



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 298 052**

⑫ Número de solicitud: 200602111

⑬ Int. Cl.:

C12N 5/06 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61F 2/08 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

A61F 2/30 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **03.08.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2008**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2008

⑰ Solicitante/s: **BIOIBÉRICA, S.A.**
Pl. Francesc Macià, 7
08029 Barcelona, ES

⑱ Inventor/es: **Escaich Ferrer, Josep;**
Ruhí Roura, Ramón y
Torrent Gibert, Ana María

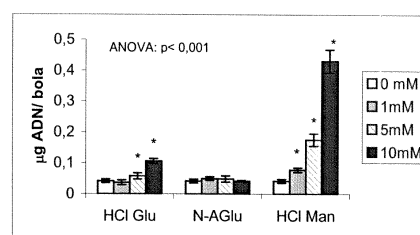
⑲ Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

⑳ Título: **Procedimiento para la proliferación de células.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la proliferación de células.

Procedimiento *in vitro* para la proliferación o cultivo de células de tejido conjuntivo seleccionadas de entre el grupo que consiste en condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras, células osteoprogenitoras, tenocitos y células de ligamento que comprende la etapa de poner en contacto dichas células con un aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, N-acetilmanosamina, sales de manosamina y sus mezclas. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden el aminoazúcar en combinación con las células. Estas composiciones son útiles para el tratamiento de defectos o lesiones de cartílago, huesos, tendones, ligamentos, pérdidas de masa ósea y defectos o lesiones osteocondrales.



HCl Glu = clorhidrato de glucosamina

N-AGlu = N-Acetilglucosamina

HCl Man = clorhidrato de manosamina

FIGURA 1

ES 2 298 052 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la proliferación de células.

5 Sector técnico de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la proliferación o cultivo de células. De igual modo, la presente invención se refiere a nuevas composiciones, así como a su uso para el tratamiento de defectos o lesiones de cartílago, pérdidas de masa ósea, lesiones de los huesos, lesiones osteocondrales, lesiones de los tendones y lesiones de los ligamentos.

Antecedentes de la invención

Los defectos o lesiones en la superficie articular se pueden clasificar como lesiones o defectos condrales y osteocondrales, dependiendo de si penetran o no en el hueso subcondral.

Las lesiones condrales, también conocidas como lesiones de cartílago, son desde hace muchos años un problema de difícil solución.

El cartílago es una forma especializada de tejido conjuntivo que se encuentra en el adulto en las articulaciones, costillas, orejas y tracto respiratorio. El cartílago articular permite que los huesos se muevan deslizándose unos sobre otros. También absorbe la tensión que produce el movimiento físico. En la artrosis, la superficie del cartílago se rompe y desgasta causando que los huesos se muevan unos contra otros, produciendo fricción, dolor, hinchazón y pérdida de movimiento en la articulación. Con el paso del tiempo la articulación puede deformarse.

Numerosos estudios han confirmado que el cartílago, huesos y partes blandas tales como ligamentos y tendones, especialmente en personas adultas, presentan una habilidad limitada de regeneración. En condiciones normales, la renovación del cartílago es un proceso muy lento que consiste en una constante síntesis (anabolismo) y degradación (catabolismo) de los componentes de la matriz extracelular. Los condrocitos son las células responsables de este metabolismo, y por lo tanto, de la formación, mantenimiento y reparación de la matriz extracelular en la que se encuentran inmersos.

En 1987 se llevó a cabo en Suecia el primer implante de condrocitos autólogos en humanos (técnica ACI), como una alternativa terapéutica a otros tratamientos para reparar defectos de cartílago. La articulación más frecuentemente tratada mediante esta técnica es la rodilla.

El implante de condrocitos autólogos es una técnica que se realiza en dos tiempos. En una primera intervención quirúrgica se extraen láminas de cartílago articular. Esta muestra se cultiva hasta alcanzar un número suficiente de condrocitos para el implante. En una segunda intervención quirúrgica se extraen los trozos sueltos de tejido y se cubre con un parche de periostio al que se deja una pequeña apertura para inyectar los condrocitos cultivados. Una vez implantados los condrocitos, se cierra y se sella el periostio. Recientemente se ha descrito la utilización de una membrana de colágeno tipo I/III en lugar del periostio (C.R. Gooding *et al.*, *The Knee*, 13 (3), 203-210 (2006)).

Desde el primer implante de condrocitos autólogos en humanos, el interés por el tratamiento o reparación de defectos o lesiones de cartílago utilizando células ha ido en aumento.

En 1994 se publicó un estudio clínico en el que se había utilizado la técnica ACI. Dicho estudio se llevó a cabo con 23 pacientes con defectos de cartílago en la rodilla (M. Brittberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 331, 889-895 (1994)).

En numerosas publicaciones se describen nuevos procedimientos de proliferación de condrocitos mediante la utilización de diversas matrices o estructuras (scaffolds) o bien de medios de cultivo alternativos a los convencionales (WO 2005/082433; WO 2005/054446; K.F. Almqvist *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 60, 781-790 (2001)).

