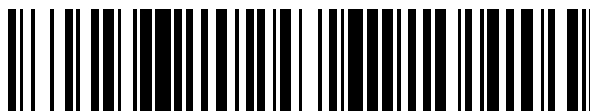


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 688**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01)	C07K 14/47	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)		
C07K 14/78	(2006.01)		
A61K 38/08	(2006.01)		
A61K 38/10	(2006.01)		
A61K 38/39	(2006.01)		
C08B 37/08	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		
A61L 27/54	(2006.01)		
C07K 9/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012** **PCT/US2012/039404**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012** **WO2012162534**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012** **E 12788776 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017** **EP 2714718**

54 Título: **Peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico, preparación y métodos de uso**

30 Prioridad:

24.05.2011 US 201161489602 P
24.10.2011 US 201161550621 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2017

73 Titular/es:

SYMIC IP, LLC (100.0%)
5980 Horton St., Suite 600
Emeryville, CA 94608, US

72 Inventor/es:

SHARMA, SHAILI;
PANITCH, ALYSSA;
BERNHARD, JONATHAN C. y
PADERI, JOHN E.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 619 688 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).

Peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico, preparación y métodos de uso**Descripción**5 **ÁMBITO TÉCNICO**

[0001] Esta invención está relacionada con el campo de los 'peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico' y con los métodos para formar y utilizar dichos compuestos.

10 **ANTECEDENTES Y RESUMEN DE LA INVENCION**

[0002] El cartílago articular es un componente importante para la protección de los huesos del cuerpo. En particular, el cartilago articular actúa para evitar que se dañen los huesos articulares y proporciona una superficie casi sin fricción para el movimiento óseo, además de proporcionar fuerza compresiva a las articulaciones. En líneas generales, el cartilago articular incluye una matriz extracelular (MEC o ECM, por sus siglas en inglés) derivada a partir de tres componentes principales: un andamio o esqueleto ('scaffold', en inglés) de colágeno, ácido hialurónico (AH) y agrecano. La composición de los materiales del cartilago articular determina las propiedades biológicas, químicas y mecánicas del tejido. La matriz extracelular (MEC) de un cartilago sano está compuesta básicamente de una red de pequeñas fibras o fibrillas de colágeno (colágeno de tipo II con un 15-22% en peso húmedo), proteoglicanos (4-7% en peso húmedo), glicoproteínas, agua (60-85%) y electrolitos, lo que da origen a un tejido viscoelástico con una anisotropía estructural y mecánica que varía dependiendo de la profundidad.

[0003] La degradación y el deterioro del cartilago es una marca distintiva de la osteoartritis (OA). Durante las etapas iniciales de la osteoartritis (OA), el agrecano, un proteoglicano principal del cartilago, es un componente que se degrada pronto. El monómero de agrecano está compuesto de un núcleo de proteína con cadenas laterales de glicosaminoglicano (GAG) unidas covalentemente y que se enlazan con el ácido hialurónico filamentosos mediante dominios globulares y una proteína de enlace. Las proteasas, como las agrecanasas, se adhieren al agrecano en sitios específicos creando fragmentos de proteína y cadenas de GAG libres que no pueden unirse de nuevo con el AH. En lugar de eso, estas cadenas de GAG libres se extruden a partir de la matriz, lo cual no solo disminuye la fuerza compresiva, sino que también provoca un aumento de las citocinas pro-inflamatorias y de las metaloproteasas de la matriz. Se ha demostrado que la presencia de agrecano disminuye la difusión de proteasas, protegiendo las fibras de colágeno subyacentes de la escisión o descomposición proteolítica. La pérdida de agrecano se da incluso en el cartilago normal y no está relacionada directamente con la OA. Sin embargo, la pérdida de colágeno de tipo II se considera un proceso irreversible, y provoca un deterioro prematuro.

[0004] La osteoartritis es la forma más común de artritis, y afecta a 27 millones de personas solo en los Estados Unidos. Los síntomas más predominantes de la osteoartritis incluyen un gran dolor, un endurecimiento de las articulaciones, y articulaciones frágiles e inflamadas. Las etapas avanzadas de la osteoartritis pueden conllevar la degradación completa del cartilago articular, causando la inmovilidad de las articulaciones y dañando el hueso subyacente. Se estima que los costes directos de la artritis en EE UU son de aproximadamente 185 500 millones de dólares cada año.

[0005] A pesar de que a menudo se provocan cambios en el estilo de vida y se utilizan diversas medicaciones para tratar la osteoartritis, ha habido escaso éxito en la regeneración del cartilago defectuoso y en la paliación de los síntomas provocados por la pérdida de cartilago. Esta falta de capacidad para detener la progresión de la osteoartritis y reparar el daño existente conlleva normalmente un procedimiento invasivo para reemplazar el cartilago en su etapa final. Por ello, existe una gran necesidad de encontrar un tratamiento alternativo para la osteoartritis.

[0006] La presente divulgación describe unos biomateriales mejorados que se utilizan para la regeneración del cartilago, incluyendo 'peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico', y que se pueden usar para restaurar el cartilago dañado de un paciente afectado, junto con métodos para formar y utilizar los peptidoglicanos sintéticos. Además, los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico están diseñados para imitar funcionalmente el agrecano, resistir a la degradación de la agrecanasa y limitar la degradación proteolítica. La ausencia de la secuencia de aminoácidos nativos que se ha observado en el agrecano hace que estas moléculas sean menos propensas a la escisión proteolítica.

[0007] La presente invención está relacionada con un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15. Se contemplan las siguientes realizaciones:

- 60 1. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, de manera que el glicano se selecciona de entre un grupo que se compone de sulfato de condroitina y de queratán sulfato.
2. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la realización 1, de manera que el peptidoglicano sintético está liofilizado.
- 65 3. Una matriz de colágeno obtenida por ingeniería, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, de manera que el colágeno se selecciona de entre un grupo que comprende colágeno de tipo I, colágeno de tipo II,

colágeno de tipo III, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo IX, colágeno de tipo XI y combinaciones de estos compuestos.

4. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de la realización 3, de manera que la matriz es eficaz como injerto tisular.

5. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de la realización 4, de manera que el injerto tisular se implanta en un paciente.

6. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de cualquiera de las realizaciones 3 a 5, de manera que la matriz está en forma de gel.

7. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de la realización 6, de manera que el gel se administra a un paciente mediante inyección.

8. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de cualquiera de las realizaciones 3 a 7, de manera que la matriz es eficaz como composición 'in vitro' para el cultivo celular.

9. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de la reivindicación 13, de manera que las células se seleccionan de un grupo que comprende condrocitos y células madre.

10. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de la reivindicación 9, de manera que las células madre se seleccionan de un grupo que comprende osteoblastos, células osteogénicas y células madre mesenquimales.

11. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de cualquiera de las realizaciones 3 a 10, que además comprende uno o más nutrientes.

12. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, que además comprende uno o más factores de crecimiento.

13. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, de manera que la matriz está esterilizada.

14. Una composición para el cultivo 'in vitro' de condrocitos o células madre que comprende un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

15. La composición de la realización 14, de manera que las células madre se seleccionan de un grupo que comprende osteoblastos, células osteogénicas y células madre mesenquimales.

16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, que además comprende uno o más nutrientes.

17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que además comprende uno o más factores de crecimiento.

18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, de manera que dicha composición está esterilizada.

19. Un aditivo para una composición de biomaterial para el recambio del cartílago o del hueso que comprende un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para añadirlo a un material de biomaterial ya existente para el recambio del cartílago o del hueso.

20. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la reivindicación 14, de manera que el peptidoglicano sintético funciona como un lubricante.

21. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la reivindicación 14 o en la realización 20, de manera que el peptidoglicano sintético evita la aparición de hueso en la articulación ósea o evita la pérdida de cartílago.

22. Un método para preparar un biomaterial o un recambio de cartílago óseo; dicho método comprende el paso de combinar el peptidoglicano sintético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un biomaterial existente o un material para sustituir el cartílago óseo.

23. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en un método para reducir o evitar la degradación de ácido hialurónico en un paciente; dicho método incluye administrar al paciente el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico.

24. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la realización 23, de manera que se reduce el ritmo de degradación del ácido hialurónico.

25. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para que se use en un método para corregir o modificar un defecto en el tejido de un paciente, lo cual conlleva administrar al tejido defectuoso un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de manera que el defecto se corrige o modifica.

26. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la realización 25, de manera que el defecto es un defecto cosmético.

27. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usarse como relleno dérmico.

28. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usarse en un método para reducir o evitar la degradación de colágeno; dicho método comprende los pasos de poner en contacto un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico con ácido hialurónico en presencia de colágeno, y de reducir o evitar la degradación de colágeno.

29. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la realización 28, de manera que se reduce el ritmo de degradación del ácido hialurónico.

30. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usarse en un método para aumentar el tamaño de los poros de una matriz de colágeno obtenida por ingeniería; dicho método comprende los pasos de combinar colágeno, ácido hialurónico y un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, y de aumentar el tamaño de los poros de la matriz.

31. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la realización 30, de

manera que la matriz está esterilizada.

32. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en las realizaciones 30 a 31, de manera que la matriz además comprende condrocitos o células madre.

33. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la realización 32, de manera que las células madre se seleccionan de un grupo que contiene osteoblastos, células osteogénicas y células madre mesenquimales.

34. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en las realizaciones 30 a 33, de manera que la matriz además comprende uno o más nutrientes.

35. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en las realizaciones 30 a 34, de manera que la matriz además comprende uno o más factores de crecimiento.

36. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 11, para que se use en un método para reducir o evitar la degradación del sulfato de condroitina; dicho método comprende los pasos de poner en contacto un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico con ácido hialurónico en presencia de colágeno, y de reducir o evitar la degradación del sulfato de condroitina.

37. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la realización 36, de manera que se disminuye el ritmo de degradación del sulfato de condroitina.

38. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, el compuesto, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería, la composición, el aditivo, el método o el relleno dérmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o cualquiera de las realizaciones precedentes, de manera que el componente peptídico del peptidoglicano sintético tiene una glicina-cisteína (GC) unida al extremo C-terminal del péptido.

39. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, el compuesto, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería, la composición, el aditivo, el método o el relleno dérmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o cualquiera de las realizaciones precedentes, de manera que el componente peptídico del peptidoglicano sintético tiene una glicina-cisteína-glicina (GCG) unida al extremo N-terminal del péptido.

40. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, el compuesto, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería, la composición, el aditivo, el método o el relleno dérmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o cualquiera de las realizaciones precedentes, de manera que el peptidoglicano sintético es resistente a las metaloproteasas de la matriz.

41. El peptidoglicano sintético, el compuesto, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería, la composición, el aditivo, el método o el relleno dérmico de la realización 40, de manera que la metaloproteasa de la matriz es agreganasa.

42. El peptidoglicano sintético, el compuesto, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería, la composición, el aditivo, el método o el relleno dérmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o cualquiera de las realizaciones precedentes, de manera que la dosis del peptidoglicano sintético tiene una concentración que va desde alrededor de 0,01 uM hasta alrededor de 100 uM.

43. El peptidoglicano sintético, el compuesto, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería, la composición, el aditivo, el método o el relleno dérmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o cualquiera de las realizaciones precedentes, de manera que la dosis del peptidoglicano sintético tiene una concentración que va desde alrededor de 0,1 uM hasta alrededor de 10 uM.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

[0008]

La FIGURA 1 muestra un esquema de reacción para la producción de una realización del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. Los pasos de la reacción se detallan en negrita.

La FIGURA 2 muestra una curva o desviación estándar de la absorbancia (215 nm) de la sal de ácido trifluoroacético de N-[β- Ácido maleimidopropiónico] hidrácido (de aquí en adelante, 'BMPH'), basada en la cantidad (mg) de BMPH inyectada. La curva estándar se usó para determinar la cantidad de BMPH consumida durante la reacción de unión o acoplamiento.

La FIGURA 3 muestra la unión del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico con el ácido hialurónico (AH) inmovilizado. Nueve 'péptidos que se unen al AH' (por ejemplo, GAHWQFNALTVRGGGC; de aquí en adelante 'GAH' o 'mAGC') se unieron con el esqueleto o estructura central ('backbone', en inglés) del glicosaminoglicano funcionalizado (por ejemplo, sulfato de condroitina, de aquí en adelante 'CS'). Las concentraciones de los peptidoglicanos sintéticos se incrementaron de 0,01 μM a 100 μM.

La FIGURA 4 muestra el enlace del peptidoglicano sintético con el AH, tal y como se determina mediante barrido de frecuencia reológico (cuadro o panel A). El módulo de almacenamiento de las mezclas de AH se analizó a una frecuencia de oscilación de 5,012 Hz. A esta frecuencia, se suministró una carga significativa al mismo tiempo que se conservó la integridad de las cadenas de AH. El análisis estadístico ($\alpha=0,05$) mostró que AH+CS y AH eran significativamente diferentes (se indica con *) y que AH+ 10,5GAH-CS y AH+CS eran significativamente diferentes (se indica con **). El cuadro B es una representación alternativa de los mismos datos que se muestran en el cuadro A.

La FIGURA 5 muestra la clasificación de la turbiedad del colágeno de tipo I más los grupos de tratamiento durante la formación de las fibrillas de colágeno. La absorbancia a 313 nm se midió cada 3 minutos. Después de una hora (esto es, punto de tiempo o referencia temporal 20) todos los grupos de tratamiento habían creado redes por completo. No hubo diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre los grupos de tratamiento con respecto a la

absorbancia máxima o el tiempo hasta la mitad de la absorbancia máxima.

La FIGURA 6 muestra la tensión de ingeniería compresiva que resistieron los geles de colágeno, basándose en la aplicación de una deformación de ingeniería de 1% por segundo. El análisis estadístico ($\alpha=0,05$) demostró que la adición de 10.5GAH-CS daba como resultado una diferencia significativa en el pico máximo de la tensión de ingeniería ('engineering stress', en inglés); además, se analizó la tensión de ingeniería con una deformación de ingeniería ('engineering strain', en inglés) de 5%, 7,5% y 10%.

La FIGURA 7 muestra el módulo de almacenamiento de las mezclas de colágeno medido a una frecuencia oscilatoria de 0,5012 Hz. El análisis estadístico ($\alpha=0,05$) demostró que la adición de 10.5GAH-CS daba como resultado un aumento significativo del módulo de almacenamiento del gel de colágeno (se indica con *).

La FIGURA 8 muestra el porcentaje de degradación de las mezclas de AH debido a la adición de hialuronidasa a las mezclas (cuadro A). El porcentaje de degradación se determinó mediante los cambios en la viscosidad dinámica de las mezclas de AH. Inicialmente, las mediciones de viscosidad dinámica se tomaron a partir de las mezclas, y sirvieron como el punto de referencia a partir del cual se calcularon los porcentajes de degradación. El punto de tiempo de 0 horas se tomó después de añadir la hialuronidasa, de dejar que las muestras se mezclaran lo suficiente y se 'pipetearan' o vertieran en el reómetro, y pasaron aproximadamente 2 minutos entre la adición de la hialuronidasa y la medición de la viscosidad dinámica. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en el porcentaje de degradación de la muestra de 10.5GAH-CS, tanto en el punto de tiempo de 0 horas como en el de 2 horas. El cuadro B muestra los mismos datos representados como la viscosidad dinámica normalizada (promedio $\pm$ SE, N=3) de las mezclas de AH debido a la adición de hialuronidasa. Inicialmente, las mediciones de viscosidad dinámica se tomaron de las mezclas antes de añadir hialuronidasa, y estos valores sirvieron como el punto de referencia a partir del cual se calcularon las viscosidades dinámicas normalizadas. Las viscosidades dinámicas normalizadas se determinaron tomando cada viscosidad dinámica medida después de añadir hialuronidasa y dividiendo este valor por la viscosidad dinámica inicial de esa muestra. Se realizó un análisis estadístico ($\alpha=0,05$) y se observaron diferencias significativas en la degradación normalizada de la muestra de 10.5GAH-CS tanto en el punto de tiempo de 0 horas como en el de 2 horas.

La FIGURA 9 muestra imágenes representativas de cryo-SEM (un aumento de 10 000x con una barra de escala de 5 μ m) del andamio de CI asociado con cada réplica de la ECM de cartílago. El cuadro A representa el control de CI. El cuadro B representa CI+AH+CS. El cuadro C representa CI+AH+10.5GAH-CS.

La FIGURA 10 muestra el porcentaje de degradación (promedio $\pm$ SE, N=3) de CI en réplicas de ECM expuestas a MMP-I durante un periodo de duración de 50 horas. El análisis estadístico ($p<0,05$) de los diferentes tratamientos mostró que los tres tratamientos (Control de CI, CI+AH+CS y CI+AH+10.5GAH-CS) eran sustancialmente diferentes unos de otros.

La FIGURA 11 muestra la pérdida acumulada de sulfato de condroitina (CS) durante un periodo de cultivo de 8 días en un medio estimulado con y sin IL-1 β . La pérdida de CS se midió con un ensayo de DMMB. La adición de mAGC tuvo un efecto significativo en la pérdida de CS por parte de los andamios ($p<0,001$). ** denota una importancia o significación estadística entre los andamios preparados sin una copia o reproducción de agregano y los preparados con mAGC. + denota una importancia estadística entre los andamios tratados con y sin IL-1 β ($p<0,05$). Las barras representan el promedio $\pm$ SEM (n=3).

La FIGURA 12 muestra la descomposición de colágeno acumulada durante un periodo de cultivo de ocho días en un medio estimulado con y sin IL-1 β . La descomposición del colágeno se midió mediante un ensayo o análisis de Sircol. La adición de una reproducción de agregano tuvo un efecto significativo en la pérdida de colágeno por parte de los andamios ($p<0,02$). ** denota una importancia estadística entre los andamios preparados sin una reproducción de agregano y los preparados con mAGC. + denota una importancia estadística entre los andamios tratados con y sin IL-1 β ($p<0,05$). Las barras representan el promedio $\pm$ SEM (n=3).

La FIGURA 13 representa una plataforma para estudiar la eficacia del peptidoglicano 'ex vivo'. Se usó un 0,5% de tripsina para eliminar el agregano nativo (o natural) de los explantes de cartílago bovino. La eliminación del agregano se confirmó mediante un ensayo de DMMB. Los gráficos representan la cantidad de agregano eliminada en comparación con el control positivo.

La FIGURA 14 muestra un ensayo para monitorizar la difusión de peptidoglicano a través de la matriz de cartílago. El eje Y representa la diferencia de los valores de absorbancia del ensayo de DMMB; esta diferencia se lee u obtiene mediante tapones de cartílago desprovistos de agregano y que se han tratado con o sin peptidoglicano. El eje X representa la distancia desde la superficie de articulación del cartílago hasta el hueso subcondral. Las barras representan la diferencia promedio $\pm$ SEM (n=3).

La FIGURA 15 muestra tinciones de Safranina O y Avidina-Biotina de explantes de cartílago bovino. Se realizó un corte medio sagital a través de la matriz y se buscó agregano residual (cuadro superior, tinción oscura) y biotina (cuadro inferior, tinción oscura), respectivamente. El peptidoglicano que se une al colágeno de tipo II [WYRGRLGC; "mAG(II)C"] se difundió a través del explante. Un mayor aumento (20X) de este corte de tejido mostró que el mAG(II)C penetra aproximadamente 200 μ m en el tejido.

La FIGURA 16 muestra tinciones de Avidina-Biotina de explantes de cartílago. Se difundieron peptidoglicanos (mAG(II)C y mAGC) a través del explante de cartílago. Las imágenes indican la profundidad de penetración de cada uno (tinción oscura).

La FIGURA 17 muestra que la adición de peptidoglicanos a los explantes desprovistos de agregano (AD, por sus siglas en inglés) aumentó la rigidez de compresión. La adición del peptidoglicano que se une al AH (mAGC) restauró de manera significativa la rigidez de los explantes de cartílago, en mayor medida que si se compara con el peptidoglicano que se une con el colágeno de tipo II (mAG(II)C). La importancia, denotada como *, especificó

un aumento de la rigidez de compresión entre los explantes aumentados con AD y AD+mAGC ($p<0,005$). Los datos se muestran como promedio $\pm$ SEM ($n=5$).

La FIGURA 18 (A) muestra una representación esquemática de la sonda de MMP-13. BHQ-3 ('Black hole quencher 3', en inglés) y CY5.5 absorbían y emitían a 695 nm, respectivamente. Las flechas y las cursivas indican el sitio de escisión. (B) muestra el perfil de concentración de la actividad de la sonda con y sin MMP-13. A la izquierda, partes de biomarcadores de fluorescencia de una microplaca de 96 pocillos; a la derecha, recuperación de la intensidad de la emisión de fluorescencia (695 nm).

La FIGURA 19 muestra el nivel de inflamación indicado por la sonda MMP-13 en ratas Sprague-Dawley tratadas con y sin peptidoglicano cuatro, seis y ocho semanas después de la cirugía.

La FIGURA 20 muestra una imagen de rayos X de las articulaciones de una rata Sprague-Dawley que muestra la rodilla lesionada 6 semanas y 8 semanas después de una inducción de OA (cuadros A y D, respectivamente), la rodilla lesionada con un tratamiento de peptidoglicano (cuadros B y E, respectivamente), y una rodilla normal (cuadro C) seis semanas después de una cirugía de inducción de osteoartritis.

La FIGURA 21 muestra un microCT de ratas Sprague-Dawley que indica el recrecimiento o regeneración de cartilago nuevo seis y ocho semanas después de la cirugía de inducción de osteoartritis. Las rodillas lesionadas 6 semanas y 8 semanas después de una inducción de OA se muestran en los cuadros A y D, respectivamente. Las rodillas lesionadas tras un tratamiento de peptidoglicano se muestran en los cuadros B y E, respectivamente. La rodilla normal se muestra en el cuadro C.

