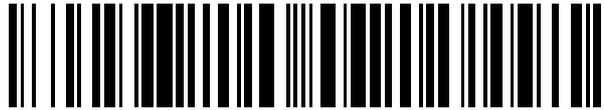


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 802**

51 Int. Cl.:

A61K 31/727 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
A61F 5/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61K 31/726 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2009 E 09813320 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2334304**

54 Título: **Heparán sulfato 2 (HS-2) para inducir el crecimiento y la regeneración óseos terapéuticos**

30 Prioridad:

11.09.2008 US 96272 P
11.09.2008 GB 0816650

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2016

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 y
NURCOMBE, VICTOR

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 562 802 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Heparán sulfato 2 (HS-2) para inducir el crecimiento y la regeneración óseos terapéuticos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al crecimiento y a la regeneración terapéuticos de tejido óseo y, particularmente, al uso de heparán sulfato 2 (HS-2) en el crecimiento y en la regeneración terapéuticos de tejido óseo.

10 **Antecedentes de la invención**

El impulso para desarrollar terapias de regeneración ósea para evitar la unión retardada y la ausencia de unión de fracturas óseas es un importante asunto terapéutico, especialmente considerando los millones de fracturas que se producen anualmente, al menos el 10 % de las cuales son incapaces de consolidarse por sí mismas. Varios factores de crecimiento desempeñan papeles clave en el proceso de reparación ósea, y estudios que pretenden elucidar los factores que afectan al destino de las células madre han demostrado recientemente que el azúcar glucosaminoglucano extracelular heparán sulfato (HS) desempeña un papel clave en la proliferación y la diferenciación de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea humana (1). Se sabe, en general, que las decisiones relacionadas con el destino del linaje osteogénico están fuertemente influenciadas por varios factores de crecimiento que se unen a heparán y está ampliamente aceptado que los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y sus receptores (FGFR) son esenciales para la proliferación y diferenciación de osteoblastos (2-4). Se han acumulado muchos indicios para mostrar que la unión de FGF cognado a su receptor y, por lo tanto, su señalización intracelular, como es el caso con un gran número de otros factores de crecimiento y adhesivos está, de hecho, controlada por HS (5).

El heparán sulfato es un miembro de la familia de macromoléculas del glucosaminoglucano, polisacáridos lineales que consisten en una estructura principal de unidades disacarídicas de glucosamina/ácido glucurónico que se repiten unidas a un núcleo proteico. El HS tiene secuencias muy sulfatadas, aunque de forma variable, contenidas dentro de sus cadenas, organizadas en agrupamientos que delimitan la unión a proteínas. Estos motivos de dominio estructural sulfatado son principalmente responsables de las propiedades reguladoras del HS (6). Los polisacáridos de HS presentan versatilidades en cuanto a conformación y orientación de grupos funcionales, lo que les permite emplear diferentes modos de unión con cualquier proteína individual o complejo de proteínas. Estas interacciones selectivas con ciertas proteínas da como resultado, por lo tanto, la regulación de las actividades de proteínas (7). El HS actúa, por lo tanto, como correceptor, uniéndose a factores de crecimiento de unión a heparina tales como FGF y BMP2, tanto protegiéndoles de la degradación proteolítica como promoviendo la unión a sus receptores de alta afinidad (7). El HS tiene una baja afinidad aunque elevada capacidad por sus ligandos, atrayéndolos de este modo sobre la superficie celular y sus receptores cognados de alta afinidad que, a continuación, transducen la señal apropiada al interior de las células (8). Además, se cree que la unión de HS es importante para proporcionar un depósito pericelular unido a la matriz de factores de crecimiento, promoviendo de este modo su disponibilidad a largo plazo para las células (9). También se cree que el HS hace que las BMP coincidan con sus receptores de BMP de treonina-serina quinasa (10-12).

El HS derivado del hueso ha demostrado mejorar la regeneración ósea cuando se añade de forma exógena en la consolidación de huesos largos (13). Jackson et al. (13) aplicaron una única dosis de HS derivado del hueso a una fractura femoral de rata en el momento de la lesión y mostraron un incremento del tamaño del callo y el volumen óseo después de 2 semanas. Notablemente, estos estudios usaban aplicaciones individuales de HS derivado de la línea celular de proteoblastos MC3T3-E1 en dispositivos de suministro a corto plazo con resultados prometedores sobre las fases tempranas de la consolidación, pero supusieron poca diferencia en las fases tardías.

Debido al patrón temporal de la expresión del factor de crecimiento durante la reparación ósea, estudios tales como Luong Van et al (16) se centraron en prolongar el suministro localizado de HS durante periodos más largos de consolidación mediante la liberación sostenida de HS a partir de microcápsulas de policaprolactona.

La cola de fibrina disfruta de una aplicación clínica muy extendida como sellante de heridas, un depósito para suministrar factores de crecimiento y como ayuda en la colocación y la fijación de implantes biológicos (19-22). Varios estudios han demostrado que la cola de fibrina promueve el nuevo crecimiento de nervios periféricos a niveles comparables con microcirugía estándar, lo que le convierte en un popular candidato para reparación nerviosa experimental (17). En el entorno celular, la fibrina se une específicamente a diversas proteínas, incluyendo fibronectina, albúmina, FGF2, VEGF e IL-1 (18). Estas proteínas la convierten en un interesante sistema de suministro de fármacos y células para diversas aplicaciones en ingeniería tisular (19-23). En cada caso, se investigaron las capacidades regeneradoras de tejido con respecto a diseñar a medida la matriz de soporte para generar ciertos perfiles de liberación de los factores de crecimiento a lo largo del tiempo.

El heparán sulfato 2 se identificó y se describió en el documento Brickman et al. (1998), J. Biol. Chem. 273(8), 4350-4359) y se purificó de neuroepitelio murino el día 10 del desarrollo embrionario (E10).

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona HS-2 para uso en un método de tratamiento médico. En particular, se proporciona HS-2 para uso en un método de tratamiento de una fractura ósea.

5 Se proporcionan composiciones farmacéuticas y medicamentos que comprenden HS-2. En un aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas y medicamentos que comprenden HS-2 para uso en un método de tratamiento, comprendiendo el método el tratamiento de una fractura ósea.

10 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un implante o prótesis biocompatible que comprende un biomaterial y HS-2. El implante o prótesis es, preferentemente, para uso en un método de tratamiento de una fractura ósea. El implante o prótesis está, preferentemente, revestido o impregnado con HS-2.

15 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de HS-2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una fractura ósea. El medicamento puede comprender un implante o prótesis biocompatible que comprende un biomaterial y HS-2, tal como se describe en el presente documento. En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de formación de un implante o prótesis biocompatible, comprendiendo el método la etapa de revestir o impregnar un biomaterial con HS-2.

20 Se desvela un método de tratamiento de una fractura ósea en un sujeto, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de HS-2 al sujeto. El método puede comprender administrar HS-2 al tejido que rodea la fractura. El método puede comprender la inyección de HS-2 al tejido que rodea la fractura.

25 También se desvela un método de tratamiento de una fractura ósea en un sujeto, comprendiendo el método implantar quirúrgicamente un implante o prótesis biocompatible, implante o prótesis que comprende un biomaterial y HS-2, en tejido del sujeto en o que rodea al sitio de la fractura.

30 El HS-2 puede formularse como una composición farmacéutica o medicamento que comprende HS-2, que comprende opcionalmente un portador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable. También puede comprender fragmentos bioactivos derivados de, o análogos a, la molécula de HS-2 parental.

También se desvela un método de estimulación del crecimiento o la regeneración de tejido óseo en un sujeto *in vivo*, que comprende administrar HS-2 a tejido óseo que necesita dicha estimulación.

35 Descripción de realizaciones preferidas

La presente invención se refiere al uso terapéutico (humano y veterinario) de HS-2 para tratar una fractura ósea. En el presente documento se indica que HS-2 aumenta la cicatrización de heridas en hueso. El HS-2 estimula la regeneración ósea en respuesta a la lesión y contribuye a cicatrización de heridas en hueso mejorada. El HS-2 proporciona mejoras en la velocidad de reparación de fracturas óseas, permitiendo una reducción del tiempo de recuperación de la lesión.

45 La fractura ósea es una afección médica. En esta solicitud "fractura" incluye daños o lesión al hueso en que un hueso se agrieta, se rompe o se astilla. Una rotura se refiere a discontinuidad en el hueso. Una fractura puede estar causada por un impacto físico, o tensión mecánica o por afecciones médicas tales como osteoporosis o artrosis.

50 La clasificación ortopédica de fracturas incluye fracturas cerradas o abiertas y simples o multifragmentarias. En las fracturas cerradas la piel sigue intacta, mientras que en una fractura abierta, el hueso puede estar expuesto a través del sitio de la herida, lo que conlleva un mayor riesgo de infección. Las fracturas simples se producen a lo largo de una única línea, que tiende a dividir el hueso en dos. Las fracturas multifragmentarias dividen el hueso en múltiples trozos.

Otros tipos de fractura incluyen, fractura por compresión, fractura compactada, fractura en espiral, fracturas completas e incompletas, fracturas transversal, lineal y oblicua y fracturas conminutas.

55 En la mayoría de los sujetos la consolidación ósea (unión de fracturas) se produce de forma natural y se inicia después de la lesión. La hemorragia normalmente causa coagulación y atracción de leucocitos y fibroblastos, seguida por la producción de fibras de colágeno. A esto le sigue el depósito de matriz ósea (hidroxiapatita cálcica) que transforma (mineralización) la matriz de colágeno en hueso. El hueso regenerado inmaduro es normalmente más débil que el hueso maduro y, con el tiempo, el hueso inmaduro experimenta un proceso de remodelación para producir hueso "laminar" maduro. El proceso completo de consolidación ósea requiere un tiempo considerable, normalmente muchos meses.

65 Los huesos en los que se producen fracturas y que pueden beneficiarse del tratamiento usando HS-2 incluyen todo tipo de huesos, particularmente todos los huesos de mamífero incluyendo, aunque sin limitarse a, huesos largos (por ejemplo fémur, húmero, falanges), huesos cortos (por ejemplo carpos, tarsos), huesos planos (por ejemplo cráneo,

costillas, omóplato, esternón, cintura pélvica), huesos irregulares (por ejemplo vértebras), huesos sesamoideos por ejemplo rótula).

La fractura ósea también incluye porosidad patológica, tal como la mostrada por sujetos con osteoporosis.

5 Las acciones principales del HS-2 pueden ser sobre células dentro de, adyacentes a, o a las que se hizo migrar al interior del sitio de la herida y puede ser sobre las células madre óseas, los preosteoblastos o los osteoblastos, o sobre cualquiera de las células auxiliares o vasculogénicas descubiertas o a las que se hizo migrar al interior o dentro del lecho de la herida.

10 Se proporcionan HS-2 y composiciones farmacéuticas y medicamentos que comprenden HS-2 para uso en un método de tratamiento de fractura ósea en un sujeto mamífero. El HS-2 puede purificarse y aislarse tal como se describe en el documento Brickman et al. (1998), J. Biol. Chem. 273(8), 4350-4359.

15 El tratamiento puede comprender cicatrización de heridas en hueso. El tratamiento puede implicar reparación, regeneración y crecimiento de hueso. El HS-2 facilita la reparación de la fractura facilitando el crecimiento de nuevo hueso. El HS-2 actúa para mejorar la velocidad de reparación de la fractura permitiendo que la consolidación ósea se produzca más rápido, conduciendo a un tiempo de recuperación de la lesión mejorado. El tratamiento puede causar una resistencia ósea mejorada.

20 El tratamiento también puede incluir tratamiento de osteoporosis o artrosis.

La administración de HS-2 es, preferentemente, al tejido que rodea a la fractura. Esto puede incluir administración directamente al tejido óseo en el que se ha producido la fractura. La administración puede ser a tejido conjuntivo que rodea el hueso o la fractura o a la vasculatura (por ejemplo vasos sanguíneos) cerca de y que alimentan al hueso. La administración puede ser directamente al sitio de la lesión y puede ser a un callo formado mediante cicatrización inicial de la herida.

30 Medicamentos y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden formularse para administración mediante una serie de vías. De la forma más preferente, el HS-2 se formula en forma fluida o líquida para inyección.

