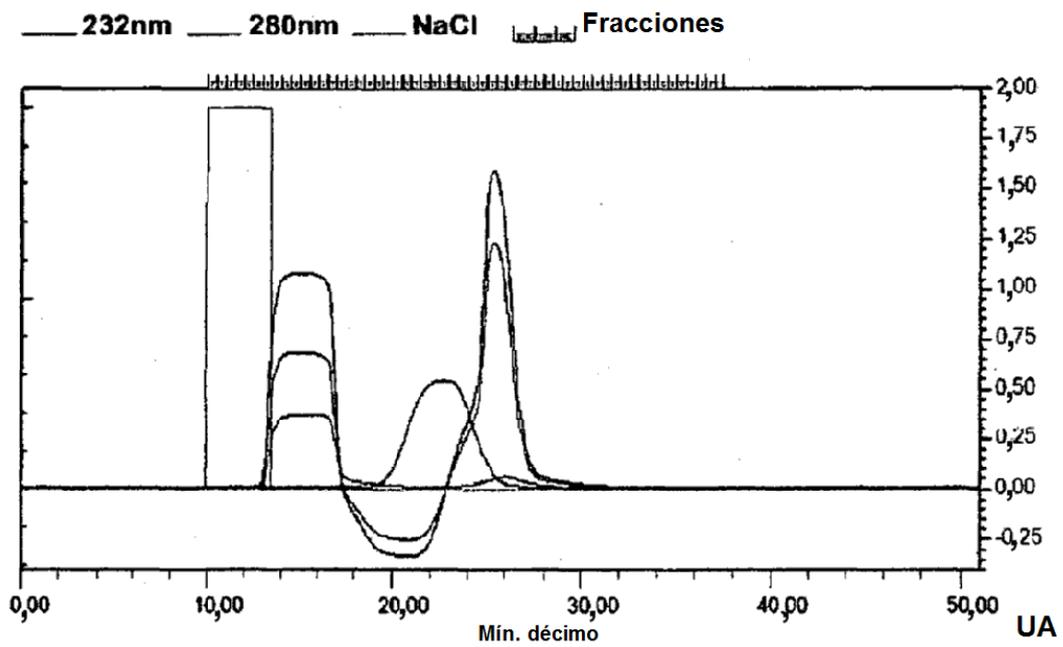


Figura 2

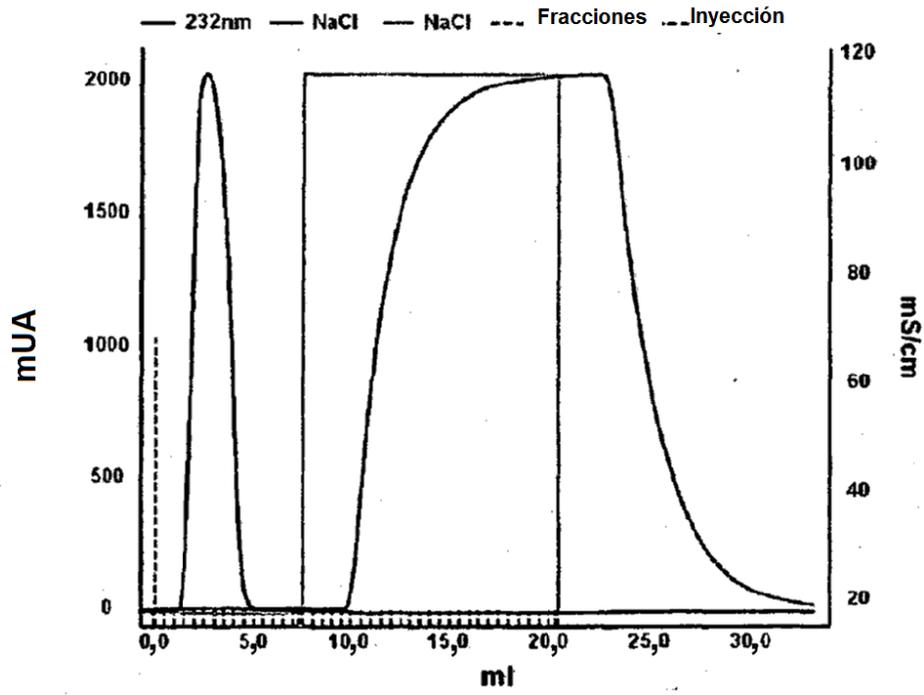


Figura 3

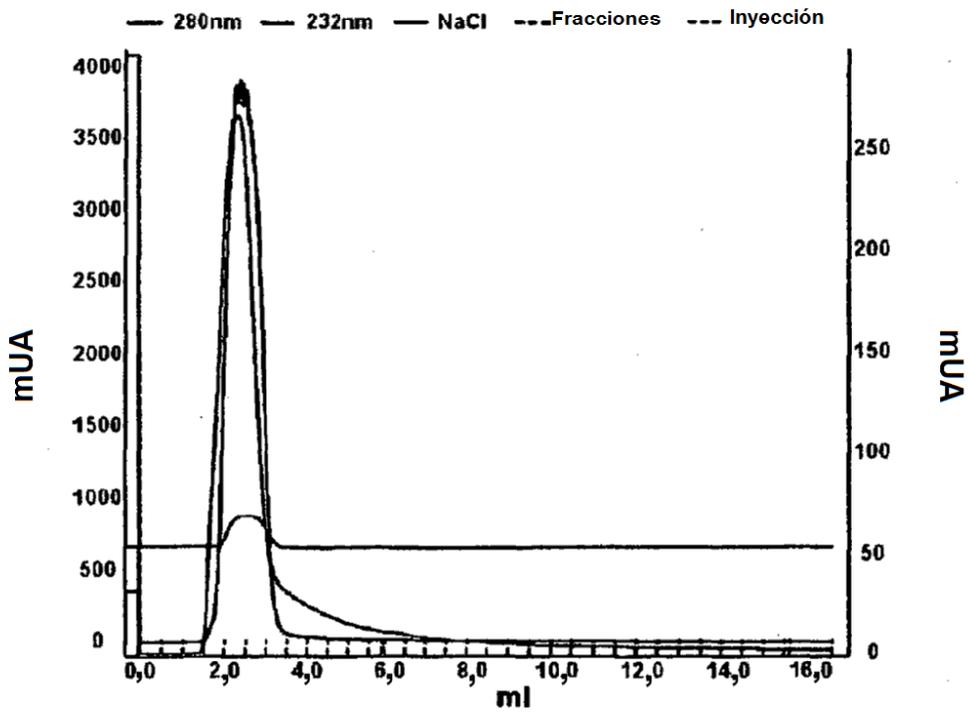


Figura 4

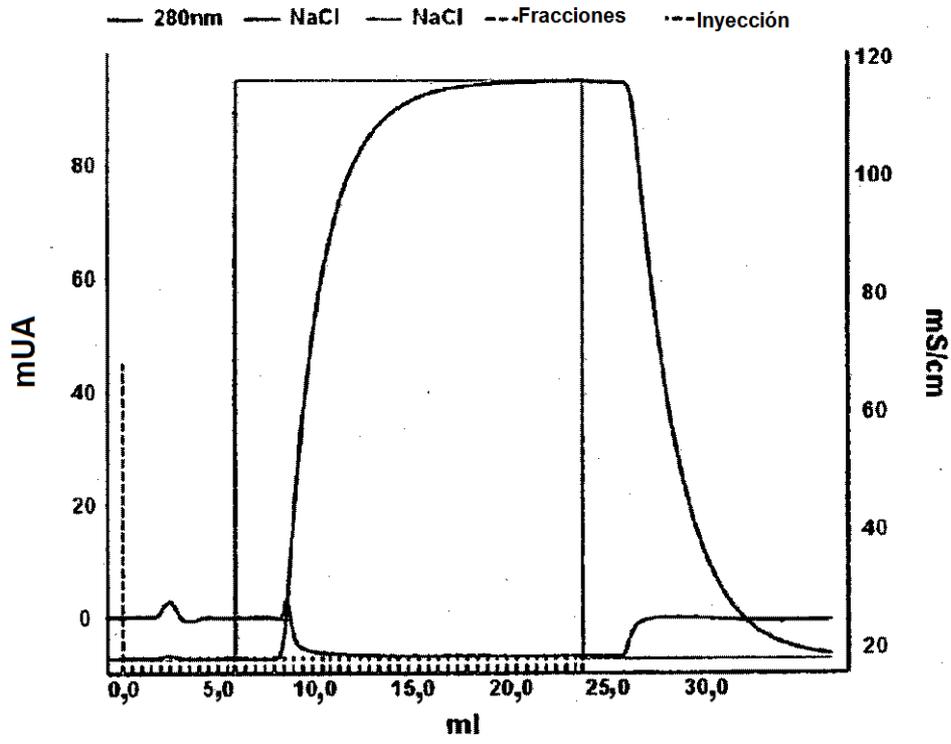


Figura 5