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado que, como los restantes tejidos conjuntivos, está formado por células, fibras y sustancia fundamental, pero, a diferencia de los otros, sus componentes extracelulares están calcificados y le convierten en un material duro, firme y adecuado para su función de soporte y protección. Proporciona apoyo interno al cuerpo y ofrece lugares de inserción a los músculos y tendones que son esenciales para el movimiento.

En los huesos que crecen activamente se distinguen cuatro tipos de células óseas: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las células osteoprogenitoras son células que se originan a partir de células mesenquimales y pueden proliferar y diferenciarse únicamente hacia osteoblastos u osteoclastos. Los osteoblastos están involucrados en la formación de hueso.

Los defectos óseos representan un gran reto médico y socio-económico. Actualmente se están desarrollando y aplicando diferentes tipos de biomateriales para la reconstrucción de los tejidos óseos dañados. (U. Kneser, *et al.*, *Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view*, *J. Cell. Mol. Med.* 10 (1), 7-19 (2006)).

Los tendones son estructuras anatómicas que unen músculos a huesos y los ligamentos son estructuras similares que unen huesos a otros huesos. Son estructuras cilíndricas, elongadas, formadas de tejido conjuntivo denso y adaptadas a la tensión en una dirección, con fibras de colágeno paralelas.

5 Las células predominantes en los tendones se llaman tenocitos. Los tenocitos tienen la función de mantener la estructura de la matriz a través de procesos de degradación y síntesis que comprenden la remodelación y también podrían contribuir hasta cierto punto a la curación. Sin embargo, el tendón tiene una densidad relativamente baja de células con baja actividad mitótica lo cual explica la baja tasa de recambio de este tejido y cuestiona el grado en que estas células pueden promover la curación intrínseca. Esto hace que el tratamiento con células exógenas pueda ser una
10 estrategia importante en la ingeniería de tejidos de tendón.

En 1994 se hicieron investigaciones preliminares con fibras de un polímero sintético y tenocitos para desarrollar implantes para ingeniería de tendones (Y. Cao *et al.* "Generation of neo-tendon using synthetic polymers seeded with tenocytes". *Transplant. Proc.* 26, 3390-3391 (1994)). Desde entonces se han publicado diversos trabajos sobre
15 implantes de tenocitos (WO 01/26667; US 2005060033).

Las lesiones de tendón son las lesiones ortopédicas más comunes. Por ejemplo, al menos 100.000 lesiones de Tendón de Aquiles son diagnosticadas y tratadas anualmente en USA (A. Praemer *et al.*, "Musculoskeletal condition in the United States", 1st ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, IL, 1992). Se estimó también
20 que había de 75.000 a 125.000 lesiones de Ligamento Anterior Cruzado (ACL) cada año en USA (D.L. Butler *et al.*, "Anterior Cruciate Ligament: Its normal response and replacement", *Journal of Orthopaedic Research* 7(6), 910-912 (1989) y unas 300.000 eran reportadas en todo el mundo. Todas estas condiciones pueden producir una incapacidad importante en los pacientes.

25 Los ligamentos, al igual que los tendones y los tejidos cartilaginoso y óseo, tienen capacidad limitada de auto-reparación. Por este motivo, la ingeniería de tejidos con terapia basada en células representa un campo de gran interés como terapia de nueva generación para este tipo de tejidos. Recientemente se han publicado trabajos referentes a implantes para ligamentos (K. Tsuchiya *et al.*, "Effects of cell adhesion molecules on adhesion of chondrocytes, ligament cells and mesenchymal stem cells", *Materials Science and Engineering C* 17, 79-82 (2001); J. A. Cooper, Jr,
30 "Evaluation of the anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, Achilles tendon and patellar tendon as cell sources for tissue-engineered ligament", *Biomaterials* 27, 2747-2754 (2006)).

Los tejidos conjuntivos del cartílago, hueso, tendón y ligamento, citados anteriormente, son componentes fundamentales del sistema muscoesquelético.

35 La D-manosamina (2-amino-2-desoxi-D-manosa) es un aminoazúcar que se utiliza en la síntesis del ácido siálico y derivados.

Existen documentos en los que se menciona o describe la proliferación de condrocitos mediante la utilización de
40 otros aminoazúcares.

En la solicitud de patente PCT WO2004/104183 se reivindica el cultivo de condrocitos en presencia del aminoazúcar glucosamina.

45 En la patente US 6479469 se describe el incremento en la proliferación de condrocitos cuando se utiliza un *N*-acilderivado de glucosamina.

Por todo lo dicho, el problema a solucionar por la presente invención es proporcionar un procedimiento alternativo para la proliferación o cultivo de células de tejido conjuntivo seleccionadas de entre el grupo que consiste en condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras, células osteoprogenitoras, tenocitos y células de ligamento, así
50 como proporcionar composiciones alternativas para ser utilizadas en el tratamiento de defectos o lesiones de cartílago, pérdidas de masa ósea, lesiones de los huesos, lesiones osteocondrales, lesiones de los tendones y lesiones de los ligamentos.

55 Explicación de la invención

La presente invención describe un procedimiento *in vitro* para la proliferación o cultivo de células de tejido conjuntivo seleccionadas de entre el grupo que consiste en condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras, células osteoprogenitoras, tenocitos y células de ligamento que comprende la etapa de poner en contacto dichas células con un
60 aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina y sus mezclas.

