

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 087**

51 Int. Cl.:

A61K 31/722 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 17/12 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2017** **PCT/EP2017/063639**
87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017** **WO17211776**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2017** **E 17734998 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2022** **EP 3463392**

54 Título: **Composiciones de polisacáridos para la reparación de tejidos**

30 Prioridad:

07.06.2016 IT UA20164153

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2022

73 Titular/es:

JOINTHERAPEUTICS S.R.L. (100.0%)
Piazza del Popolo 1
22100 Como, IT

72 Inventor/es:

CALLEGARO, LANFRANCO;
BRUN, PAOLA y
BIANCHINI, GIULIO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 928 087 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de polisacáridos para la reparación de tejidos

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con composiciones de polisacáridos que comprenden una mezcla hidrosoluble de polisacáridos útiles como moduladores de procesos de proliferación celular y su uso en la reparación de tejidos con inhibición de procesos fibróticos. Estas propiedades de modulación pueden usarse adecuadamente en la reparación de tejidos y para la prevención de fibrosis y/o adherencias de tejidos.

Técnica anterior

10 La matriz extracelular es una colección dinámica de moléculas que interactúan entre sí y juega un papel clave en la regulación y modulación de las funciones celulares en los procesos de reparación de tejidos. En estos procesos de reparación, luego de traumatismos de diversos orígenes, ocurre una secuencia de eventos que involucra diferentes tipos de células, desde macrófagos hasta células endoteliales vasculares y fibroblastos, todos rodeados por una matriz extracelular compuesta por una multiplicidad de componentes como fibronectina, colágeno, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (por ejemplo, ácido hialurónico), que tienen muchas funciones de regulación celular. El colágeno es reconocido como el componente más abundante de la matriz extracelular. Las células conectivas, como fibroblastos y sinoviocitos, son las células involucradas especialmente en la remodelación tisular necesaria para la reparación y, por lo tanto, principalmente en la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz extracelular, entre las que predomina el colágeno tipo I y tipo II. Su regulación funcional en esta etapa parece crucial, ya que, si esta síntesis es excesiva y no está contrarrestada por procesos de degradación del colágeno, la producción de colágeno por parte de estas células conduce a la formación de tejidos fibróticos. La fibrosis consiste básicamente en un depósito excesivo de componentes de la matriz celular con consecuencias patológicas sobre la arquitectura tisular y sus funciones (Mutsaers SE et al., Int J Biochem Cell Biol, 1997, 29, 5-17).

25 En la reparación de tejidos, como por ejemplo tras intervenciones quirúrgicas, es necesario intervenir tanto en la fase reparadora con la promoción de la proliferación y migración celular, como en la remodelación tisular evitando el depósito excesivo de matriz extracelular, especialmente colágeno, para evitar procesos fibróticos que subyacen a la adhesión tisular y la cicatrización hipertrófica.

30 Entre las moléculas que forman la matriz extracelular se encuentran los glicosaminoglicanos que, como es sabido, están implicados en un gran número de procesos biológicos tanto normales como patológicos de las células involucradas en la reparación de tejidos. Dichos procesos biológicos incluyen: migración, adhesión, diferenciación y proliferación. Los glicosaminoglicanos son biopolímeros no ramificados compuestos por unidades repetitivas de disacárido con alta hidrofilia y se comportan como polianiones a nivel fisiológico debido a la presencia de grupos carboxilo o sulfatos en los residuos sacáridos. Esto les permite adoptar conformaciones adecuadas para la formación de matrices resistentes a la compresión con características reológicas de alta viscosidad y/o viscoelasticidad. Entre estos biopolímeros, el ácido hialurónico (también conocido como hialuronato de sodio o HA) es el más simple y consiste en unidades repetitivas de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. Su peso molecular puede oscilar entre 400 dalton (disacárido) o más de 10 millones de dalton y está presente en muchos tejidos y fluidos corporales de mamíferos, como la capa dérmica de la piel, el cartílago articular, los fluidos endobulbares del ojo, donde es un elemento clave para la organización de otras moléculas y por tanto también en la formación de la matriz extracelular. Asimismo, en el tejido conjuntivo, la hidratación asociada al ácido hialurónico determina un entorno propicio para la motilidad y proliferación celular.