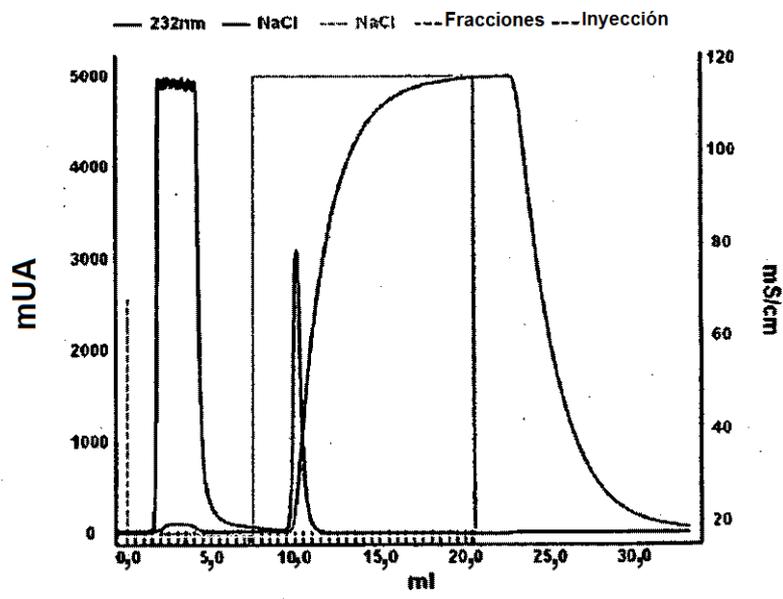


Figura 6

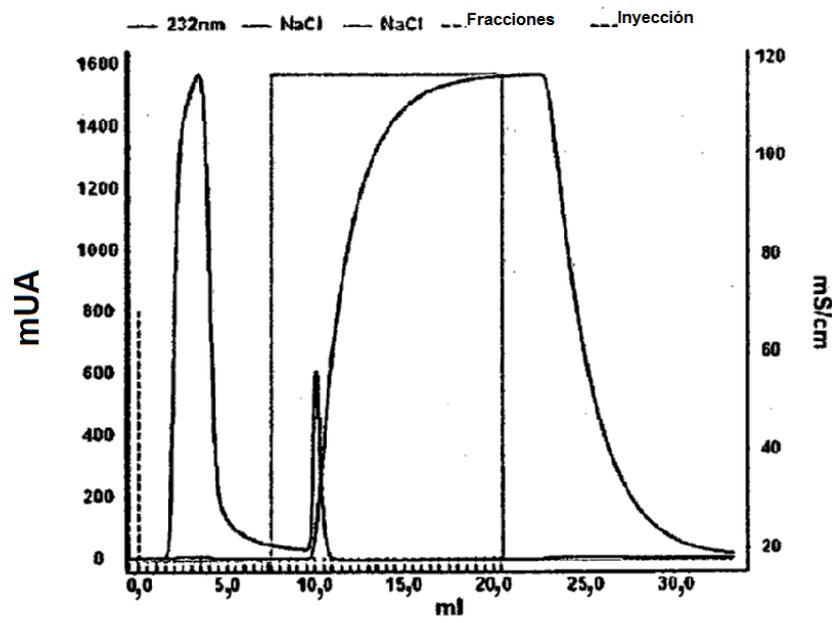


Figura 7

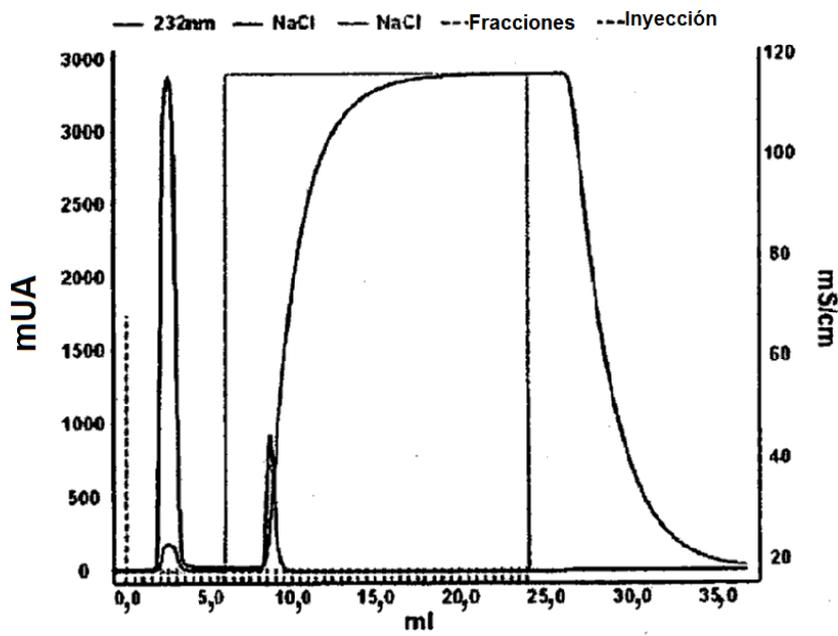


Figura 8

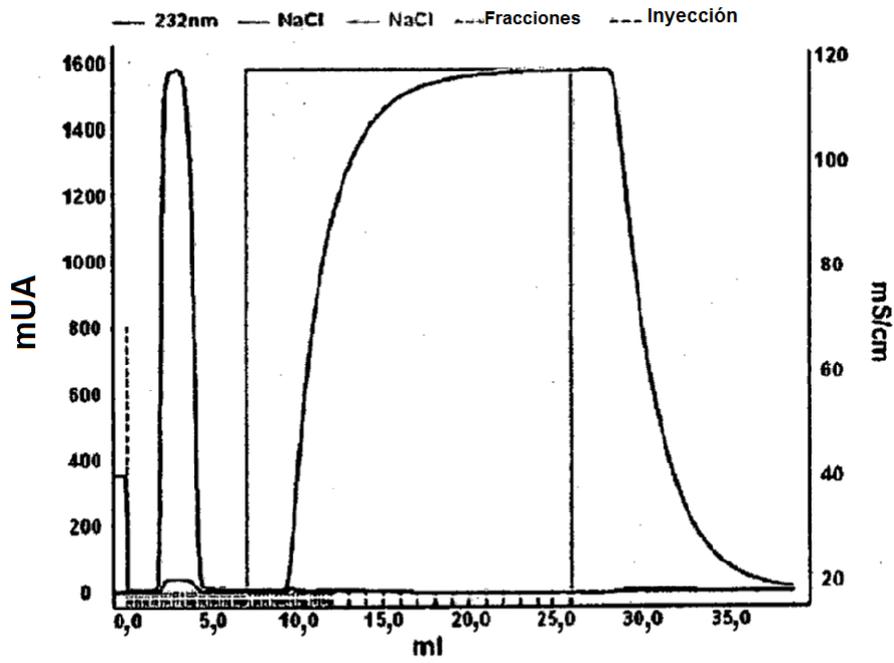


Figura 9

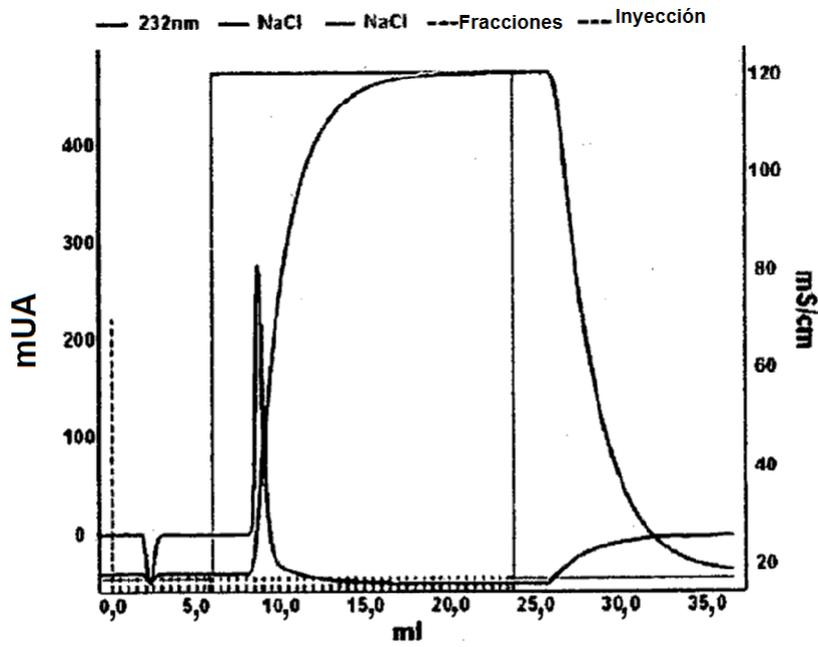