En una realización preferida las células de tejido conjuntivo se encuentran en una matriz soporte biocompatible, la cual preferentemente comprende un material polimérico y es adecuada para el implante en el cuerpo humano o
65 animal.

En una realización más preferida el aminoazúcar es clorhidrato de manosamina.

En una realización igualmente preferida las células de tejido conjuntivo son condrocitos. Igualmente preferidos son los osteoblastos. Igualmente preferidas son las células condroprogenitoras. Igualmente preferidas son las células osteoprogenitoras. Igualmente preferidos son los tenocitos e igualmente preferidas son las células de ligamento.

La presente invención también describe composiciones que comprenden un aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina y sus mezclas en combinación con células de tejido conjuntivo seleccionadas de entre el grupo que consiste en condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras, células osteoprogenitoras, tenocitos y células de ligamento. En una realización preferida las composiciones contienen además una matriz soporte biocompatible, preferentemente de material polimérico, siendo el aminoazúcar más preferido el clorhidrato de manosamina.

En una realización igualmente preferida las composiciones contienen condrocitos. Igualmente preferidas son las composiciones que contienen osteoblastos. Igualmente preferidas son las composiciones que contienen células condroprogenitoras. Igualmente preferidas son las composiciones que contienen células osteoprogenitoras. Igualmente preferidas son las composiciones que contienen tenocitos e igualmente preferidas son las composiciones que contienen células de ligamento.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de las composiciones de la invención en las que las células son condrocitos o células condroprogenitoras para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento o profilaxis de defectos o lesiones de cartílago. En una realización preferida los defectos o lesiones de cartílago se presentan en la enfermedad artrósica.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de las composiciones de la invención en las que las células son condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras o células osteoprogenitoras para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento o profilaxis de pérdidas de masa ósea.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de las composiciones de la invención en las que las células son condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras o células osteoprogenitoras para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento de defectos o lesiones de los huesos.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de las composiciones de la invención en las que las células son condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras o células osteoprogenitoras para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento de defectos o lesiones osteocondrales.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de las composiciones de la invención en las que las células son tenocitos o células de ligamento para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento de lesiones de los tendones.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de las composiciones de la invención en las que las células son tenocitos o células de ligamento para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento de lesiones de los ligamentos.

Preferentemente los aminoazúcares manosamina, *N*-acetilmanosamina y sales de manosamina utilizados en la presente invención son de la serie D.

Dichos aminoazúcares pueden existir en formas anoméricas α y β . La presente invención incluye la utilización tanto de los anómeros individuales α y β separados como de sus mezclas.

Las sales de manosamina con ácidos farmacéuticamente aceptables, incluye, sin límite, las sales con los siguientes ácidos: ácido clorhídrico, yodhídrico, bromhídrico, fosfórico, sulfúrico, metanosulfónico, acético, fórmico, tartárico, maleico, cítrico, succínico, láctico, glucónico, pirúvico, fumárico, propiónico, aspártico, glutámico, benzoico, ascórbico, glucurónico y málico.

Las sales de manosamina se pueden preparar siguiendo procedimientos estándares de preparación de sales de aminoazúcares. Un procedimiento consiste en obtener previamente la manosamina base a partir del clorhidrato de manosamina, para después añadir el ácido correspondiente dependiendo de la sal que se desee obtener. Otro procedimiento consiste en obtener las sales directamente a partir del clorhidrato de manosamina utilizando una resina de intercambio aniónico previamente acondicionada con el ácido que contiene el anión de la sal que se desea obtener o bien una sal de metal del ácido. También se pueden obtener utilizando la técnica de electrodiálisis.

El clorhidrato de manosamina es un producto comercial (NZP, New Zealand Pharmaceutical), pero si se desea se puede preparar mediante la epimerización de la *N*-acetilglucosamina con una disolución acuosa de Ca(OH)_2 seguida de separación de los isómeros, tratamiento con ácido clorhídrico, decoloración y precipitación con disolventes (Sugai *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, 3581-3589 (1995); Sugai *et al.*, *Tetrahedron*, 53 (7), 2397-2400 (1997)).

Cuando en la presente invención se habla de procedimiento *in vitro*, también se está incluyendo el procedimiento denominado *ex vivo*.

Cuando en la presente invención se habla de células condroprogenitoras y de células osteoprogenitoras se hace referencia a células que ya han conseguido una diferenciación parcial y que han perdido la capacidad pluripotencial de la célula madre. Es decir, son células que en su progresión evolutiva, se han comprometido con un determinado linaje celular para dar lugar a células especializadas específicas. Así, las células condroprogenitoras darán lugar a condrocitos y las células osteoprogenitoras darán lugar a osteoblastos y osteoclastos.

Cuando en la presente invención se habla de matrices soporte se incluyen también las denominadas estructuras soporte (support scaffolds).

Preferentemente las matrices o estructuras soporte biocompatibles utilizadas en la presente invención están compuestas de un material biodegradable, como por ejemplo ácido poliglicólico, ácido poliláctico, celulosa, gelatina, colágeno, pectina, alginato, dextrano, ácido hialurónico o derivados de los mismos.