La FIGURA 22 muestra que la adición de mAGC a los andamios de colágeno incrementó los módulos de almacenamiento y la rigidez de compresión. Los barridos de frecuencia (A) sobre los andamios de colágeno indicaron un aumento en el módulo de almacenamiento en un rango de 0,1-2,0 Hz. De manera similar, la rigidez de compresión (B) mostró un aumento de los valores cuando el andamio se preparó con la adición de mAGC. La importancia o significación se denota como * ($p<0,0001$). Los datos se muestran como promedio $\pm$ SEM ($n=5$).

La FIGURA 23 muestra la pérdida acumulada de sulfato de condroitina (CS) durante un periodo de cultivo de ocho días en un medio estimulado con y sin IL-1 β . La pérdida de CS se midió mediante un ensayo de DMMB. Las composiciones de los andamios (A-H) se describen en el cuadro 3. La adición de mAGC tuvo un efecto significativo en la pérdida de CS por parte de los andamios ($p<0,001$). * denota la significación estadística entre el andamio A y el C, y entre el andamio E y el G ($p<0,05$). Las barras representan promedio $\pm$ SEM ($n=3$).

La FIGURA 24 muestra la descomposición acumulada de colágeno durante un periodo de cultivo de ocho días en un medio estimulado con y sin IL-1 β . La descomposición del colágeno se midió mediante un ensayo de Sircol. Las composiciones de los andamios (A-H) se describen en el cuadro 3. La adición de una réplica de agregano tuvo un efecto significativo en la pérdida de colágeno por parte de los andamios ($p<0,02$). * denota una significación estadística entre los andamios A y C, y los andamios E y G ($p<0,05$). Las barras representan promedio $\pm$ SEM ($n=3$).

La FIGURA 25 muestra un análisis de PCR en tiempo real del agregano y el colágeno de tipo II expresados por condrocitos bovinos cultivados en andamios de colágeno no alineados (A) y alineados (B). Los valores se normalizaron a una expresión de GAPDH endógeno. La adición de mAGC alteró estadísticamente la expresión de agregano y colágeno de tipo II ($p_{\text{agregano}}<0,02$ y $p_{\text{colágeno}}<0,001$ respectivamente). También hubo una diferencia estadística en la expresión de agregano y colágeno de tipo II entre los andamios no alineados y alineados ($p<0,001$). De manera similar, la expresión de agregano y colágeno de tipo II fue diferente entre los andamios tratados con y sin IL-1 β ($p<0,01$). Las composiciones de los andamios (A-H) se describen en el cuadro 3. Las barras representan promedio $\pm$ SEM ($n=4$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0009] Tal y como se utiliza en el presente texto, un 'peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico' hace referencia a un péptido sintético conjugado con un glicano, en el que el péptido comprende una secuencia que se une al ácido hialurónico.

[0010] En el presente texto se describen diversas realizaciones de la invención. En una de las realizaciones descritas en el presente texto, se proporciona un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico comprende un péptido sintético conjugado con un glicano, de manera que el péptido sintético comprende una 'secuencia que se une al ácido hialurónico'.

[0011] En otra realización, se describe un compuesto cuya fórmula es P_nG_x y en el que n es de 1 a 20; en el que x es de 1 a 20; en el que P es un péptido sintético de entre alrededor de 5 y alrededor de 40 aminoácidos que comprende una secuencia que se une al ácido hialurónico; y en el que G es un glicano.

[0012] En otra realización, se describe un compuesto cuya fórmula es $(P_nL)_xG$ en el que n es de 1 a 20;

en el que x es de 1 a 20;

en el que P es un péptido sintético de entre alrededor de 5 y alrededor de 40 aminoácidos que comprende una secuencia que se une al ácido hialurónico;

en el que L es un conector o enlazador ('linker', en inglés);

y en el que G es un glicano.

[0013] En otra realización, se describe un compuesto cuya fórmula es $P(LG_n)_x$

en el que n es de 1 a 20;
 en el que x es de 1 a 20;
 en el que P es un péptido sintético de entre alrededor de 5 y alrededor de 40 aminoácidos que comprende una
 secuencia que se une al ácido hialurónico;
 en el que L es un enlazador;
 y en el que G es un glicano.

[0014] En otra realización, se describe un compuesto cuya fórmula es P_nG_x

en el que n es MWG/1000;
 en el que MWG es el peso molecular de G redondeado hasta el 1 kDa más cercano;
 en el que x es de 1 a 20;
 en el que P es un péptido sintético de entre alrededor de 5 y alrededor de 40 aminoácidos que comprende una
 secuencia que se une al ácido hialurónico;
 y en el que G es un glicano.

[0015] En otra realización, se describe un compuesto cuya fórmula es $(P_nL)_xG$

en el que n es MWG/1000;
 en el que MWG es el peso molecular de G redondeado hasta el 1 kDa más cercano;
 en el que x es de 1 a 20;
 en el que P es un péptido sintético de entre alrededor de 5 y alrededor de 40 aminoácidos que comprende una
 secuencia que se une al ácido hialurónico;
 en el que L es un enlazador;
 y en el que G es un glicano.

[0016] Para el propósito de la presente invención, los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico y
 los compuestos descritos en los párrafos precedentes se denominarán colectivamente como 'peptidoglicanos
 sintéticos que se unen al ácido hialurónico' o 'peptidoglicanos sintéticos'.

[0017] En cada una de las realizaciones previas sobre péptidos, el peptidoglicano sintético puede contener 5-15
 moléculas peptídicas (n es 5-15), 5-20 moléculas peptídicas (n es 5-20), 1-20 moléculas peptídicas (n es 1-20), o 1-
 25 moléculas peptídicas (n es 1-25). En una realización, n se selecciona de un grupo que consta de 1, 2, 3, 4, 5, 6,
 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 moléculas peptídicas.

[0018] En otra realización ilustrativa descrita en el presente texto, se proporciona una matriz de colágeno obtenida
 por ingeniería. La matriz comprende colágeno polimerizado, ácido hialurónico y un peptidoglicano sintético que se
 une al ácido hialurónico. En otra realización, se proporciona una composición para el cultivo 'in vitro' de condrocitos
 o células madre. La composición comprende cualquiera de los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido
 hialurónico descritos en la presente divulgación.

[0019] En otra realización descrita en el presente texto, se proporciona un método para aumentar el tamaño de los
 poros de una matriz de colágeno obtenida por ingeniería. El método comprende los pasos de combinar el colágeno,
 el ácido hialurónico y el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, y de aumentar el tamaño de los
 poros de la matriz.

[0020] En otra realización ilustrativa, se proporciona un método para disminuir el deterioro o la erosión del cartílago
 de un paciente. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede usarse en un método para
 disminuir el deterioro o la erosión del cartílago. En una realización, la erosión o el deterioro del cartílago pueden
 estar causados por la artritis. En una realización, la erosión o el deterioro del cartílago pueden estar causados por el
 envejecimiento, la obesidad, un trauma o una lesión, una anomalía anatómica, enfermedades genéticas,
 desequilibrios metabólicos, inflamaciones o similares.

[0021] En otra realización ilustrativa, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede usarse en un
 método para tratar la artritis de un paciente. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede usarse
 en dicho método, de manera que el peptidoglicano sintético reduce o alivia los síntomas asociados con la artritis.

[0022] En otra realización ilustrativa, se proporciona un método para reducir o evitar la degradación del ácido
 hialurónico en un paciente. El método incluye administrar al paciente un peptidoglicano sintético que se une al ácido
 hialurónico.

[0023] En otra realización ilustrativa, se proporciona un método para reducir o evitar la degradación del colágeno. El
 método comprende los pasos de poner en contacto un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico con
 ácido hialurónico en presencia de colágeno, y de reducir o evitar la degradación del colágeno.

[0024] En otra realización ilustrativa, se proporciona un método para corregir o modificar un defecto en el tejido de
 un paciente. El método incluye administrar al tejido defectuoso un peptidoglicano sintético que se une al ácido
 hialurónico de manera que el defecto se corrija o modifique. En otra realización ilustrativa descrita en el presente

texto, se proporciona un relleno dérmico. El relleno comprende un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. En una realización, el relleno además contiene ácido hialurónico.

[0025] En otra realización, se proporciona un aditivo para una composición de biomaterial para el recambio del cartílago o del hueso. El aditivo contiene un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico para añadirlo a un recambio -ya existente- de biomaterial del cartílago o del hueso.

[0026] En las diversas realizaciones, el componente peptídico del peptidoglicano sintético comprende una secuencia de aminoácidos cuya fórmula es B1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-B2, en la que X8 está presente o no está presente, en la que B1 es un aminoácido básico, en la que B2 es un aminoácido básico, y en la que X1-X8 son aminoácidos no ácidos.

[0027] En otra realización, el componente peptídico del peptidoglicano sintético puede contener o puede ser una secuencia de aminoácidos cuya fórmula es B1-X1-B2-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-B3, en la que X9 está presente o no está presente, en la que B1 es un aminoácido básico, en la que B2 es un aminoácido básico, en la que B3 es un aminoácido básico, y en la que X1-X9 son aminoácidos no ácidos.

[0028] En otra realización, el péptido sintético puede contener o puede ser una secuencia de aminoácidos cuya fórmula es B1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-B2-X9-B3, en la que X8 está presente o no está presente, en la que B1 es un aminoácido básico, en la que B2 es un aminoácido básico, en la que B3 es un aminoácido básico, y en la que X1-X9 son aminoácidos no ácidos.

[0029] Tal y como se utiliza en el presente texto, un 'aminoácido básico' se selecciona de un grupo que contiene lisina, arginina o histidina. Tal y como se utiliza en el presente texto, un 'aminoácido no ácido' se selecciona de un grupo que se compone de alanina, arginina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

[0030] En las diversas realizaciones ilustrativas descritas en el presente texto, el componente peptídico del peptidoglicano sintético puede contener una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que comprende los siguientes compuestos:

GAHWQFNALTVRGG;
GDRRRRRMWHRQ;
GKHLGGKHRRSR;
RGTHHAQKRRS;
RRHKSGHIQGSK;
SRMHGRVRGRHE;
RRRAGLTAGRPR;

5 RGTHHAQKRRS;
 RRHKSGHIQGSK;
 SRMHGRVGRHE;
 RRRAGLTAGRPR;
 10 RYGGHRTSRKWV;
 RSARYGHRRGVG;
 GLRGNRRVFARP;
 SRGQRGRLGKTR;
 15 DRRGRSSLPKLAGPVEFPDRKIKGRR;
 RMRRKGRVKHWG;
 RGGARGRHKTGR;
 20 TGARQRGLQGGWGPRHLRGKDQPPGR;
 RQRRRDLTRVEG;
 STKDHNRGRNVGPVSRSTLRDPIRR;
 25 RRIGHQVGGRN;
 RLESRAAGQRRRA;
 GGPRRHLGRRGH;
 30 VSKRGHRTAHE;
 RGTRSGSTR;
 RRRKKIQGRSKR;
 35 RKSYGKYQGR;
 KNGRYSISR;
 RRRCGQKKK;
 KQKIKHVVKLK;
 40 KLKSQLVKRK;
 RYPISRPRKR;
 KVGKSPPVR;
 45 KTFGKMKPR;
 RIKWSRVSK; γ
 50 KRTMRPTRR.
 60

En cada una de las realizaciones peptídicas previas, el péptido puede tener una glicina-cisteína unida al extremo C-terminal del péptido, y/o una glicina-cisteína-glicina (CGC) unida al extremo N-terminal del péptido. En diversas realizaciones descritas en el presente texto, el componente peptídico del peptidoglicano sintético contiene cualquier secuencia de aminoácidos descrita en el párrafo anterior o una secuencia de aminoácidos con un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 100% de homología con cualquiera de estas secuencias de aminoácidos.

[0031] Los péptidos adicionales que pueden incluirse como componente peptídico de los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico incluyen los péptidos descritos en Amemiya et al., Biochem. Biophys. Acta, vol. 1724, págs. 94-99 (2005). Estos péptidos tienen un motivo de Arg-Arg e incluyen péptidos seleccionados de un grupo que se compone de:

RRASRSRGQVGL;
GRGTHHAQKRRS;
QPVRRLGTPVVG;
ARRAEGKTRMLQ;
PKVRGRRHQASG;
SDRHRRRREADG;
NQRVRRVKHPPG;
RERRERHAVARHGPGLERDARNLARR;

TVRPGGKRGGQVGPAGVLHGRRARS;
NVRSRRGHRMNS;
DRRRGRTRNIGN;
KTAGHGRRWSRN;
AKRGEGRREWPR;
GGDRRKAHKLQA;
RRGGRKWGSFEG; γ
RQRRRDLTRVEG.

En cada una de las realizaciones peptídicas previas, el péptido puede tener una glicina-cisteína unida al extremo C-terminal del péptido. En cada una de las realizaciones peptídicas previas, el péptido puede tener una glicina-cisteína-glicina (CGC) unida al extremo N-terminal del péptido. En diversas realizaciones descritas en el presente texto, el componente peptídico del peptidoglicano sintético contiene cualquier secuencia de aminoácidos descrita en el párrafo anterior o una secuencia de aminoácidos con un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 100% de homología con cualquiera de estas secuencias de aminoácidos.

[0032] En otras realizaciones, los péptidos descritos en Yang et al., EMBO Journal, vol. 13, págs. 286-296 (1994) y Goetinck et al., J. Cell. Biol., vol. 105, págs. 2403-2408 (1987) pueden usarse en los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico descritos en el presente texto, incluyendo los péptidos seleccionados del grupo que comprende RDGTRYVQKGEYR, HREARSGKYK, PDKKHLYGV y WDKERSRYDV. En cada una de estas realizaciones, el péptido puede tener una glicina-cisteína unida al extremo C-terminal del péptido. En cada una de estas realizaciones, el péptido puede tener una glicina-cisteína-glicina (GCG) unida al extremo N-terminal del péptido. En otras realizaciones, el componente peptídico del peptidoglicano sintético contiene una secuencia de aminoácidos con un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 100% de homología con cualquiera de estas secuencias de aminoácidos.

[0033] En diversas realizaciones, el componente peptídico del peptidoglicano sintético descrito en el presente texto puede modificarse mediante la inclusión de una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Como es bien sabido para aquellos versados en la materia, alterar cualquier aminoácido no crítico de un péptido mediante una sustitución conservadora no debería alterar de manera significativa la actividad de dicho péptido, pues la cadena lateral del aminoácido de recambio debería ser capaz de formar vínculos y contactos similares a los de la cadena lateral del aminoácido que ha sido sustituido. Son posibles las sustituciones conservadoras siempre y cuando estas

no afecten de manera excesiva a la actividad de unión con el ácido hialurónico del péptido.

[0034] Como es bien sabido en este campo, una 'sustitución conservadora' de un aminoácido o una 'variante o variación de una sustitución conservadora' de un péptido hacen referencia a una sustitución de un aminoácido que conserva: 1) la estructura secundaria del péptido; 2) la carga o hidrofobia del aminoácido; y 3) el volumen de la cadena lateral o una o más de estas características. A título ilustrativo, los conocidos términos 'residuos hidrofílicos' están relacionados con la serina o la treonina. 'Residuos hidrofóbicos' hacen referencia a la leucina, la isoleucina, la fenilalanina, la valina o la alanina, o similares. 'Residuos cargados positivamente' hacen referencia a la lisina, la arginina, la ornitina o la histidina. 'Residuos cargados negativamente' hacen referencia al ácido aspártico o al ácido glutámico. Los residuos que tienen 'cadenas laterales voluminosas' hacen referencia a la fenilalanina, el triptófano o la tirosina, o similares. En la TABLA 1 se ofrece una lista ilustrativa de las sustituciones de aminoácidos conservadoras:

TABLA 1

Para este aminoácido	Sustituir con
Alanina	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Asparagina	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Isoleucina	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Lisina	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Metionina	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Prolina	D-Pro
Serina	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Treonina	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Tirosina	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Valina	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

5 **[0035]** En una realización, las sustituciones de aminoácidos conservadoras que se pueden aplicar a las moléculas descritas en el presente texto no alteran los motivos que tienen una fórmula de B1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-B2, una fórmula de B1-X1-B2-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-B3, una fórmula de B1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-B2-X9-B3 o un motivo de Arg-Arg.

10 **[0036]** En diversas realizaciones descritas en el presente texto, el componente glicano (por ejemplo, glicosaminoglicano, abreviado como GAG, o polisacárido) del peptidoglicano sintético descrito en este texto puede seleccionarse de un grupo que comprende dextrano, condroitina, sulfato de condroitina, dermatán, dermatán sulfato, heparán, heparina, queratina, queratán sulfato y ácido hialurónico. En una realización, el glicano se selecciona de un grupo que se compone de sulfato de condroitina y queratán sulfato. En otra realización ilustrativa, el glicano es sulfato de condroitina.

15 **[0037]** En una realización descrita en el presente texto, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico comprende (GAHWQFNALTVRGG)¹⁰ conjugado con sulfato de condroitina de manera que cada péptido en la molécula de peptidoglicano está unido de manera separada con el sulfato de condroitina. En otra realización descrita en el presente texto, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico comprende (GAHWQFNALTVRGGGC)¹¹ conjugado con sulfato de condroitina de manera que cada péptido en la molécula de peptidoglicano está unido de manera separada con el sulfato de condroitina. En cada una de las realizaciones peptídicas previas, el número de péptidos puede seleccionarse de un grupo que se compone de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 moléculas peptídicas.

25 **[0038]** En diversas realizaciones descritas en el presente texto, el peptidoglicano sintético es resistente a la agrecanasa. En este campo, la agrecanasa se caracteriza por ser cualquier enzima que escinde o descompone el agrecano.

30 **[0039]** En un aspecto ilustrativo, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede esterilizarse. Tal y como se utilizan en el presente texto, 'esterilización', 'esterilizar' o 'esterilizado/a' significan desinfectar los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico eliminando los contaminantes no deseados, incluyendo - pero sin limitarse a- las endotoxinas y los agentes infecciosos.

35 **[0040]** En diversas realizaciones, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede desinfectarse y/o esterilizarse usando técnicas convencionales de esterilización, incluyendo un tratamiento con óxido de propileno u óxido de etileno, esterilización con plasma de gas, radiación gamma (por ejemplo, irradiación gamma de 1-4 Mrads o irradiación gamma de 1-2,5 Mrads), un haz de electrones, y/o esterilización con un perácido, como el ácido peracético. Pueden usarse técnicas de esterilización que no afecten de manera adversa a la estructura y las propiedades biotróficas del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. En una realización, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede someterse a uno o más procesos de esterilización. En otra realización ilustrativa, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se somete a una filtración esterilizada. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede envolverse en cualquier tipo de envase, incluyendo un envoltorio de plástico o un envoltorio de papel de aluminio, y además puede esterilizarse. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede prepararse en condiciones esterilizadas, por ejemplo, mediante liofilización, algo que puede lograrse con facilidad usando las técnicas estándares que son bien conocidas para aquellos versados en la materia.

40 **[0041]** En diversas realizaciones descritas en el presente texto, los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico pueden combinarse con minerales, aminoácidos, azúcares, péptidos, proteínas, vitaminas (como ácido ascórbico), o laminina, colágeno, fibronectina, ácido hialurónico, fibrina, elastina, o agrecano, o factores de crecimiento como factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento de fibroblastos, y glucocorticoides como dexametasona o agentes de alteración viscoelásticos, como polímeros solubles en agua iónicos y no iónicos; polímeros de ácido acrílico; polímeros hidrofílicos como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, y polivinilalcohol; polímeros celulósicos y derivados de polímeros celulósicos como celulosa de hidroxipropilo, celulosa de hidroxietilo, metilcelulosa de hidroxipropilo, ftalato de metilcelulosa de hidroxipropilo, metilcelulosa, celulosa de carboximetilo, y celulosa eterificada; ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido láctico y glicólico, u otros agentes poliméricos, tanto naturales como sintéticos.

50 **[0042]** En diversas realizaciones descritas en el presente texto, el componente peptídico del peptidoglicano sintético se sintetiza de acuerdo con protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida que son conocidos para aquellas personas versadas en la materia. En una realización, un precursor peptídico se sintetiza en un soporte sólido de acuerdo con el conocido protocolo Fmoc, se escinde del soporte con ácido trifluoroacético y se purifica mediante cromatografía siguiendo métodos conocidos para las personas versadas en la materia.

65

[0043] En varias realizaciones descritas en el presente texto, el componente peptídico del peptidoglicano sintético se sintetiza utilizando métodos de biotecnología que son bien conocidos por las personas versadas en la materia. En una realización, una secuencia de ADN que codifica la información de la secuencia de aminoácidos para el péptido deseado se liga mediante técnicas de ADN recombinante -que son conocidas por las personas versadas en la materia- con un plásmido de expresión (por ejemplo, un plásmido que incorpora una etiqueta de afinidad para la purificación por afinidad del péptido), el plásmido se transfecta a un organismo huésped para su expresión, y entonces el péptido se aísla del organismo huésped o el medio de crecimiento siguiendo métodos conocidos por las personas versadas en la materia (por ejemplo, mediante purificación por afinidad). Los métodos con tecnología de ADN recombinante se describen en Sambrook et al., 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual', 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001), y son bien conocidos por las personas con conocimientos en la materia.