Figura 10

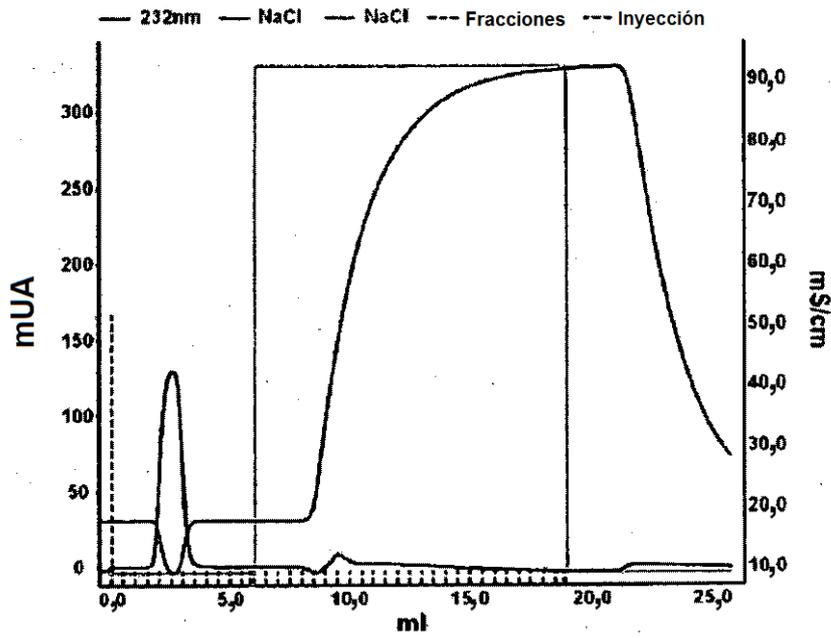


Figura 11

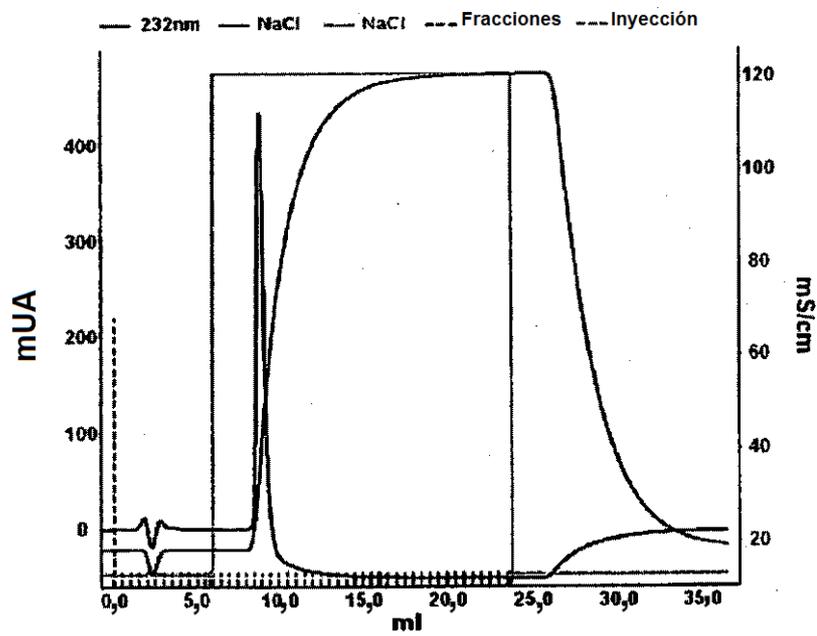


Figura 12

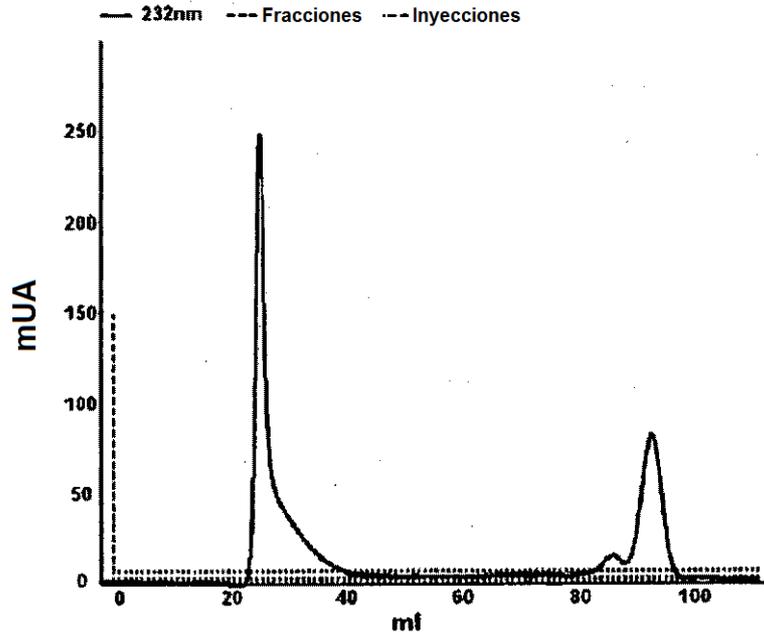


Figura 13

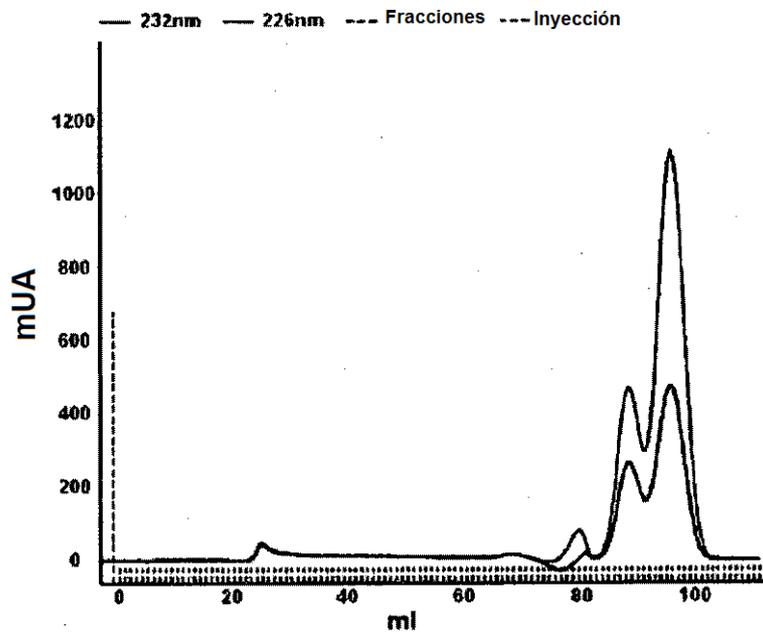