También se pueden utilizar matrices constituidas por materiales no biodegradables tales como teflón, poliestireno, poliacrilato o polivinilo. En este caso, si se desea, se puede recubrir de un segundo material tal como la gelatina para aumentar la unión de las células al polímero.

La matriz puede ser flexible o rígida. La estructura tipo esponja también puede utilizarse.

Para proliferar o cultivar condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras, células osteoprogenitoras, tenocitos o células de ligamento, según el procedimiento de la presente invención, se ponen en contacto las células con el aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina o sus mezclas. Las células antes de añadirles el aminoazúcar pueden estar inmersas en un medio de cultivo que puede contener nutrientes, antibióticos, factores de crecimiento e inductores de diferenciación o de desdiferenciación. Opcionalmente el aminoazúcar puede formar parte de un medio de cultivo que puede contener nutrientes, antibióticos, factores de crecimiento e inductores de diferenciación o de desdiferenciación. Las células una vez proliferadas se pueden implantar, o bien, opcionalmente, se pueden transferir a una matriz soporte para su posterior implante. Esto es útil en el caso de que después del cultivo las células se hayan desdiferenciado, ya que al transferirlas a una matriz soporte se producirá su rediferenciación y síntesis de componentes de la matriz extracelular.

Alternativamente, las células a proliferar se pueden transferir previamente a una matriz soporte, para posteriormente añadir el medio de cultivo que contiene el aminoazúcar, para que tenga lugar la proliferación de las células en la matriz soporte.

Antes de realizar el implante, se pueden lavar las células o las matrices soporte que contienen las células, eliminando el medio de cultivo. Alternativamente, se pueden implantar composiciones que comprendan las células proliferadas y el aminoazúcar o bien las células proliferadas, la matriz soporte y el aminoazúcar (manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina o sus mezclas). Las composiciones pueden contener además nutrientes u otras sustancias que formen parte del medio de cultivo.

Las células se pueden hacer proliferar *in vitro* hasta que se haya desarrollado un volumen celular adecuado, y posteriormente se pueden implantar las células (con o sin matriz) junto con el aminoazúcar, para que las células puedan continuar proliferando *in vivo*. Alternativamente, si se desea, también se pueden implantar directamente las células, con o sin matriz, y el aminoazúcar para que la proliferación tenga lugar *in vivo*.

Se pueden seguir técnicas de cultivo y de implante conocidas por expertos en cultivos celulares e implantes quirúrgicos.

Las composiciones objeto de la invención son una alternativa al implante de células con o sin matriz para reparar y/o regenerar el cartílago, el hueso, el tendón o el ligamento dañado.

La células y el aminoazúcar pueden estar presentes en las composiciones de la invención a diferentes concentraciones.

Las composiciones de la invención que contienen condrocitos y/o células condroprogenitoras (con o sin matriz) y el aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina y sus mezclas son útiles para tratar defectos o lesiones de cartílago que se puedan presentar en cualquier articulación del cuerpo. Dichos defectos pueden ser el resultado de un traumatismo, de un defecto de nacimiento o de una enfermedad tal como la artrosis.

Las composiciones de la invención que contienen condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras y/o células osteoprogenitoras (con o sin matriz) y el aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina y sus mezclas son útiles para tratar defectos o lesiones de hueso u osteocondrales que pueden ser el resultado de un traumatismo, defecto genético o enfermedad. También son útiles para tratar pérdidas de masa ósea que se puedan presentar, por ejemplo con la edad, la menopausia o como consecuencia de enfermedades.

Las composiciones de la invención que contienen tenocitos y/o células de ligamento (con o sin matriz) y el aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina y sus mezclas son útiles para tratar lesiones de los tendones o lesiones de los ligamentos.

Una ventaja de la presente invención radica en que al utilizar clorhidrato de manosamina la proliferación de condrocitos es mayor que cuando se utiliza un medio de cultivo estándar o cuando se utilizan los aminoazúcares clorhidrato de glucosamina y *N*-acetilglucosamina.

Otra ventaja radica en que al utilizar clorhidrato de manosamina en un cultivo de condrocitos, se reduce la liberación de GAGs, así como la actividad metaloproteasa en comparación con un medio de cultivo estándar.

Otra ventaja importante de la presente invención es que al utilizar la *N*-acetilmanosamina en un cultivo de condrocitos, se produce un incremento en la síntesis de GAGs. Esta actividad estimuladora del anabolismo es importante ya que los GAGs forman parte de la matriz extracelular.

Breve descripción de la figuras

En la Figura 1 se representa a tres concentraciones (1, 5 y 10 mM) el efecto del clorhidrato de manosamina, clorhidrato de glucosamina y *N*-acetilglucosamina sobre los niveles de ácido desoxiribonucleico (ADN) por bola de alginato.

En la Figura 2 se representa a dos concentraciones (1 y 10 mM) el efecto del clorhidrato de manosamina, clorhidrato de glucosamina y *N*-acetilglucosamina sobre el porcentaje de glicosaminoglicanos (GAGs) liberados respecto a GAGs totales por los condrocitos en bolas de alginato, después de la estimulación con IL-1 β .