[0044] En diversas realizaciones descritas en el presente texto, el componente peptídico del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se conjuga con un glicano haciendo reaccionar un grupo amino libre del péptido con una función de aldehído del glicano en presencia de un agente reductor, utilizando métodos conocidos por las personas versadas en la materia, para producir el conjugado de peptidoglicano. En una realización, se forma una función de aldehído del glicano (por ejemplo, polisacárido o glicosaminoglicano) haciendo reaccionar el glicano con metaperyodato de sodio siguiendo métodos conocidos por las personas versadas en la materia.

[0045] En una realización, el componente peptídico del peptidoglicano sintético se conjuga con un glicano haciendo reaccionar una función de aldehído del glicano con 3-(2-piridilditio)propionil hidrácido (PDPH) para formar un glicano intermedio y, después, se hace reaccionar el glicano intermedio con un péptido que contiene un grupo tiol libre para obtener el conjugado de peptidoglicano. En otra realización, la secuencia del componente peptídico del peptidoglicano sintético puede modificarse para incluir un segmento de glicina-cisteína para proporcionar un punto de unión para un glicano o un conjugado con un enlazador de glicano. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente texto, el reticulante ('crosslinker', en inglés) puede ser N-[β-ácido maleimidopropiónico]hidrácido (BMPH).

[0046] A pesar de que en los párrafos precedentes se han descrito realizaciones específicas, los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico que se describen en el presente texto pueden obtenerse utilizando cualquier método reconocido en este campo para la conjugación de un péptido y un glicano (por ejemplo, polisacárido o glicosaminoglicano). Esto puede incluir los enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno, tanto de forma directa como de forma indirecta mediante un grupo de unión como un enlazador divalente. Normalmente, el conjugado se forma por medio de un enlace covalente del péptido con el glicano mediante la formación de enlaces de amidas, ésteres o iminas entre los grupos de ácido, aldehído, hidroxilo, amino o hidrazo de los respectivos componentes del conjugado. Todos estos métodos son conocidos en este campo o se describen más adelante en la sección de Ejemplos de esta solicitud o en Hermanson G.T., 'Bioconjugate Techniques', Academic Press, págs.169-186 (1996). Habitualmente, el enlazador ('linker', en inglés) comprende entre alrededor de 1 y alrededor de 30 átomos de carbono, y más habitualmente entre alrededor de 2 y alrededor de 20 átomos de carbono. Normalmente se utilizan enlazadores con menos peso molecular (esto es, aquellos que tienen, aproximadamente, un peso molecular de entre alrededor de 20 y alrededor de 500).

[0047] Además, en el presente texto se contemplan las modificaciones estructurales de la zona o porción del enlazador en los conjugados. Por ejemplo, los aminoácidos se pueden incluir en el enlazador y se pueden realizar diversas sustituciones de aminoácidos en la zona del enlazador del conjugado, incluyendo -pero sin limitarse a- los aminoácidos que existen de manera natural, así como aquellos que están disponibles a partir de métodos sintéticos habituales. En otro aspecto, se pueden usar aminoácidos beta, gamma y de cadenas más largas en lugar de uno o más aminoácidos alfa. En otro aspecto, el enlazador puede acortarse o alargarse, tanto alterando el número de aminoácidos incluidos en él como incluyendo más o menos aminoácidos beta, gamma o con cadenas más largas. De manera similar, es posible modificar la longitud y la forma de otros fragmentos químicos de los enlazadores descritos en el presente texto.

[0048] En diversas realizaciones descritas en el presente texto, el enlazador puede incluir uno o más fragmentos bivalentes seleccionados -de manera independiente en cada caso- de un grupo que se compone de alquileo, heteroalquileo, cicloalquileo, cicloheteroalquileo, arileno y heteroarileno (cada uno de ellos se puede sustituir de manera opcional). Tal y como se utiliza en el presente texto, heteroalquileo representa un grupo que es el resultado de sustituir uno o más átomos de carbono de un grupo de alquileo lineal o ramificado con un átomo seleccionado -de manera independiente en cada caso- de un grupo que se compone de oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. En una realización alternativa, el enlazador no está presente.

[0049] En una realización descrita en el presente texto, se proporciona una matriz de colágeno obtenida por ingeniería. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se pueden aplicar a la matriz de colágeno obtenida por ingeniería descrita en el presente texto. En una realización, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprende colágeno polimerizado, ácido hialurónico y un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. En una realización, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprende colágeno polimerizado y un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. En diversas realizaciones ilustrativas, se pueden añadir agentes reticuladores o reticulantes -como carbodiimidas,

aldehídos, lysl-oxidasa, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres, hidrácidos y maleimidados, así como diversos agentes reticuladores naturales, incluyendo genipina y similares- antes, durante o después de la polimerización del colágeno en una solución.

5 **[0050]** En diversas realizaciones ilustrativas, el colágeno utilizado en el presente texto para preparar una matriz de colágeno obtenida por ingeniería puede ser cualquier tipo de colágeno, incluyendo colágeno de tipo I a XXVIII, solo o con cualquier tipo de combinación; por ejemplo, pueden usarse colágenos de tipo I, II, III y/o IV. En algunas realizaciones, el colágeno utilizado para preparar una matriz de colágeno obtenida por ingeniería se selecciona de un grupo que se compone de colágeno de tipo I, colágeno de tipo II, colágeno de tipo III, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo IX, colágeno de tipo XI y combinaciones de estos. En una realización, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería se forma usando colágeno disponible de manera comercial (por ejemplo, Sigma, St. Louis, MO, EE UU). En una realización alternativa, el colágeno puede depurarse o purificarse a partir de submucosa que contiene material de tejido como tejido intestinal, estomacal o de la vejiga urinaria. En otra realización, el colágeno puede purificarse a partir de tendón de la cola. En otra realización adicional, el colágeno puede purificarse a partir de la piel. En diversos aspectos, el colágeno también puede contener proteínas no colágenas añadidas de manera endógena o exógena -además de los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico-, como fibronectina o proteínas de seda, glicoproteínas y polisacáridos, o similares. Las matrices de colágeno obtenidas por ingeniería y preparadas siguiendo los métodos descritos en el presente texto pueden tener la forma de un injerto tisular (por ejemplo, ser en forma de gel), el cual puede adoptar las propiedades características del tejido o tejidos con los que están asociadas en el sitio de implantación o inyección. En una realización, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería es un implante tisular que puede implantarse en un paciente. En otra realización, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería puede ser administrada a un paciente mediante inyección. En cualquier realización, la matriz puede estar en forma de gel o en forma de polvos, por ejemplo.

25 **[0051]** En una realización, el colágeno de la matriz obtenida por ingeniería comprende entre alrededor del 40 y alrededor del 90 del porcentaje (%) del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 40 y alrededor del 80% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 40 y alrededor del 70% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 40 y alrededor del 60% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 50 y alrededor del 90% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 50 y alrededor del 80% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 50 y alrededor del 75% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 50 y alrededor del 70% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 60 y alrededor del 75% del peso en seco de la matriz. En otra realización, el colágeno de la matriz obtenida por ingeniería comprende alrededor del 90% del peso en seco, alrededor del 85% del peso en seco, alrededor del 80% del peso en seco, alrededor del 75% del peso en seco, alrededor del 70% del peso en seco, alrededor del 65% del peso en seco, alrededor del 60% del peso en seco, alrededor del 50% del peso en seco, alrededor del 45% del peso en seco, alrededor del 40% del peso en seco, o alrededor del 30% del peso en seco de la matriz.

[0052] En una realización, la concentración final de colágeno de la matriz en forma de gel es de entre alrededor de 0,5 y alrededor de 6 mg por mL, entre alrededor de 0,5 y alrededor de 5 mg por mL, entre alrededor de 0,5 y alrededor de 4 mg por mL, entre alrededor de 1 y alrededor de 6 mg por mL, entre alrededor de 1 y alrededor de 5 mg por mL, entre alrededor de 1 y alrededor de 4 mg por mL. En una realización, la concentración final de colágeno de la matriz es de alrededor de 0,5 mg por mL, de alrededor de 1 mg por mL, de alrededor de 2 mg por mL, de alrededor de 3 mg por mL, de alrededor de 4 mg por mL o de alrededor de 5 mg por mL.

45 **[0053]** En una realización, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprende entre alrededor del 2 y alrededor del 60% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 2 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 5 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 20% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 30% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 25% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 15 y alrededor del 30% del peso en seco de la matriz o entre alrededor del 15 y alrededor del 45% del peso en seco de la matriz. En otra realización, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprende alrededor del 2% del peso en seco, alrededor del 5% del peso en seco, alrededor del 10% del peso en seco, alrededor del 15% del peso en seco, alrededor del 20% del peso en seco, alrededor del 25% del peso en seco, alrededor del 30% del peso en seco, alrededor del 35% del peso en seco, alrededor del 40% del peso en seco, alrededor del 45% del peso en seco o alrededor del 50% del peso en seco de la matriz.

[0054] En otra realización, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprende ácido hialurónico y el ácido hialurónico de la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprende entre alrededor del 2 y alrededor del 60% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 2 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 5 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 20% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 30% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 25% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 15 y alrededor del 30% del peso en seco de la matriz o entre alrededor del 15 y alrededor del 45% del peso en seco de la matriz. En otra realización, el ácido hialurónico de la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprende alrededor del 2% del peso en seco, alrededor del 5% del peso en seco, alrededor

del 10% del peso en seco, alrededor del 15% del peso en seco, alrededor del 20% del peso en seco, alrededor del 25% del peso en seco, alrededor del 30% del peso en seco, alrededor del 35% del peso en seco, alrededor del 40% del peso en seco, alrededor del 45% del peso en seco o alrededor del 50% del peso en seco de la matriz.

- 5 **[0055]** En una realización, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería contiene ácido hialurónico y un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. El ácido hialurónico y el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprenden entre alrededor del 10 y alrededor del 60% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 20 y alrededor del 60% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 30 y alrededor del 60% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 40 y alrededor del 60% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 10 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 20 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 25 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz, entre alrededor del 30 y alrededor del 50% del peso en seco de la matriz o entre alrededor del 25 y alrededor del 40% del peso en seco de la matriz. En otra realización, el ácido hialurónico y el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de la matriz de colágeno obtenida por ingeniería comprenden alrededor del 10% del peso en seco, alrededor del 15% del peso en seco, alrededor del 20% del peso en seco, alrededor del 25% del peso en seco, alrededor del 30% del peso en seco, alrededor del 35% del peso en seco, alrededor del 40% del peso en seco, alrededor del 50% del peso en seco, alrededor del 55% del peso en seco, alrededor del 60% del peso en seco o alrededor del 70% del peso en seco de la matriz.
- 10
- 15
- 20 **[0056]** En un aspecto ilustrativo, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería puede esterilizarse. Tal y como se utilizan en el presente texto, 'esterilización', 'esterilizar' o 'esterilizado/a' hacen referencia a desinfectar la matriz eliminando contaminantes no deseados, incluyendo -pero sin limitarse a- endotoxinas, contaminantes del ácido nucleico y agentes infecciosos.
- 25
- 30 **[0057]** En diversas realizaciones ilustrativas, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería puede desinfectarse y/o esterilizarse usando técnicas de esterilización habituales, incluyendo el curtido con glutaraldehído, el curtido con formaldehído con un pH ácido, el tratamiento con óxido de propileno u óxido de etileno, la esterilización con plasma de gas, la radiación gamma (por ejemplo, irradiación gamma de 1-4 Mrads o irradiación gamma de 1-2,5 Mrads), un haz de electrones y/o la esterilización con un perácido, como el ácido peracético. Pueden usarse técnicas de esterilización que no afecten de manera adversa a la estructura y las propiedades biotrópicas de la matriz. En una realización, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería puede someterse a uno o más procesos de esterilización. En las realizaciones ilustrativas, el colágeno en solución también puede esterilizarse o desinfectarse antes de la polimerización. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería puede envolverse en cualquier tipo de envase, incluyendo un envoltorio de plástico o un envoltorio de papel de aluminio, y además puede esterilizarse.
- 35
- 40 **[0058]** En cualquiera de estas realizaciones, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería además puede comprender una población exógena de células. La población añadida de células puede comprender una o más poblaciones de células. En varias realizaciones, las poblaciones de células comprenden una población de células epiteliales queratinizadas o no queratinizadas o una población de células seleccionadas de un grupo que se compone de células endoteliales, células derivadas mesodérmicamente, células mesoteliales, sinoviocitos, neuronas, células gliales, osteoblastos, fibroblastos, condrocitos, tenocitos, células musculares lisas, células esqueleto-musculares, células del músculo cardíaco, células progenitoras multipotenciales (por ejemplo, células madre, incluyendo células progenitoras de la médula ósea) y células osteogénicas. En algunas realizaciones, la población de células se selecciona de un grupo que se compone de condrocitos y células madre. En algunas realizaciones, las células madre se seleccionan de un grupo que se compone de osteoblastos, células osteogénicas y células madre mesenquimales. En diversas realizaciones, la matriz de colágeno obtenida por ingeniería puede poblarse con uno o más tipos de células de forma combinada.
- 45
- 50 **[0059]** En diversos aspectos, las matrices de colágeno obtenidas por ingeniería o los constructos de injertos obtenidos por ingeniería de la presente invención pueden combinarse con nutrientes, incluyendo minerales, aminoácidos, azúcares, péptidos, proteínas, vitaminas (como ácido ascórbico), o laminina, fibronectina, ácido hialurónico, fibrina, elastina, o agregano, o factores de crecimiento como factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento de fibroblastos, y glucocorticoides como dexametasona o agentes de alteración viscoelásticos, como polímeros solubles en agua iónicos y no iónicos; polímeros de ácido acrílico; polímeros hidrofílicos como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxitileno-polioxiopropileno, y polivinilalcohol; polímeros celulósicos y derivados de polímeros celulósicos como celulosa de hidroxipropilo, celulosa de hidroxietilo, metilcelulosa de hidroxipropilo, ftalato de metilcelulosa de hidroxipropilo, metilcelulosa, celulosa de carboximetilo, y celulosa eterificada; ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido láctico y glicólico, u otros agentes poliméricos, tanto naturales como sintéticos. En otras realizaciones ilustrativas, los agentes reticuladores, como carbodiimidas, aldehídos, lysl-oxidasa, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres, hidrácidos y maleimidas, así como agentes reticuladores naturales, incluyendo genipina, y similares, pueden añadirse antes, al mismo tiempo o después de la adición de las células.
- 60
- 65 **[0060]** Tal y como se ha explicado previamente, de acuerdo con una realización, pueden añadirse células a las matrices de colágeno obtenidas por ingeniería o a los constructos de injertos obtenidos por ingeniería después de la polimerización del colágeno o durante la polimerización del colágeno. Posteriormente, las matrices de colágeno

obtenidas por ingeniería que contienen las células pueden inyectarse o implantarse en un huésped y usarse como constructos de injertos obtenidos por ingeniería. En otra realización, las células que se encuentran sobre o en las matrices de colágeno obtenidas por ingeniería pueden cultivarse 'in vitro', durante un periodo de tiempo predeterminado, para aumentar el número de células o para provocar la remodelación deseada antes de la implantación o la inyección en un paciente.

[0061] En una realización descrita en el presente texto, se proporciona una composición para el cultivo 'in vitro' de condrocitos o células madre (esto es, para el cultivo 'in vitro' de células sin que después se implanten o inyecten en un paciente). La composición para el cultivo 'in vitro' contiene un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse a la composición para el cultivo 'in vitro' aquí descrita.

[0062] En diversos aspectos, la composición para el cultivo 'in vitro' de la presente invención puede combinarse con nutrientes, incluyendo minerales, aminoácidos, azúcares, péptidos, proteínas, vitaminas (como ácido ascórbico), o laminina, fibronectina, ácido hialurónico, fibrina, elastina, o agregano, o factores de crecimiento como factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento de fibroblastos, y glucocorticoides como dexametasona.

[0063] En algunas realizaciones, la composición para el cultivo 'in vitro' incluye células madre seleccionadas de un grupo que se compone de osteoblastos, células osteogénicas y células madre mesenquimales. En diversas realizaciones, la composición para el cultivo 'in vitro' puede proveerse de uno o más tipos de células de forma combinada.

[0064] En un aspecto ilustrativo, la composición para el cultivo 'in vitro' puede esterilizarse. Tal y como se utilizan en el presente texto, 'esterilización', 'esterilizar' o 'esterilizado/a' hacen referencia a desinfectar la composición eliminando contaminantes no deseados, incluyendo -pero sin limitarse a- endotoxinas, contaminantes del ácido nucleico y agentes infecciosos. Los procedimientos, métodos y realizaciones de esterilización proporcionados en los párrafos precedentes también pueden aplicarse a la composición para el cultivo 'in vitro' descrita en el presente párrafo. La composición para el cultivo 'in vitro' puede usarse para aumentar las poblaciones de células para implantarlas o inyectarlas en un paciente.

[0065] En una realización descrita en el presente texto, se proporciona un aditivo para una composición de biomaterial para el recambio del cartílago. El aditivo contiene un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico para añadirlo a un material de biomaterial -ya existente- para el recambio del cartílago. Las realizaciones previamente descritas del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse al aditivo aquí descrito.

[0066] Tal y como se utiliza en el presente texto, la frase 'material para el recambio de cartílago de biomaterial ya existente' hace referencia a una composición biológicamente compatible que puede usarse para el recambio o sustitución de cartílago del cuerpo dañado, defectuoso o ausente. En este campo se conocen y se contemplan diversos tipos de composiciones de biomaterial para el recambio del cartílago. Por ejemplo, las composiciones de biomaterial ya existentes para el recambio del cartílago o del hueso incluyen el 'DeNovo® NT Natural Tissue Graft' (Zimmer), el 'MaioRegen™' (JRI Limited) o la colección de tejidos osteoarticulares criopreservados que produce Biomet.

[0067] En una realización, se proporciona un método para preparar un biomaterial o recambio de cartílago óseo. El método incluye el paso de combinar el peptidoglicano sintético con un biomaterial o un material para el recambio del cartílago óseo ya existentes. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse al método aquí descrito.

[0068] En una realización, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se utiliza en un método para el tratamiento de la artritis en un paciente. El método incluye el paso de administrar al paciente un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, de manera que el peptidoglicano sintético alivia uno o más síntomas asociados con la artritis. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse al método aquí descrito.

[0069] En diversas realizaciones, el peptidoglicano sintético utilizado en el método para el tratamiento de la artritis reduce uno o más síntomas asociados con la artritis. En este campo se conocen diversos síntomas que están asociados con la artritis, incluyendo -pero sin limitarse a- dolor, rigidez, sensibilidad, inflamación, hinchazón, enrojecimiento, quemazón y movilidad reducida. Los síntomas de la artritis pueden presentarse en una articulación, un tendón u otras partes del cuerpo. Tal y como se utiliza en el presente texto, 'reducir' significa prevenir o aliviar completa o parcialmente los síntomas de la artritis.

[0070] En diversas realizaciones, la artritis es osteoartritis o artritis reumatoide. La patogénesis y los síntomas clínicos de la osteoartritis y de la artritis reumatoide son bien conocidos en este campo. En una realización de este método, el peptidoglicano sintético funciona como lubricante después de su administración o evita la pérdida de

cartílago. En otra realización, el peptidoglicano sintético evita la articulación de los huesos del paciente. Por ejemplo, el peptidoglicano sintético inhibe la articulación hueso contra hueso en un paciente con un cartílago disminuido o dañado.

[0071] En una realización, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se utiliza en un método para reducir o evitar la degradación de los componentes de la ECM (la matriz extracelular) de un paciente. Por ejemplo, se proporciona un método para reducir o evitar la degradación de los componentes de la ECM en el cartílago de un paciente. El método incluye administrar al paciente un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse al método aquí descrito. En una realización, el peptidoglicano sintético es resistente a las metaloproteasas de la matriz, por ejemplo, la agreganasa.

[0072] En otra realización, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se usa en un método para reducir o evitar la degradación del ácido hialurónico de un paciente. El método incluye administrar al paciente un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse al método aquí descrito.

[0073] En otra realización, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se usa en un método para reducir o evitar la degradación del colágeno. El método incluye los pasos de poner en contacto un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico con ácido hialurónico en presencia de colágeno, y de reducir o evitar la degradación del colágeno. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse al método aquí descrito.

[0074] En otra realización, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se usa en un método para reducir o evitar la degradación del sulfato de condroitina. El método incluye los pasos de poner en contacto un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico con ácido hialurónico en presencia de colágeno, y de reducir o evitar la degradación del sulfato de condroitina. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse al método aquí descrito.

[0075] 'Reducir' la degradación de los componentes de la ECM, por ejemplo, la degradación de ácido hialurónico, colágeno o sulfato de condroitina, significa reducir completa o parcialmente la degradación de ácido hialurónico, colágeno o sulfato de condroitina, respectivamente.

[0076] En una realización, reducir la degradación del ácido hialurónico de un paciente significa reducir el ritmo o tasa de degradación del ácido hialurónico. Por ejemplo, la Figura 8 descrita en la sección de Ejemplos de la presente solicitud muestra que la tasa de degradación del ácido hialurónico en una mezcla de ácido hialurónico y peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se reduce de forma significativa cuando se añade el peptidoglicano sintético.

[0077] En una realización, reducir la degradación del colágeno significa reducir el ritmo o tasa de degradación del colágeno. Por ejemplo, la Figura 10 descrita en la sección de Ejemplos de la presente solicitud muestra que la tasa de degradación del colágeno en presencia de ácido hialurónico y de un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se reduce de forma significativa cuando se añade el peptidoglicano sintético.