35 La administración es, preferentemente, en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para mejorar la consolidación de la fractura ósea en comparación con una fractura no tratada correspondiente. La cantidad real administrada, y la tasa y la evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la fractura. La prescripción de tratamiento, por ejemplo decisiones sobre la posología etc., está dentro de la responsabilidad de facultativos generales y otros médicos, y tendrán en cuenta normalmente la naturaleza de la fractura, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por facultativos. Administraciones individuales o múltiples de dosis de HS-2 pueden administrarse de acuerdo con la orientación del facultativo médico que realiza la prescripción. Puramente a modo de ejemplo, el HS-2 puede administrarse en dosis de al menos 1 ng/ml, más preferentemente al menos 5 ng/ml y opcionalmente 10 ng/ml o más. Las dosis individuales de HS-2 pueden ser del orden de menos de 1 mg y más de 1 µg, por ejemplo una de aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 100 µg, aproximadamente 0,5 mg, o aproximadamente 1 mg. Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente puede encontrarse en el documento Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

50 El HS-2 puede usarse para tratar una fractura ósea junto con otros tratamientos, tales como administración de medicamentos analgésicos o antiinflamatorios, inmovilización y recolocación del hueso, por ejemplo inmovilizar la extremidad lesionada en un molde de yeso, intervención quirúrgica, por ejemplo para recolocar un hueso o mover un hueso al desplazamiento, angulación o luxación correcta. Si se requiere cirugía, el HS-2 puede administrarse directamente a (por ejemplo aplicarse a) la fractura durante el procedimiento quirúrgico.

55 Las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención pueden asumir la forma de un biomaterial que está revestido y/o impregnado con HS-2. Un implante o prótesis puede estar formado del biomaterial. Dichos implantes o prótesis pueden implantarse quirúrgicamente para ayudar al crecimiento, regeneración, restructuración y/o remodelación ósea. El HS-2 puede aplicarse a implantes o prótesis para acelerar la formación de nuevo hueso en una ubicación deseada. Se apreciará que los heparán sulfatos, a diferencia de las proteínas, son particularmente robustos y tienen una mucho mejor capacidad de resistir los disolventes requeridos para la fabricación de biomatrices de soporte sintéticas y la aplicación a implantes y prótesis.

65 El biomaterial puede estar revestido o impregnado con HS-2. La impregnación puede comprender formar el biomaterial mezclando HS-2 con los componentes constitutivos del biomaterial, por ejemplo durante la polimerización, o absorber HS-2 en el biomaterial. El revestimiento puede comprender adsorber el HS-2 sobre la superficie del biomaterial.

El biomaterial debe permitir que el HS-2 aplicado como revestimiento o impregnado se libere del biomaterial cuando se administra a o se implanta en el sujeto. La cinética de liberación del biomaterial puede alterarse alterando la estructura, por ejemplo la porosidad, del biomaterial.

- 5 Además de revestir o impregnar un biomaterial con HS-2, una o más moléculas biológicamente activas pueden impregnarse o aplicarse como revestimiento sobre el biomaterial. Por ejemplo, al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en: BMP-2, BMP-4, OP-1, FGF-1, FGF-2, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3; VEGF; colágeno; laminina; fibronectina; vitronectina. Además de o como alternativa a las moléculas bioactivas anteriores, uno o más bisfosfonatos pueden impregnarse o aplicarse como revestimiento sobre el biomaterial junto con HS-2. Los ejemplos
10 de bisfosfonatos útiles pueden incluir al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en: etidronato; clodronato; alendronato; pamidronato; risedronato; zoledronato.

Los biomateriales revestidos o impregnados con HS-2 pueden ser útiles en fines tanto médicos como veterinarios. Se apreciará que la presente invención puede mejorar la calidad de vida de un paciente o prolongar potencialmente
15 la vida de un animal, por ejemplo un caballo de carreras valioso para uso en cría.

El biomaterial proporciona una matriz de soporte o soporte matricial. El biomaterial puede ser adecuado para implantación en tejido, o puede ser adecuado para administración (por ejemplo como microcápsulas en solución).

- 20 El implante o prótesis debe ser biocompatible, por ejemplo no tóxico y de baja inmunogenicidad (de la forma más preferente no inmunógeno). El biomaterial puede ser biodegradable, de modo que el biomaterial se degrade a medida que se produce la cicatrización de la herida, dejando finalmente solamente el hueso regenerado *in situ* en el sujeto. Como alternativa, puede usarse un biomaterial no biodegradable, por ejemplo para guiar la regeneración ósea a lo largo de una gran discontinuidad y/o para actuar como soporte estructural durante la consolidación ósea,
25 con la eliminación quirúrgica del biomaterial siendo un requisito opcional después de la cicatrización de la herida con éxito.

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

Como alternativa, los biomateriales pueden ser estructuras relativamente rígidas, por ejemplo formadas a partir de materiales macizos tales como plásticos o metales biológicamente inertes tales como titanio.

El biomaterial puede tener una estructura matricial porosa que puede proporcionarse mediante un polímero reticulado. La matriz es, preferentemente, permeable a nutrientes y factores de crecimiento requeridos para el crecimiento óseo.

- 40 Las estructuras matriciales pueden formarse reticulando fibras, por ejemplo fibrina o colágeno, o de películas líquidas de alginato sódico, quitosana, u otros polisacáridos con reticulantes adecuados, por ejemplo sales de calcio, ácido poliacrílico, heparina. Como alternativa, las matrices de soporte pueden formarse como un gel, fabricado mediante colágeno o alginatos, reticulado usando métodos bien establecidos conocidos por los expertos en la materia.
45

Los materiales poliméricos adecuados para formación de la matriz incluyen, aunque no están limitados por, polímeros biodegradable/bioesaborbibles que pueden seleccionarse entre el grupo de: colágeno, fibrina, quitosano, policaprolactona, poli(DL-láctido-co-caprolactona), poli(L-láctido-co-caprolactona-co-glicólido), poliglicólido, poliláctido, polihidroxialcanoatos, copolímeros de los mismos, o polímeros no biodegradables que pueden seleccionarse entre el grupo de: acetato de celulosa; butirato de celulosa, alginato, agarosa, polisulfona, poliuretano, poliacrilonitrilo, polisulfona sulfonada, poliamida, poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato, copolímeros de los mismos.

El colágeno es un material prometedor para la construcción de la matriz debido a su biocompatibilidad y propiedad favorable de soportar la adhesión y la función celulares (patente de Estados Unidos N.º 5.019.087; Tanaka, S.; Takigawa, T.; Ichihara, S. & Nakamura, T. Mechanical properties of the bioabsorbable polyglycolic acid-collagen nerve guide tube Polymer Engineering & Science 2006, 46, 1461-1467). Las esponjas de colágeno clínicamente aceptables son un ejemplo de una matriz y se conocen bien en la técnica (por ejemplo de Integra Life Sciences).

- 60 Las matrices de soporte de fibrina (por ejemplo cola de fibrina) proporcionan un material matricial alternativo.

Luong-Van et al (In vitro biocompatibility and bioactivity of microencapsulated heparan sulphate Biomaterials 28 (2007) 2127-2136), describen el suministro localizado prolongado de HS a partir de microcápsulas de policaprolactona.

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

El biomaterial puede suplementarse con células adicionales. Por ejemplo, se puede “sembrar” el biomaterial (o cosintetizarlo) con células precursoras óseas indiferenciadas, por ejemplo células madre tales como células madre mesenquimatosas, más preferentemente células madre mesenquimatosas humanas.

- 5 El sujeto a tratar puede ser cualquier animal o ser humano. El sujeto es preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser un mamífero no humano (por ejemplo conejo, cobaya, rata, ratón u otro roedor (incluyendo células de cualquier animal del orden Rodentia), gato, perro, cerdo, oveja, cabra, vacuno, caballo, primate no humano), pero es más preferentemente humano. El sujeto puede ser macho o hembra. El sujeto puede ser un paciente.

10

Heparán sulfato

Los proteoglucanos de heparán sulfato (HSPG) representan un subgrupo muy diverso de proteoglucanos y están compuestos por cadenas laterales de glucosaminoglucano de heparán sulfato adheridas a una estructura principal proteica. La proteína principal puede existir en tres formas: una forma secretada conocida como perlecano, una forma anclada en la membrana plasmática conocida como glicano, y una forma transmembrana conocida como sindecano. Estos son constituyentes ubicuos de las superficies de células de mamífero y la mayoría de las matrices extracelulares.

15

20

El “Heparán Sulfato” (“Heparán sulfato” o “HS”) se sintetiza inicialmente en el aparato de Golgi como polisacáridos que consisten en repeticiones en tándem de ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Los polisacáridos nacientes pueden modificarse posteriormente en una serie de etapas: N-desacetilación/N-sulfatación de GlcNAc, epimerización en C5 de GlcA a ácido idurónico (IdoA), O-sulfatación en C2 de IdoA y GlcA, O-sulfatación en C6 de N-sulfoglucosamina (GlcNS) y O-sulfatación ocasional en C3 de GlcNS. N-desacetilación/N-sulfatación, 2-O-, 6-O- y 3-O-sulfatación de HS son 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 diversidad de secuencia considerable. Esta complejidad estructural del HS ha hecho difícil determinar su secuencia y entender la relación entre la estructura y la función del HS.

25

30

Las cadenas laterales de heparán sulfato consisten en ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico y D-glucosamina dispuestos de forma alterna, enlazados mediante enlaces glucosídicos (1 → 4). La glucosamina está a menudo N-acetilada o N-sulfatada y tanto el ácido urónico como la glucosamina pueden estar adicionalmente O-sulfatados. La especificidad de un HSPG particular por un socio de unión particular es creada por el patrón específico de grupos carboxilo, acetilo y sulfato adheridos a la glucosamina y el ácido urónico. En contraste con la heparina, el heparán sulfato contiene menos grupos N- y O-sulfato y más grupos N-acetilo. Las cadenas laterales de heparán sulfato están enlazadas a un residuo de serina de la proteína principal a través de una región de enlace tetrasacárido (-glucuronosil-β-(1→3)-galactosil-β-(1→3)-galactosil-β-(1→4)-xilosil-β-1-O-(Serina)).

35

40

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

45

50

55

Se formula la hipótesis de que las cadenas de heparán sulfato altamente variables desempeñan papeles clave 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 complicada combinación de bucles de retroalimentación autocrina, yuxtacrina y paracrina, controlando de este modo la señalización intracelular y, de este modo, la diferenciación de células madre. Por ejemplo, incluso aunque los glucosaminoglucanos de heparán sulfato pueden describirse genéticamente (Alberts et al. (1989) Garland Publishing, Inc, Nueva York y Londres, págs. 804 y 805), las especies de glucosaminoglucano de heparán sulfato aisladas de una única fuente pueden diferir en actividad biológica. Tal como se muestra en el documento Brickman et al, 1998, Glycobiology 8, 463, dos mezclas independientes de glucosaminoglucanos de heparán sulfato obtenidos de células neuroepiteliales podrían activar específicamente FGF-1 o FGF-2, dependiendo del estado mitogénico. Análogamente, 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 esta solicitud de patente, un HS respectivo capaz de interactuar con FGF-1 puede obtenerse de células murinas en un

60

65

día del desarrollo embrionario de aproximadamente 11 a aproximadamente 13, mientras que un HS capaz de interactuar con FGF-2 puede obtenerse en un día del desarrollo embrionario de aproximadamente 8 a aproximadamente 10.

5 Tal como se ha afirmado anteriormente, la estructura del HS es muy compleja y variable entre el HS. De hecho, se considera que la variación de la estructura del HS desempeña una parte importante en contribuir a la diferente actividad de cada HS en promover el crecimiento celular y dirigir la diferenciación celular. Se considera que la complejidad estructural sobrepasa la de los ácidos nucleicos y, aunque la estructura del HS puede caracterizarse como una secuencia de unidades disacáridicas que se repiten que tienen patrones de sulfatación específicos y
10 únicos en el momento presente, no hay ninguna técnica de secuenciación estándar, equivalente a las disponibles para secuenciación de ácidos nucleicos, para determinar la estructura de la secuencia del HS. En ausencia de métodos sencillos para determinar una estructura de la secuencia del HS definitiva, las moléculas de HS son identificadas positivamente y caracterizadas estructuralmente por profesionales expertos en la materia, mediante una serie de técnicas analíticas. Éstas incluyen uno o una combinación de análisis de disacáridos, análisis de
15 tetrasacáridos, HPLC y determinación del peso molecular. Estas técnicas analíticas son bien conocidas y usadas por los expertos en la materia.