Figura 14

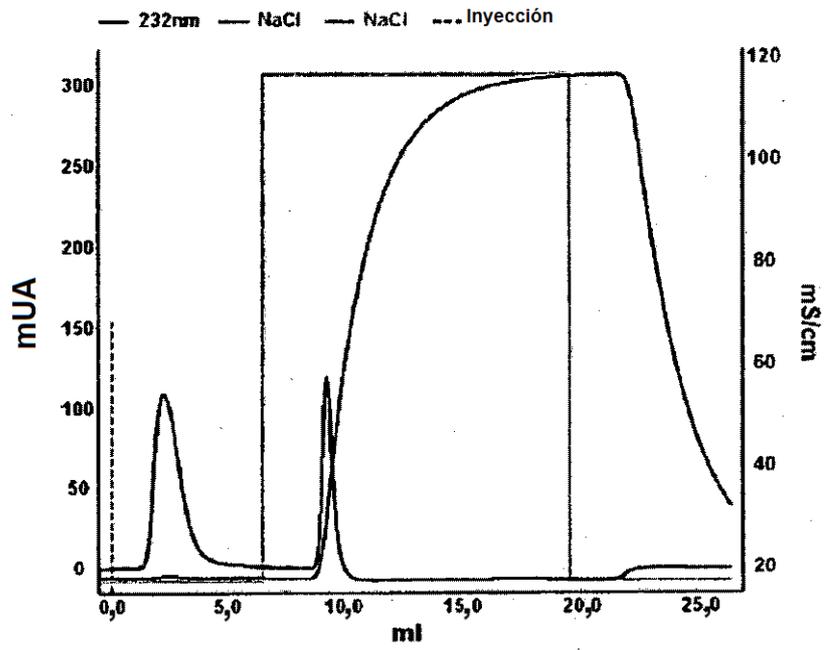


Figura 15

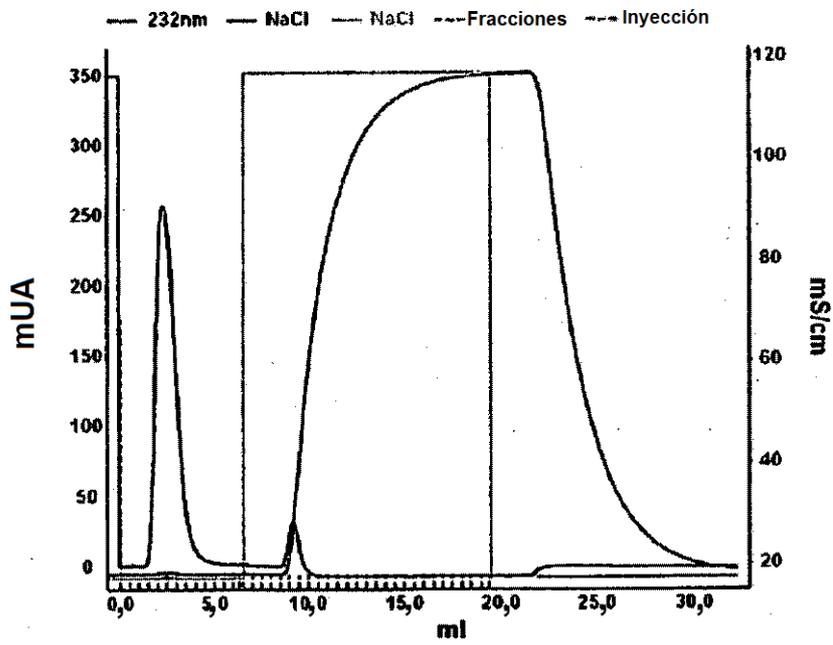


Figura 16

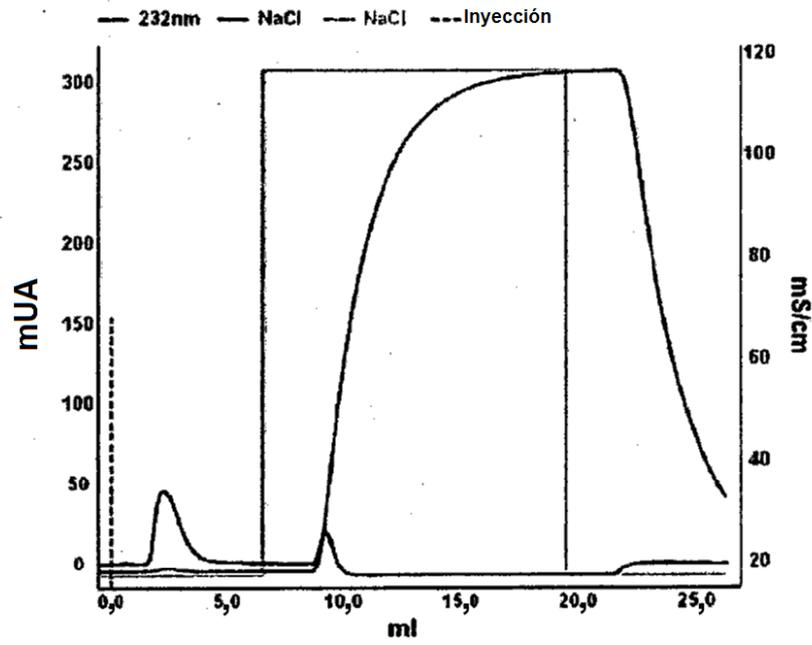


Figura 17

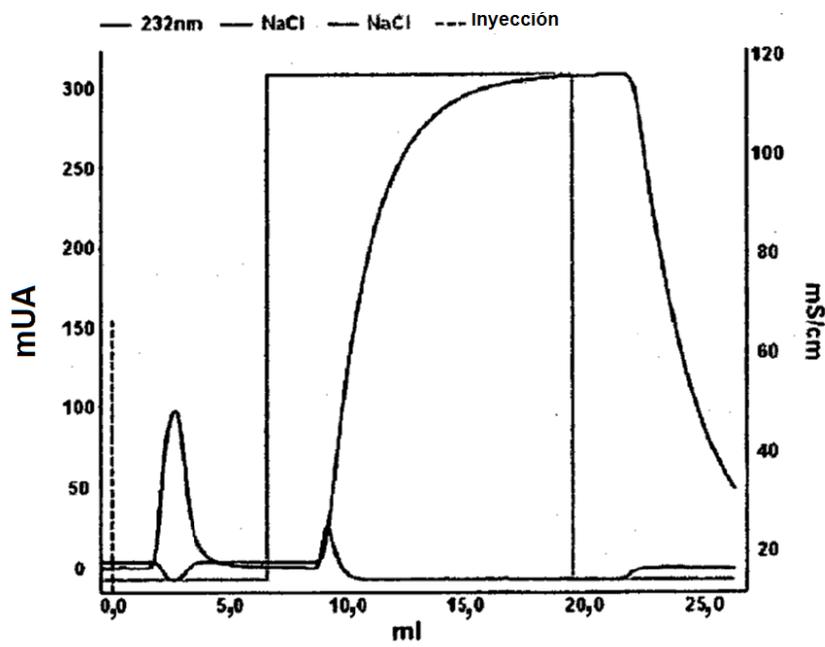


Figura 18