[0078] En una realización, reducir la degradación del sulfato de condroitina significa reducir el ritmo o tasa de degradación del sulfato de condroitina. Por ejemplo, la Figura 11 descrita en la sección de Ejemplos de la presente solicitud muestra que la tasa de degradación del sulfato de condroitina en presencia de un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se reduce de forma significativa cuando se añade el peptidoglicano sintético.

[0079] En una realización descrita en el presente texto, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se utiliza en un método para corregir o modificar un defecto en el tejido de un paciente. El método incluye administrar en el tejido defectuoso de un paciente ácido hialurónico y un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, de manera que el defecto se corrige o modifica. Las realizaciones previamente descritas sobre el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden aplicarse al método aquí descrito. En una realización, el defecto del tejido es un defecto cosmético.

[0080] Las siguientes realizaciones pueden aplicarse a los métodos aquí descritos, en los que el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se administra a un paciente. En diversas realizaciones, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede inyectarse o implantarse (por ejemplo, incorporado en una composición o dispositivo para reparar el cartílago). En algunas realizaciones descritas en el presente texto, la inyección es una inyección intraarticular. En otra realización descrita en el presente texto, la inyección se realiza en una cápsula articular del paciente. En otras realizaciones, la inyección es una inyección subcutánea, como en el caso de los rellenos dérmicos. Los medios adecuados para la inyección incluyen un inyector con aguja (incluyendo una miniaguja) o un dispositivo para realizar una infusión.

[0081] En una realización ilustrativa, las formulaciones farmacéuticas que se usan con peptidoglicanos sintéticos

que se unen al ácido hialurónico para administrarse a un paciente comprenden: a) una cantidad farmacéuticamente activa del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico; b) un agente amortiguador del pH farmacéuticamente aceptable para proporcionar un pH que se encuentre en un rango de entre alrededor de pH 4.5 y alrededor de pH 9; c) un agente que modifique la fuerza iónica con un rango de concentración de entre alrededor de 0 y alrededor de 300 milimolares; y d) un agente soluble en agua que modifique la viscosidad con un rango de concentración de entre alrededor del 0,25% y alrededor del 10% del peso total de la fórmula; o cualquier componente individual a), b), c) o d); o cualesquiera combinaciones de a), b), c) y d).

[0082] En diversas realizaciones descritas en el presente texto, los agentes amortiguadores del pH son aquellos agentes que resultan conocidos para alguien versado en la materia, e incluyen, por ejemplo, amortiguadores de acetato, borato, carbonato, citrato y fosfato, así como ácido hidroclorehídrico, hidróxido de sodio, óxido de magnesio, fosfato de monopotasio, bicarbonato, amoniaco, ácido carbónico, ácido hidroclórico, citrato de sodio, ácido cítrico, ácido acético, hidrógeno fosfato disódico, bórax, ácido bórico, ácido dietilbarbitúrico y proteínas, así como diversos amortiguadores biológicos como, por ejemplo, TAPS, Bicina, Tris, Tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato o MES.

[0083] En diversas realizaciones descritas en el presente texto, los agentes que modifican la fuerza iónica incluyen aquellos agentes conocidos en este campo, por ejemplo, glicerina, propilenglicol, manitol, glucosa, dextrosa, sorbitol, cloruro de sodio, cloruro de potasio y otros electrolitos.

[0084] Los agentes adecuados que modulan la viscosidad incluyen -pero no se limitan a- polímeros solubles en agua iónicos y no iónicos, polímeros reticulados acrílicos y ácidos como la familia de polímeros del 'carbopol' (o 'carbomer'), por ejemplo, carboxipolialquilenos que pueden obtenerse comercialmente bajo la marca registrada Carbopol®; polímeros hidrofílicos como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, y polivinilalcohol; polímeros celulósicos y derivados de polímeros celulósicos como celulosa de hidroxipropilo, celulosa de hidroxietilo, metilcelulosa de hidroxipropilo, ftalato de metilcelulosa de hidroxipropilo, metilcelulosa, celulosa de carboximetilo, y celulosa eterificada; gomas como la goma tragacanto y la goma xantana; alginato de sodio; gelatina, ácido hialurónico y sales de estos, quitosanos, goma gellan o cualquier combinación de estos compuestos. Normalmente, los agentes no ácidos que aumentan la viscosidad, como un agente neutro o básico, se emplean para que sea más fácil obtener una formulación con el pH deseado.

[0085] En diversas realizaciones descritas en el presente texto, las formulaciones para inyectarse pueden formularse o prepararse como una solución esterilizada no acuosa o como una forma seca (por ejemplo, liofilizada) que se usará junto con un vehículo adecuado como, por ejemplo, agua esterilizada y exenta de pirógenos. La preparación de formulaciones para inyectarse en condiciones de esterilización, por ejemplo, mediante liofilización, puede realizarse con facilidad utilizando técnicas farmacéuticas estándares que son bien conocidas para las personas versadas en la materia. En una realización, la viscosidad de una solución que contiene ácido hialurónico se incrementa mediante la adición de un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico.

[0086] En diversas realizaciones descritas en el presente texto, la solubilidad de un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico utilizado en la preparación de formulaciones para administrarse mediante inyección puede aumentarse utilizando las técnicas de preparación adecuadas, como la incorporación de composiciones que aumentan la solubilidad como manitol, etanol, glicerina, polietilenglicoles, polipropilenglicol, poloxómeros y otros compuestos conocidos para aquellas personas con conocimientos en este campo.

[0087] En diversas realizaciones descritas en el presente texto, las formulaciones para administrarse mediante inyección pueden prepararse para que tengan una liberación inmediata o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen formulaciones de liberación retardada, sostenida, pulsátil, controlada, dirigida y programada. Así, un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede prepararse como un líquido sólido, semisólido o tixotrópico que se administra como un depósito implantado y que proporciona una liberación modificada del compuesto activo. Los ejemplos ilustrativos de estas formulaciones incluyen 'stents' recubiertos de fármacos y microesferas copoliméricas de ácido (DL-láctico, glicólico) (PGLA). En otra realización, los peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico o las composiciones que contienen peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico pueden administrarse de forma continua, siempre y cuando sea lo adecuado.

[0088] En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente texto, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede administrarse solo o en combinación con diluyentes o portadores ('carriers', en inglés) farmacéuticamente apropiados. Los ingredientes para los diluyentes o portadores utilizados en la preparación del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden seleccionarse de tal manera que no disminuyan los efectos deseados del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. La formulación del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede tener cualquier forma que sea adecuada. Los ejemplos de formas para administrar la dosis incluyen soluciones acuosas del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, por ejemplo, una solución salina isotónica, un 5% de glucosa u otros portadores o vehículos líquidos bien conocidos y farmacéuticamente aceptables como alcoholes, glicoles, ésteres y amidas.

[0089] Las dosis adecuadas del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico pueden determinarse

mediante métodos estándares; por ejemplo, estableciendo curvas de respuesta a la dosis en modelos animales de laboratorio o en ensayos clínicos. En diversas realizaciones descritas en el presente texto, la dosis del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede variar de manera significativa dependiendo de las condiciones del paciente, el estado de la enfermedad que se está tratando, la vía de administración y la distribución de los tejidos, y la posibilidad de un uso compartido de otros tratamientos terapéuticos. De forma ilustrativa, las dosis adecuadas de peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico (administradas en un único bolo o durante más tiempo) incluyen desde alrededor de 1 ng/kg hasta alrededor de 10 mg/kg, desde alrededor de 100 ng/kg hasta alrededor de 1 mg/kg, desde alrededor de 1 µg/kg hasta alrededor de 500 µg/kg o desde alrededor de 100 µg/kg hasta alrededor de 400 µg/kg. En cada una de estas realizaciones, dosis/kg hace referencia a la dosis por kilogramo de la masa del paciente o peso corporal. En otros aspectos ilustrativos, las dosis eficaces pueden ir desde alrededor de 0,01 µg hasta alrededor de 1000 mg por dosis, desde alrededor de 1 µg hasta alrededor de 100 mg por dosis, desde alrededor de 100 µg hasta alrededor de 50 mg por dosis, desde alrededor de 500 µg hasta alrededor de 10 mg por dosis o desde alrededor de 1 mg hasta alrededor de 10 mg por dosis, o desde alrededor de 1 hasta alrededor de 100 mg por dosis, o desde alrededor de 1 mg hasta alrededor de 5000 mg por dosis, o desde alrededor de 1 mg hasta alrededor de 3000 mg por dosis, o desde alrededor de 100 mg hasta alrededor de 3000 mg por dosis, o desde alrededor de 1000 mg hasta alrededor de 3000 mg por dosis. En una realización, las dosis adecuadas de peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico incluyen concentraciones que van desde alrededor de 0,01 uM hasta alrededor de 100 uM, desde alrededor de 0,05 uM hasta alrededor de 100 uM, desde alrededor de 0,1 uM hasta alrededor de 100 uM, desde alrededor de 0,1 uM hasta alrededor de 50 uM, desde alrededor de 0,1 uM hasta alrededor de 20 uM, desde alrededor de 0,1 uM hasta alrededor de 10 uM, desde alrededor de 0,5 uM hasta alrededor de 10 uM, desde alrededor de 0,5 uM hasta alrededor de 50 uM y desde alrededor de 0,5 uM hasta alrededor de 100 uM. En otra realización, las dosis adecuadas de peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico incluyen concentraciones de alrededor de 0,01 uM, 0,1 uM, 0,2 uM, 0,5 uM, 1 uM, 2 uM, 5 uM, 10 uM, 20 uM, 50 uM y 100 uM.

[0090] El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede prepararse en un excipiente. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente texto, el excipiente puede tener una concentración que va desde alrededor de 0,4 mg/ml hasta alrededor de 6 mg/ml. En diversas realizaciones, la concentración del excipiente puede ir desde alrededor de 0,5 mg/ml hasta alrededor de 10 mg/ml, desde alrededor de 0,1 mg/ml hasta alrededor de 6 mg/ml, desde alrededor de 0,5 mg/ml hasta alrededor de 3 mg/ml, desde alrededor de 1 mg/ml hasta alrededor de 3 mg/ml, desde alrededor de 0,01 mg/ml hasta alrededor de 10 mg/ml y desde alrededor de 2 mg/ml hasta alrededor de 4 mg/ml.

[0091] En las realizaciones en las que el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se implanta como parte de un dispositivo o composición para reparar el cartílago (por ejemplo, un gel para implantarse), se puede utilizar cualquier preparación adecuada previamente descrita.

[0092] Puede usarse cualquier régimen efectivo para administrar el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. Por ejemplo, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede administrarse como una dosis única o en un régimen diario de múltiples dosis. Además, puede usarse un régimen escalonado, por ejemplo, de uno a cinco días por semana, como alternativa al tratamiento diario.

[0093] En diversas realizaciones descritas en el presente texto, se trata al paciente con múltiples inyecciones del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico. En una realización, se le inyecta al paciente en múltiples ocasiones (por ejemplo, desde alrededor de 2 hasta alrededor de 50 veces) el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico; por ejemplo, en intervalos de 12-72 horas o en intervalos de 48-72 horas. Se le pueden administrar al paciente inyecciones adicionales de peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico en un intervalo de días o meses después de la(s) inyección(es) inicial(es).

[0094] En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente texto, debe entenderse que se puede usar una combinación de dos o más peptidoglicanos sintéticos que se unen al ácido hialurónico -los cuales difieren en la parte peptídica, la parte del glicano o ambas- en lugar de un único peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico.

[0095] También debe entenderse que, en las realizaciones anteriores, algunos aspectos de los compuestos, composiciones y métodos se presentan alternativamente en listas, como, por ejemplo y de manera ilustrativa, en selecciones de cualquier G o P. Por lo tanto, debe entenderse que diversas realizaciones alternativas de la invención incluyen elementos individuales de dichas listas, así como los diversos subconjuntos de dichas listas. Debe entenderse que cada una de esas combinaciones se describe en el presente texto por medio de las listas.

[0096] En los siguientes ejemplos ilustrativos, los términos 'réplica o imitación de(l) agrecano' ('aggrecan mimetic', en inglés) y 'réplica o imitación' ('mimetic', en inglés) se usan como sinónimos del término 'peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico'.

EJEMPLO 1

Síntesis Peptídica

[0097] Todos los péptidos se sintetizaron utilizando un sintetizador de péptidos Symphony (Protein Technologies, Tucson, AZ, EE UU) y utilizando un protocolo Fmoc con una resina Knorr. El péptido crudo se liberó de la resina con TFA y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en un AKTAexplorer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE UU) usando una columna de fase inversa (o reversa) Grace-Vydac 218TP C-18 y un gradiente de agua/acetonitrilo con un 0,1% de TFA. Se prepararon péptidos modificados con Dansyl añadiendo un paso adicional de unión con dansyl-Gly (Sigma) antes de la separación o liberación de la resina. Las estructuras peptídicas se verificaron mediante espectrometría de masas. Se prepararon los siguientes péptidos tal y como se ha descrito previamente: GAHWQFNALTVRGGGC, KQKIKHVVKLGKC y KLKSQLVVRKGC.

EJEMPLO 2

Funcionalización del Sulfato de Condroitina y Formación del Peptidoglicano Sintético

[0098] En la Figura 1 puede verse el esquema de reacción para la creación de la réplica de agrecano (esto es, GAH). La funcionalización del sulfato de condroitina (CS) (Sigma, St. Louis, MO, EE UU) se consiguió usando peryodato de sodio (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE UU) para oxidar el CS. Variando el tiempo de duración de la reacción y la concentración del peryodato de sodio, se controló el número de grupos de aldehído producidos por la reacción de oxidación, valores que se muestran en la Tabla 2. La Tabla 2 detalla la concentración del peryodato de sodio y la duración de la reacción necesaria para obtener el número deseado de aldehídos por cada cadena de CS. Mediante progresivas reacciones químicas, esquema que se muestra en la Figura 1, se asume que el número de BMPH vinculados -o unidos- por cada cadena de CS es igual al número de aldehídos producidos y al número de 'péptidos que se unen al ácido hialurónico (AH)' vinculados. Basándose en el tiempo de duración de la reacción y en la concentración del peryodato de sodio, en la Tabla 2 se muestra el número de péptidos (promedio) por cadena de CS.

TABLA 2

Concentración del Peryodato de Sodio (mM)	Tiempo de Duración de la Reacción (h)	# Aldehídos / Cadena de CS
10	24	3
20	24	7,2
30	24	8,5
20	48	9
30	48	10,5

[0099] La concentración del CS se mantuvo constante a 20 mg por mL en todas las reacciones de oxidación. Se hicieron reaccionar las cantidades medidas de CS y de peryodato de sodio y se protegieron de la luz en un 'buffer' o solución amortiguadora de 0,1 M de acetato de sodio (pH 5.5) durante los periodos de tiempo especificados. La reacción se consiguió completar eliminando el peryodato de sodio, para lo que se realizó una cromatografía de filtración en gel con una columna de Mini Bio-Gel de bio-Scale llena de perlas de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE UU) usando un Purificador ÄKTA FPLC (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE UU). El 'buffer' utilizado para el proceso de desalación fue una 'solución salina de fosfato' (también llamada 'tampón fosfato salino' o 'PBS') (pH 7.4, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE UU).

[0100] La sal de ácido trifluoroacético de N-[β- Ácido maleimidopropiónico]hidrácido (BMPH) (Pierce, Rockford, IL, EE UU) se hizo reaccionar con un sobrante de 50 M del CS desalado y oxidado en un PBS. El extremo hidrácido del BMPH reacciona y se vincula covalentemente con el CS funcionalizado, a través de los recién creados aldehídos, para formar una base de Schiff intermediaria. Se añadió cianoborohidruro de sodio (5 M, Pierce) a la reacción para reducir la imina de la base de Schiff intermediaria a una amina más estable. El sobrante de BMPH se eliminó de la solución mediante una desalación con FPLC en agua desionizada. Gracias a la capacidad de detección de la absorbancia del Purificador ÄKTA FPLC, se midió la cantidad sobrante de BMPH. El pequeño tamaño y el bajo peso molecular del BMPH (297,19 g/mol) provocó que su elución de la columna se produjera en un punto temporal separado y muy posterior. Con la presencia de sus numerosos enlaces simples y ocasionales enlaces dobles, el

BMPH produjo un fuerte espectro de absorbancia tanto en la longitud de onda de 215 nm (característica de los enlaces simples) como en la longitud de onda de 254 nm (característica de los enlaces dobles). Por tanto, se produjo una curva estándar, estableciéndose una relación entre las masas conocidas de BMPH y el área integrada de los espectros de absorbancia de 215 nm (Figura 2). Con esta curva estándar se determinó la masa del sobrante de BMPH. Sustraer la masa de BMPH excedente de la masa de la reacción original permite determinar la masa de BMPH consumida en la reacción. Usando la masa consumida, se calculó el número de enlaces de BMPH con el CS oxidado. El producto de CS-BMPH recogido se congeló, liofilizó y almacenó a -80° Celsius.

[0101] La secuencia del péptido que se une con el AH se identificó con Mummert. Ligeras modificaciones en la secuencia identificada produjeron la secuencia específica de unión con el AH, GAHWQFNALTVRGGGC (denominado GAH), que se utilizó en esta investigación. El péptido fue producido por Genscript (Piscataway, NJ, EE UU) y adquirido a través del mismo proveedor. Se incluyó el aminoácido de cisteína para hacer posible el acoplamiento, mediante la formación de enlaces de tioéter, al grupo de maleimida del BMPH. Esta reacción se da con un ratio 1:1, permitiendo asumir que el número de BMPH que se unen con el CS funcionalizado será igual que el número de péptidos de GAH enlazados. El péptido de GAH, con un sobrante de un molar con respecto al número de BMPH enlazados por cada cadena, se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) y se añadió a la solución de CS-BMPH en intervalos de 15 minutos, en un cuarto de volumen cada vez. Tras la última adición del péptido de GAH, se permitió que la reacción avanzara durante dos horas. Durante este tiempo, el péptido de GAH excedente formó partículas. Antes de purificar la solución para obtener CS funcionalizado con GAH, la solución se pasó a través de un filtro de Acrodisc con poros de 0,8 µm de diámetro (Pall, Port Washington, NY, EE UU) para eliminar el sobrante de partículas peptídicas. Después, la solución se pasó -con agua desionizada-a través del Purificador ÄKTA de FPLC para depurar el compuesto de GAH-CS. El compuesto recogido se congeló a -80° Celsius y se liofilizó para producir las réplicas de agregado deseadas. Por decisión del laboratorio, la réplica de agregado se nombró mediante (# de péptidos unidos) (las primeras tres letras de la secuencia peptídica) – (la abreviatura de GAG que se funcionalizó); esto es, en el caso de la réplica de agregado, 3GAH-CS, en relación con los 3 péptidos de GAH que se unen al AH y se funcionalizaron con un esqueleto de GAG de sulfato de condroitina.

EJEMPLO 3

Unión del Peptidoglicano Sintético con el Ácido Hialurónico

Unión del Peptidoglicano Sintético con el Ácido Hialurónico Inmovilizado

[0102] El Ácido Hialurónico (AH, de *Streptococcus equi*) (Sigma) con una concentración de 4 mg por mL, se inmovilizó en una placa de 96 pocillos (Costar, blk/clr, Coming, New York, EE UU) durante la noche a 4° Celsius. Los péptidos de GAH etiquetados o marcados con biotina se unieron, por medio de BMPH, con CS funcionalizado con una concentración de 1 biotina-GAH por cada cadena de CS. Los péptidos de GAH no etiquetados se unieron con los aldehídos de CS restantes que no habían reaccionado. Se usaron métodos estándares de detección con biotina-estreptavidina para determinar el grado de unión de la réplica de agregado con el AH inmovilizado. El bloqueo de la superficie de AH se llevó a cabo durante una hora con 1% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sera Care Life Sciences, Milford, MA, EE UU) en una solución de 1x PBS. Después de un lavado con 1x PBS, la réplica de agregado etiquetada con biotina se incubó en el pocillo durante 30 minutos y después se lavó con 1x PBS. Una solución de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE UU) se añadió a cada pocillo, y se dejó reaccionar durante 20 minutos. Después de completarse la reacción y tras un lavado, se añadió solución de cromógeno (Substrate Reagent Pack, R&D Systems) y se dejó que se desarrollara durante 15 minutos. A los 15 min., se añadió ácido sulfúrico (Sigma) directamente a cada pocillo para detener la reacción. Después, se analizó la placa de pozos con un M5 SpectraMax Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE UU) en unas longitudes de onda de 450 y 540 nm. Sustrayendo las dos lecturas de absorbancia obtenidas, se determinó la absorbancia debida a la réplica de agregado -etiquetada con biotina- enlazada.

[0103] Se sustituyó un péptido de GAH por cada réplica de agregado con un péptido de GAH etiquetado con biotina y la réplica de agregado ya etiquetada se incubó con AH inmovilizado. Los productos para la detección de biotina (mediante estreptavidina y HRP) disponibles comercialmente mostraron el grado de unión de la réplica con el AH inmovilizado (ver Figura 3). Empezando con una concentración de 1 µM, la réplica de agregado mostró un aumento -dependiente de la dosis- en presencia de AH inmovilizado, lo que demostró que la réplica estaba uniéndose con el AH. Sin embargo, no se buscó determinar la afinidad de enlace de la réplica debido a las dudas acerca de la cantidad de AH inmovilizado.