En la Figura 3 se representa a dos concentraciones (5 y 10 mM) el efecto del clorhidrato de manosamina, clorhidrato de glucosamina y *N*-acetilglucosamina sobre la actividad metaloproteasa (MMP) de los condrocitos en bolas de alginato, después de estimulación con IL-1 β y activación con APMA (acetato de 4-aminofenilmercurio).

En la Figura 4 se representa a dos concentraciones (5 y 10 mM) el efecto de la *N*-acetilmanosamina y *N*-acetilglucosamina sobre los niveles de GAGs respecto a los niveles de ADN.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no representan una limitación del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Proliferación de condrocitos medida a través de los niveles de ADN

El objetivo era determinar el efecto del clorhidrato de manosamina sobre la proliferación de condrocitos en un modelo de cultivo *in vitro*.

Se comparó la actividad del clorhidrato de manosamina con los siguientes compuestos: clorhidrato de glucosamina y *N*-acetilglucosamina.

Para cuantificar el incremento de condrocitos se determinó el aumento de los niveles de ácido desoxiribonucleico (ADN).

Materiales y métodos

Los condrocitos de origen bovino se aislaron mediante digestión con collagenasa siguiendo un procedimiento descrito previamente (B. Beekman *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 237, 135-141 (1997)).

Los condrocitos bovinos aislados se cultivaron siguiendo una metodología descrita en la literatura (J. DeGroot, *et al.*, 266, 303-310 (2001)). Los condrocitos se transfirieron a una matriz soporte de alginato, formando bolas de alginato que contenían las células a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml y se les añadió DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con Glutamax suplementado con ácido ascórbico, penicilina, estreptomycin y FCS (suero bovino fetal). Después de 24 horas, se renovó el medio, y los condrocitos contenidos en bolas de alginato (5 bolas/pocillo, con 250 μ l de medio/pocillo, en placas de 48 pocillos) se cultivaron en ausencia (control) o presencia del compuesto a ensayar (a concentraciones de 1, 5 y 10 mM). Se regeneró el medio dos veces por semana. Al cabo de 10 días, se recogieron las bolas (5 bolas en cada pocillo, n=3 pocillos por condición) y se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta efectuar los análisis.

Para cuantificar los niveles de ADN se digirieron las bolas con papaína, y se utilizó el colorante Hoechst 33258 (bis-benzimida). Se determinaron los niveles de ADN por bola de alginato.

La evaluación de las diferencias entre todos los compuestos y la condición control se ensayó mediante análisis de la varianza (ANOVA). Después se realizó el ensayo LSD para determinar las diferencias entre cada compuesto y la condición control. Se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$.

5 Resultados

A las tres concentraciones ensayadas (1, 5 y 10 mM) los niveles más altos de ADN/bola medidos se obtuvieron en las células cultivadas con clorhidrato de manosamina (Figura 1).

10 Tanto el clorhidrato de manosamina como el clorhidrato de glucosamina causaron un incremento dosis dependiente en los niveles de ADN. Se encontraron diferencias significativas entre el clorhidrato de manosamina y el clorhidrato de glucosamina a las tres concentraciones ensayadas. A la concentración de 10 mM, el clorhidrato de manosamina causó un incremento 10 veces superior al control (sin compuesto), mientras que el incremento producido por el clorhidrato de glucosamina fue 4 veces superior.

15 Con la *N*-acetilglucosamina no se observó ningún efecto significativo sobre el contenido de ADN.

Podemos concluir que el clorhidrato de manosamina estimula la proliferación de condrocitos, siendo mucho más eficaz que el clorhidrato de glucosamina.

20

Ejemplo 2

Liberación de glicosaminoglicanos de los condrocitos en bolas de alginato

25

El objetivo era determinar el efecto del clorhidrato de manosamina sobre la liberación de glicosaminoglicanos (GAGs) de los condrocitos en bolas de alginato, después de haber sido estimulados con IL-1 β .

30 La liberación de GAGs es un ensayo utilizado para evaluar los efectos de los compuestos en la degradación de proteoglicanos inducida por IL-1 β en los condrocitos. Permite evaluar la actividad catabólica de los condrocitos. La liberación de GAGs inducida por IL-1 β está principalmente mediada por agreganasas.

Se comparó la actividad del clorhidrato de manosamina con los siguientes compuestos: clorhidrato de glucosamina y *N*-acetilglucosamina.