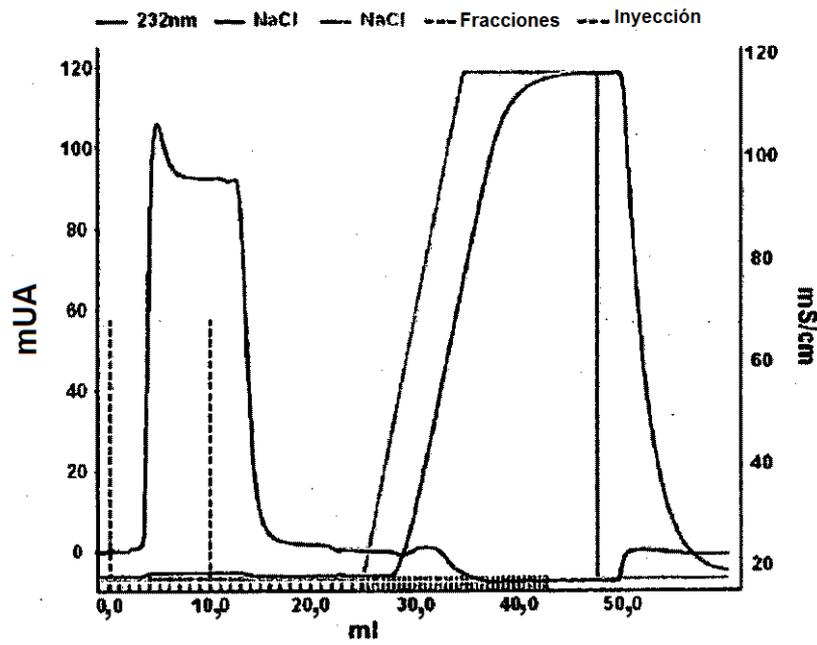


Figura 19

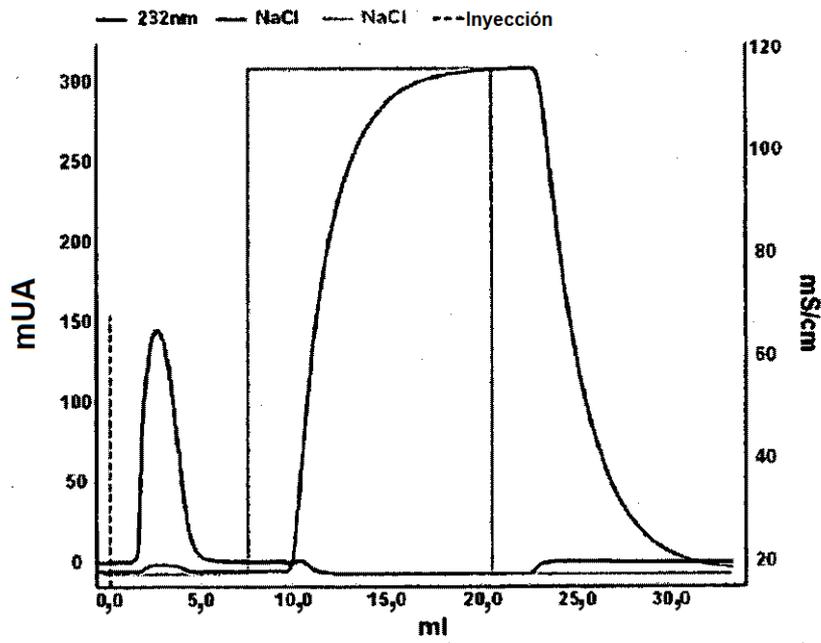


Figura 20

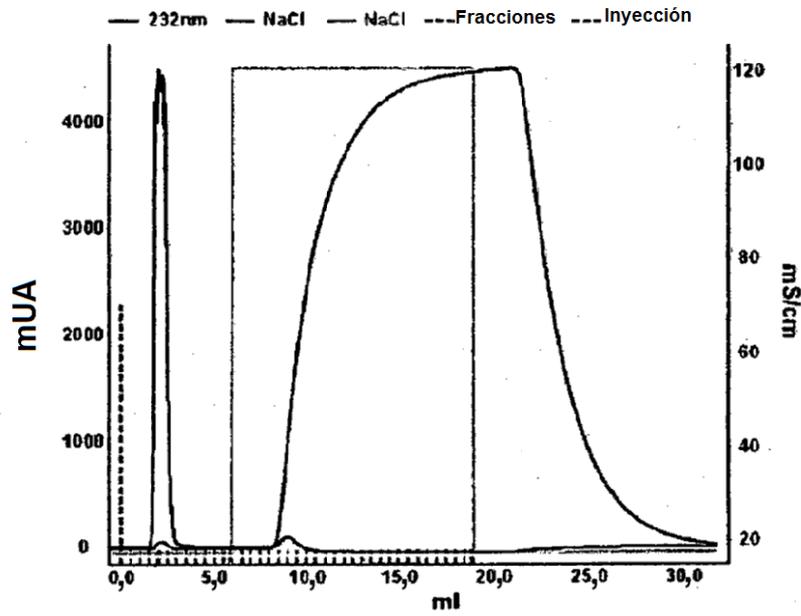


Figura 21

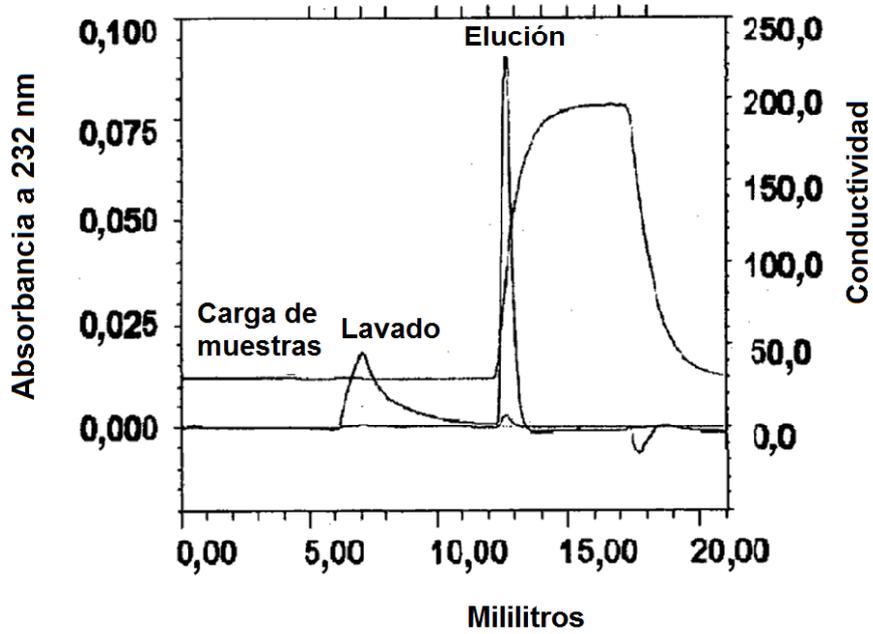


Figura 22