Unión del Peptidoglicano Sintético Obtenido por Reómetro con el Ácido Hialurónico

[0104] Se prepararon soluciones de AH para analizar la capacidad de la réplica de agregado para unirse con el AH en una situación más pertinente fisiológicamente. La capacidad de la réplica de agregado para unirse con el AH se dedujo debido a la mejora del módulo de almacenamiento de la solución, lo cual indicó un entrecruzamiento ('crosslinking', en inglés) del AH por parte de la réplica. Se crearon múltiples tratamientos con 1x PBS pH 7.4 para analizar la capacidad de la réplica de agregado para unirse con el AH: control de AH con un 2,5 de porcentaje de peso, AH+CS con un ratio molar de 25:1 de CS:AH, AH+3GAH-CS con 25:1, AH+7,2GAH-CS con 25:1,

AH+10,5GAH-CS con 25:1.

[0105] Utilizando el reómetro AR-G2 (TA Instruments, New Castle, DE, EE UU), frecuencia (0,1 - 100 Hz, 2,512 Pa) y tensión (0,1 - 100 Pa, 1,0 Hz), se realizaron barridos para medir el módulo de almacenamiento de cada solución.

[0106] La reología estudia el flujo o fluir de una sustancia en respuesta a las fuerzas aplicadas y se usa a menudo a la hora de medir materiales viscoelásticos. En particular, el reómetro determina el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdidas basándose en la reacción o respuesta de la sustancia frente a la fuerza aplicada. El módulo de almacenamiento es una medición de la cantidad de energía que es absorbida elásticamente por la sustancia, y el módulo de pérdidas describe la cantidad de energía que se pierde mediante el calor. Un módulo de almacenamiento grande o elevado es indicativo de una sustancia similar a un gel con una estructura más rígida y elástica, mientras que un módulo de almacenamiento bajo o pequeño y un módulo de pérdidas grande indican un material viscoso que no retiene o conserva elásticamente la carga aplicada. El AH, con su elevado peso molecular (≈ 1.5 MDa), es un material muy viscoso que retiene elásticamente una parte de la carga aplicada debido al pseudo-gel que forma por el entrelazamiento de las cadenas de AH. La réplica de agregano que se forma contiene múltiples péptidos que se enlazan con el AH y que pueden funcionar como una especie de reticulante de las cadenas de AH adquiriendo una unión de réplica al AH adecuada. Hipotéticamente, en solución con el AH de elevado peso molecular, la réplica de agregano podría aumentar la rigidez de la solución, creando un módulo de almacenamiento mayor. Un módulo de almacenamiento mayor sería indicativo de un amplio entrecruzamiento (o reticulación) del AH, lo que probaría una fuerte afinidad de enlace entre la réplica de agregano y las cadenas de AH presentes en la mezcla. Se analizaron múltiples versiones de la réplica de agregano que se diferenciaban por el número de péptidos de GAH (de promedio, 3, 7,2 ó 10,5) enlazados por cada cadena de CS funcionalizado.

[0107] Los resultados del experimento, que se muestran en la Figura 4, demostraron que la adición de CS reducía de forma significativa ($\alpha=0,05$) el módulo de almacenamiento de la solución de AH. La adición de densas cargas negativas asociadas con el CS ayudó a extender las cadenas de AH, disminuyendo el grado de entrelazamiento del AH y eliminando el pseudo-gel que guardaba la energía aplicada. Confirmando la hipótesis, ya que el número de péptidos de GAH por CS aumentó de 3 a 10,5, el módulo de almacenamiento de la mezcla también aumentó. Este aumento puede atribuirse a dos características beneficiosas que se derivan de tener un mayor número de péptidos de GAH por cada réplica de agregano. En primer lugar, cuantos más péptidos de GAH unidos haya por CS, mayor será la 'avidez' de la réplica, lo que provocará una unión más fuerte de la réplica con la molécula de AH. En segundo lugar, cuantos más péptidos de GAH unidos haya por CS, mayor será la probabilidad de que la réplica funcione como un reticulante entre las moléculas de AH. Ambos efectos contribuyeron a la obtención de una mezcla más similar al gel, lo que dio como resultado una medición más elevada del módulo de almacenamiento. Un enlace más débil entre la réplica y el AH no restituiría el pseudo-gel y no podría almacenar la energía aplicada por el reómetro. El aumento en el módulo de almacenamiento confirma la fuerte unión de la réplica con el AH inmovilizado, que se muestra en la Figura 3. De forma específica, con 10,5 péptidos de GAH por cada cadena de CS, el módulo de almacenamiento fue significativamente más elevado ($\alpha=0,05$) que el control de AH+CS, alcanzando un módulo de almacenamiento promedio similar al del control de AH.

EJEMPLO 4

Estudios sobre la Compresión del Peptidoglicano Sintético

Formación del Gel de Colágeno y Turbidez

[0108] Para imitar la matriz extracelular de cartílago nativo, se utilizó colágeno para atrapar el AH y los agregados de réplicas de agregano dentro de un andamio natural. Se adquirió colágeno de tipo II (CII) de dos fuentes comerciales diferentes (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE UU, y Sigma). Se prepararon mezclas de los componentes de la ECM de cartílago en un tampón TES (60 mM de TES, 20mM de Na₂HPO₄, 0,56 M de NaCl, productos químicos de Sigma) con un pH de 7.6 de acuerdo con la descomposición de los componentes nativos, de manera que el CII comprendía el 70% del peso en seco y la combinación de AH y la réplica de agregano/control de CS formaba el restante 30% de peso en seco de la mezcla. La concentración final de CII en el gel era de 2 mg por ml. Las muestras estaban compuestas de un control de CII, un control de CII+AH+CS y una réplica de CII+AH+agregano (10,5GAH-CS). Para evitar una fibrillogénesis y una formación de gel prematuras, las soluciones se conservaron en hielo con un pH ácido. Las mezclas de soluciones de los componentes se depositaron en una placa de 384 pocillos (Greiner blk/cfr, Monroe, NC, EE UU), y se pusieron a 37° C y con un pH fisiológico para iniciar la fibrillogénesis, y se monitorizaron a 313 nm con un M5 SpectraMax para determinar la formación de gel. El CII no pudo formar geles cuando se incluyó con diversos tratamientos (ver información adicional). Por tanto, se utilizó colágeno de tipo I (CI, colágeno de tipo I de cola de rata altamente concentrado) (BD Biosciences, Bedford, MA, EE UU) para la formación de gel. Los mismos tratamientos y procedimientos se utilizaron con el CI, exceptuando el hecho de que las masas de los componentes se modificaron para obtener una concentración final de CI de 4 mg por mL. Se utilizó CI para todos los experimentos siguientes.

[0109] Se comprobó la turbidez con CI para medir la formación de la réplica de cartílago (los resultados se muestran en la Figura 5). Como se demostró, la adición de AH+10,5GAH-CS no afectó a la fibrillogénesis de las fibras de colágeno. Todos los tratamientos siguieron una curva similar y alcanzaron picos de absorbancia similares al mismo

tiempo más o menos. El tratamiento de AH+10,5GAH-CS tenía una absorbancia inicial mayor debido a la tendencia de las réplicas de agregano para formar auto-agregados en una solución de 1x PBS, y no debido a la formación prematura de fibrillas de CI. El proceso de agregación de 10,5GAH-CS se identificó durante los tests de reómetro iniciales con el AH, pero dicha agregación no inhibió la capacidad de la réplica de agregano para unirse con el AH.

Pruebas Sobre las Propiedades del Gel de Colágeno

[0110] Se realizaron pruebas sobre la compresión de los geles basados en el colágeno y también se realizaron barridos de frecuencia usando un reómetro AR-G2 con una geometría o estructura de placas paralelas de 20 milímetros (TA Instruments). Las mezclas de gel de 375 μ L se prepararon en hielo y se pasaron con una pipeta a la placa base del reómetro. Se rebajó la geometría hasta obtener una distancia entre espacios de 1 mm y se calentó la solución hasta 37° C. Se utilizó una trampa de humedad para evitar la deshidratación del gel mientras se dejaba que la mezcla se 'gelificara' durante dos horas. Este valor de dos horas se determinó mediante los datos sobre el tiempo requerido hasta alcanzar la gelificación, obtenidos a partir de los datos de turbidez. Después de un periodo de tiempo de dos horas, los geles se habían comprimido u oscilaban, dependiendo de la prueba. Las pruebas o tests de compresión se desarrollaron con una tasa de deformación de ingeniería del 1% (10 μ m) por segundo. Se midieron la distancia entre espacios y la fuerza normal ejercida sobre la cabeza de la estructura. Los barridos de frecuencia midieron el módulo de almacenamiento de los geles formados durante un aumento de frecuencia de logaritmo en base diez que fue desde 0,1 hasta 1 Hz.

[0111] Se midieron la fuerza normal y el desplazamiento simultáneos, y se calcularon la tensión y deformación de ingeniería para los tratamientos. Tal y como se muestra en la Figura 6, la inclusión de la réplica de agregano aumentó de manera significativa ($\alpha=0,05$) la fuerza compresiva del complejo de gel. La tensión de ingeniería máxima de la réplica de colágeno+AH+AGG alcanzó 7,5 kPa con una deformación de ingeniería del 9%, mientras que el control de colágeno+AH+CS alcanzó un pico de 4,8 kPa al 4%, y el control de colágeno alcanzó un pico de 4,2 kPa al 15% de deformación.

[0112] Dos factores contribuyeron al aumento de la fuerza compresiva del gel de CI+AH+10,5. En primer lugar, la capacidad de la réplica para atraer el agua y, en segundo lugar, la capacidad de la réplica de agregano para la reticulación del AH. En el cartílago nativo, la predominancia de las cargas negativas atrapadas proporcionada por el AH y el CS atrae el agua y retrasa su difusión desde el cartílago. Cuando se aplica una fuerza compresiva al cartílago, el agua no puede difundirse hacia afuera hasta la cápsula sinovial. Retener esta agua incompresible aumenta la fuerza compresiva de la estructura. De manera similar, en los complejos de gel analizados la inclusión de las cargas negativas asociadas con el CS en el gel proporciona la misma atracción. Tal y como se puede ver en la Figura 6, tanto el tratamiento de CS como el tratamiento de 10,5GAH-CS tienen una fuerza compresiva aumentada. El tratamiento de CS no está fijado en el complejo de CI (no está unido con el AH) y, por lo tanto, después de una pequeña deformación compresiva, el CS y el agua que ha atraído se difunden fuera del complejo hacia el fluido de alrededor. La difusión del CS y el agua desde el complejo disminuye la fuerza compresiva del mismo, provocando que el perfil compresivo del gel resultante se parezca al del control del andamio de colágeno. Por el contrario, el 10,5GAH-CS está unido con el AH entrelazado. Por lo tanto, se requiere una fuerza compresiva mucho mayor para superar o debilitar la unión de la réplica con el AH y provocar la difusión del CS y el agua atraída desde el complejo.

[0113] En segundo lugar, la capacidad de la réplica de agregano para funcionar como reticulante del AH confiere un mayor grado de 'atrapamiento' ('entrapment', en inglés) al ácido hialurónico y la réplica. En efecto, la naturaleza reticulada del AH forma grandes agregados en el complejo de colágeno, de manera similar a lo que sucede con los agregados nativos de agregano/AH. La diferencia principal entre la réplica de agregano y el agregano nativo reside en el tamaño de la molécula. Solamente el esqueleto de la proteína de agregano pesa $\approx$ 220 kDa, mientras que la réplica de agregano, en su totalidad, solo pesa alrededor de 30kDa. Por lo tanto, el complejo de agregados nativo, con más de 100 moléculas unidas al AH, produce agregados mucho más grandes que los que podría producir la réplica de agregano. Sin embargo, al actuar como reticulante entre las cadenas de AH, la réplica de agregano puede producir su propia forma de agregado, que también posee las principales características de los agregados nativos; estructuras voluminosas y cargadas negativamente. El papel de la réplica de agregano como reticulante del AH se investigó más a fondo aplicando fuerza de cizalla mediante pruebas reológicas con los geles de CI descritos previamente. Los resultados de estos experimentos pueden verse en la Figura 7.

[0114] La inclusión de 10,5GAH-CS aumentó de manera significativa ($\alpha=0,05$) el módulo de almacenamiento del gel formado. La red creada por la unión de la réplica con el AH complementó la rigidez de la matriz de CI, propiciando un aumento de la absorbancia elástica de la energía aplicada mediante la fuerza de cizalla. Este estudio fue importante puesto que sirvió para verificar la capacidad de reticulación del 10,5GAH-CS y la creación de una forma de agregado alternativa.

EJEMPLO 5

Protección del Peptidoglicano Sintético frente a la Degradación del Ácido Hialurónico

[0115] Los valores de viscosidad dinámica de las soluciones de AH se determinaron usando el AR-G2. Las

soluciones de AH con elevados pesos moleculares tienen una gran viscosidad debido al amplio entrelazamiento de las cadenas causado por la gran longitud de las cadenas. La hialuronidasa (tipo II de las pruebas con ovejas, Sigma) descompone o separa las cadenas de AH, creando cadenas más cortas con un entrelazamiento menor. Las cadenas más cortas de AH tendrán una viscosidad menor que se puede medir. Las soluciones de AH se incubaron con 100 unidades/mL de hialuronidasa. Las viscosidades dinámicas se determinaron utilizando un barrido de tiempo con una frecuencia angular constante y una tensión oscilante al inicio, y en los puntos temporales de 2 y 4 horas. Las muestras (con un 0,5 de porcentaje de peso de AH) estaban compuestas de AH, AH+CS y AH+10,5GAH-CS. Los valores de tratamiento se añadieron con un ratio molar tratamiento/AH de 75:1. El porcentaje de degradación se calculó con cada medición dividiendo la viscosidad inicial con la diferencia de la viscosidad medida menos la viscosidad inicial.

[0116] El trabajo realizado por Pratta et al. y Little et al. ha demostrado la importancia del agregado a la hora de prevenir la degradación de los componentes de cartílago. La destrucción de la matriz de cartílago en la osteoartritis comienza con la descomposición de los proteoglicanos del agregado. La eliminación de la zona rica en GAG del proteoglicano deja los componentes restantes -CII y AH- expuestos a las enzimas degradantes. Con estos conocimientos sobre la importancia del agregado para evitar la degradación, se realizaron estudios para determinar la capacidad de la réplica de agregado a la hora de evitar la degradación del ácido hialurónico.

[0117] La viscosidad de una solución de ácido hialurónico depende del tamaño de las cadenas de AH. Debido al entrelazamiento, las cadenas de AH más grandes darán lugar a una viscosidad mayor. Cuando se expone a la hialuronidasa, la cadena de AH se separa en unidades más pequeñas. Por lo tanto, el tamaño del AH y el grado de entrelazamiento del AH disminuyen. Esta disminución provoca una disminución similar en la viscosidad medida. El porcentaje de cambio en la viscosidad de las soluciones de AH en presencia de hialuronidasa proporcionará información vital sobre el nivel de degradación que haya sufrido el AH. La Figura 8 representa el porcentaje de degradación del control de AH versus los tratamientos asociados. Tal y como se puede observar, la réplica de AGG, GAH, redujo de forma significativa la tasa de degradación del AH, lo que indica que se comporta de forma similar al AGG nativo a la hora de proteger los componentes de la ECM.

[0118] Las viscosidades de cada tratamiento sin hialuronidasa (un tampón TES sustituyó al volumen de hialuronidasa) se midieron inicialmente y sirvieron como referencia para los cálculos sobre el porcentaje de degradación. El punto temporal de 0 h requería añadir la hialuronidasa, mezclar la solución, pasarlo a un reómetro con una pipeta y poner en marcha la operación de equilibrado de la máquina. Por tanto, el punto temporal de 0 h tuvo lugar aproximadamente 2 minutos después de la adición de hialuronidasa. Se usó una alta concentración de hialuronidasa (25 unidades por mL) para replicar el peor escenario posible. Además, se dispersaron las moléculas de AH en una solución, en lugar de estrechamente ligadas en una red de colágeno. Tal y como se puede apreciar en la Figura 8, tanto el control de AH como el tratamiento de AH+CS sufrieron una degradación casi completa de la solución de AH en el punto temporal de 0 h. Por el contrario, la adición de 10,5GAH-CS redujo de manera significativa ($\alpha=0,05$) el nivel de degradación del AH. De hecho, la presencia de 10,5GAH-CS aumentó la viscosidad por encima de los valores de referencia. Se cree que la adición de hialuronidasa descompone una parte del excedente de AH. Esto permite que el 10,5GAH-CS reticule mejor las cadenas restantes, intactas, creando un gel más denso que da lugar a una mayor viscosidad.

[0119] En el punto temporal de 2 h, tanto el control de AH como el AH+CS se habían degradado por completo con unos porcentajes de degradación superiores al 90%, pero la solución de AH con 10,5GAH-CS mostraba un porcentaje de degradación significativamente más bajo ($\alpha=0,05$). Por último, en el punto temporal de 4 h, todos los tratamientos se habían degradado, y todos sus porcentajes de degradación eran superiores al 90%. Entre las tres referencias temporales, el 10,5GAH-CS no pudo evitar por completo la degradación del AH, pero redujo drásticamente la tasa de degradación en comparación con la degradación del control de AH y el AH+CS. Esta tasa reducida demuestra que el 10,5GAH-CS evita la degradación de las cadenas de AH. Se cree que esto se consigue mediante la inhibición competitiva del punto de descomposición de la hialuronidasa en la cadena de AH. El enlace o unión no covalente de la réplica con la cadena de AH, junto con la tasa de degradación gradual de las cadenas de AH, parecen confirmar esta teoría. Además, se cree que la tasa de degradación de la solución de 10,5GAH-CS sigue siendo artificialmente elevada. Después de la incubación de la réplica en la solución de AH, se formaron agregados de AH+10,5GAH-CS. Sin embargo, estos agregados no se distribuyeron de manera uniforme por todo el volumen de la solución. Así, se mezclaron las soluciones, de forma similar a las otras muestras, antes de realizar las mediciones. El hecho de mezclar la solución alteró los agregados, desplazando el 10,5GAH-CS y dejando expuesto el punto de descomposición de la hialuronidasa. Incluso después del punto temporal de referencia de 4 h, cuando, supuestamente, debería haber tenido lugar una degradación completa, todavía había una agregación considerable de AH+10,5GAH-CS. En una matriz compacta como la ECM de cartílago, es posible que el 10,5GAH-CS pudiera no solo reducir de forma significativa la tasa de degradación, sino también suprimir por completo la degradación de AH.

EJEMPLO 6

Microscopio Electrónico de Barrido de Congelación (SEM)

[0120] Los constructos basados en la ECM, tal y como se ha descrito en el caso de las mediciones de turbidez, se

formaron durante la noche en una placa SEM a 37° C. Las placas SEM se aseguraron en un recipiente y se sumergieron en una solución de nitrógeno líquido. Se aplicó un vacío a la muestra cuando esta se transfirió a una precámara Gatan Alto 2500. Ya en la cámara, enfriada hasta -170° C, se utilizó un escalpelo enfriado para crear una superficie libre de rupturas en la muestra. Se hizo que la muestra se sublimara a -85° C durante 15 minutos y después se roció con un revestimiento de platino durante 120 segundos. Después del revestimiento, la muestra se transfirió al microscopio y se tomaron imágenes a -130° C.

[0121] Se obtuvieron imágenes representativas con un aumento de 10 000x, tal y como se muestra en la Figura 9. El Panel A muestra el control de CI, y se caracteriza por el extenso entrecruzamiento (o reticulación) entre las principales fibrillas, y por el tamaño relativamente pequeño de los poros de la matriz. El Panel B muestra el CI+AH+CS y contiene un extenso entrecruzamiento, además de un tamaño de poros mayor, debido a la presencia de grandes cadenas de AH. El Panel C muestra el CI+AH+10,5GAH-CS e ilustra un grado de entrecruzamiento notablemente más bajo, además de un tamaño de poros muy grande. La réplica de AGG puede unirse con el AH, creando un complejo relativamente grande y voluminoso que dificulta el entrecruzamiento de CI.

[0122] Tal y como se puede observar en las imágenes representativas, la adición del AH+CS no tuvo ningún efecto sobre la variación de los diámetros de las fibrillas de colágeno, pero las muestras de AH+CS sí mostró un espacio vacío más grande. En comparación con los grupos de control, la adición de la réplica de AGG con AH dio como resultado una menor variación de los diámetros de las fibrillas de colágeno, debido al limitado número de diámetros de fibrillas pequeños, y un aumento general del espacio vacío de la muestra. La unión de la réplica de AGG con la molécula de AH creó un complejo de agregados que quedó atrapado en el andamio de colágeno y evitó la formación de fibrillas más pequeñas entre las fibrillas más grandes debido a los impedimentos estéricos.

EJEMPLO 7

Protección del Colágeno

[0123] Los constructos basados en la ECM que contienen solo colágeno, colágeno+AH+CS o colágeno+AH+10,5GAH-CS se crearon en láminas compartimentadas de 8 pocillos, tal y como se ha descrito previamente. El volumen final de la muestra fue de 200 µL, y se componía de 0,8 mg de colágeno de tipo I. La metaloproteasa-I de la matriz (MMP-I, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE UU), con una concentración de 0,133 mg/mL, se activó siguiendo el protocolo que se detalla en las instrucciones del fabricante. De manera resumida, la MMP-1, ya disuelta en el 'buffer' o tampón del fabricante (50mM de Tris, 10 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 0,05% de Brij-35, pH 7.5), se combinó con un volumen igual de 25 mM de APMA (Sigma) en DMSO a 37° C durante 2 h para activar la enzima. Después de la activación, la solución de MMP-1 se diluyó dos veces en agua y se añadió a la muestra como sobrenadante de 100 µL. Las muestras se incubaron a 37° C y se agitaron con suavidad. 25 horas después de la adición de la solución inicial de enzimas, se eliminó el sobrenadante y se sustituyó con un nuevo lote de enzimas. Después de un total de 50 h de incubación con las enzimas, los geles que quedaban se retiraron de las láminas compartimentadas, se lavaron con agua desionizada para eliminar cualquier solución de enzimas o producto de degradación, y se resolubilizaron en 12 M de HCl. Las muestras se diluyeron en agua para alcanzar una concentración final de 6 M de HCl, y se hidrolizaron durante la noche a 110° C. Después de la hidrólisis, se analizó la cantidad de hidroxiprolina (hyp) de acuerdo con el protocolo desarrollado por Reddy, et al. (Clin Biochem, 1996, 29: 225-9). De manera resumida, las muestras hidrolizadas se incubaron con una solución de cloramina T (0,56 M) durante 25 minutos a temperatura ambiente antes de añadir reactivo de Ehrlich y del desarrollo posterior del cloróforo durante 20 minutos a 65° C. Tras el desarrollo del cloróforo, las muestras se analizaron con un espectrofotómetro en una longitud de onda de 550 nm. Las lecturas de absorbancia se compararon con las obtenidas a partir de concentraciones de colágeno conocidas para determinar la cantidad de colágeno que quedaba en cada muestra.