Dos técnicas para la producción de di- y tetra- sacáridos a partir de HS incluyen digestión con ácido nitroso y digestión con ligasa. A continuación se proporciona, tan solo como ejemplo, una descripción de cómo realizar estas
20 técnicas de digestión, sin limitar dicha descripción el alcance de la presente invención.

Digestión con ácido nitroso

La despolimerización a base de ácido nitroso de heparán sulfato causa la eventual degradación de la cadena de
25 carbohidratos en sus componentes disacáridos individuales cuando se completa.

Por ejemplo, puede prepararse ácido nitroso enfriando en hielo, por separado, 250 μ l de H_2SO_4 0,5 M y $Ba(NO_2)_2$ 0,5 M durante 15 minutos. Después de refrigerar, el $Ba(NO_2)_2$ se combina con el H_2SO_4 y se somete a agitación vorticial antes de centrifugar para eliminar el precipitado de sulfato de bario. Se añadieron 125 μ l de HNO_2 a muestras
30 GAG resuspendidas en 20 μ l de H_2O , y se agitaron en vórtice antes de incubarlos durante 15 minutos a 25 °C con mezcla ocasional. Después de la incubación, se añadió Na_2CO_3 1 M a la muestra para llevarla a pH 6. A continuación, se añaden 100 μ l de $NaBH_4$ 0,25 M en $NaOH$ 0,1 M a la muestra y la muestra se calienta a 50 °C durante 20 minutos. La mezcla se refrigera a continuación a 25 °C y se añade ácido acético glacial acidificado para llevar la muestra a pH 3. La mezcla se neutraliza a continuación con $NaOH$ 10 M y el volumen se reduce mediante
35 liofilización. Las muestras finales se introducen en una columna P-2 de Bio-Gel para separar di- y tetra- sacáridos para verificar el grado de degradación.

Digestión con ligasa

40 La heparinasa III escinde cadenas de azúcar en enlaces glucuronídicos. La serie de enzimas heparinasa (I, II y III) muestran, 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 causa la alteración de los dominios sulfatados. La heparinasa III despolimeriza HS con los dominios NA, dando como resultado la separación de la cadena de carbohidratos en dominios sulfatados
45 individuales. La heparinasa II escinde principalmente en los dominios "hombro" NA/NS de las cadenas de HS, donde se han descubierto patrones de sulfatación variables. Nota: la estructura principal de disacáridos que se repiten del polímero de heparán es un ácido urónico conectado a la glucosamina del aminoazúcar. "NS" significa que el aminoazúcar porte un sulfato en el grupo amino, lo que permite la sulfatación de otros grupos en C2, C6 y C3. "NA" indica que el grupo amino no está sulfatado y permanece acetilado.

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

55 Los di- y tetrasacáridos pueden eluirse mediante cromatografía en columna.

En la presente invención, el heparán sulfato es heparán sulfato 2 (HS-2). HS-2 denomina las cadenas de azúcar de un HSPG, que se ha descubierto que tienen afinidad por FGF-2. HS-2 tiene un peso molecular de aproximadamente
60 25 kDa y por lo tanto, suponiendo una masa molecular promedio de 400 Da por disacárido, consiste en aproximadamente 60 disacáridos. La composición de disacáridos de HS-2 se muestra en el documento Brickman et al. (Glycobiology Vo. 8 No. 5 págs. 463-471, 1998), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

65 Por "heparán sulfato 2" o "HS-2" se entiende el heparán sulfato que es descrito por Brickman et al. (1998), J. Biol.

Chem. 273(8), 4350-4359) y que se deriva (y puede obtenerse) de neuroepitelio embrionario murino, y es preferentemente capaz de interactuar con FGF-2. Por consiguiente, este heparán sulfato 2 puede obtenerse de proteoglucanos de heparán de células murinas del día 10 del desarrollo embrionario, según lo descrito por Brickman (*supra*). Se ha descubierto que el HS-2 que se usa en la sección experimental de la presente solicitud que procede de ratón embrionario, es muy potente en células de ratón, de ser humano, de rata, de pollo, de *Xenopus* y de *Drosophila*.

El HS-2 puede obtenerse de neuroepitelio de ratón del día 10 del desarrollo embrionario (E10). El peso molecular del HS-2 se muestra en la figura 9 después de diversos tratamientos que incluyen tratamiento con pronasa para eliminar cualquier componente de proteína asociado, álcali suave y heparinasa. El HS-2 puede caracterizarse, además, mediante el análisis del porcentaje de enlaces sensibles al tratamiento con HNO₂, heparinasa o heparanasa a pH bajo. Los resultados se muestran en la figura 10. La composición disacáridica del HS-2 después de la digestión con ácido nitroso se muestra en la figura 11. La composición tetrasacáridica del HS-2 después de la digestión con ácido nitroso se muestra en la figura 12. La composición disacáridica del HS-2 después del tratamiento con una mezcla de heparina liasa se muestra en la figura 13. Las características de sulfatación de los disacáridos mostrados en la figura 13 se muestran en la figura 14. La metodología para determinar el porcentaje de enlaces sensibles a tratamiento susceptible con cualquiera de HNO₂, heparinasa o heparanasa a pH bajo; la digestión con ácido nitroso y la digestión con heparina liasa se describen en otra parte en esta solicitud.

En esta memoria descriptiva la referencia a HS-2 incluye HS obtenido de neuroepitelio de mamífero del día 10 del desarrollo embrionario (E10) de ratón.

La invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritas excepto donde dicha combinación es claramente no permisible o se evita expresamente.

Aspectos y realizaciones de la presente invención se ilustrarán a continuación, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Aspectos y realizaciones adicionales serán evidentes para los expertos en la materia.

Breve descripción de las figuras

A continuación se describirán realizaciones y experimentos que ilustran los principios de la invención con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1. Fabricación de una matriz de soporte de cola de fibrina. Se mezclaron trombina, fibrinógeno y HS-2 y se polimerizaron en el cuerpo cilíndrico de una jeringa modificada de 1 ml (A) y se expulsaron después de la producción (B). La matriz de soporte de fibrina estéril producida tenía dimensiones de aproximadamente 5 mm de diámetro y un grosor de 2 mm (D), que podría implantarse a continuación fácilmente directamente en los sitios con defecto de 5 mm (C).

Figura 2. El análisis *in vitro* de la cinética de liberación de Alexa-468-heparina de matrices de soporte de fibrina reveló un brusco estallido inicial de más del 50 % de la heparina total liberada en las primeras 4 h, seguido por una liberación sostenida de hasta el 100 % durante 4 días. ▲ = Trombina 500 ● = Trombina 4.

Figura 3. μ TC cuantificada de sitios con defecto a 1 y 3 meses para sitios con defecto vacíos, sitios con cola de fibrina en solitario y tratados con HS. Evaluación mediante MIMICS del volumen total de hueso mineralizado, en mm³, detectado dentro de los sitios con defecto. El asterisco (*) denota una diferencia significativa entre sitios tratados con HS y todos los demás sitios con defecto a los 3 meses.

Figura 4. Fotografías representativas de análisis de sección tisular de tinción con haematoxilina y eosina (A-C), e inmunohistoquímica para colágeno de tipo I (D-F), osteocalcina (G-I) y osteopontina (J-L) dentro de cada sitio con defecto después de 3 meses.

Figura 5. Cuantificación de tinción como un porcentaje de formación de tejido total después de 3 meses determinada usando el software de análisis de imágenes Bioquant. El asterisco (*) denota una diferencia significativa entre sitios tratados con HS-2 y todos los demás sitios.

Figura 6. Morfología de la esponja de colágeno. Las esponjas se revistieron mediante pulverización catódica con oro y a continuación se examinaron usando MEB (Jeol JSM 5310 LV) a una tensión de aceleración de 10 kV.

Figura 7. Liberaciones de heparina a partir de esponjas de colágeno en el plazo de 24 h. La heparina se marcó de forma fluorescente con Alexa-488 y su liberación de las esponjas de colágeno se cuantificó mediante fluorometría durante 24 h.

Figura 8. El HS suministrado a partir de una esponja de colágeno no promueve una respuesta inflamatoria. Las esponjas de colágeno se trataron con 160 ng de HS y se incubaron durante 24 h para permitir el 100 % de liberación de HS en el medio (1 ml). Medio acondicionado (cond HS) se recogió y se añadió sobre macrófagos

RAW264.7 de ratón durante 24 h. Los niveles de TNF- α se valoraron usando ELISA. Se usaron macrófagos estimulados con HS (160 ng/ml) o LPS (10 ng/ml) como controles. El *asterisco* (*) indica una diferencia significativa ($p < 0,05$).

5 **Figura 9.** Un resumen de la M_r estimada de HS2 extracelular procedente de neuroepitelio E10. La fuente de HS se sometió a separación en una columna CL-6B de Sepharose de 1 X 120 cm después de diversos tratamientos. El tamaño de HS de longitud completa purificado se determinó tanto antes como después del tratamiento con álcali suave para determinar la presencia de más de una cadena por núcleo proteico. Además, la distancia aproximada entre disacáridos sensibles a heparinasa se determinó aislando los oligosacáridos grandes no resueltos, a partir de una columna P-10 de Bio-Gel y devolviéndolos a una columna CL-6B de Sepharose.

10 **Figura 10.** Proporción de los enlaces en HS-2 susceptibles a HNO_2 , heparinasa y heparinasa pH bajo. Heparán sulfato 2 radiomarcado se trató con HNO_2 , heparinasa o heparinasa a pH bajo y se fraccionó en una columna P-10 de Bio-Gel. El porcentaje de los enlaces totales sensibles al tratamiento se determinó en dos experimentos independientes mediante $\Sigma A_n/n$ donde A_n es el porcentaje de radiactividad total en ese pico, y n es el número de unidades repetidas de disacárido en los oligosacáridos, según lo determinado por la posición de elución (Turnbull y Gallagher, 1990; Kato et al. 1994).

15 **Figura 11.** Composición de disacáridos derivada de ácido nitroso de heparán sulfato procedente de neuroepitelios E10. HS-2 radiomarcado se despolimerizó mediante escisión desaminante con HNO_2 a pH bajo. Los disacáridos se aislaron después del tratamiento con HNO_2 de los GAG y las muestras se introdujeron a continuación en una columna P-2 de Bio-Gel 1 X 120 cm. Los disacáridos resultantes se fraccionaron mediante SAX-HPLC. Las áreas bajo los picos se integraron para dar la composición de disacáridos y posteriormente, la composición en porcentaje en cada muestra.

20 **Figura 12.** Tetrasacáridos de HS-2 tratado con HNO_2 separados por SAX-HPLC. Los tetrasacáridos derivados de heparán sulfatos tratados con HNO_2 se separaron originalmente en una columna P-2 de Bio-Gel y se resolvieron adicionalmente a continuación en SAX-HPLC. El porcentaje de cada uno se determinó calculando la radiactividad en cada pico y comparándola con la radiactividad total en todos los picos combinados. Los números de pico de tetrasacárido en la columna izquierda corresponden a los picos de SAX-HPLC. El grado de sulfatación se determinó mediante comparación de estas muestras tritadas con picos generados por muestras radiomarcadas doblemente con $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ (de Dr. Gordon Jayson, University of Manchester) que introdujeron en la misma columna en condiciones idénticas.

25 **Figura 13.** Composición de disacáridos de heparán sulfato de neuroepitelio E10 después del tratamiento con heparina liasa. El heparán sulfato 2 se despolimerizó completamente con una mezcla de heparán liasas. Los disacáridos insaturados resultantes se aislaron en una columna P-2 y se fraccionaron mediante cromatografía en columna de intercambio aniónico fuerte. El área bajo cada curva resultante se integró para calcular el porcentaje de cada disacárido en cada muestra. Los números representan el promedio de dos series (para las muestras de GAG primarias) y tres series (para las muestras derivadas de 2.3D). Más del 97 % de los disacáridos se recuperaron de cada muestra.

30 **Figura 14.** Características de sulfatación de disacáridos de las mezclas de HS-2 mostradas en la figura 13.

35 Descripción detallada de la invención

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se muestran en la descripción adjunta a continuación que incluye detalles específicos del mejor modo contemplado por los inventores para llevar a cabo la invención, a modo de ejemplo. Será evidente para un experto en la materia que la presente invención puede ponerse en práctica sin limitación a estos detalles específicos.