40 También se sabe que el ácido hialurónico, como biopolímero endógeno, tiene un papel en la motilidad y adhesión celular mediada por un receptor de superficie, RHAMM (receptor para motilidad mediada por hialuronano), y por el receptor transmembrana CD44. De lo que se describió de manera breve anteriormente, por lo tanto, es evidente que el ácido hialurónico tiene un papel clave en los procesos biológicos asociados con la reparación de tejidos (Jiang D, Liang J, Noble PW, Annu Rev. Cell Dev Biol, 2007, 23, 435-61).

Las peculiares actividades físicas y biológicas, junto con la alta biocompatibilidad y biodegradabilidad de la hialuronidasa endógena, han llevado a un amplio uso de este biopolímero con aplicaciones en cosmética, oftalmología, reumatología, transporte de principios activos, en reparación de tejidos e ingeniería de tejidos.

50 Un aspecto esencial en el uso del ácido hialurónico es su peso molecular promedio, de hecho, el ácido hialurónico es un polímero formado por fracciones de diferente peso molecular y esta característica técnica es responsable de sus propiedades físicas, que a su vez son esenciales para los efectos biológicos (documentos EP 0138572; WO 2010/003797).

55 Las propiedades viscosas y/o viscoelásticas, en particular, han sido la base de su uso en viscosuplementación en enfermedades osteoarticulares, uso que se ha referido sobre todo a las fracciones de ácido hialurónico de alto peso molecular (superior a 2000 kDa), las fracciones de alto peso molecular que tiene un alto módulo viscoelástico además de una alta viscosidad.

Además del ácido hialurónico, otros polisacáridos también han llamado la atención para un uso de aplicación por su biocompatibilidad y su disponibilidad relativamente alta, como el quitosano, que es un biopolímero de interés particular.

De hecho, el quitosano es un polisacárido ampliamente disponible en la naturaleza, obtenible a través de la desacetilación química de la quitina, y está compuesto principalmente por unidades de glucosamina y unidades de N-acetil-glucosamina residuales del tratamiento de desacetilación de quitina. A diferencia del ácido hialurónico, se comporta como un polícatión debido a la presencia de grupos amino de la glucosamina derivados de la desacetilación de quitina.

Hasta la fecha, se sabe que el quitosano puede desempeñar un papel en la regulación celular de acuerdo con mecanismos aún bajo investigación. En el cartílago de la rodilla de ratas, por ejemplo, el quitosano ha demostrado ser capaz de inducir la formación de tejido fibroso, la proliferación de condrocitos y reducir la disminución del grosor del cartílago epifisario (Jian Xi Lu et al., 1999, 20, Biomaterials, 1937-1944).

Además, los hidrogeles formados por un polímero per se desprovisto de actividad biológica, como la polivinilpirrolidona en combinación con quitosano, han mostrado una interesante actividad de modulación sobre diferentes tipos celulares. En particular, estos hidrogeles han demostrado ser capaces de inhibir el crecimiento y proliferación de fibroblastos e inducir el enraizamiento y crecimiento de células epiteliales.

Cabe señalar, sin embargo, que el quitosano solo ha demostrado la capacidad de inducir una disminución en el crecimiento de las células epiteliales (Risbud M et al., J Biosci, 2000, 25, 25-31). Este efecto de inhibición del crecimiento celular del quitosano también se confirmó en un modelo de lesión del tendón de Aquiles donde el quitosano ha demostrado ser capaz de inducir una inhibición del crecimiento de fibroblastos, actuando sobre los procesos de adhesión celular lo que es significativo en las secuelas posquirúrgicas de estas enfermedades (Qiang Chen et al, Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7, 8462-8470).

Sin embargo, el mayor problema en el uso del quitosano es su baja solubilidad en agua por lo que requiere un pH igual o inferior a 5. La disminución del pH implica la protonación de los grupos amino de residuos de glucosamina, impartiendo así solubilidad al sistema. Además, en relación a su alta carga positiva en soluciones acuosas, es poco compatible con polímeros polianiónicos, resultando coacervados con separación de fases.