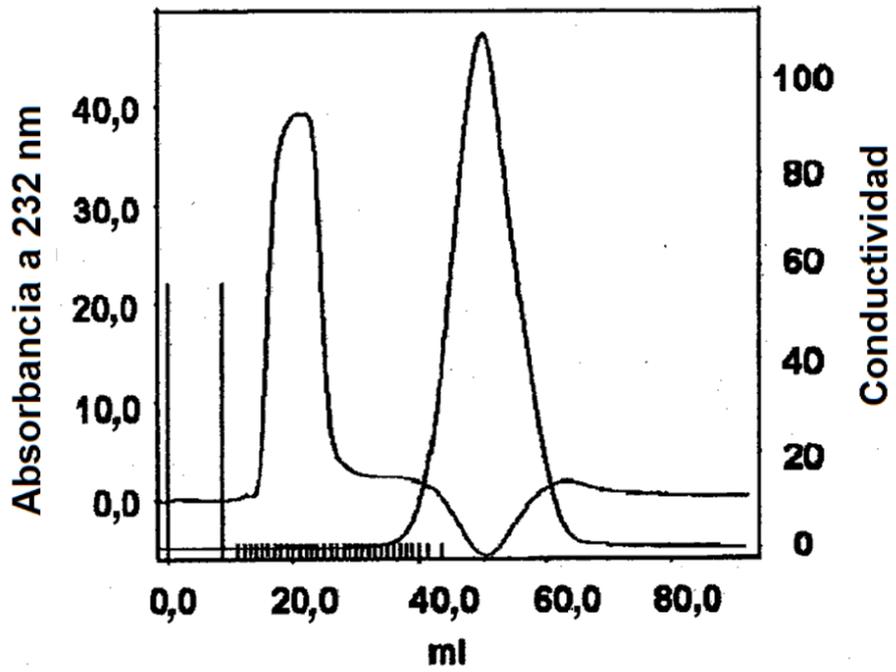


Figura 23

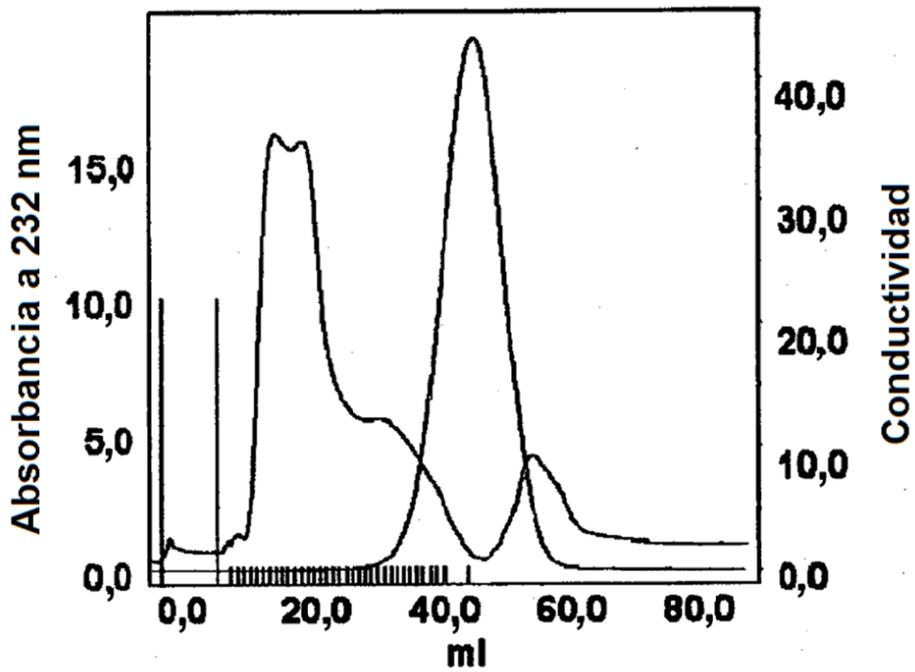


Figura 24

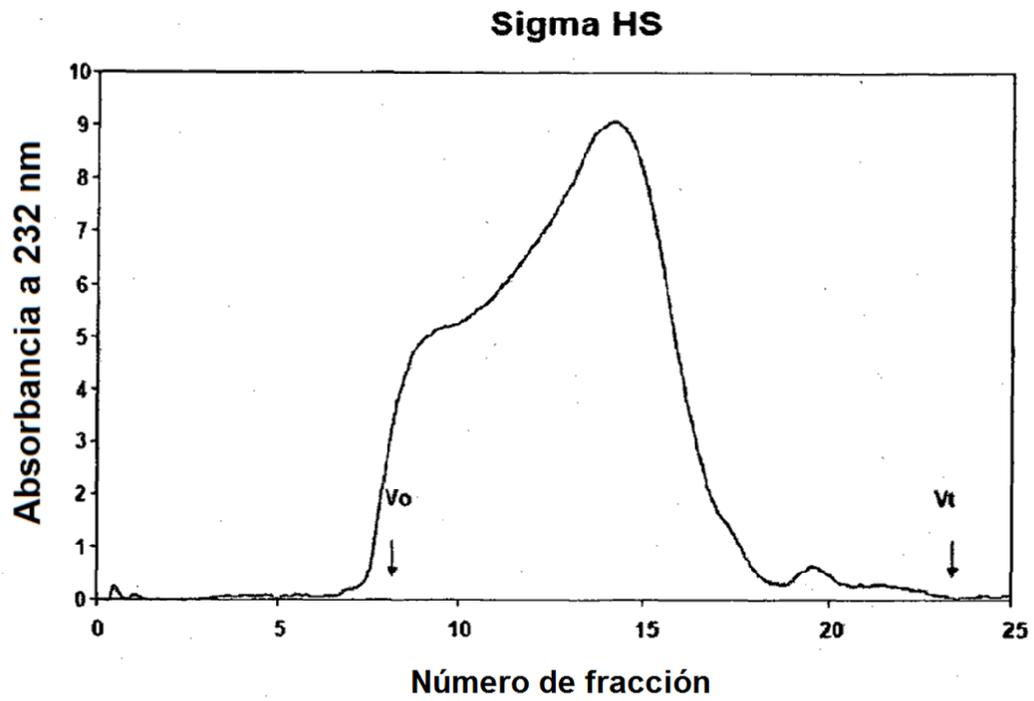


Figura 25

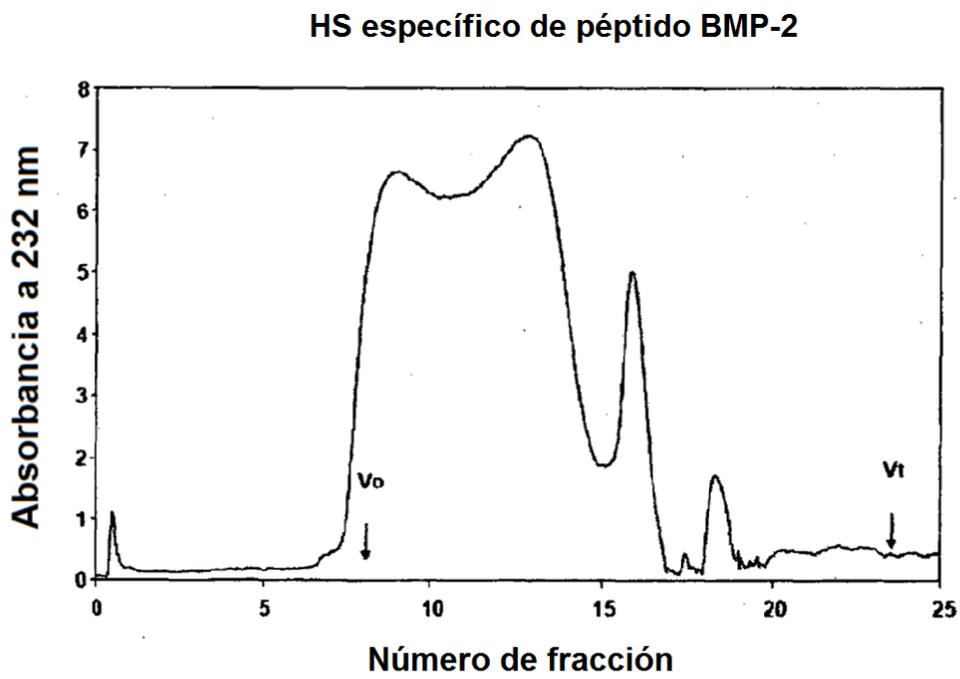


Figura 26

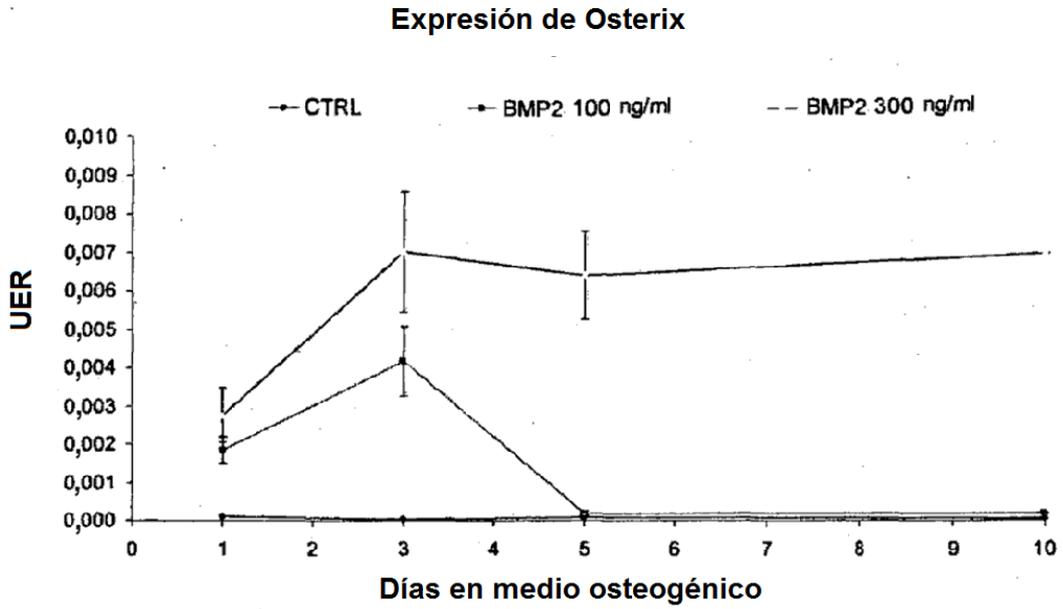