50 La presente invención se refiere al papel terapéutico del heparán sulfato-2 (HS-2) derivado del neuroepitelio para el aumento de la reparación ósea.

55 Previamente, el heparán sulfato derivado de hueso (por ejemplo tejido óseo, células óseas o células precursoras óseas) ha sido investigado para uso en el aumento de la reparación ósea. La presente invención se refiere a un heparán sulfato derivado de fuentes no óseas. En particular, se refiere al uso de HS-2 que se deriva de células neuroepiteliales embrionarias, que son células precursoras neurales que normalmente se desarrollan en el tubo neural antes de dar origen a neuronas inmaduras y tejido neural. El descubrimiento de que un heparán sulfato derivado de tejido neural, no óseo, es activo para mejorar la regeneración de tejido óseo y para mejorar la cicatrización de heridas en hueso *in vivo* es sorprendente.

60 Matrices de soporte que comprenden cola de fibrina cargada con el heparán sulfato-2 derivado de neuroepitelio embrionario se evaluaron experimentalmente, en primer lugar en un depósito de liberación, y en segundo lugar en una matriz de soporte para estimular la regeneración ósea en un defecto craneal en rata de tamaño crítico.

Las matrices de soporte cargadas con HS-2 han demostrado tener una distribución uniforme de heparán sulfato, que es liberado fácilmente con una fase de estallido típica, seguida rápidamente por un suministro prolongado que dura varios días. De forma importante, el HS-2 liberado contribuye a una cicatrización de heridas mejorada durante un periodo de 3 meses, según lo determinado mediante exploración por microTC (μ TC), histología, histomorfometría y PCR para marcadores osteogénicos. En todos los casos, solamente se observó una cicatrización mínima después de 1 y 3 meses en ausencia de HS-2. En contraste, se observó una marcada cicatrización a los 3 meses después del tratamiento con HS-2, con el cierre casi completo del sitio con defecto. El análisis por PCR mostraba incrementos significativos en la expresión génica de los marcadores osteogénicos Runx2, fosfatasa alcalina y osteopontina en el grupo de HS-2 en comparación con los controles.

El suministro con éxito del HS-2 no derivado del hueso en un hidrogel proporciona una novedosa alternativa a terapias basadas en injerto óseo autólogo y factor de crecimiento.

El ejemplo 1 demuestra la capacidad de regeneración ósea de una única dosis de HS-2 encapsulado dentro de una matriz de soporte de cola de fibrina implantada en un modelo de defecto de la bóveda craneal en rata de tamaño crítico durante una evolución temporal de 3 meses. La distribución *in vitro* y la liberación de HS-2 de la matriz de soporte de cola de fibrina se describe junto con los efectos *in vivo* de HS-2 sobre el proceso de regeneración ósea, según lo determinado mediante exploración por microTC (μ TC), examen histológico y cribados por PCR osteogénica.

El ejemplo 2 demuestra el uso de una matriz de esponja de colágeno para liberar HS-2. El ejemplo describe la cinética de liberación y la respuesta inflamatoria a HS-2 liberado desde una esponja de colágeno aprobada clínicamente.

Ejemplo 1

Fabricación de la matriz de soporte

Se prepararon matrices de soporte de cola de fibrina usando un kit comercial (kit TISSEEL; Baxter AG). El molde para la matriz de soporte de cola de fibrina cilíndrica era una jeringa de 1 ml modificada estéril (figura 1A y B) que permitía la aplicación fácil directamente al interior del sitio con defecto una vez que la matriz de soporte se había polimerizado, mejorando de este modo la esterilidad eliminando la necesidad de manipular cualquiera de las matrices de soporte (figura 1 C). Se añadió fibrinógeno (25 μ l) a 25 μ l de solución de trombina, produciendo una matriz de soporte polimerizada de aproximadamente 5 mm de diámetro y un grosor de 2 mm (figura 1 D). Dos concentraciones diferentes de trombina (Trombina 4 y Trombina 500) se investigaron *in vitro* para optimizar el inicio de experimentos *in vivo*. Las matrices de soporte de cola de fibrina creadas se usaron como matriz portadora para el suministro de heparán sulfato así como para llenar el sitio con defecto óseo. Para incorporar HS-2 en la matriz de soporte, se añadieron 5 μ g de HS-2 al componente de trombina. Esto se mezcló minuciosamente y a continuación se pipeteó en el cuerpo de la jeringa modificada estéril antes de añadir el componente de fibrinógeno mientras se mezclaba. La subsiguiente polimerización de la cola, que encapsula el HS-2, requirió aproximadamente 1 h. Las matrices de soporte se examinaron a continuación *in vitro* para a) liberación de HS-2, para observar la cinética de liberación de HS-2 a partir de la cola de fibrina, y b) microscopía confocal, para observar la distribución de HS-2 por toda la matriz de soporte de cola de fibrina, y c) implantación *in vivo* y evaluación por μ TC de la mineralización ósea y examen histológico. Para el fin de este estudio, todos los experimentos *in vitro* se emprendieron usando Heparina (Sigma) como un sustituto de control para HS-2. La heparina es estructuralmente similar al HS, siendo una variante hipersulfatada, y se cree que se distribuye y se libera de la misma manera dentro de una matriz de soporte. Puede conjugarse fácilmente con la marca fluorescente Alexa Fluor-488, permitiendo que su distribución se localice y se observe usando microscopía confocal, y su liberación se cuantifique usando lectura de placas fluorescentes. Todos el trabajo *in vivo* utilizaba HS-2.

Cinética de liberación

Matrices de soporte de cola de fibrina que contenían 5 μ g de heparina marcada con Alexa Fluor-488 se colocaron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato calentada previamente (PBS) y se incubaron a 37 °C, protegidas de la luz, durante un periodo de 7 días. En cada punto temporal, se retiraron 100 μ l de PBS para muestreo y se sustituyeron por PBS fresco. La heparina liberada se cuantificó a partir de la intensidad de fluorescencia del medio de liberación a 485 nm mediante comparación con una curva patrón de Alexa Fluor-488-heparina. A continuación, se representó gráficamente la liberación acumulativa.

Microscopía confocal

Se conjugó heparina de forma fluorescente con Alexa Fluor-488 (A488, Molecular probes) usando un método adaptado de Osmond (24), antes de la incorporación en la matriz de soporte. Para visualizar la distribución de heparina, las matrices de soporte se observaron usando microscopía de barrido láser confocal (microscopio Zeiss LSM S10 meta invertido). Se construyeron proyecciones en profundidad tridimensionales a partir de 100 secciones

horizontales de 10 μm de tamaño de paso.

Cirugía

5 El estudio *in vivo* implicaba la creación de dos defectos óseos de 5 mm de diámetro en el hueso parietal. Se usaron 20 ratas Wistar hembra (300-400 gm) con aprobación del *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC), Singapur. Éstas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos: (a) defectos que se dejaron vacíos, (b) defectos que contienen matriz de soporte de cola de fibrina en solitario, y (c) defectos que contienen matriz de soporte de cola de fibrina que encapsula 5 μg de HS-2.

10 Antes de la cirugía, a las ratas se les administró anestesia intraperitoneal de 75 mg/kg de Ketamina y 1 mg/kg de Medetomidina, las cabezas se afeitaron y se aplicó gasa empapada en solución salina a los ojos. Bajo técnica aséptica, la piel sobre la bóveda craneal se desinfectó con Betadine™, la piel sobre el hueso parietal se diseccionó en el plano sagital y el periostio se eliminó de ambos lados del hueso parietal. Se usó un trépano de 5 mm de diámetro para crear dos defectos óseos de tamaño crítico de lado a lado circulares (25) que se irrigaron con solución salina para eliminar coágulos sanguíneos; se consiguió hemostasia apropiada con presión suave. Las matrices de soporte de cola de fibrina +/- HS-2 se aplicaron directamente al interior de los sitios con defecto utilizando el novedoso sistema de jeringa. A continuación, la piel se cerró con suturas de vicrilo revestidas absorbibles 5-0 (poliglactina 910, Johnson and Johnson). A los animales se les administraron a continuación anestésicos inversos (5 mg/ml de antisedan), antibióticos y analgésicos temegésicos. Se colocaron individualmente en jaulas con alimento y agua, y se observaron de forma postoperatoria para cualesquiera efectos adversos indebidos.

Exploración por micro tomografía computarizada (μTC)

25 A los 1 y 3 meses después de la cirugía, las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal tal como se ha descrito anteriormente, antes de someterse a exploración por μTC para obtener una medida cuantitativa de los niveles de hueso regenerado (SKYSCAN-1076 escáner de micro tomografía computarizada *in vivo*, Bélgica). La imaginología se realizó con anchura de barrido de 68 mm, un filtro Al-1 mm, tamaño de píxel de 35 μm y promediando 4 datos en uno (26). Todas las muestras fueron exploradas a través de un ángulo de rotación de 180° con un paso de rotación de 0,8° a 35 μm de resolución. Los datos se reconstruyeron volumétricamente usando software de reconstrucción de TC de haz cónico de SKYSCAN a 1968x1968 píxeles. Los archivos se reconstruyeron a continuación para análisis usando el software Mimics v 8.11 (Materialize, Bélgica) usando funciones incorporadas. A partir de la imagen en 3D, se seleccionó una región de interés (RDI) cilíndrica de tamaño de defecto de 5 mm de diámetro para análisis. Esta RDI corresponde a la ubicación del defecto original. El grado de regeneración ósea que se produce dentro del defecto se presentó como un volumen en mm^3 de datos reconstruidos obtenidos en análisis por micro TC. El umbral se ajustó empíricamente para visualizar el sitio con defecto y la mineralización (-284 a 1420 para todas las reconstrucciones). La reconstrucción del defecto se obtuvo sustrayendo los datos de mineralización explorados.

Histología e histomorfometría

40 Los animales fueron sacrificados a los 3 meses en una cámara de CO_2 . Después de la eutanasia, los tejidos se diseccionaron del hueso de la bóveda craneal y el sitio con defecto se seccionó para histología. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % durante 2 días, y se descalcificaron en EDTA al 12,5 % (Sigma Aldrich) pH 7,0 durante 3 semanas. Las muestras se deshidrataron sucesivamente en etanol en un procesador de tejidos (Shandon Citadel 1000, Thermo Scientific), y se incluyeron en parafina (Leica EG 1160). Se tomaron secciones (5 μm) usando un microtomo (Leica RM 2135). Los portaobjetos se desparafinizaron con xileno y se rehidrataron con concentraciones sucesivas de etanol, antes de teñirlos con hematoxilina y eosina (Sigma) y se montaron con solución de preparación DPX (Fluka Biochemica). También se usó tinción inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales de ratón contra colágeno de tipo I (Sigma) a dilución 1:500, osteopontina (Santa Cruz) dilución 1:50, y osteocalcina (Abcam) a dilución 1:150. Los anticuerpos secundarios eran IgG anti-ratón adsorbidos a rata (Vector). Los antígenos se localizaron usando un procedimiento con inmunoperoxidasa de acuerdo con las directrices del fabricante (kit VECTASTAIN® ABC, Vector Labs). También se incluyó un control negativo de IgG1 de ratón (Caltag Laboratories).

55 La histomorfometría se realizó usando software Bioquant Osteo II para cuantificar la tinción porcentual para colágeno I, osteocalcina y osteopontina dentro del sitio con defecto. En resumen, una región de interés se dibujó de forma manual alrededor del sitio con defecto. Todo el sitio con defecto se cuantificó en primer lugar (área total), y a continuación el porcentaje de tinción positiva para cada una de las proteínas mencionadas anteriormente se cuantificó y se expresó como un porcentaje de todo el sitio con defecto. Esta tinción positiva se obtuvo estableciendo de forma manual el umbral en las imágenes y dirigiendo el software para seleccionar solamente las tinciones positivas atribuibles a la proteína de interés (conseguidas a través de comparaciones con controles negativos). Los umbrales se memorizaron y se aplicaron a cada portaobjetos dentro del conjunto de datos, para cada tinción.