[0124] Cada muestra de réplica se preparó con 0,8 mg de CI y, tras la degradación, se determinó la cantidad de CI restante mediante el protocolo desarrollado por Reddy et al. El porcentaje de degradación se determinó sustrayendo el CI restante del CI inicial, dividiendo por el CI inicial y multiplicando por 100. El porcentaje de degradación de los tres tratamientos se muestra en la Figura 10. Todos los tratamientos resultaron ser significativamente diferentes unos de otros (p<0,05). En particular, el porcentaje de degradación de la muestra de la réplica de AGG (CI+AH+10,5GAH-CS=41,0%) fue significativamente menor (p<0,05) que los otros dos tratamientos (CI=64,5% y CI+AH+CS=74,7%). La presencia de la réplica de AGG redujo la degradación de CI de forma significativa. La presencia de la réplica de AGG puede suponer un obstáculo para los sitios de descomposición de las enzimas degradantes. Si se crean grandes agregados con AH que están fuertemente atrapados en el andamio de colágeno, la réplica de AGG puede ocupar el espacio próximo al colágeno, evitando el acceso de las enzimas a los lugares de degradación.

EJEMPLO 8

Difusión de los Peptidoglicanos a través de la Matriz de Cartílago

[0125] Se obtuvieron explantes de cartílago de la zona de carga de las articulaciones de las rodillas de un animal

bovino de tres meses. Se eliminó el agregado nativo de los explantes de cartílago recogidos, lo que dejó una matriz que estaba compuesta principalmente de colágeno de tipo II y de GAG residual. Esto se consiguió tratando los explantes con 0,5% (p/v) de tripsina en HBSS durante 3 horas a 37° C (Figura 13). Después del tratamiento con tripsina, los explantes se lavaron tres veces en HBSS y se incubaron con un 20% de FBS para desactivar la actividad de la tripsina residual. Se disolvió peptidoglicano en agua destilada con una concentración de 10 µM y se difundió por la superficie articular de los explantes de cartílago depositando 10 µL de la solución en la superficie cada diez minutos durante una hora a temperatura ambiente (Figura 14). El cartílago normal y el cartílago desprovisto de agregado se trataron con 1X PBS como control positivo y negativo, respectivamente. Tras la difusión, los explantes se lavaron tres veces con 1X PBS y se guardaron a -20° C para posteriores análisis. La difusión del peptidoglicano se confirmó tiñendo con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante una zona media sagital del tejido. La tinción de estreptavidina se une con la molécula etiquetada con biotina y se representa en color marrón (Figuras 15 y 16).

EJEMPLO 9

Pruebas de Compresión de Volumen

[0126] Se llevó a cabo una compresión no confinada y con desplazamiento controlado en un reómetro AR G2 con transductores de fuerza capaces de detectar fuerzas normales en un rango de 0,01-50 N (TA Instruments). Los explantes se fijaron a la parte inferior de una lámina impresa hidrofóbica (Tekdon) y se cubrieron con un baño de 1X PBS. Se hizo descender una cabeza geométrica de una placa paralela de acero inoxidable de 20 mm de diámetro hasta lograr un primer contacto. Se midió la altura del explante utilizando un micrómetro digital (Duratool). Se aplicaron fuerzas o cargas de compresión con un 0-30% de deformación nominal (con intervalos del 5%) a los explantes de manera gradual, lo que requirió una duración de rampa ('ramp duration', en inglés) de 5 segundos (esto es, una tasa de deformación del 1,0%/seg) y un tiempo de retención de 30 seg. Los valores de la rigidez de compresión se obtuvieron usando la pendiente de los valores de la tensión de equilibrio, computados en cada zona o sección de retención, frente a los respectivos valores de deformación, basados en un modelo de ajuste lineal. Los andamios que se analizaron en cuanto a la compresión de volumen ('bulk compression', en inglés) incluyeron: 1) Cartílago normal, 2) Cartílago desprovisto de agregado (AD) y 3) AD+mAGC (Figura 17). La adición de peptidoglicano que se une al AH (mAGC) restauró de forma significativa la rigidez o firmeza de los explantes de cartílago llevándola a un nivel mayor en comparación con el peptidoglicano que se une al colágeno de tipo II (mAGC(II)C).

EJEMPLO 10

Modelo Animal

[0127] Para la cirugía se usaron ratas Sprague-Dawley (250-300g). Se cortaron transversalmente el tendón rotuliano, el ligamento cruzado anterior y posterior, y el ligamento colateral tibial y el ligamento lateral colateral. Se practicó una meniscectomía completa en el menisco medial y lateral. Se reparó la cápsula de la articulación de la rodilla mediante una sutura absorbible y se selló la piel con un monofilamento de nailon 4-0. Comenzando en la cuarta semana, se administraron semanalmente 10 µL de 1 µM de mAGC.

[0128] El grado de inflamación se determinó mediante una sonda de MMP-13 (Figura 18) en ratas Sprague-Dawley tratadas con y sin peptidoglicano cuatro, seis y ocho semanas después de la cirugía (Figura 19). Las imágenes de rayos X de las articulaciones de la rodilla de las ratas Sprague-Dawley mostraron la rodilla dañada 6 semanas y 8 semanas después de la inducción de OA (Figura 20, Paneles A y D, respectivamente), la rodilla dañada con un tratamiento de peptidoglicano (Figura 20, Paneles B y E, respectivamente) y la rodilla normal (Figura 20, Panel C) seis semanas después de la cirugía de inducción de la osteoartritis. La microCT de las ratas Sprague-Dawley indicó un crecimiento de cartílago nuevo seis y ocho semanas después de la cirugía de inducción de OA. Se muestran las rodillas dañadas 6 semanas y 8 semanas después de la inducción de OA (Figura 21, Paneles A y D, respectivamente), las rodillas dañadas después del tratamiento con peptidoglicano (Figura 21, Paneles B y E, respectivamente) y la rodilla normal (Figura 21, Panel C).

EJEMPLO 11

Reactivos

[0129] El péptido GAHWQFNALTVRGGGC (GAH) se adquirió a través de Genscript (Piscataway, NJ, EE UU). La sal de ácido trifluoroacético de N-[β- Ácido maleimidopropiónico] hidrácido (BMPH) se adquirió a través de Pierce (Rockford, IL, EE UU). El colágeno de tipo I de cola de rata se adquirió a través de BD Biosciences (Bedford, MA, EE UU). La interleucina-1β recombinante humana se adquirió a través de Peprotech (Rocky Hill, NJ, EE UU). A no ser que se indique lo contrario, todos los demás suministros se adquirieron a través de VWR (West Chester, PA, EE UU) o Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE UU).

EJEMPLO 12

Síntesis de los Andamios de Colágeno

[0130] Los andamios de colágeno se prepararon en un tampón TES (60 mM de TES, 20 mM de Na_2PO_4 , 0,56 M de NaCl) con un pH de 7.6. La composición de los andamios para las pruebas mecánicas y los estudios sobre modelos inflamatorios 'in vitro' se describen en sus respectivas secciones. Todas las soluciones se conservaron en hielo hasta que comenzó la fibrillogénesis a 37° C. Los andamios de colágeno alineados se crearon depositando la solución de colágeno en el isocentro de un imán de 9,4 Teslas (Chemagnetics CMX400) a 37° C durante una hora, mientras que los geles no alineados se prepararon de forma similar, pero sin someterlos a una exposición magnética. La lámina que contenía la solución de colágeno se colocó en paralelo con el campo magnético, de manera que las fibras de colágeno se orientaron en una dirección perpendicular a la parte inferior (o fondo) de la lámina. Los geles se conservaron a 37° C durante 24 horas en una cámara de control de humedad para evitar la evaporación.

EJEMPLO 13Pruebas Mecánicas y Reológicas

[0131] Las pruebas de cizalla y compresión se realizaron en un reómetro AR G2 con la tensión controlada (TA Instruments) usando una cabeza geométrica de una placa paralela de acero inoxidable de 20 mm de diámetro. Los andamios de colágeno se prepararon en láminas impresas hidrofóbicas de 20 mm de diámetro (Tekdon). Para las pruebas de cizalla, se bajó la cabeza geométrica hasta lograr el contacto a una altura de 950 μm . La frecuencia preliminar y los barridos de tensión se realizaron para determinar el rango -lineal e independiente de la tensión- del módulo de almacenamiento. Después, se llevaron a cabo barridos de frecuencia en todos los geles con una tensión oscilante de 0,2 Pa y en un rango de frecuencia de 0,1 a 2 Hz. Para las pruebas de compresión, la cabeza geométrica se bajó hasta lograr el contacto con el andamio a una altura de 1000 μm . Se aplicaron fuerzas de compresión con una tensión nominal de 0-30% (a intervalos del 5%) al andamio de colágeno de manera gradual, lo que requirió una duración de rampa de 5 segundos (esto es, una tasa de deformación del 1,0%/seg) y un tiempo de retención de 30 seg. Los valores de la rigidez de compresión se obtuvieron usando la pendiente de los valores de la tensión de equilibrio, computados en cada zona o sección de retención, frente a los respectivos valores de deformación, basados en un modelo de ajuste lineal. La composición de los andamios de colágeno en las pruebas mecánicas fue la siguiente: 1) Colágeno no alineado, 2) Colágeno alineado, 3) Colágeno no alineado+mAGC y 4) Colágeno alineado+mAGC.

[0132] *Análisis Mecánico del Volumen:* La réplica de agrecano, mAGC, aumentó las propiedades mecánicas de volumen de los andamios, independientemente del alineamiento de las fibras (Figura 22). Para las pruebas de cizalla, los valores de los módulos de almacenamiento a 0,5 Hz de los geles de colágeno no alineados y alineados fueron de $104,1 \pm 3,6$ Pa y $49,9 \pm 5,4$ Pa, respectivamente. La adición de mAGC al andamio de colágeno mostró un aumento significativo de los módulos de almacenamiento de los geles no alineados y alineados, de $113,9 \pm 4,6$ Pa y $76,6 \pm 3,6$ Pa, respectivamente ($p < 0,001$). Los geles no alineados mostraron un módulo de almacenamiento más alto en comparación con los geles alineados ($p < 0,0001$). Para las pruebas de compresión, la rigidez de compresión de los andamios alineados (2478 ± 250 Pa) fue menor que la de los andamios no alineados (3564 ± 315 Pa) ($p < 0,001$). La adición de mAGC a estos sistemas de andamios aumentó la rigidez de compresión de los andamios alineados y no alineados a 4626 ± 385 Pa y 5747 ± 306 Pa, respectivamente ($p < 0,0001$).

EJEMPLO 14Modelo de Inflamación 'In Vitro'

[0133] Los andamios de colágeno sembrados con condrocitos se estimularon con IL- β y se analizaron con productos degradantes.

[0134] *Aislamiento de los Condrocitos:* los condrocitos primarios se recogieron de las articulaciones de las rodillas de un animal bovino de tres meses, obtenidas de un matadero en las 24 horas siguientes a la matanza (Dutch Valley Veal). Las láminas de cartílago, con un grosor de 150-200 μm , se extrajeron del cóndilo femoral lateral y se lavaron tres veces en un medio de DMEM/F-12 libre de suero (50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico 2-fosfato, 100 $\mu\text{g/mL}$ de piruvato de sodio, 0,1% de albúmina de suero bovino, 100 unidades/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina y 25 mM de HEPES) antes de digerirlas con un 3% de suero fetal bovino (FBS) y un 0,2% de colagenasa-P (Roche Pharmaceuticals) a 37° C durante seis horas. Los condrocitos liberados se filtraron a través de un colador de células de 70 μm y se centrifugaron a 1000 rpm tres veces durante cinco minutos (cada vez) en un medio que se ha detallado previamente y que estaba enriquecido con un 10% de FBS. El cúmulo de células se volvió a suspender en un medio -enriquecido- con 10% de FBS y se depositó en platillos de 10 cm, en una medida de 10 000 células/mL, a 37° C en una incubadora humidificada (5% de CO_2) hasta que fuera confluyente.

[0135] *Fabricación de los andamios:* cuando se consiguió dicha confluencia, las células se tripsinizaron y se encapsularon a 10 000 células/mL en los andamios de colágeno (Tabla 3) y se dejó que se equilibraran durante 3

días antes del tratamiento.

TABLA 3: composición de los andamios para las pruebas 'in vitro'

Configuración del Experimento con Colágeno No Alineado	Configuración del Experimento con Colágeno Alineado
A: Colágeno+CS+AH+IL-1 β B: Colágeno+CS+ AH C: Colágeno+mAGC+AH+IL-1 β D: Colágeno+mAGC+ AH	E: Colágeno+CS+AH+IL-1 β F: Colágeno+CS+ AH G: Colágeno+mAGC+AH+IL-1 β H: Colágeno+mAGC+ AH

[0136] Modelo de Inflamación: los constructos se incubaron con o sin 20 ng/mL de IL-1 β en medios químicamente definidos y enriquecidos con un 5% de FBS y antibióticos (100 unidades/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomycin). El medio de cultivo se sustituyó cada dos días. Los extractos de medios eliminados se guardaron a -80° C para pruebas posteriores.

[0137] Ensayo de Degradación: la degradación de GAG se monitorizó midiendo el CS liberado en el medio de cultivo celular utilizando un ensayo de tinción de dimetilmetiltileno azul (DMMB) y se calculó con una curva estándar de condroitina-6-sulfato. De manera similar, la degradación de colágeno de tipo I en un medio de cultivo celular se monitorizó usando un ensayo de colágeno Sircol y siguiendo los protocolos (Bio-Color) establecidos por el fabricante. Se estableció que la degradación del GAG y el colágeno era de liberación acumulada durante un periodo de cultivo de ocho días.

[0138] Análisis de Degradación Proteolítica: la cantidad de CS y colágeno liberada en el medio de cultivo celular disminuyó de manera significativa cuando se añadieron andamios que contenían mAGC (Figuras 11, 12, 23 y 24) ($p_{CS}<0,001$ y $p_{colágeno}<0,02$, respectivamente). Los geles de colágeno alineados mostraron una liberación de CS y colágeno en el medio más alta estadísticamente en comparación con las fibras de colágeno no alineadas ($p<0,001$).

[0139] Tal y como se describe en el presente texto, el peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico puede proteger el AH -y las fibras de colágeno subyacentes del andamio- de la escisión proteolítica (o proteólisis). Para la síntesis del peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico se usaron los beneficios condroprotectivos del CS. Se ha demostrado que el CS regula hacia abajo la producción de metaloproteasas de la matriz. Nuestro peptidoglicano sintético, descrito en el presente texto, permitió que las cadenas de CS se unieran con el AH, evitando la degradación de ambas moléculas. Al colocar el peptidoglicano sintético en un entorno rico en enzimas proteolíticas, su capacidad para evitar una pérdida excesiva de los componentes de la ECM quedó demostrada.

EJEMPLO 15

PCR en Tiempo Real

[0140] Tras el estudio sobre el cultivo de células, los constructos se guardaron en una solución RNeasy (Ambion) a 4° C durante menos de una semana. El ARNm total se extrajo utilizando Nucleospin RNA II (Clontech) de acuerdo con los protocolos del fabricante. El ARNm extraído de todas las muestras se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se transcribió inversamente a ADNc usando un Kit de Transcriptasa Inversa de ADNc de Alta Capacidad (Applied Biosystems) con los siguientes cebadores: GAPDH (Bt03210913_g1), agrecano (Bt03212186_ml) y colágeno de tipo II (Bt03251861_ml). Se prepararon 60 ng de plantilla de ADNc por cada 20 μ L de reacción para los dos genes de interés y el gen endógeno. El análisis de PCR en tiempo real se realizó usando un Taqman PCR Master Mix y un Sistema de PCR en Tiempo Real 7500 (Applied Biosystems). Los datos recogidos se normalizaron para una expresión genética de GAPDH.

[0141] Análisis de Expresión de ARNm: el alineamiento de colágeno, la presencia de la réplica de agrecano y la estimulación con IL-1 β tuvieron un efecto significativo sobre el agrecano ($p_{alineamiento}<0,001$, $p_{peptidoglicano}<0,02$ y $p_{IL-1\beta}<0,001$) y la expresión de colágeno de tipo II ($p_{alineamiento}<0,01$, $p_{peptidoglicano}<0,001$ y $p_{IL-1\beta}<0,015$). La presencia de mAGC limitó la pérdida excesiva de CS del andamio, lo que da como resultado una expresión de agrecano más baja ($p<0,02$) (Figura 25). La presencia de mAGC también limitó la degradación de colágeno. Sin embargo, la expresión del colágeno de tipo II dependió de la cantidad de colágeno que se perdió durante la degradación (Figura 25). En los andamios no alineados, el nivel de expresión del colágeno de tipo II fue más alto en el caso de los andamios preparados sin mAGC, mientras que en los andamios de colágeno alineados, el nivel de colágeno de tipo II fue más alto en el caso de los andamios preparados con mAGC ($p<0,05$).

EJEMPLO 16

Análisis Estadístico

5 **[0142]** Cada experimento se repitió dos veces, con al menos $n=3$ en cada conjunto de datos. Se analizó la
 importancia o significación estadística de los datos de análisis mecánicos con un ANOVA de dos direcciones con el
 alineamiento y la adición de peptidoglicano como factores. Los datos del cultivo celular se analizaron usando un
 10 ANOVA de tres direcciones con el alineamiento y la adición del peptidoglicano y el tratamiento con IL-1 β como
 factores. También se usó una comparación por pares post hoc de Tukey ($\alpha= 0,05$) para comparar directamente los
 andamios preparados con y sin la réplica de agregado en cada sistema.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un 'peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico' que comprende un péptido sintético conjugado con un glicano, de manera que el péptido sintético comprende una 'secuencia que se une al ácido hialurónico' (o 'secuencia de unión con el ácido hialurónico').
- 10 **2.** El peptidoglicano sintético de la reivindicación 1, de manera que el péptido sintético está conjugado covalentemente con el glicano.
- 15 **3.** El peptidoglicano sintético de la reivindicación 1 ó 2, de manera que el glicano se selecciona de un grupo que se compone de dextrano, condroitina, sulfato de condroitina, dermatán, dermatán sulfato, heparán, heparina, queratina y queratán sulfato.
- 20 **4.** El peptidoglicano sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y que tiene la fórmula P_nG_x , donde G es un glicano y P es un péptido sintético de entre alrededor de 5 y alrededor de 40 aminoácidos que comprende una secuencia que se une al ácido hialurónico.
- 25 **5.** El peptidoglicano sintético de la reivindicación 4, de manera que x es de 1 a 20 y, opcionalmente, n es de 1 a 20.
- 30 **6.** El peptidoglicano sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, de manera que el péptido sintético comprende una secuencia de aminoácidos con la fórmula B1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-B2, en la que X8 está presente o no está presente, en la que B1 es un aminoácido básico, en la que B2 es un aminoácido básico, y en la que X1-X8 son aminoácidos no ácidos.
- 35 **7.** El peptidoglicano sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, de manera que el componente peptídico del peptidoglicano sintético comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que se compone de:
- 40 GAHWQFNALTVRGG (SEQ ID NO: 2) [Identidad de secuencia nº 2];
 GDRRRRRMWHRRQ (SEQ ID NO: 3);
 GKHLGGKHRRSR (SEQ ID NO: 4);
 35 RGTHHAQKRRS (SEQ ID NO: 5);
 RRHKSGHIQGSK (SEQ ID NO: 6);
 SRMHGRVGRHE (SEQ ID NO: 7);
 RRRAGLTAGRPR (SEQ ID NO: 8);
 RYGGHRTSRKWV (SEQ ID NO: 9);
 40 RSARYGHRRGVG (SEQ ID NO: 10);
 GLRGNRRVFARP (SEQ ID NO: 11);
 SRGQRGRLGKTR (SEQ ID NO: 12);
 DRRGRSSLPKLAGPVEFPDRKIKGR (SEQ ID NO: 13);
 RMRRKGRVKHWG (SEQ ID NO: 14);
 45 RGGARGRHKTGR (SEQ ID NO: 15);
 TGARQRGLQGGWGPRHLRGKDQPPGR (SEQ ID NO: 16);
 RQRRRDLTRVEG (SEQ ID NO: 17);
 STKDHNRGRNVGPVSRSTLRDPIRR (SEQ ID NO: 18);
 RRIGHQVGGRRN (SEQ ID NO: 19);
 50 RLESRAAGQRRRA (SEQ ID NO: 20);
 GGPRRHLGRRGH (SEQ ID NO: 21);
 VSKRGHRRTAHE (SEQ ID NO: 22);
 RGTRSGSTR (SEQ ID NO: 23);
 RRRKKIQGRSKR (SEQ ID NO: 24);
 55 RKSYGKYQGR (SEQ ID NO: 25);
 KNGRYSISR (SEQ ID NO: 26);
 RRRCGQKKK (SEQ ID NO: 27);
 KQKIKHWKLK (SEQ ID NO: 28);
 KLKSQLVKRK (SEQ ID NO: 29);
 60 RYPISRPRKR (SEQ ID NO: 30);
 KVGKSPVPR (SEQ ID NO: 31);
 KTFGKMKPR (SEQ ID NO: 32);
 RIKWSRVSK (SEQ ID NO: 33);
 KRTMRPTRR (SEQ ID NO: 34) y
 65 una secuencia de aminoácidos que tiene un 85% de homología con cualquiera de las identidades de secuencia nºs 2 a 34 (SEQ ID NO: 2-34).