En relación con su amplio uso, el quitosano se ha convertido en uno de los polisacáridos más estudiados desde el punto de vista químico para mejorar sus propiedades útiles para fines de aplicación, en particular su viscosidad y solubilidad en agua. En los últimos años se han obtenido varios derivados del quitosano mediante modificaciones químicas de la cadena polimérica. Comúnmente, las reacciones de los residuos amino de las unidades de glucosamina se usan para estas modificaciones. En particular, la introducción de unidades de sacáridos (mono y oligosacáridos) en la cadena lateral permitió obtener derivados de quitosano solubles en agua sin necesidad de bajar el pH a valores ácidos, evitando así los problemas de degradación del polímero. La derivatización del quitosano con grupos sacáridos laterales, por ejemplo, mediante la inserción de unidades de lactosa obtenidas por una reacción de aminación reductora, ha supuesto, como se reporta en la Patente US 4.424.346 (Hall, L.D. y Yalpani, M.), una mayor solubilidad de los derivados de este polisacárido en agua y es precisamente en estas formas derivatizadas donde el quitosano toma las propiedades más favorables para su uso como biomaterial de alta biocompatibilidad. Además, dicha derivatización mejora la compatibilidad del quitosano en soluciones acuosas con biopolímeros polianiónicos, como ácido algínico y ácido hialurónico (documento EP 2021408). Se ha demostrado que las mezclas de estos polímeros producen soluciones acuosas homogéneamente dispersas sin la formación de coacervados caracterizados por una viscosidad y viscoelasticidad superiores a las de los polisacáridos de partida.

El derivado de oligosacárido de quitosano obtenido por la funcionalización del grupo amino de glucosamina con lactosa también ha mostrado propiedades interesantes desde el punto de vista biológico. En particular, dos derivados con diferente grado de funcionalización fueron capaces, a diferencia del quitosano no modificado, de inducir la agregación celular de condrocitos y estimular la producción de glicosaminoglicanos y colágeno a través de una interacción con galectina-1 (Donati et al., Biomaterials, 2005, 26, 987-998; Marcon P. et al., 2005, 26, 4975-4984). Esta actividad también se mantiene cuando el derivado oligosacárido del quitosano con lactosa se combina en hidrogeles con polisacáridos aniónicos, como ácido algínico (Macleod E. et al., J Biomed Mat Res Part A, 2007, DOI:10.1002/jbm.a31307).

En el campo de la reparación de tejidos, se siente fuertemente la necesidad de instrumentos capaces de inducir una reparación equilibrada de los tejidos afectados sin la formación de procesos fibróticos y/o de adhesión y para cubrir esta necesidad, el uso de ácido hialurónico tiene una larga historia de estudio por sus propiedades viscoelásticas solo o en combinación con otros compuestos.

Por ejemplo, el documento EP 059015 describe composiciones que comprenden un pegamento a base de fibrina y fibrinógeno combinado con polímeros biodegradables y biocompatibles capaces de aumentar la viscosidad de las composiciones. Preferiblemente, estos polímeros se seleccionan entre proteoglicanos y polisacáridos, incluido el ácido hialurónico, y para los fines de la invención tales polímeros deben tener un alto peso molecular. De estos polímeros, por lo tanto, se explota la única propiedad física y, de hecho, estos polímeros se definen como "polímeros que mejoran

la viscosidad". Este concepto se ha seguido durante mucho tiempo en la preparación de composiciones adecuadas para prevenir las adherencias de tejidos.

En este sentido, la investigación encaminada al desarrollo de herramientas de reparación de tejidos con inhibición de procesos fibróticos y de adhesión tisular se ha dirigido fundamentalmente al desarrollo de fracciones de ácido hialurónico de alto peso molecular o sus derivados resistentes a la degradación por hialuronidasa endógena para la promoción de un "efecto barrera" debido a la alta viscosidad de las composiciones.