Aislamiento de ARN y RQ-PCR

65

Después del sacrificio de los animales, los sitios con defecto se recogieron quirúrgicamente y se congelaron inmediatamente usando nitrógeno líquido. El tejido extraído se trituró a continuación en forma de polvo con un mortero y un mazo. El ARN total se extrajo usando reactivo Trizol (Invitrogen Corp., EE. UU.) y posterior limpieza usando un RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Singapur) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN aislado se evaluó mediante electroforesis en gel y se cuantificó en un espectrofotómetro de ARN/ADN Genequant (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) y se almacenó a -80°C hasta uso adicional. Para conversión a ADNc, 500 ng de ARN total se transcribieron de forma inversa usando hexámeros aleatorios catalizados mediante Superscript III RT (Invitrogen Corp., EE. UU.). Después de la cuantificación espectrofotométrica del ADNc, los niveles de expresión de los genes diana se determinaron usando RQ-PCR. En resumen, 120 ng de ADNc se amplificaron por triplicado dos veces usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism FAST 7500® (PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA, EE. UU.) usando el ciclo por defecto: 95°C x 20 s seguido por 40 ciclos de 95°C x 3 s, 60°C x 30 s. Cebadores y sondas Runx2, OP y 18S se diseñaron usando el software Primer Express (v 2.1, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), y se han descrito en otra parte (27). Las sondas de cebadores ALP se adquirieron como un ensayo a medida (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). La sonda Runx2 LNA se rediseñó para incorporar bases LNA y se marcó con BHQ-1 (Proligo, Singapur). El gen de la subunidad ribosómica 18S (VIC/TAMRA) se usó como control endógeno. Los datos se analizaron usando el software ABI Sequence Detector. Las amplificaciones se realizaron tres veces por triplicado. Los valores de expresión del gen diana ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) se calcularon con respecto a los niveles de expresión de 18S.

20 *Análisis estadístico*

Un ANOVA de dos vías con diferencias consideradas significativas en el intervalo de confianza al 95 %, se usó para determinar diferencias significativas entre la mineralización dentro de las matrices de soporte tratadas con HS-2 y sin HS-2 seguido por el post-test de Bonferroni. Se incluyeron barras de error típico en todos los gráficos y representan el intervalo de confianza al 95 %.

Análisis in vitro de matrices de soporte de cola de fibrina cargadas con HS-2

Para examinar la distribución de heparina a través de la matriz de soporte de fibrina y para evaluar su liberación basada en el tiempo, se realizó una combinación de microscopía confocal y espectroscopía fluorescente. La microscopía confocal demostró una distribución uniforme de heparina (sustituto de HS-2) por todo el cuerpo de la matriz de soporte de fibrina. Se tomaron barridos secuenciales de secciones de $10\ \mu\text{m}$ y no mostraban ningún cambio significativo de la distribución de heparina entre cada sección por todo el cuerpo entero de la matriz de soporte (datos no mostrados).

La figura 2 muestra la cinética de liberación de heparina a partir de la matriz de soporte, usando componentes tanto de Trombina 4 como de Trombina 500. La liberación a partir de ambas matrices de soporte seguía el mismo patrón; un rápido estallido inicial con más del 50 % de liberación en el plazo de las primeras 4 h, seguido por una liberación sostenida en el transcurso de 4 días, momento en el que el 100 % de la heparina había sido liberada. Solamente se usó trombina 4 para estudios *in vivo* después de que ensayos iniciales demostraron que la tasa de polimerización de Trombina 500 era demasiado rápida, por tanto propensa a la formación de burbujas de aire y la encapsulación no uniforme del componente de heparina.

Análisis in vivo de matrices de soporte de cola de fibrina cargadas con HS-2

El efecto de HS-2 sobre el aumento de la consolidación ósea *in vivo* se evaluó mediante μTC e histomorfometría. La exploración por microTC detectó incrementos significativos de la mineralización para aquellos sitios con defecto tratados con HS-2 tanto a 1 mes como a 3 meses. La figura 3 representa reconstrucciones representativas de sitios con defecto a 1 y 3 meses para defectos vacíos, con cola de fibrina en solitario y matrices de soporte de cola de fibrina cargadas con HS-2. A los 3 meses, los sitios tratados con HS-2 presentaban un cierre completo del defecto con hueso mineralizado. La cuantificación de esta mineralización usando software MIMICS mostraba significativamente más hueso presente en los sitios tratados con HS-2 a los 3 meses en comparación con sitios con defecto vacíos y sitios con defecto con cola de fibrina en solitario ($p < 0,05$). No se descubrieron diferencias significativas después de solamente 1 mes. Todos los tratamientos demostraron incrementos significativos desde el mes 1 al 3 dentro de sus grupos respectivos.

A continuación se examinaron las muestras aisladas y seccionadas histológicamente usando tinción con hematoxilina y eosina (H&E) e inmunquímica. Los sitios con defecto con cola de fibrina en solitario parecen tener astillas óseas residuales presentes procedentes de la cirugía, posiblemente debido a taladrado incompleto a través del hueso parietal, y parecen estar compuestos por hueso recién formado con tinción más intensa y uniforme, que contiene islas dispersas, no contiguas dentro del área del defecto (figura 4B). Los defectos vacíos parecen tener solamente tejido conjuntivo fibroso disperso que forma puentes entre los frentes óseos (figura 4A). En las muestras tratadas con HS-2, puede observarse hueso contiguo recién formado con y rodeando a todos los bordes del sitio con defecto (figura 4C). Todos los marcadores osteogénicos, el colágeno de tipo I, la osteocalcina y la osteopontina, dieron una tinción superior de forma demostrable dentro de los grupos tratados con HS-2 en comparación con defectos vacíos. El colágeno I era poco detectable y estaba desordenado en los sitios con defecto tanto vacíos como

con cola de fibrina (figura 4D, E). En contraste, en las muestras tratadas con HS-2, el colágeno I tenía un aspecto más organizado y fibrilar a lo largo de la dirección del tejido fibroso, contiguo con los bordes óseos estructurados del sitio con defecto (figura 4F). La tinción de osteocalcina era muy baja en los sitios con defecto tanto vacíos como con fibrina, con una señal detectada de forma predominante en los bordes óseos del sitio con defecto (figura 4G, H). En los sitios con defecto tratados con HS-2, la tinción de osteocalcina era uniforme en todas partes tanto en los bordes óseos como en el sitio con defecto reparado (figura 4J). La osteopontina era muy baja en las muestras con defecto vacío (figura 4J) pero estaba presente en todos los defectos tratados con fibrina (figura 4K). La distribución de osteopontina por todos los defectos tratados con HS-2 parecía estar localizada en su mayoría en los bordes óseos (figura 4L). Cuando se cuantifica la tinción dentro de los sitios con defecto usando análisis Bioquant, estas observaciones se reforzaron con defectos tratados con HS-2 que se determinó que tenían niveles significativamente más elevados de colágeno de tipo I, osteocalcina y osteopontina a los 3 meses (figura 5).

RQ PCR

Para evaluar adicionalmente la formación ósea, se evaluó un panel de transcritos de ARNm (Runx2, ALP y OP) mediante RQ PCR. La figura 5 revela regulación positiva significativa de Runx2, fosfatasa alcalina y osteopontina en grupos tratados con HS-2 en comparación con cola de fibrina en solitario. En particular, Runx2 experimentó una regulación positiva de 6 veces, la fosfatasa alcalina una regulación positiva de 3 veces y la osteopontina una regulación positiva de 2 veces en muestras tratadas con HS-2 en comparación con controles.

El hueso es un órgano dinámico y multifuncional, capaz de remodelación y auto-regeneración. Sin embargo, en casos extremos de no unión o unión de fracturas retardada, a menudo se requiere intervención terapéutica. En procedimientos convencionales, el trasplante de hueso requiere procedimientos invasivos tales como incisiones en piel y la mucosa y reflexión del periostio. La capacidad de implantar una matriz de soporte bioactiva con propiedades osteoinductoras dentro de un defecto de tamaño crítico, es una atractiva, especialmente si la terapia niega el requisito de incluir células vivas en la matriz de soporte.

Se ha demostrado que la aplicación local o sistémica de una serie de factores de crecimiento tales como FGF2 y BMP2 (2, 14) puede ayudar a la reparación ósea. Las desventajas de dicha aplicación incluyen sus rápidas tasas de aclaramiento y la susceptibilidad a degradación proteolítica (28). Adicionalmente, existen preocupaciones sobre su seguridad a largo plazo, particularmente dado que se requieren grandes cantidades, con sus elevados costes asociados. El HS se une a diversas proteínas solubles implicadas en el control del fenotipo celular, incluyendo factores de crecimiento de unión a heparina tales como los FGF, TGF- β y BMP, incrementando su unión a receptores de alta afinidad. El HS actúa para concentrar factores de crecimiento cerca de las células, protegerlas de proteasas extracelulares, guiarlas a la superficie celular y facilitar la unión a sus receptores específicos (1). Los complejos formados pueden disociarse y movilizarse fácilmente en el caso de daño tisular, dando como resultado una prolongación de bioactividad en el sitio de daño tisular (12). Se ha indicado que miméticos similares a heparán (dextranos carboximetil-bencilamida-sulfonados) inducen la reparación de defectos del cráneo de rata (15), y dosis individuales de 5 μ g de HS han demostrado aumentar la reparación de fracturas en un modelo de fractura en rata (14). Este estudio buscó investigar los efectos del HS-2 derivado de células no óseas sobre la regeneración ósea dentro de un defecto craneal de rata de tamaño crítico usando cola de fibrina como depósito de liberación. Se utilizó exploración por μ TC para determinar la mineralización ósea dentro de los sitios con defecto y esto se reforzó con examen histológico e histomorfométrico de los sitios con defecto.

El análisis por microTC mostraba regeneración ósea significativa dentro de defectos tratados con HS-2 en comparación con defectos vacíos y con cola de fibrina en solitario, con cierre completo de algunos sitios después de 3 meses. Esto se corresponde con estudios de Jackson (14) y Blanquaert (15), cada uno de los cuales demostró regeneración ósea incrementada a través de la adición de HS derivado de hueso y moléculas similares a HS tal como se observa mediante radiomorfometría e histomorfometría. La histología mostró claras diferencias en la formación de tejido entre los diversos sitios de tratamiento. Se descubrió que tejido conjuntivo fibroso disperso atraviesan los efectos vacíos, compuesto por los niveles más bajos de tinción para colágeno I, osteocalcina y osteopontina; significativamente menor que los sitios tratados con HS-2 a los 3 meses.

El hueso recién formado puede observarse rodeando todos los bordes del sitio con defecto en (figura 4C) con tinción más intensa y uniforme que el presente en los sitios con defecto con cola de fibrina en solitario, que parecían contener solamente islas dispersas dentro del área del sitio con defecto no contiguo al frente óseo (figura 4B). La tinción de colágeno era apenas visible y desordenada para los sitios con defecto vacíos y con cola de fibrina en solitario (figura 4D y E) pero tenían un aspecto fibrilar más organizado dentro del sitio tratado con HS-2 a lo largo de la dirección del tejido fibroso, contiguo a los antiguos huesos/bordes estructurados del sitio con defecto (figura 4F) El sitio con defecto con cola de fibrina parece tener astillas óseas residuales presentes desde la cirugía, posiblemente debido a taladrado incompleto a través del hueso parietal. La cuantificación de la tinción dentro de los sitios con defecto reveló que los defectos tratados con HS-2 tienen niveles significativamente más elevados de colágeno de tipo I, osteocalcina y osteopontina que sitios con defecto vacíos o sitios con defecto con cola de fibrina después de 3 meses. Adicionalmente RQ-PCR demostraba una regulación positiva de 6 veces de Runx2, una regulación positiva de 3 veces de fosfatasa alcalina y una regulación positiva de 2 veces de osteopontina en los grupos tratados con HS-2 en comparación con cola de fibrina en solitario. Debe observarse que era difícil obtener suficiente tejido a partir de

los sitios con defecto vacíos para permitir la extracción de ARN. Runx2 ha demostrado ser esencial tanto para el establecimiento del patrón esquelético durante la embriogénesis como para la progresión de diferencia de osteoblastos (29-33). Las células de la bóveda craneal recogidas de ratones deficientes en Runx2 tienen tasas incrementadas de proliferación celular, síntesis de ADN y marcadores de fase G1/S; la reintroducción de Runx2 restaura el desarrollo del ciclo celular normal, haciendo hincapié en la importancia de Runx2 para la regulación del ciclo celular (34).