8. El peptidoglicano sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, de manera que el péptido sintético comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que se compone de:

- 5 GAHWQFNALTVRGG (SEQ ID NO: 2) [Identidad de secuencia nº 2];
 GDRRRRRMWHRQ (SEQ ID NO: 3);
 GKHLGGKHRRSR (SEQ ID NO: 4);
 RGTHHAQKRRS (SEQ ID NO: 5);
 RRHKSGHIQGSK (SEQ ID NO: 6);
 10 SRMHGRVGRHE (SEQ ID NO: 7);
 RRRAGLTAGRPR (SEQ ID NO: 8);
 RYGGHRTSRKWV (SEQ ID NO: 9);
 RSARYGHRRGVG (SEQ ID NO: 10);
 GLRGNRRVFARP (SEQ ID NO: 11);
 15 SRGQRGRLGKTR (SEQ ID NO: 12);
 DRRGRSSLPLAGPVEFPDRKIKGRR (SEQ ID NO: 13);
 RMRRKGRVKHWG (SEQ ID NO: 14);
 RGGARGRHKTGR (SEQ ID NO: 15);
 TGARQRGLQGGWGPRLRGKDQPPGR (SEQ ID NO: 16);
 20 RQRRRDLTRVEG (SEQ ID NO: 17);
 STKDHNRGRRNVGPVSRSTLRDPIRR (SEQ ID NO: 18);
 RRIGHQVGGRRN (SEQ ID NO: 19);
 RLESRAAGQRRR (SEQ ID NO: 20);
 GGPRRHLGRRGH (SEQ ID NO: 21);
 25 VSKRGHRRTAHE (SEQ ID NO: 22);
 RGTRSGSTR (SEQ ID NO: 23);
 RRRKKIQGRSKR (SEQ ID NO: 24);
 RKSYGKYQGR (SEQ ID NO: 25);
 KNGRYSISR (SEQ ID NO: 26);
 30 RRRCGQKKK (SEQ ID NO: 27);
 KQKIKHVVKLK (SEQ ID NO: 28);
 KLKSQLVKRK (SEQ ID NO: 29);
 RYPISRPRKR (SEQ ID NO: 30);
 KVGKSPPVV (SEQ ID NO: 31);
 35 KTFGKMKPR (SEQ ID NO: 32);
 RIKWSRVSK (SEQ ID NO: 33);
 KRTMRPTRR (SEQ ID NO: 34) y
 una secuencia de aminoácidos modificada a partir de cualesquiera identidades de secuencia nºs 2 a 34 (SEQ ID NO: 2-34) mediante la inclusión de una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

40 9. El peptidoglicano sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, de manera que el peptidoglicano sintético es resistente a la agrecanasa.

45 10. El peptidoglicano sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, de manera que el componente peptídico del peptidoglicano sintético tiene una glicina-cisteína unida al extremo C-terminal del péptido.

11. El peptidoglicano sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, de manera que el peptidoglicano sintético es resistente a las metaloproteasas de la matriz.

50 12. Una matriz de colágeno obtenida por ingeniería que comprende colágeno polimerizado, ácido hialurónico y un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

55 13. La matriz de colágeno obtenida por ingeniería de la reivindicación 12, de manera que la matriz comprende, además, una población de células exógena.

14. Un peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso en un método para tratar la artritis de un paciente.

60 15. El peptidoglicano sintético que se une al ácido hialurónico, para que se use como en la reivindicación 14, de manera que la artritis es osteoartritis o artritis reumatoide.

65

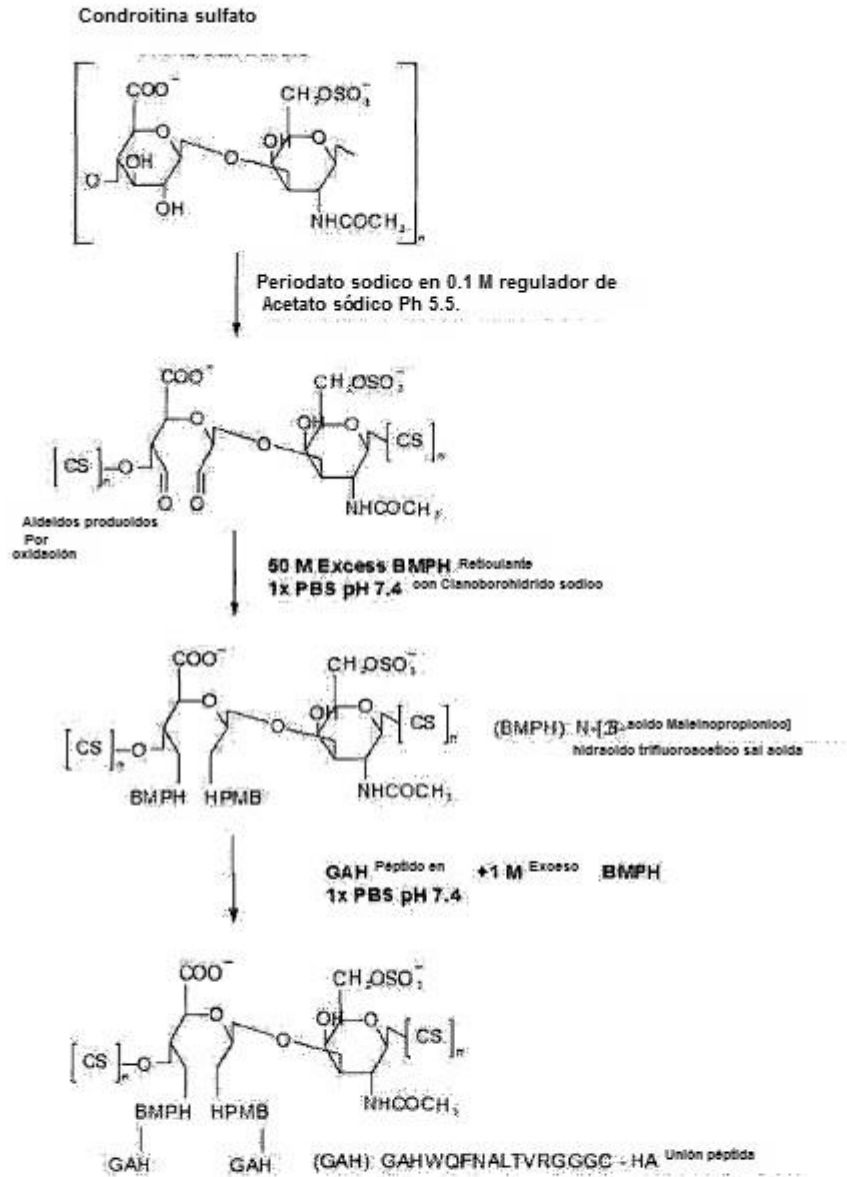


FIGURA 1

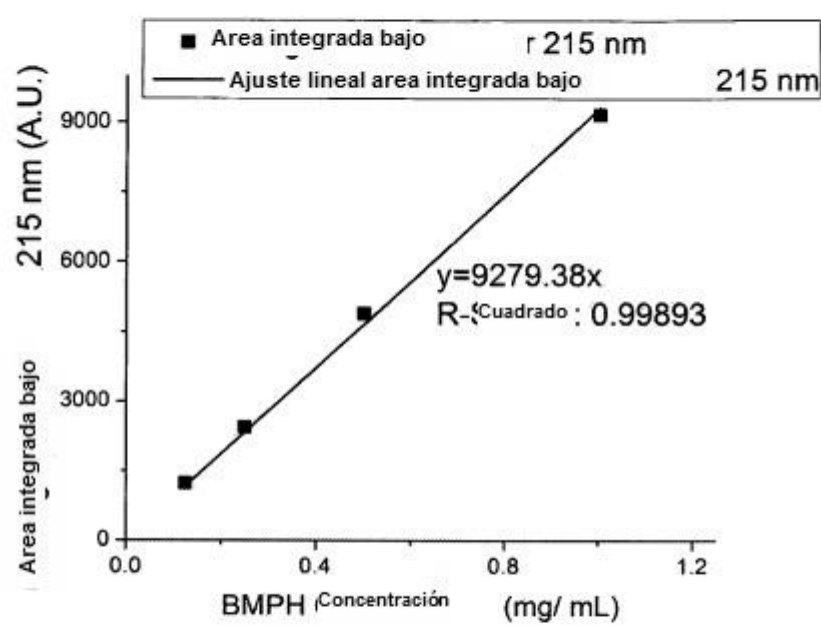


Figura 2

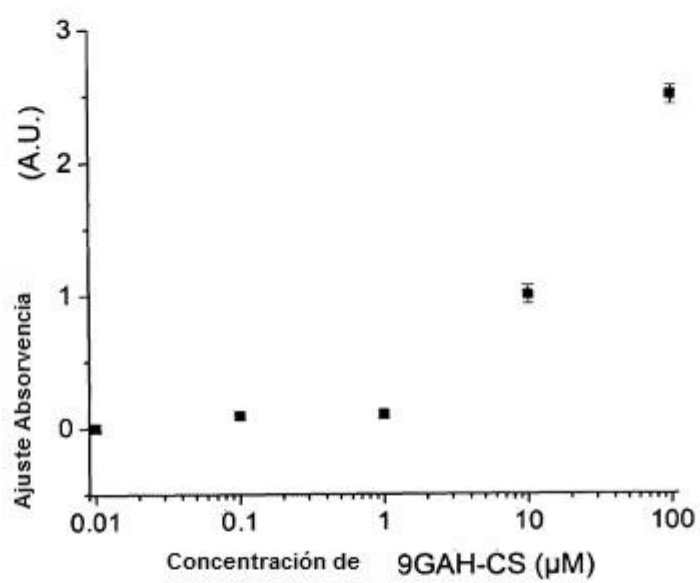
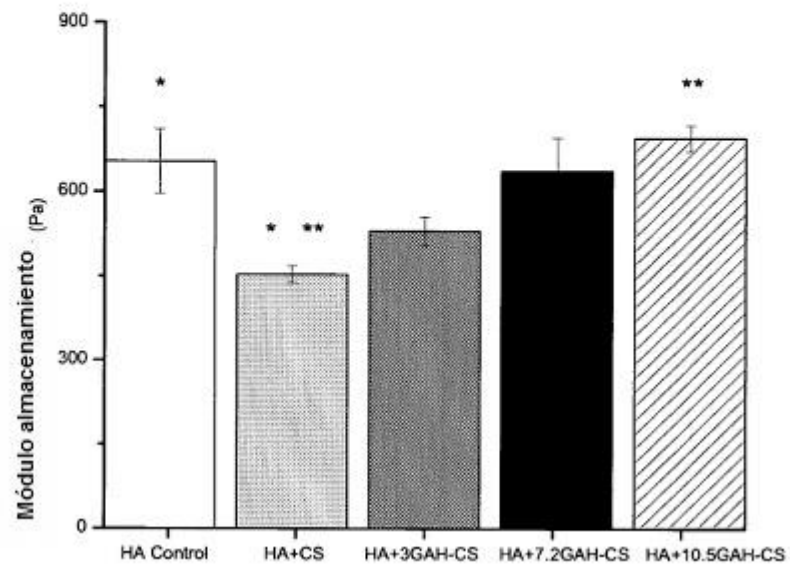


FIGURA 3

A



B

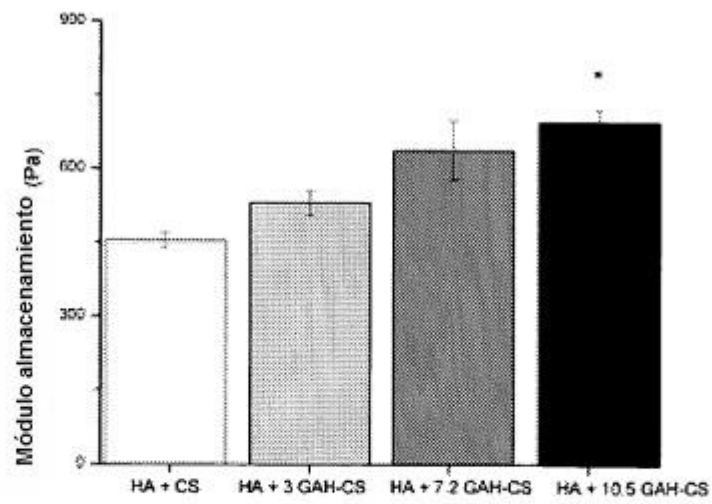


FIGURA 4

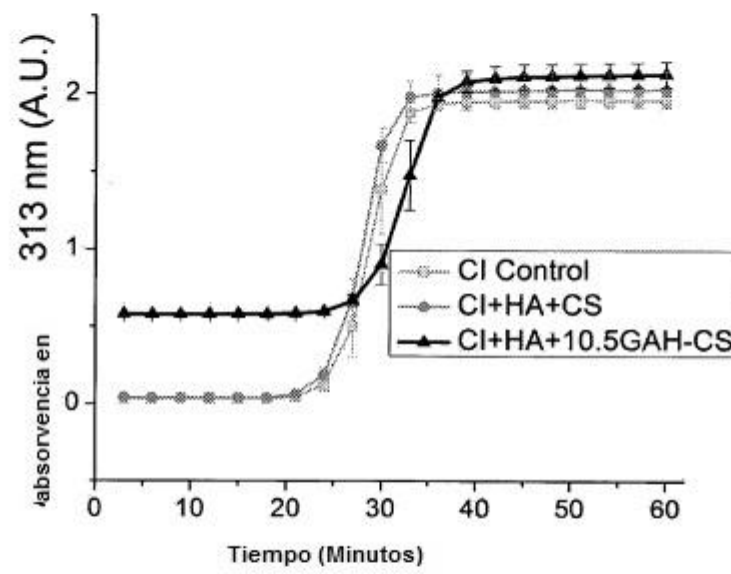


FIGURA 5

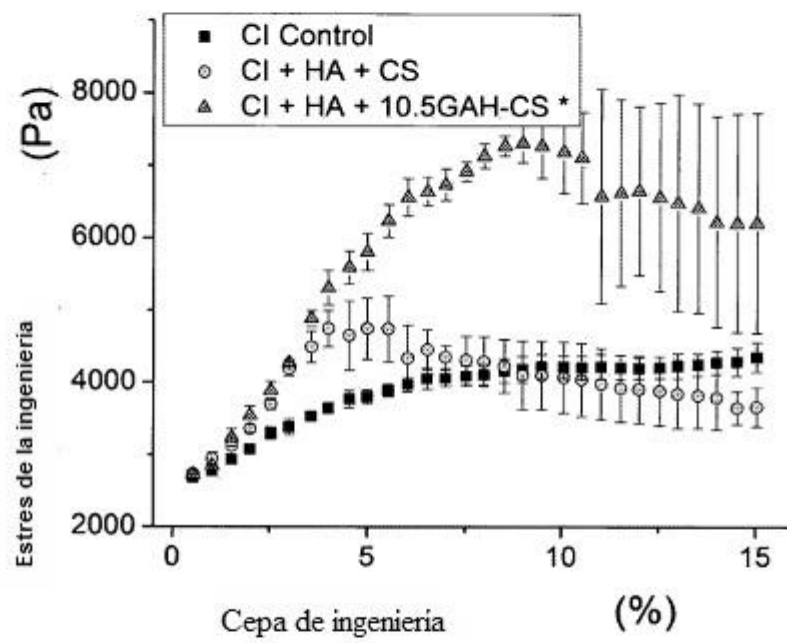


FIGURA 6

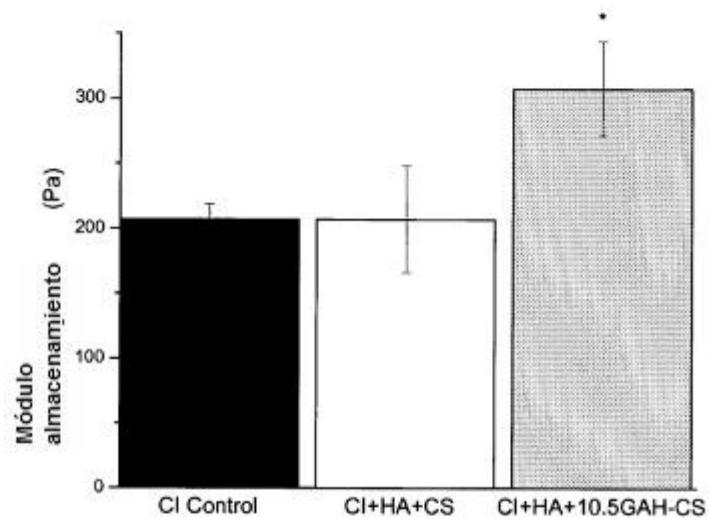
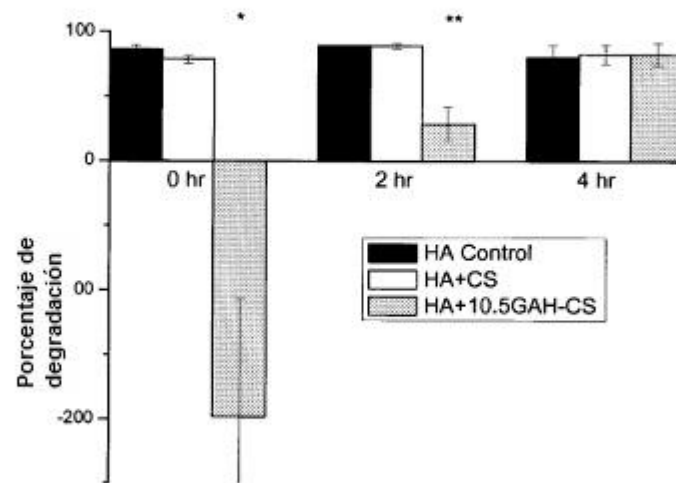