Figura 27

Osteocalcina

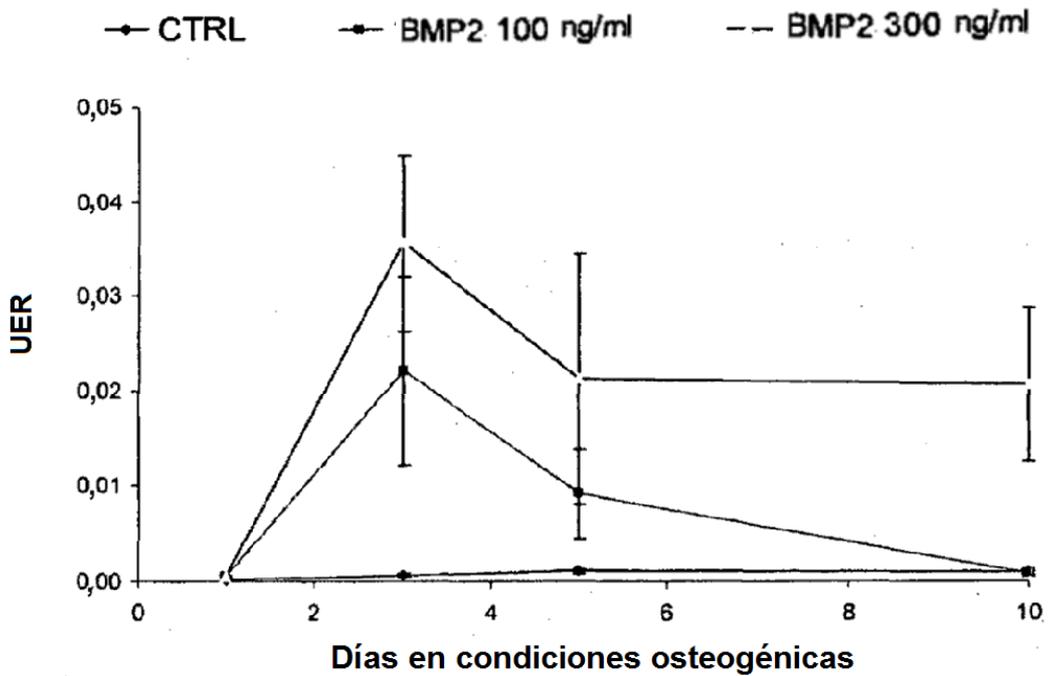


Figura 28

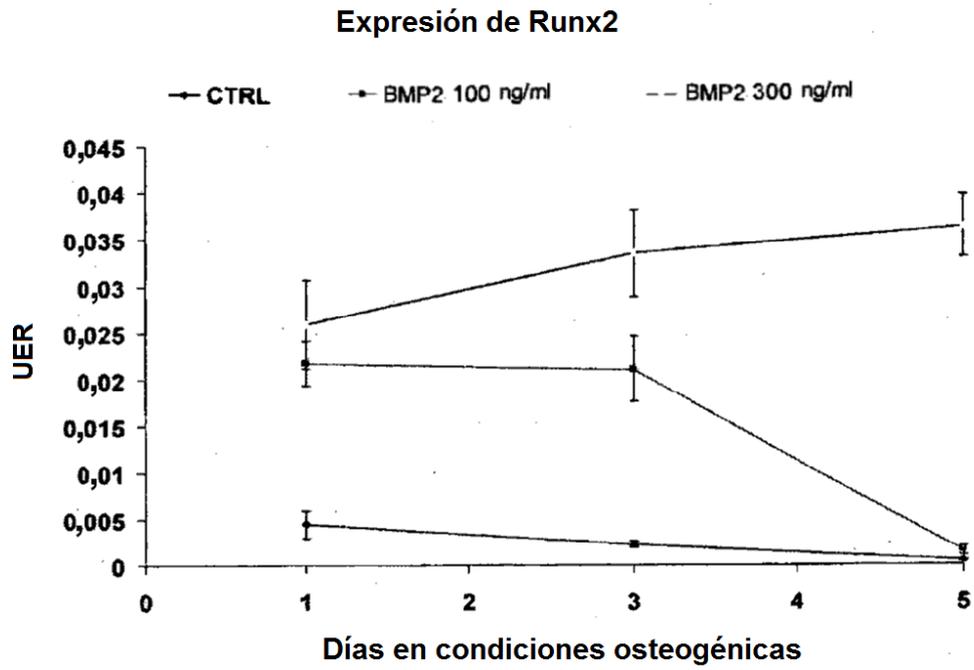


Figura 29

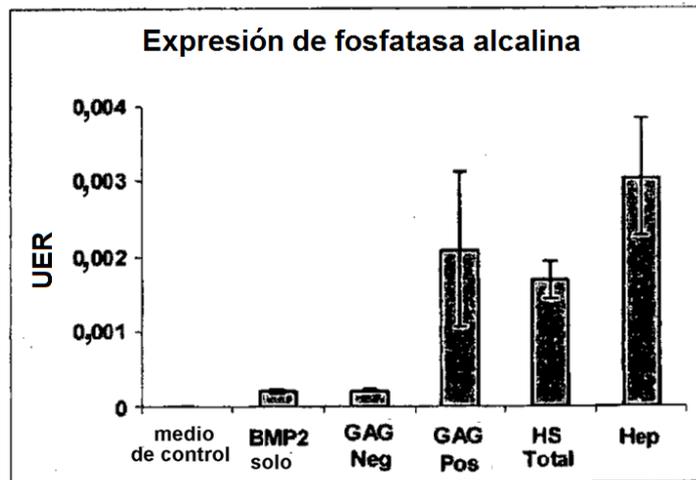


Figura 30

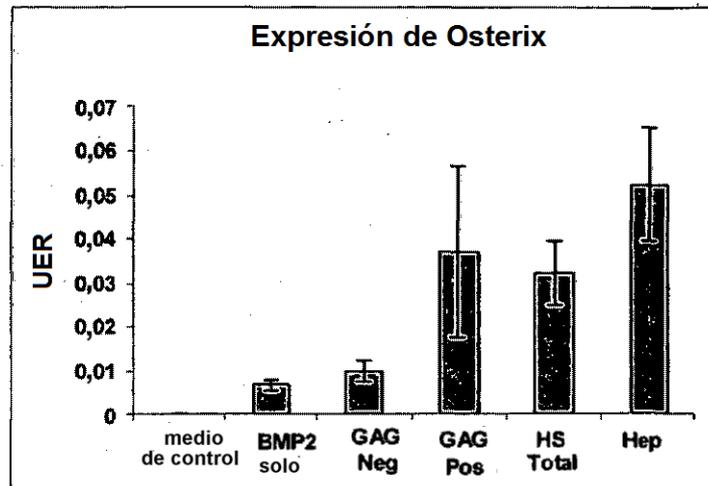