La cola de fibrina es una matriz fisiológicamente relevante cuyo componente principal, fibrina, tiene papeles fundamentales en el proceso de coagulación sanguínea y cicatrización de heridas. También es un vehículo biológico potencialmente adecuado para trasplante de células, dado que tiene biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de unión a las células demostradas (35). El factor estabilizante de fibrina XIII, contenido en la cola de fibrina, favorece la migración de células mesenquimatosas indiferenciadas en la estructura altamente reticulada de la cola y mejora la proliferación de estas células (36, 37). Las matrices de soporte de cola de fibrina en este estudio estaban compuestas de una baja concentración de trombina; trombina 4 (en oposición a trombina 500) dado que la trabajabilidad y la incorporación de HS-2 en la cola polimerizante demostraron ser difíciles usando concentraciones elevadas; incrementar la concentración de trombina ha demostrado afectar al grosor de la fibra, la porosidad y la homogeneidad de la fibrina (38). La heparina (el control de HS-2) se liberó rápidamente en las primeras 4 h a partir de la cola de fibrina, con más del 50 % de heparina total liberada en las primeras 4 h seguida por una liberación sostenida, hasta el 100 % durante 4 días. Este brusco estallido puede haber proporcionado el estímulo inicial para reclutamiento de factor de crecimiento y el inicio de la regeneración ósea. El estudio actual utilizaba una dosis de 5 µg de HS-2, encapsulado dentro de un sistema de suministro de cola de fibrina, dentro de defectos craneales de rata de tamaño crítico. Nuestros resultados sugieren que potenciar la actividad del factor de crecimiento dentro del sitio con defecto a través del medio de azúcar de HS-2, de modo que incrementar la expresión de genes osteogénicos, tiene efectos terapéuticos significativos sobre la regeneración ósea.

Ejemplo 2

Materiales y métodos

Matriz de soporte de colágeno

Las esponjas de colágeno se adquirieron en Integra Life Sciences (HELISTAT®, Integra Life Sciences Corp, EE. UU.) y median 7 x 21 x 5 mm. Para todos los ensayos, las esponjas se cortaron uniformemente en seis trozos que median 7 x 7 x 5 mm y se mantuvieron estériles. La morfología de las esponjas se evaluó usando Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). En resumen, las esponjas de colágeno se revistieron mediante pulverización catódica con oro y a continuación se examinaron usando MEB (Jeol JSM 5310 LV) a una tensión de aceleración de 10 kV.

Marcado fluorescente de heparina

Para ensayos *in vitro* no biológicos, la heparina, un miembro hipersulfatado de la familia de glucosaminoglucano de HS, se conjugó con Alexa Fluor 488 (A488, Molecular Probes, RU) usando un método publicado anteriormente por el grupo de los inventores (39). En resumen, 3 mg de heparina (H-3149) se solubilizaron en 300 µl de solución 0,1 M de tampón ácido 4-morfolinoetanosulfónico (MES, M3671) (pH 4,5) y se combinaron con 50 µl de una solución al 10 % de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Fluka 03449) en tampón MES 0,1 M. A continuación, una solución al 1 % de A488 (50 µl) en tampón MES 0,1 M se añadió a la solución de heparina/EDC. La mezcla se protegió de la luz y se incubó durante una noche a temperatura ambiente. La heparina conjugada de forma fluorescente se eluyó en una columna desalinizadora Amersham PD10. La eficiencia de marcado era de aproximadamente 1,3 moles de A488/mol de heparina.

Perfil de liberación

Las esponjas de colágeno se adsorbieron de forma pasiva con 500, 250, 125, 50, 10 y 0 µg de A488-heparina (50 µl), se protegieron de la luz, y se colocaron en 1 ml de PBS a 37 °C durante 24 h. A 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h, 100 µl de PBS acondicionado se recogieron para muestreo y se sustituyeron por PBS fresco. Adicionalmente, las esponjas se visualizaron mediante microscopía fluorescente en cada punto temporal usando un estereomicroscopio Olympus SZX12. La concentración de A488-heparina liberada se cuantificó mediante fluorometría y la liberación acumulativa de A488-heparina se notificó como un porcentaje de concentración de carga.

Respuesta proinflamatoria a esponjas de colágeno pretratadas con HS-2

Las respuestas inflamatorias a corto plazo al compuesto de HS-2/colágeno se evaluaron durante 24 h y se valoraron midiendo niveles endógenos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en el medio de cultivo. Se sembraron macrófagos RAW264.7 de ratón (1,5 x 10⁵ células/cm²) en placas de 48 pocillos y se cultivaron durante 24 h en presencia de medio acondicionado con HS-2 o medio que contenía HS-2 exógeno (160 ng/ml). La cantidad de (TNF-α) secretada al medio en respuesta al medio de tratamiento se cuantificó usando kit de ELISA de TNF-α (BD

Bioscience, EE. UU.) según las instrucciones de fabricante. Las células estimuladas con 10 ng/ml de lipopolisacárido (LPS, Fluka, Alemania) se usaron como control positivo, mientras que las células cultivadas en medio basal sin estimulación proporcionaban medición de niveles de fondo de TNF- α .

5 *Análisis estadístico*

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con tres ensayos independientes. Los resultados se notifican como la media \pm error típico. La significación ($p < 0,05$) se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguida por análisis post hoc de Tukey-Kramer.

10 Para examinar la morfología de las esponjas de colágeno, se realizó MEB. Tal como se muestra en la figura 6, las esponjas tienen una elevada porosidad (tamaño promedio de poro 20 μ m de diámetro) que contribuye a su capacidad para soportar la infiltración de nutrientes, la adsorción pasiva de moléculas, y la colonización celular. Para ensayos no funcionales, se usó heparina para imitar a HS-2. Para detectar heparina adsorbida pasivamente tras la liberación, se conjugó de forma fluorescente el GAG con una sonda Alexa488 tanto para visualización como para cuantificación por fluorometría. Tal como se esperaba, se descubrió heparina pasivamente adsorbida liberada con una fase de estallido inicial a partir de las esponjas de colágeno, con más del 50 % de liberación en el plazo de la primera hora y el 100 % liberado a las 24 h independientemente de la concentración de revestimiento inicial (figura 7). Esto también se evidenció visualmente cuantificando la disminución de intensidad fluorescente con el tiempo, a medida que las esponjas tratadas se sumergieron en PBS.

25 Dado que las estructuras de heparina y HS-2 son comparables, se supuso la misma cinética de liberación a partir de la esponja de colágeno que la de HS-2 adsorbido de forma pasiva. Por lo tanto, se supuso que el 100 % del HS-2 se libera a partir de la matriz de soporte de colágeno a las 24 h; este periodo de tiempo se seleccionó a continuación para recoger el medio acondicionado y respuestas inflamatorias del ensayo. Se incubaron, por lo tanto, esponjas de HS-2 pretratadas durante 24 h en medio libre de suero para permitir que el 100 % del HS-2 se liberara. El medio acondicionado con esponja, tanto con como sin HS-2, inducía solamente niveles de fondo de producción de TNF- α , mientras que la estimulación con LPS dio una respuesta de TNF- α significativa (figura 8). La falta de una respuesta proinflamatoria inducida por las esponjas tratadas con HS-2 *in vitro* indica que este sistema de suministro es adecuado para uso *in vivo*.

35 Tal como se esperaba, el HS-2 adsorbido pasivamente se liberaba con un estallido inicial a partir de la esponja de colágeno, seguida por una liberación sostenida de hasta el 100 % a las 24 h. Jackson *et al.* (13) observaron que una única aplicación que solo se realiza una vez de HS derivado de hueso en el momento de la lesión era capaz de mejorar significativamente la formación de hueso en un 20 % dentro del callo de consolidación. Análogamente, el ejemplo 1 identifica que HS-2, liberado a partir de la cola de fibrina con una fase de estallido inicial (50 % en el plazo de las primeras 4 h), alcanzando el 100 % de liberación en 4 días, consolidaba significativamente un defecto craneal de rata de tamaño crítico en comparación con la inducida por compuestos de cola de fibrina no tratados.

40 Similar a otros estudios (39), se descubrió que las esponjas tratadas tanto con como sin HS-2 solamente inducían niveles de fondo de TNF- α , indicando su uso potencial como sistema de suministro biocompatible de HS-2.

45 Diversos sustratos incluyendo hidrogeles (40-42), cemento óseo (43), colágeno (44), y titanio (45), así como otros materiales han sido derivatizados con heparina, una forma hipersulfatada de HS, para proporcionar liberación bioactiva y sostenida de factores de crecimiento de unión a heparina (HBGF) tales como VEGF, FGF y BMP-2. Estos estudios demuestran la potente capacidad de la heparina para proteger los HBGF y promover una liberación más eficaz y eficiente de estos factores a partir del portador de biomaterial. Sin embargo, el uso de heparina tiene limitaciones debido a su falta de especificidad, su actividad anti-trombógena, y su plétora de efectos secundarios no deseados, con trombocitopenia y osteoporosis siendo los más notables (46).

50 Este ejemplo describe el suministro de HS-2 a partir de una matriz de soporte de colágeno en 3-D clínicamente aprobado. Los resultados de este estudio apoyan claramente una base lógica para explotar el uso de HS-2 para fines terapéuticos. La rápida liberación de HS-2 mantiene la bioactividad sin inducir una respuesta inflamatoria.

55 **Referencias**

1. Simon M. Cool y Victor Nurcombe. The osteoblast-heparan sulfate axis: Control of the bone cell lineage. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2005, 37; 9: 1739-1745
- 60 2. Fakhry, A., et al., 2005. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. Bone 36, 254-266.
- 65 3. Ornitz, D.M., Marie, P.J., 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. Genes Dev. 16, 1446-1465.

4. Zhang, X., Sobue, T., Hurley, M.M., 2002. FGF-2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF-1 mRNA in mouse marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 526-531.
5. Rebecca A. Jackson, Victor Nurcombe y Simon M. Cool. Coordinated fibroblast growth factor and heparan sulfate regulation of Osteogenesis. *Gene.* 2006. 379: 79-91
6. Guido David y Merton Bernfield. The emerging roles of cell surface heparan sulfate proteoglycans *Matrix Biology.* 1998. 17; 7: 461-463
10. 7. Jeremy Turnbull, Andrew Powell y Scott Guimond Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends in Cell Biology* 2001. 11; 2: 75-82
8. Malcolm Lyon y John T. Gallagher. Bio-specific sequences and domains in heparan sulfate and the regulation of cell growth and adhesion. *Matrix Biolog.* 1998. 17: 7: 485-493
15. 9. Olli Saksela y Daniela Rifkin Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity *Fibrinolysis.* 1989. 3: 36
20. 10. Irie A, Habuchi H, Kimata K, Sanai Y. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 858-65.
11. Takada T, Katagiri T, Ifuku M, Morimura N, Kobayashi M, Hasegawa K, et al. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 43229-35.
25. 12. Coombe DR, Kett WC. Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 410-24
13. Jackson RA, McDonald MM, Nurcombe V, Little DG, Cool SM. The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model. *J Orthop Res* 2006; 24: 636-44.
30. 14. Blanquaert F, Saffar JL, Colombier ML, Carpentier G, Barritault D, Caruelle JP. Heparan-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone* 1995; 17: 499-506.
15. Lafont J, Blanquaert F, Colombier ML, Barritault D, Caruelle JP, Saffar JL. Kinetic study of early regenerative effects of RGTA11, a heparan sulfate mimetic, in rat craniotomy defects. *Calcif Tissue Int* 2004; 75: 517-25.
35. 16. Emma Luong-Van, Lisbeth Grøndahl, Victor Nurcombe Simon Cool. In vitro biocompatibility and bioactivity of microencapsulated heparan sulfate. *Biomaterials* 2007. 28: 2127-2136
40. 17. Shireman PK, Greisler HP, Fibrin Sealant in vascular surgery: a review. *Journal of Long term effects of Medical Implants.* 1998; 8: 117-132
18. Weisel JW, Fibrinogen y Fibrin. *Advanced Protein Chemistry.* 2005; 70: 247-299
45. 19. Rajesh Vasita, Dhirendra S Katti. Growth factor delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert Reviews in Medical Devices.* 2006; 3(1): 29-47.
20. Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgersen S. *Thromb. Haemost.* 2003 89(3): 573-582
50. 21. Pandit AS, Wilson DJ, Feldman DS. Fibrin scaffold as an effective vehicle for the delivery of acidic growth factor (FGF-1). *J. Biomaterials Applications.* 2000; 14(3); 229-242.
22. DeBlois Cote MF. Doillon CJ. Heparin-fibroblast growth factor fibrin complex: in vitro and in vivo applications to collagen based materials. *Biomaterials.* 1994; 15(9): 665-672.
55. 23. B Rai, SH Teoh, DW Hutmacher, T Cao, KH Ho. Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. *Biomaterials* 2005; 26: 3739-3748.
24. Osmond RI, Kett WC, Skett SE, Coombe DR. Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization. *Anal Biochem* 2002; 310: 199-207.
60. 25. Catherine. M Cowan, Yun-Ying Shi, Oliver O Aalami, Yu-Fen Chou, Carina Mari, Romy Thomas, Natalina Quarto, Christopher H Contag, Benjamin Wu & Michael T Longaker Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects; *Nature Biotechnology* 2004 22, 560 - 567
65. 26. Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JC, Lee EH. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of