FIGURA 7

A



B

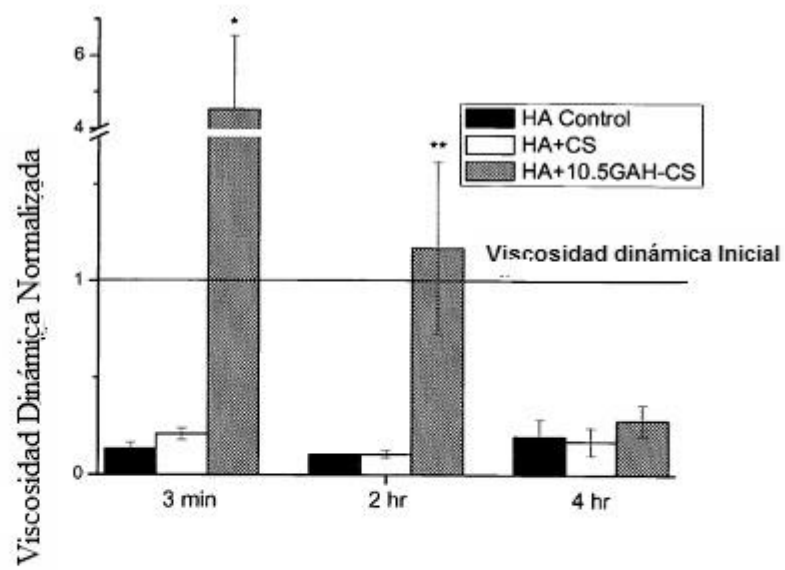


FIGURA 8

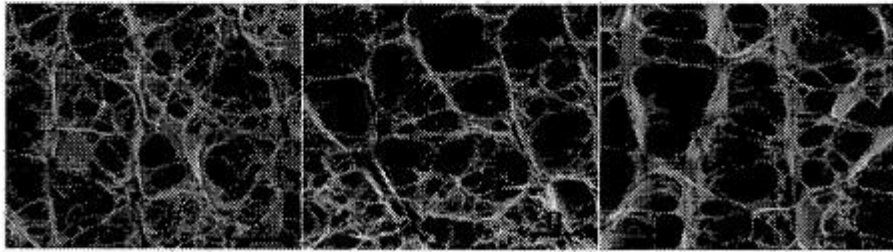


FIGURA 9

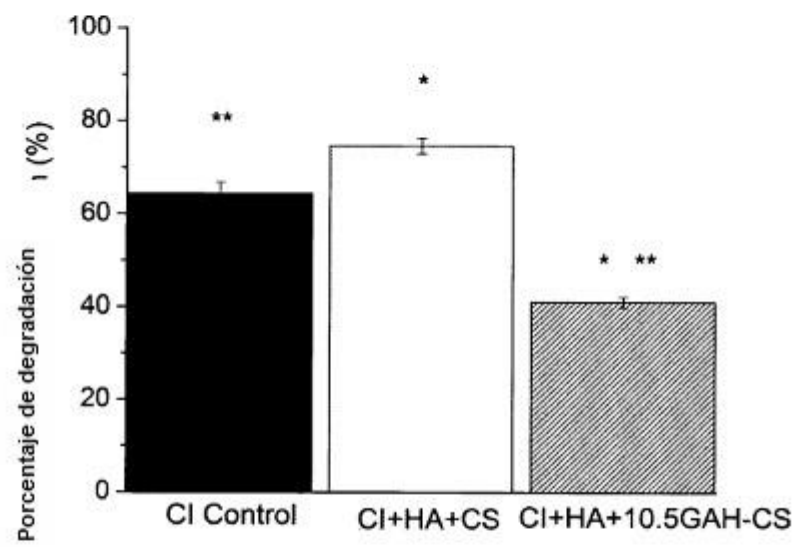


FIGURA 10

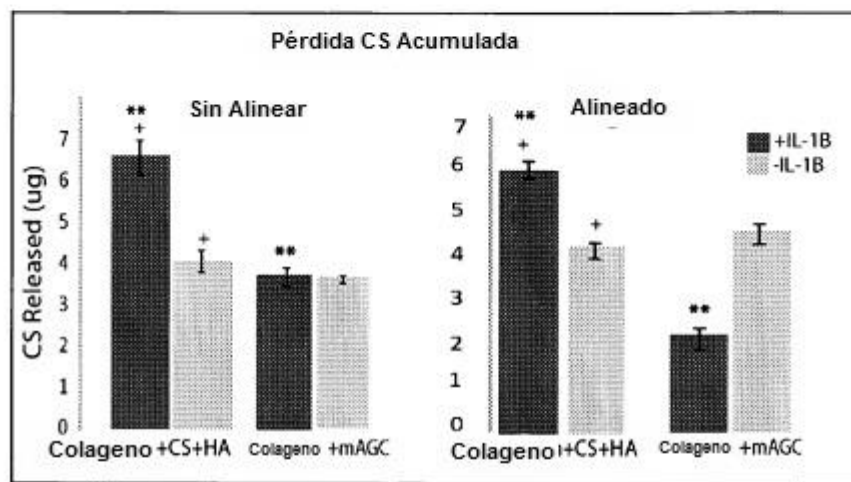


FIGURA 11

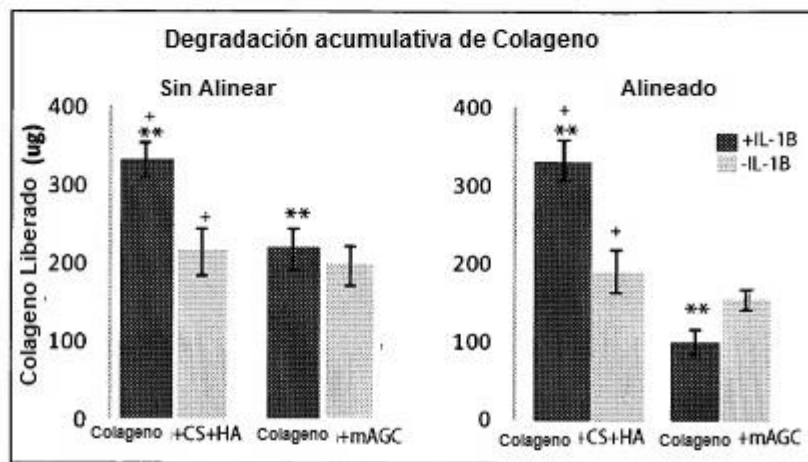


Figura 12

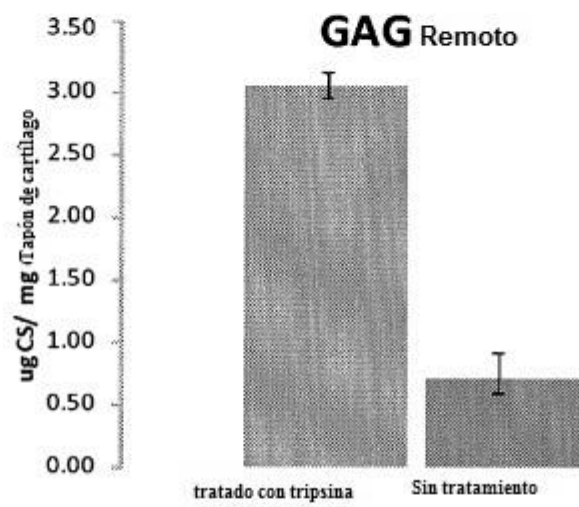


Figura 13

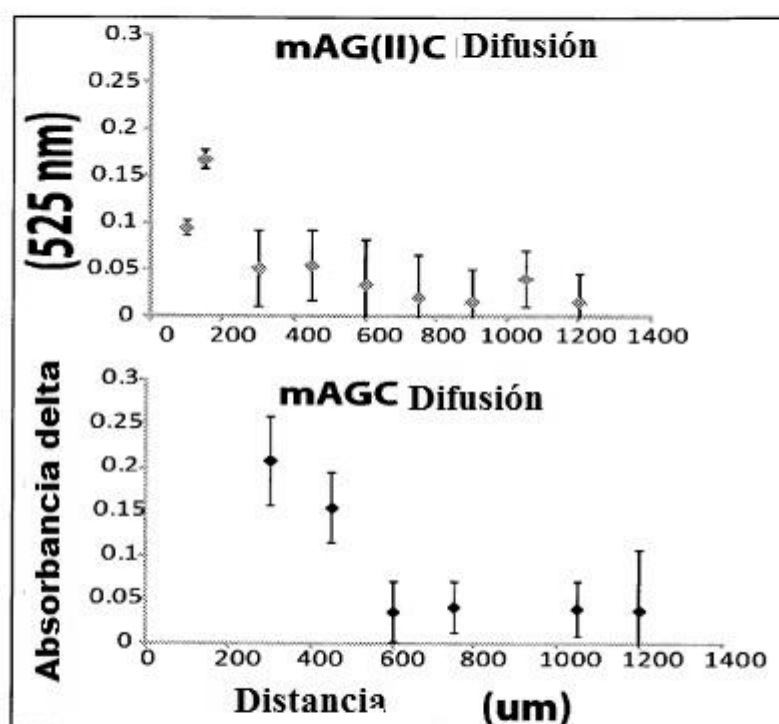


Figura 14

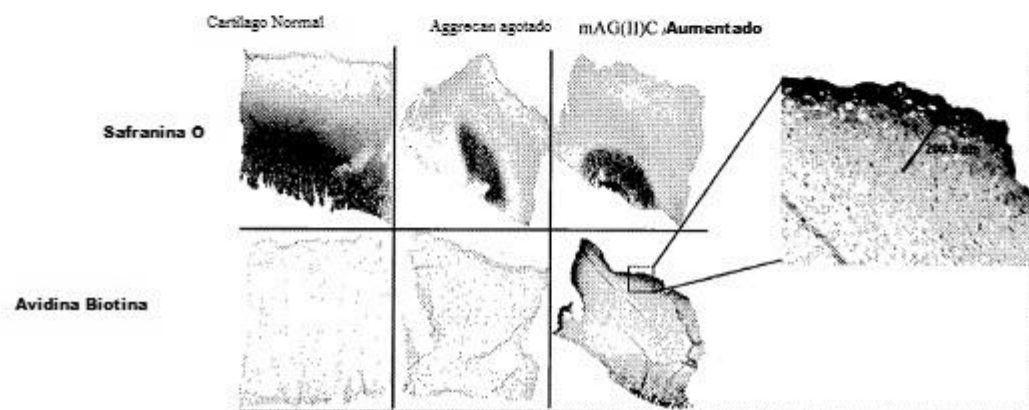


Figura 15

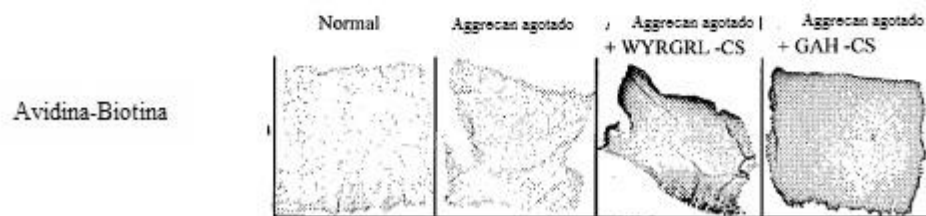


Figura 16

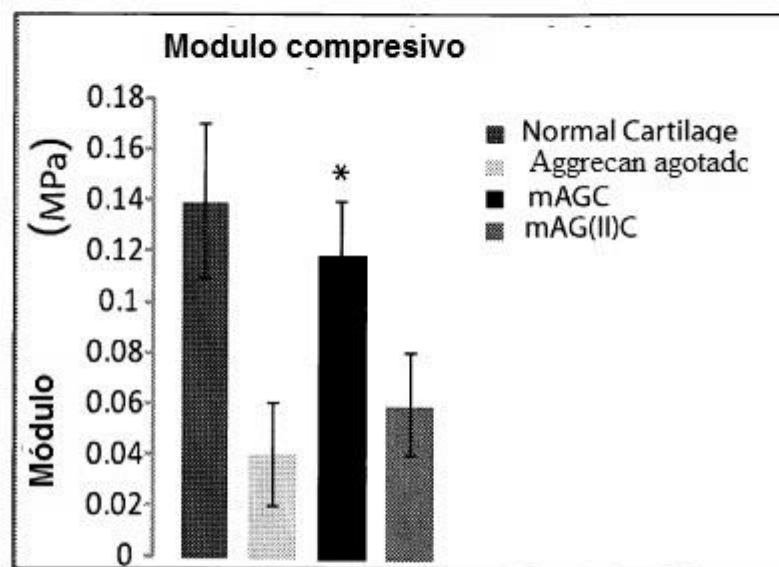


Figura 17

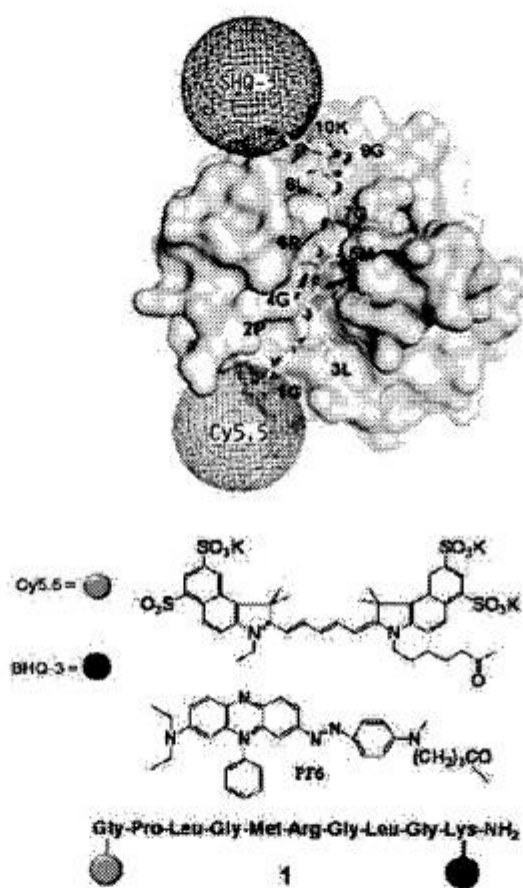


Figura 18

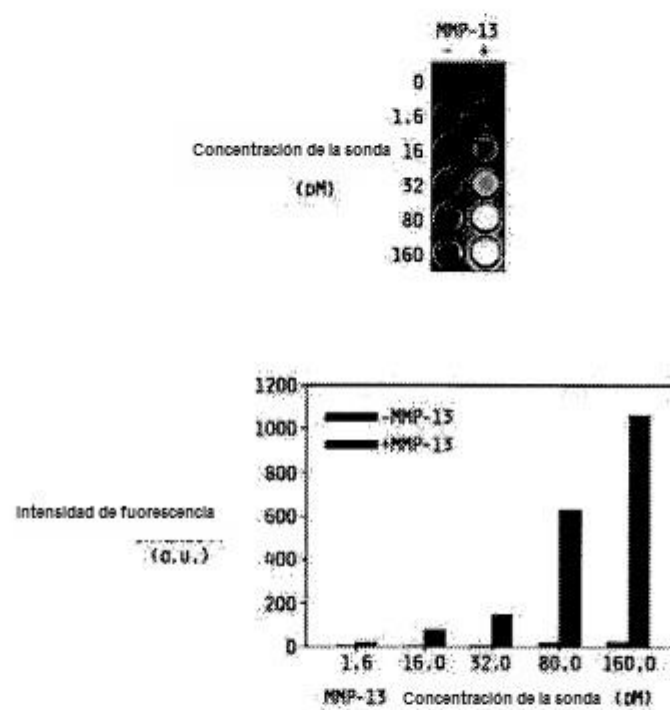


Figura 18 A

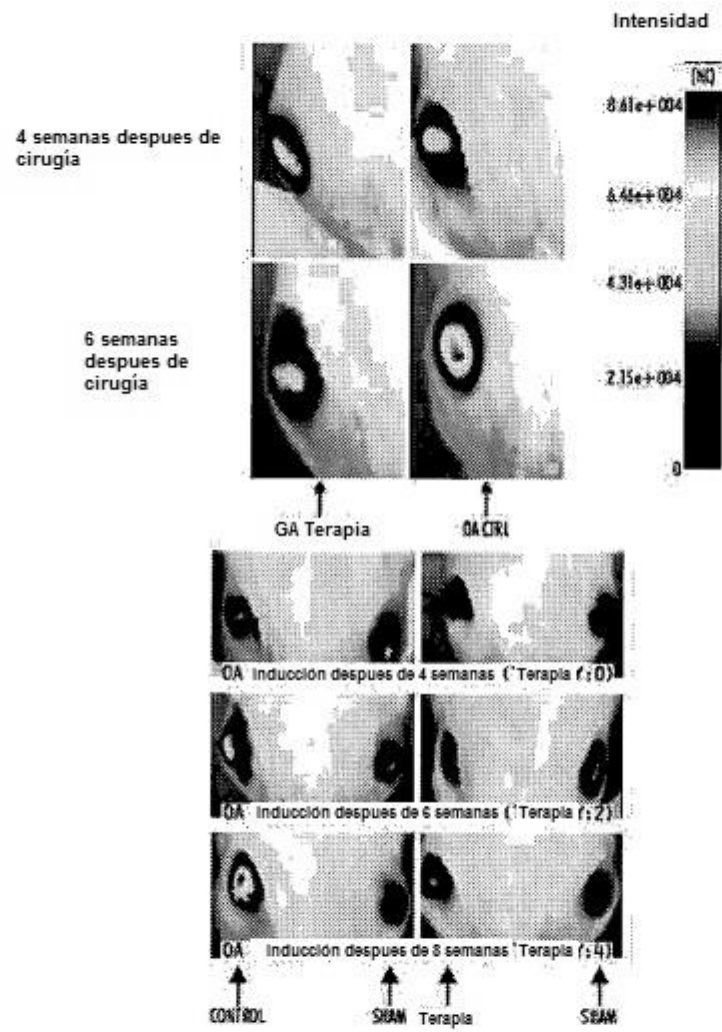


Figura 19

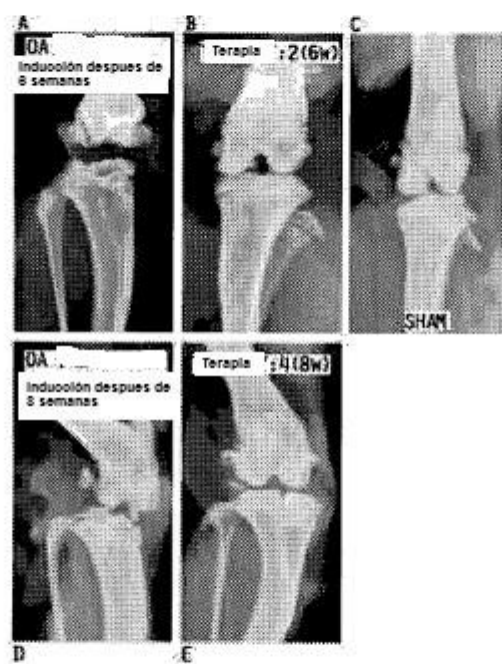


Figura 10

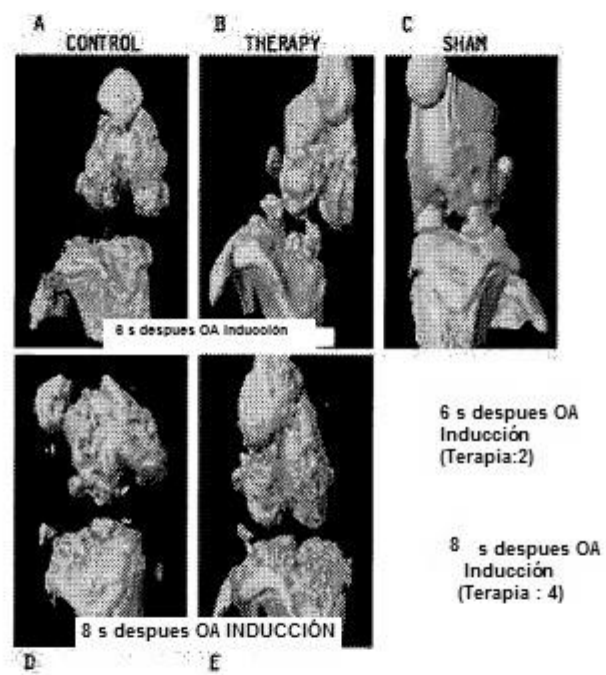


Figura 21

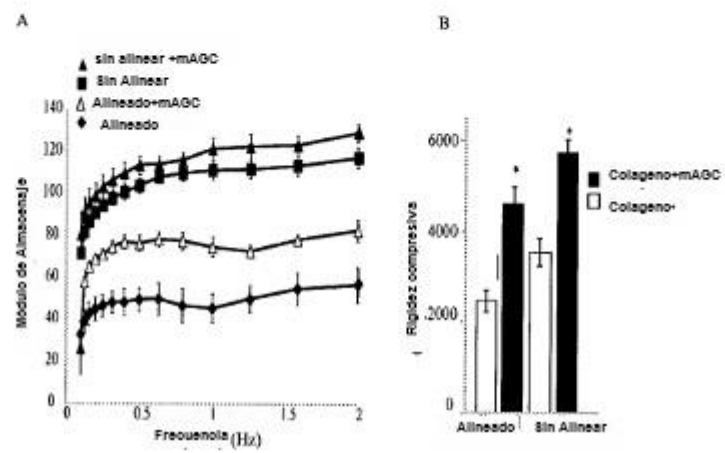


Figura 22

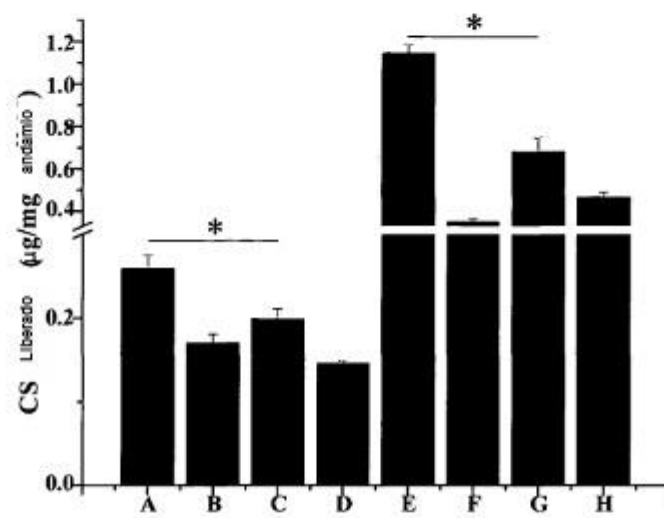


Figura 23

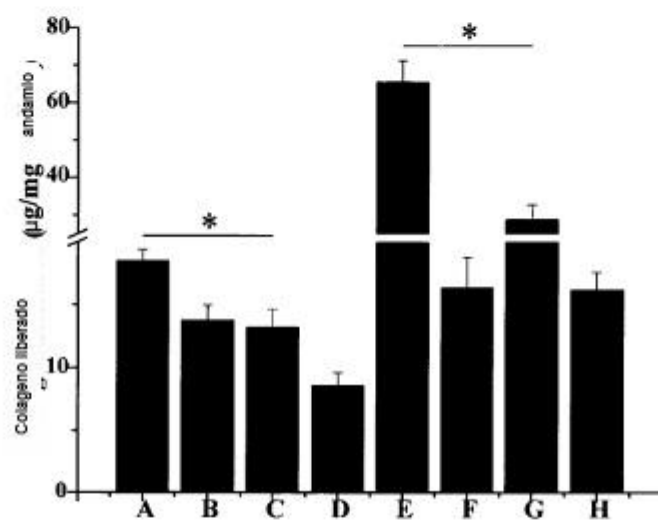


Figura 24

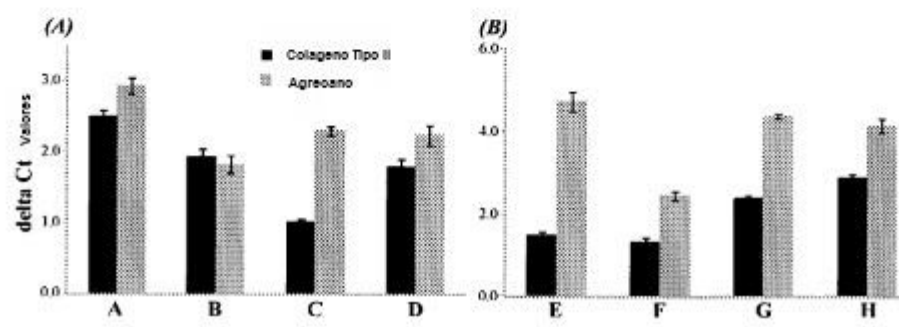


Figura 25