35

Materiales y métodos

Los condrocitos de origen bovino se cultivaron durante 21 días en bolas de alginato como matriz soporte; aproximadamente 100 bolas en frascos de cultivo de 75 cm² en 25 ml de medio, sin adición de los compuestos a ensayar. Dos veces por semana, el medio se regeneró. Después de 21 días de cultivo, las bolas se transfirieron a placas de 48 pocillos, 5 bolas por pocillo, 250 μ l de medio por pocillo. A día 21 se añadieron los compuestos a ensayar (clorhidrato de manosamina, clorhidrato de glucosamina y *N*-acetilglucosamina) para evaluar el efecto sobre la degradación de la matriz extracelular después de la estimulación con IL-1 β (20 ng/ml). Cada compuesto se ensayó a las concentraciones de 1 y 10 mM. En cada experimento cada concentración se ensayó a n=3 pocillos, excepto en el control (n=8 pocillos). Una vez incubadas las bolas de alginato con IL-1 β (20 ng/ml) y los compuestos durante 48 horas, se recogió el medio de cultivo (día 21 hasta día 23). Se midió el contenido en GAGs en las bolas y en el medio de cultivo del día 23 (liberación de GAGs mediada por agreganasas). El contenido de GAGs se determinó, previa digestión con papaína, con el ensayo (kit) BlyscanTM de Biocolor Ltd.

50 Los resultados se expresaron como porcentaje de GAGs liberados respecto a GAGs totales.

La evaluación de las diferencias entre todos los compuestos y la condición control se ensayó mediante análisis de la varianza (ANOVA). Después se realizó el ensayo LSD para determinar las diferencias entre cada compuesto y la condición control. Se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$.

55

Resultados

A la concentración superior (10 mM), el clorhidrato de manosamina, igual que el clorhidrato de glucosamina, redujo la liberación de GAGs por los condrocitos (Figura 2).

60

El clorhidrato de manosamina redujo la liberación de GAGs en un 30% respecto al control (cultivo sin compuesto).

La liberación de GAGs en el cartílago artrósico es mayor en comparación con el cartílago normal, lo cual conlleva un menor contenido en proteoglicanos en el tejido afectado, por tanto, una reducción de la liberación de GAGs es beneficiosa porque se traduce en una reducción de la pérdida de proteoglicanos en la patología artrósica.

65

Ejemplo 3

Inhibición de la actividad metaloproteasa

El objetivo era determinar el efecto del clorhidrato de manosamina sobre la actividad metaloproteasa de los condrocitos en bolas de alginato, después de la estimulación con IL-1 β .

La actividad metaloproteasa es utilizada para evaluar los efectos de los compuestos en la liberación de metaloproteasas (MMPs) inducida con IL-1 β en los condrocitos. Se trata de un ensayo útil para evaluar la actividad catabólica del condrocito. Las metaloproteasas son secretadas por los condrocitos como pro-enzimas inactivos y son activadas previamente utilizando APMA (acetato de 4-aminofenilmercurio).

La primera causa de la destrucción patológica del cartílago es la elevada actividad proteolítica. Las metaloproteasas son un tipo de enzimas que degradan la matriz extracelular del cartílago articular. Estas enzimas tienen una gran capacidad para degradar la triple hélice del colágeno. En pacientes con osteoartritis se han encontrado altos niveles de colagenasas y también una relación entre esos niveles y la severidad de las lesiones osteoartísticas.

Se comparó la actividad del clorhidrato de manosamina con los siguientes compuestos: clorhidrato de glucosamina y *N*-acetilglucosamina.

Materiales y métodos

Se partió de condrocitos bovinos y se siguió la misma metodología explicada en el Ejemplo 2, pero en este caso cada compuesto se ensayó a dos concentraciones (5 y 10 mM).

Los condrocitos se cultivaron durante 21 días en alginato para producir matriz extracelular. Después de 2 días de estimulación con IL-1 β y sin o con compuestos, se renovó el medio. A continuación se determinó la actividad metaloproteasa en el medio de cultivo a las 2 horas de incubación con 20 ng/ml de IL-1 β , 1 mM de APMA y sin o con los compuestos. La actividad metaloproteasa se cuantificó utilizando el sustrato para metaloproteasas TNO 211-F (I. Tchetverikov *et al.*, *Clin. Exp. Rheumatol.* 21, 711-8 (2003)).

La evaluación de las diferencias entre todos los compuestos y la condición control se ensayó mediante análisis de la varianza (ANOVA). Después se realizó el ensayo LSD para determinar las diferencias entre cada compuesto y la condición control. Se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$.

Resultados

Como se puede observar en la Figura 3, de todos los compuestos ensayados el clorhidrato de manosamina es el único que redujo la actividad metaloproteasa.

A la concentración de 10 mM el clorhidrato de manosamina causó una reducción de la actividad metaloproteasa del 30% respecto al control.

Ejemplo 4

Determinación del contenido de glicosaminoglicanos por condrocito

El objetivo era determinar el efecto del clorhidrato de manosamina sobre el contenido de GAGs por ADN, es decir, corregido por número de condrocitos.

Es un ensayo que permite evaluar los efectos de los compuestos en la deposición de GAGs por condrocito, siendo útil para evaluar la actividad anabólica del condrocito.

Se comparó la *N*-acetilmanosamina con la *N*-acetilglucosamina.

Materiales y métodos

Se partió de condrocitos bovinos y se siguió la misma metodología explicada en el Ejemplo 1 (proliferación de condrocitos medida a través de los niveles de ADN), pero en este caso cada compuesto se ensayó a dos concentraciones (5 y 10 mM).

El contenido de GAGs se determinó, previa digestión con papaína, con el ensayo (kit) Blyscan™ de Biocolor Ltd.