- high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials* 2006; 27(7): 1071-80.
- 5 27. Kee Woei Ng, Tobias Speicher, Christian Dombrowski, Torben Helledie, Larisa M Haupt, Victor Nurcombe y Simon M Cool. Osteogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells Is Mediated by Fibroblast Growth Factor Receptors. *Stem Cells and Development* (2007) 16: 305-318
28. Babensee JE, McIntyre LV, Mikos AG. Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm Res.* 2000; 17: 497-504.
- 10 29. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. 1999. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13(8): 1025-1036.
- 15 30. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5): 755-764.
- 20 31. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelmann R, Zabel BU, Olsen BR. 1997. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5): 773-779.
- 25 32. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5): 765-771.
- 30 33. Choi KY, Kim HJ, Lee MH, Kwon TG, Nah HD, Furuichi T, Komori T, Nam SH, Kim YJ, Kim HJ, Ryoo HM. 2005. Runx2 regulates FGF2-induced Bmp2 expression during cranial bone development. *Dev Dyn* 233(1): 115-121.
34. Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, Choi JY, Komori T, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. 2003. Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Res* 63(17): 5357-5362.
- 35 35. Keller J, Anderasses TT, Joyce F. Fixation of osteochondral fractures: fibrin sealant tested in dogs. *Acta Orthop Scand* 1985; 56: 323-326.
36. Kasai S, Kunimoto T, Nitta K. Cross linking of fibrin by activated factor XIII stimulates attachment, morphological changes and proliferation of fibroblasts. *Biomed Res.* 1983; 4: 155-160
- 40 37. Marktl W, Rudas B. The effect of factor XIII on wound granulation in the rat. *Thromb Diath Haemorrh.* 1974; 32: 578-581.
- 45 38. Damien Le Nihouannen, Laurent Le Guehennen, Thierry Rouillon, Paul Pilet, Melitta Bilban, Pierre Layrolle, Guy Daculsi. Micro-architecture of calcium phosphate.
39. Luong-Van E, Grondahl L, Nurcombe V, Cool S. In vitro biocompatibility and bioactivity of microencapsulated heparan sulfate. *Biomaterials.* Abril de 2007; 28(12): 2127-36.
- 50 40. Cai S, Liu Y, Zheng Shu X, Prestwich GD. Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* Octubre de 2005; 26(30): 6054-67.
41. Liu Y, Cai S, Shu XZ, Shelby J, Prestwich GD. Release of basic fibroblast growth factor from a crosslinked glycosaminoglycan hydrogel promotes wound healing. *Wound Repair Regen.* Marzo-Abril de 2007; 15(2): 245-51.
- 55 42. Pike DB, Cai S, Pomraning KR, Firpo MA, Fisher RJ, Shu XZ, et al. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF. *Biomaterials.* Octubre de 2006; 27(30): 5242-51.
- 60 43. Lode A, Reinstorf A, Bernhardt A, Wolf-Brandstetter C, König U, Gelinsky M. Heparin modification of calcium phosphate bone cements for VEGF functionalization. *J Biomed Mater Res A.* 27 de noviembre de 2007.
44. Steffens GC, Yao C, Prevel P, Markowicz M, Schenck P, Noah EM, et al. Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng.* Septiembre-Octubre de 2004; 10(9-10): 1502-9.
- 65 45. Wolf-Brandstetter C, Lode A, Hanke T, Scharnweber D, Worch H. Influence of modified extracellular matrices

on Ti6AL4V implants on binding and release of VEGF. J Biomed Mater Res A. 15 de diciembre de 2006; 79(4): 882-94.

- 5 46. Kock HJ, Handschin AE. Osteoblast growth inhibition by unfractionated heparin and by low molecular weight heparins: an in-vitro investigation. Clin Appl Thromb Hemost. Julio de 2002; 8(3): 251-5.

REIVINDICACIONES

1. Heparán sulfato 2 (HS-2) para uso en un método de tratamiento médico, en donde el HS-2 puede obtenerse de neuroepitelio embrionario murino del día 10 del desarrollo embrionario.
5
2. HS-2 para uso en un método de tratamiento de una fractura ósea, en donde el HS-2 puede obtenerse de neuroepitelio embrionario murino del día 10 del desarrollo embrionario.
3. Una composición farmacéutica que comprende HS-2, en la que el HS-2 puede obtenerse de neuroepitelio embrionario murino del día 10 del desarrollo embrionario.
10
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, para uso en un método de tratamiento, comprendiendo el método el tratamiento de una fractura ósea.
5. Un implante o una prótesis biocompatibles que comprenden un biomaterial y HS-2, en donde el HS-2 puede obtenerse de neuroepitelio embrionario murino del día 10 del desarrollo embrionario.
15
6. El implante o la prótesis de la reivindicación 5, en donde el implante o la prótesis están revestido(s)/a(s) de HS-2.
7. El implante o la prótesis de la reivindicación 5, en donde el implante o la prótesis están impregnado(s)/a(s) de HS-2.
20
8. Uso de HS-2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una fractura ósea, en el que el HS-2 puede obtenerse de neuroepitelio embrionario murino del día 10 del desarrollo embrionario.
9. Un método de formación de un implante o una prótesis biocompatibles, comprendiendo el método la etapa de aplicar un revestimiento o impregnar un biomaterial con HS-2, en donde el HS-2 puede obtenerse de neuroepitelio embrionario murino del día 10 del desarrollo embrionario.
25

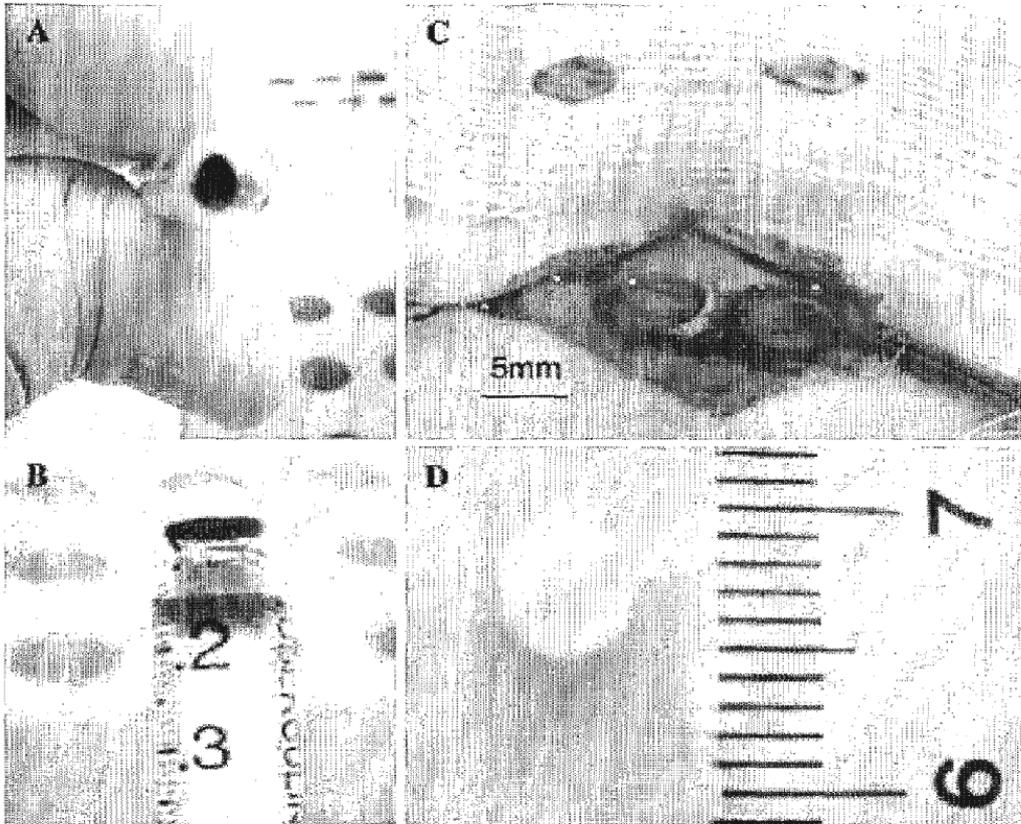


Figura 1

Cinética de liberación de heparina a partir de matrices de soporte de cola de fibrina