En el documento WO 97/07833 se describen biomateriales constituidos por derivados de ácido hialurónico esterificados con alcohol bencílico o entrecruzados como alternativa a las fracciones de ácido hialurónico de alto peso molecular y por tanto muy viscosas para uso en la prevención de adherencias posquirúrgicas. La derivatización del ácido hialurónico tiene como objetivo aumentar su resistencia a la degradación y optimizar los biomateriales en forma de geles, membranas y tejidos.

Similarmente, el documento EP 1207828 describe geles que se pueden utilizar como barreras antiadherencias, que se obtienen mezclando una espuma de derivados de ácido hialurónico entrecruzados y soluciones acuosas de ácido hialurónico. Para obtener dicho gel, se indica el uso de ácido hialurónico con un peso molecular en el intervalo de 1000 kDa a 2000 kDa. Para este uso, sin embargo, se consideran válidos tanto el uso de fracciones de ácido hialurónico de alto peso molecular (por ejemplo, de 3500 a 10000 kDa), como se describe en la solicitud de patente reciente EP 2977460, y el uso de ácidos hialurónicos modificados químicamente y, en particular, hidrogeles que consisten en derivados de ácido hialurónico estructuralmente complejos, en donde los ácidos hialurónicos que tienen un peso molecular en el intervalo de 50 a 3500 kDa están enlazados a poliésteres biocompatibles y biodegradables con un peso molecular en el intervalo de 3 a 900 kDa, como se describe en el documento WO 2012/014180.

Cabe señalar, sin embargo que, debido a la complejidad de las interacciones celulares en los procesos de reparación de tejidos, para promoverla sin incurrir en procesos fibróticos y/o de adhesión tisular, es necesario identificar una estrategia no basada exclusivamente en un "efecto barrera" del ácido hialurónico de alto peso molecular o sus derivados endógenos resistentes a la degradación. Para satisfacer la necesidad terapéutica, como ha demostrado una larga investigación en el campo, puede ser más importante explotar las propiedades biológicas peculiares del ácido hialurónico y otros polisacáridos biocompatibles con fines terapéuticos, e intervenir en la modulación de los procesos de proliferación de los diferentes tipos de células involucradas en la reparación de tejidos.

Resumen

El objeto de la presente invención es proporcionar composiciones para modular los procesos de proliferación celular para uso en la reparación de tejidos con la inhibición de los procesos fibróticos, aprovechando las propiedades biológicas de los biopolímeros de polisacáridos. Por tanto, un objeto de la presente invención son las composiciones de polisacáridos que comprenden ácido hialurónico y un oligosacárido derivado de quitosano con lactosa, obtenidas por una reacción de aminación reductora de D-glucosamina que tiene un grado de sustitución del grupo funcional amina de la misma con lactosa de al menos el 40 %, para uso en la reparación de tejidos y en la inhibición de fibrosis y/o adherencias tisulares a través de la modulación de la proliferación celular, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Típicamente, el ácido hialurónico de la composición de polisacáridos objeto de la invención es la matriz en la que se dispersa homogéneamente el derivado oligosacárido del quitosano.

De acuerdo con algunos aspectos, las composiciones de la invención son para uso en la reparación de tejidos y/o para la prevención de fibrosis y/o adherencias en lesiones tisulares traumáticas, posquirúrgicas e inflamatorias crónicas.

Las ventajas conseguidas con la presente invención serán más evidentes para una persona experimentada a partir de la siguiente descripción detallada con referencia a las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. En la figura se muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación de fibroblastos humanos tras incubación a 24 horas, 3 y 6 días con ácido hialurónico (HA), chitlac, ácido hialurónico y chitlac a diferentes concentraciones: (A) HA a la concentración de 0.1 a 1.25 mg/ml; (B) chitlac a la concentración de 0.1 a 1.0 mg/ml; (C) HA a la concentración de 1.25 y chitlac a la concentración de 0.1 a 1.0 mg/ml.

Figura 2. En la figura se muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación de condrocitos humanos tras incubación a 24 horas, 3 y 6 días con ácido hialurónico (HA), chitlac, ácido hialurónico y chitlac a diferentes concentraciones: (A) HA a la concentración de 0.25 a 1.25 mg/ml; (B) chitlac a la concentración de 0.1 a 1.5 mg/ml; (C) HA a la concentración de 0.5 mg/ml y chitlac a la concentración de 0.1 a 1.5 mg/ml; (D) HA a la concentración de 1.0 mg/ml y chitlac a la concentración de 0.1 a 1.0 mg/ml; (E) HA a la concentración de 1.25 mg/ml y chitlac a la concentración de 0.1 a 1.0 mg/ml.