La evaluación de las diferencias entre todos los compuestos y la condición control se ensayó mediante análisis de la varianza (ANOVA). Después se realizó el ensayo LSD para determinar las diferencias entre cada compuesto y la condición control. Se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$.

ES 2 298 052 A1

Resultados

Como se puede observar en la Figura 4, la *N*-acetilmanosamina causó un incremento dosis dependiente en los niveles de GAGs por condrocito.

A la concentración de 10 mM la *N*-acetilmanosamina incrementó el contenido de GAGs por condrocito en un 63% respecto al control (cultivo sin producto).

Con la *N*-acetilglucosamina no se observó ningún efecto sobre el contenido de GAGs por condrocito.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para la proliferación o cultivo de células de tejido conjuntivo seleccionadas de entre el grupo que consiste en condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras, células osteoprogenitoras, tenocitos y células de ligamento que comprende la etapa de poner en contacto dichas células con un aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina y sus mezclas.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células de tejido conjuntivo se encuentran en una matriz soporte biocompatible.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la matriz soporte biocompatible comprende un material polimérico.
4. El procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, en el que la matriz soporte biocompatible es adecuada para el implante en el cuerpo humano o animal.
5. El procedimiento según la reivindicación 1 a 4, en el que el aminoazúcar es clorhidrato de manosamina.
6. El procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que las células de tejido conjuntivo son condrocitos.
7. El procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que las células de tejido conjuntivo son osteoblastos.
8. El procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que las células de tejido conjuntivo son células condroprogenitoras.
9. El procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que las células de tejido conjuntivo son células osteoprogenitoras.
10. El procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que las células de tejido conjuntivo son tenocitos.
11. El procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que las células de tejido conjuntivo son células de ligamento.
12. Una composición que comprende un aminoazúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manosamina, *N*-acetilmanosamina, sales de manosamina y sus mezclas en combinación con células de tejido conjuntivo seleccionadas de entre el grupo que consiste en condrocitos, osteoblastos, células condroprogenitoras, células osteoprogenitoras, tenocitos y células de ligamento.
13. La composición según la reivindicación 12, que contiene además una matriz soporte biocompatible.
14. La composición según la reivindicación 13, en la que la matriz soporte biocompatible comprende un material polimérico.
15. La composición según la reivindicación 12 a 14, en la que el aminoazúcar es clorhidrato de manosamina.
16. La composición según la reivindicación 12 a 15, en la que las células de tejido conjuntivo son condrocitos.
17. La composición según la reivindicación 12 a 15, en la que las células de tejido conjuntivo son osteoblastos.
18. La composición según la reivindicación 12 a 15, en la que las células de tejido conjuntivo son células condroprogenitoras.
19. La composición según la reivindicación 12 a 15, en la que las células de tejido conjuntivo son células osteoprogenitoras.
20. La composición según la reivindicación 12 a 15, en la que las células de tejido conjuntivo son tenocitos.
21. La composición según la reivindicación 12 a 15, en la que las células de tejido conjuntivo son células de ligamento.
22. Uso de una composición según la reivindicación 16, para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento o profilaxis de un defecto o lesión de cartílago.
23. Uso de una composición según la reivindicación 18, para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento o profilaxis de un defecto o lesión de cartílago.

ES 2 298 052 A1

24. Uso según la reivindicación 22 ó 23, en el que el defecto o lesión de cartílago se presenta en la enfermedad artrósica.

5 25. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento o profilaxis de una pérdida de masa ósea.

26. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento de un defecto o lesión de hueso.

10 27. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento de un defecto o lesión osteocondral.

15 28. Uso de una composición según la reivindicación 20 ó 21, para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento de una lesión de tendón.

29. Uso de una composición según la reivindicación 20 ó 21, para la preparación de un medicamento para implante para el tratamiento de una lesión de ligamento.