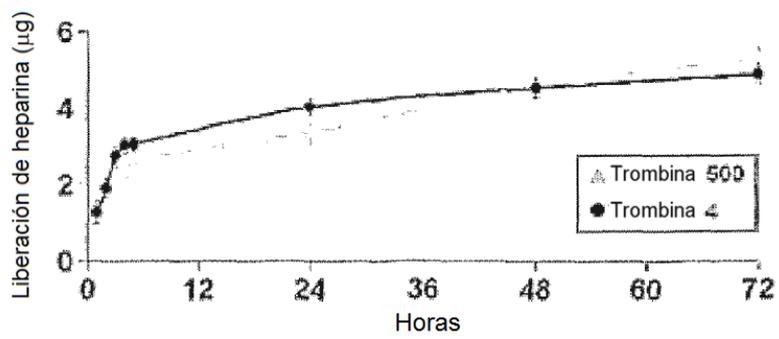


Figura 2

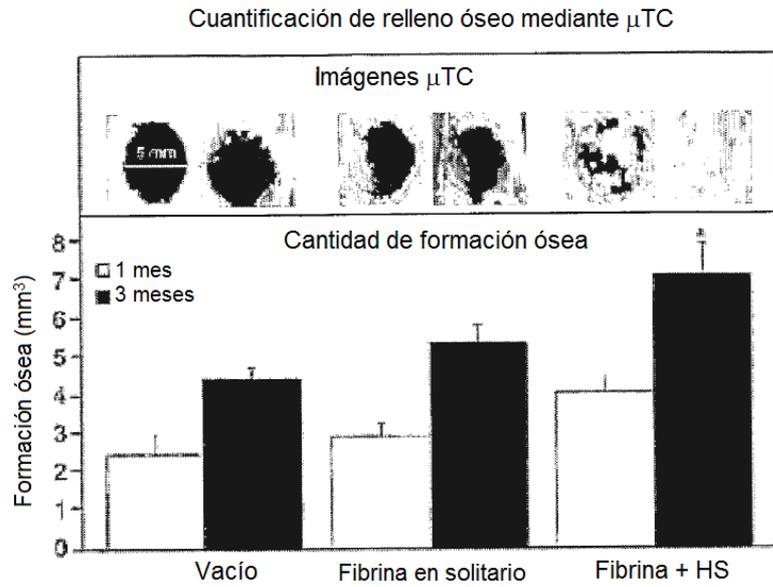


Figura 3

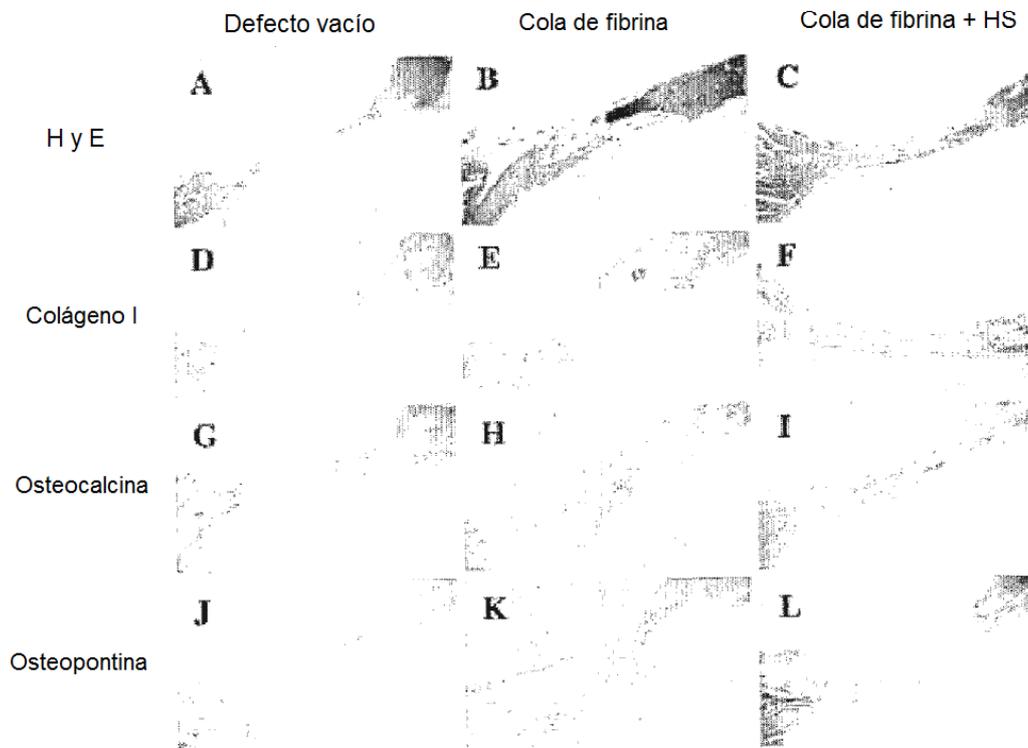


Figura 4

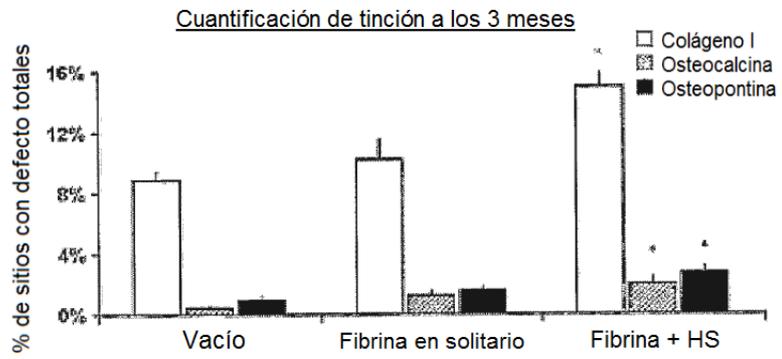


Figura 5

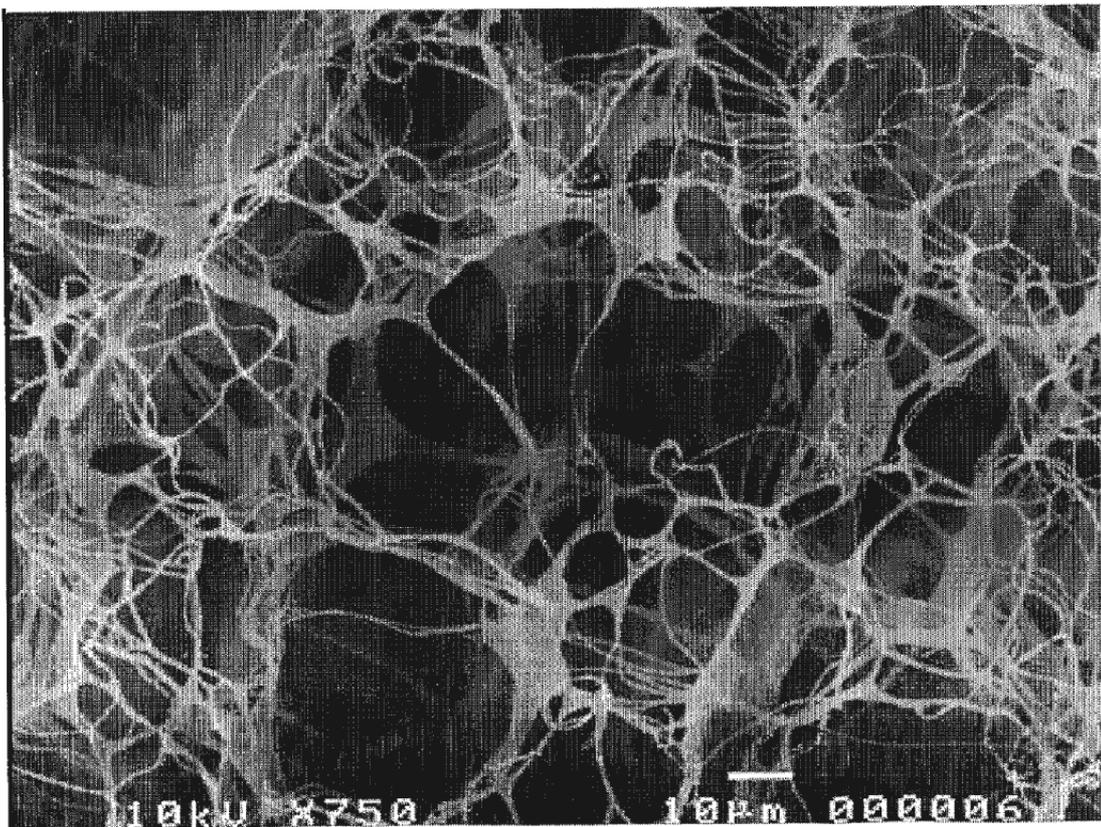


Figura 6

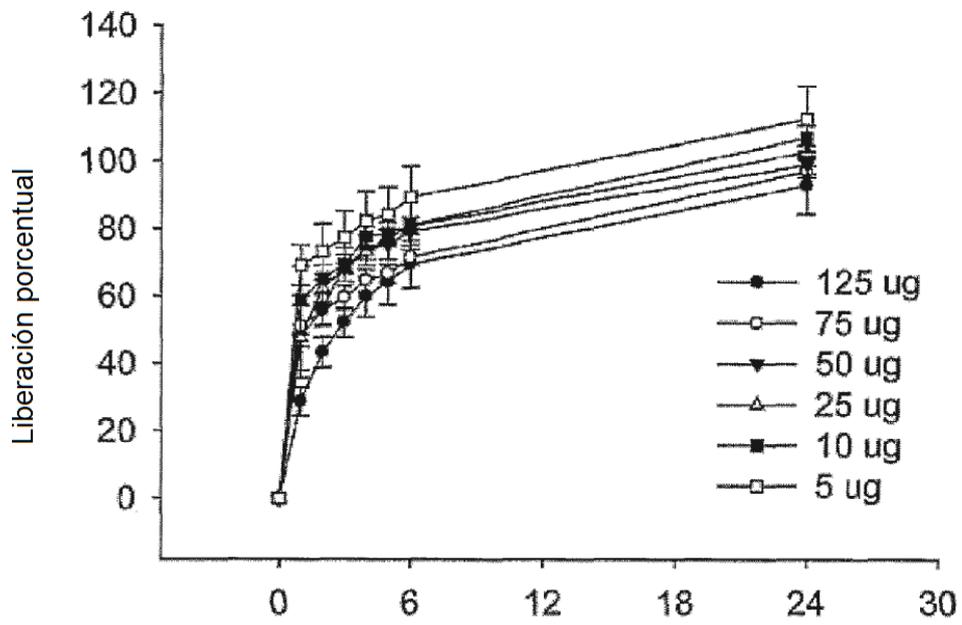


Figura 7

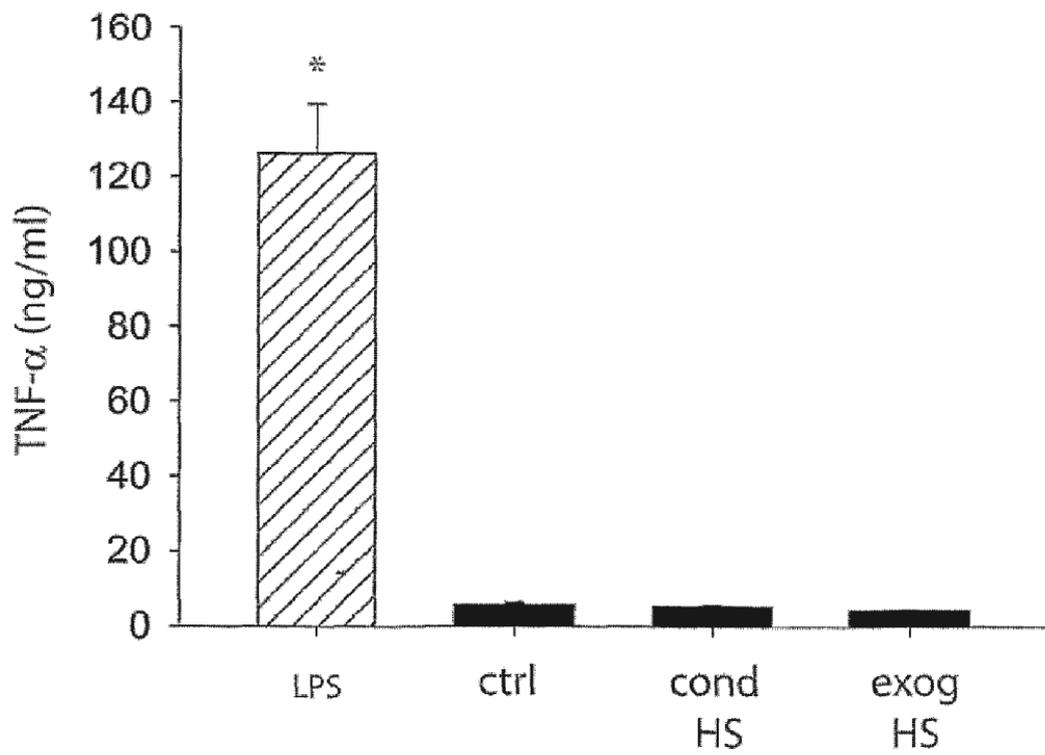


Figura 8

CONDICIÓN	E 10
Pronasa	40.000
Tratamiento con álcali suave	25.000
Heparinasa	7.000
Número de dominios resistentes a heparinasa	2

Figura 9

	% E10
TRATAMIENTO	
Heparitinasa	61,5
Heparinasa	15,3
HNO₂	49,0

Figura 10

	% de GAG a E10
DISACÁRIDO	
IdoA/GlcA-AMann_R	12,9
IdoA(2S)-AMann_R	53,4
GlcA-AMann_R(6S)	10,25
IdoA-AMann_R(6S)	3,4
IdoA(2S)-AMann_R(6S)	18,7
GlcA(2S)-AMann_R	1,0
GlcA-AMann_R(3S)	0,30
GlcA- AMann_R(3,6S)	0,15
DESCONOCIDO	0,0

Figura 11

	% EN E10
Número de sulfatación : número de picos	
No sulfatado: 1	37,2
Monosulfatado: 1	1,5
Monosulfatado: 2	1,0
Monosulfatado: 3	0,3
Monosulfatado: 4	0,3
Monosulfatado: 5	7,7
Monosulfatado: 6	23,9
Monosulfatado: 7	18,4
Monosulfatado: 8	0,7
Monosulfatado: 9	0,4
Disulfatado: 1	1,8
Disulfatado: 2	0,9
Disulfatado: 3	2,7
Disulfatado: 4	1,5
Trisulfatado: 1	1,0
Trisulfatado: 2	0,0
Trisulfatado: 3	0,3
Trisulfatado: 4	0,4
TOTAL	100

Figura 12

NÚMERO DE PICOS	DISACÁRIDO	% en GAG a E10
1	Δ HexUA-GlcNAc	44,8
3	Δ HexUA-GlcNSO ₃	21,5
2	Δ HexUA-GlcNAc(6S)	8,0
7	Δ HexUA(2S)-GlcNAc	2,4
4	Δ HexUA-GlcNSO ₃ (6S)	4,0
5	Δ HexUA(2S)-GlcNSO ₃	12,4
8	Δ HexUA(2S)-GlcNAc(6S)	0,2
6	Δ HexUA(2S)-GlcNSO ₃ (6S)	4,1
9	desconocido	2,4

Figura 13

SULFATACIÓN	% en GAG a E10
Sulfatación total/100 disacáridos	77,4
6-O-Sulfato	16,3
2-O-Sulfato	19,1
N-Sulfato	42,0
O-Sulfato	35,4
Proporciones de sulfataciones	
2-O-Sulfato/6-O-Sulfato	1,17
N-Sulfato/O-Sulfato	1,19
N-Sulfato/2-O-Sulfato	2,2
N-Sulfato/6-Sulfato	2,58

Figura 14