Figura 31

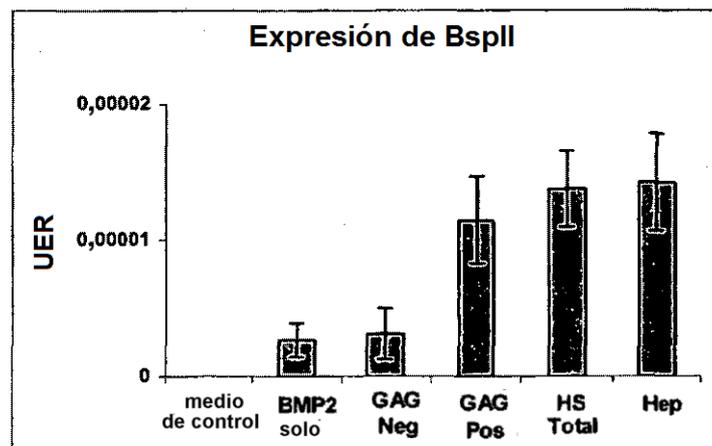


Figura 32

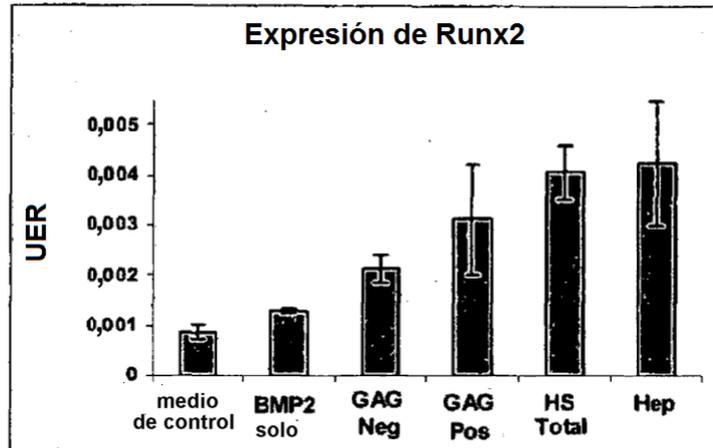


Figura 33

Aumento de la expresión del gen de osteocalcina

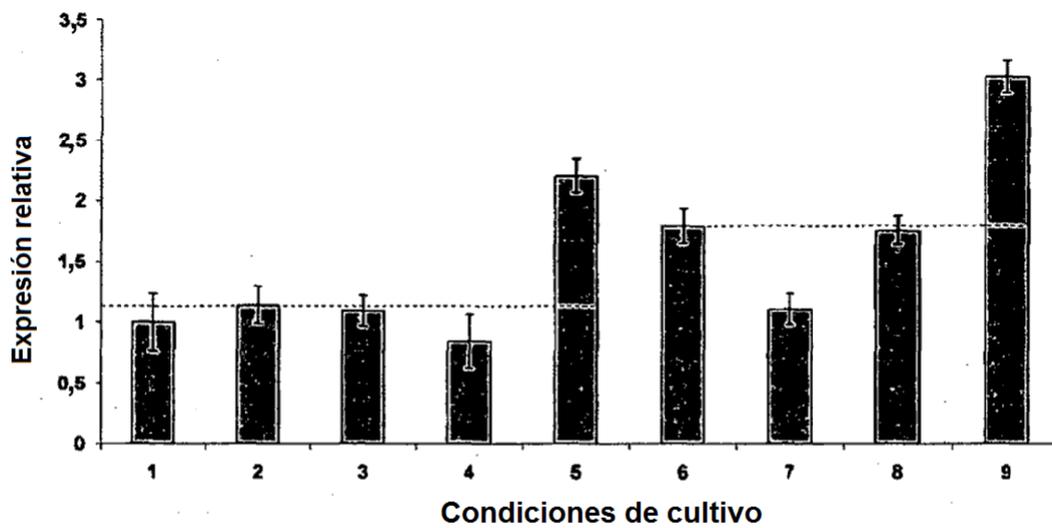


Figura 34