20

25

30

35

40

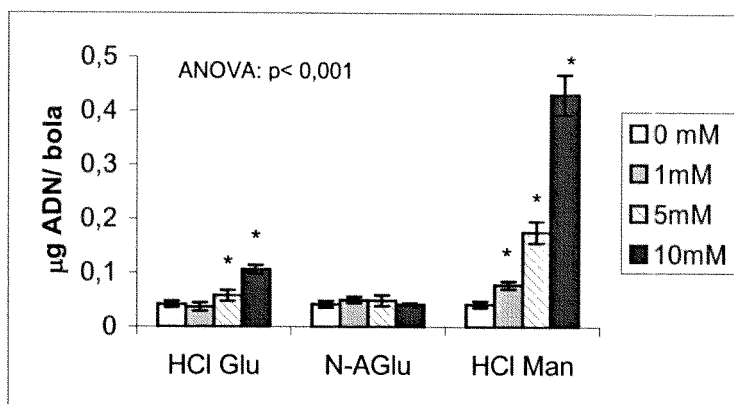
45

50

55

60

65

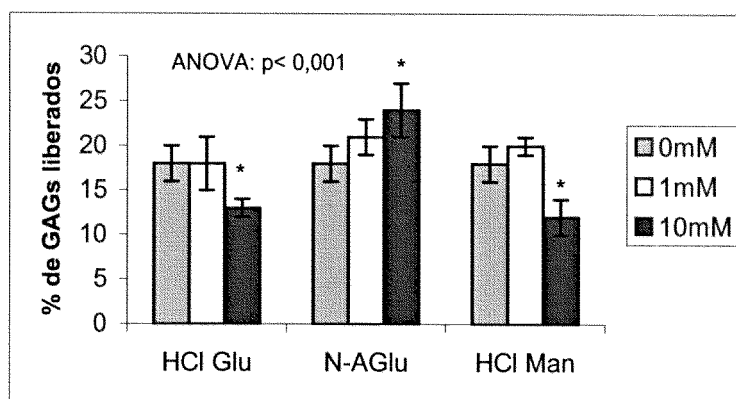


HCl Glu = clorhidrato de glucosamina

N-AGlu = *N*-Acetilglucosamina

HCl Man = clorhidrato de manosamina

FIGURA 1

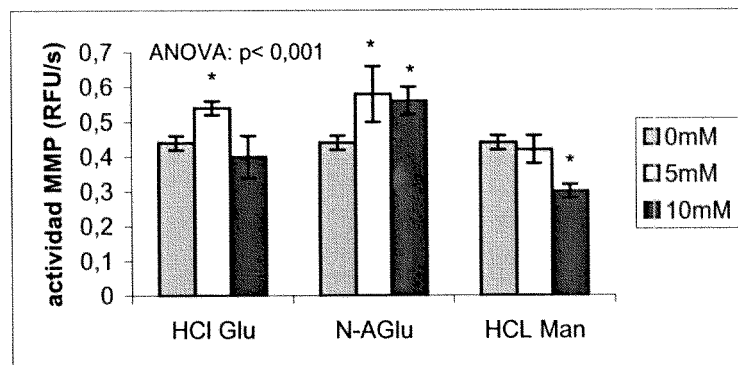


HCl Glu = clorhidrato de glucosamina

N-AGlu = *N*-Acetilglucosamina

HCl Man = clorhidrato de manosamina

FIGURA 2

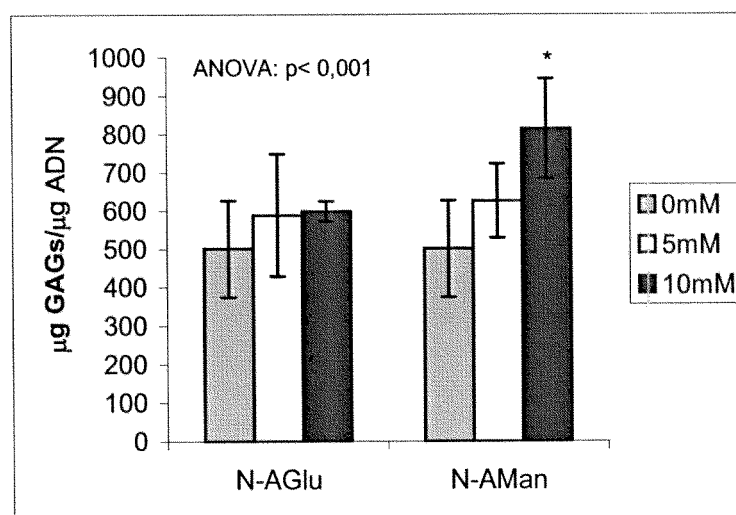


HCl Glu = clorhidrato de glucosamina

N-AGlu = *N*-Acetilglucosamina

HCL Man = clorhidrato de manosamina

FIGURA 3



N-AGlu = *N*-Acetilglucosamina

N-Aman = *N*-Acetilmanosamina

FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 298 052

⑫ Nº de solicitud: 200602111

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 03.08.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BRYSON, H. et al.: "Evidence that the Inhibition of Cartilage Proteoglycan Breakdown by mannosamine is not Mediated Via Inhibition of Glycosylphosphatidylinositol Anchor Formation", Biochem. J., 2000, vol. 345, pp.: 495-501; resumen y discusión.	1,6
X	PATWARI, P. et al.: "Mannosamine Inhibits Aggrecanase-mediated Changes in the Physical Properties and Biochemical Composition of Articular Cartilage", Arch.Biochem. Biophys., 2000, vol. 374 (1), pp.: 79-85; discusión.	1,6
X	MELLO, D.M. et al.: "Comparison of Inhibitory Effects of Glucosamine and Mannosamine on Bovine Articular Cartilage Degradation in vitro", AJVR, 2004, vol. 65 (10), pp.: 1440-1445; resultados y discusión.	1,6
A	US 20040003432 A1 (OBUKOWICZ, M.G.) 01.01.2004, resumen.	12-29
A	DE 19738484 A1 (REUTTER, W.) 04.03.1999, todo el documento, en particular, resumen.	12-29
A	PIPERNO, M. et al.: "Glucosamine Sulfate Modulates Dysregulated Activities of Human Osteoarthritic Chondrocytes in vitro", Osteoarthritis and Cartilage, 2000, vol. 8, pp.: 207-212, todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.03.2008

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 5/06 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61F 2/08 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

A61F 2/30 (2006.01)