Figura 3. En la figura se muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación de sinoviocitos humanos tras incubación a 24 horas, 3 y 6 días con ácido hialurónico (HA), chitlac, ácido hialurónico y chitlac a diferentes concentraciones: (A) HA a la concentración de 0.25 a 1.25 mg/ml; (B) chitlac a la concentración de 0.1 a 1.5 mg/ml; (C) HA a la concentración de 0.5 mg/ml y chitlac a la concentración de 0.1 a 1.5 mg/ml; (D) HA a la concentración de 1.0 mg/ml y chitlac a la concentración de 0.1 a 1.0 mg/ml; (E) HA a la concentración de 1.25 mg/ml y chitlac a la concentración de 0.1 a 1.0 mg/ml.

Figura 4. La figura muestra los resultados obtenidos en la prueba de rayado sobre fibroblastos dérmicos tratados con ácido hialurónico a una concentración de 1 mg/ml, chitlac a una concentración de 0.75 mg/ml y una mezcla de estos (HA 1 mg/ml, chitlac 0.75 mg/ml) a las 0, 48 y 72 horas de migración celular en % (A) y cierre del corte en μm (B).

Descripción detallada de la invención

Se evaluó in vitro el derivado oligosacárido del quitosano, obtenido por aminación reductora de la función amino de la D-glucosamina con lactosa, de la composición polisacárida objeto de la invención, en adelante también denominada chitlac, en diferentes tipos de células de origen de tejido conectivo, ya que estas células son las más implicadas en la reparación y remodelación de problemas tras lesiones tisulares. Dichas lesiones pueden tener diversos orígenes y pueden variar desde lesiones quirúrgicas o traumáticas hasta las resultantes de procesos inflamatorios crónicos.

En experimentos in vitro, cuyos resultados se presentan en detalle a continuación, dicho derivado del quitosano sustituido con lactosa (chitlac) ha demostrado tener interesantes propiedades biológicas sobre la proliferación de células de diferente origen.

En particular, tanto en fibroblastos y sinoviocitos dérmicos como en condrocitos humanos, ha mostrado un efecto dependiente de la dosis de inhibición de la proliferación celular que, sin embargo, no afecta a la viabilidad celular.

Sobre estas células, de hecho, chitlac ejerce un claro y significativo efecto inhibidor dependiente de la dosis sobre la proliferación celular después de una incubación durante seis días ya a la concentración de 0.25 mg/ml. El efecto es muy notable a concentraciones más altas (0.75 y 1.0 mg/ml para fibroblastos y 1.0 y 1.5 mg/ml para sinoviocitos y condrocitos). Sin embargo, después de la incubación durante tres días, no hay un efecto significativo sobre los fibroblastos, mientras que el efecto es significativo para condrocitos y sinoviocitos en concentraciones más altas. Además, no hay efectos significativamente diferentes a concentraciones entre 1.0 y 1.5 mg/ml. Del análisis de datos, por lo tanto, se puede ver que chitlac inhibe la proliferación celular de condrocitos y sinoviocitos después de tres días de incubación a concentraciones de 1.0 y 1.25 mg/ml y después de 6 días de incubación ya a 0.25 mg/ml en todos los tres tipos de células consideradas. Por lo tanto, el efecto no solo depende de la dosis sino también del tiempo.

De estos resultados es claro que chitlac inhibe la proliferación celular de cualquier tipo de célula, es decir, tanto de células involucradas en la remodelación tisular con depósito de colágeno, como fibroblastos y sinoviocitos cuya hiperactividad es prodrómica a procesos fibróticos, como en células que tienen una función implicada en la reparación de tejidos lesionados como los condrocitos, que como se sabe son células implicadas en la formación del cartílago articular.

A diferencia del chitlac, el ácido hialurónico (en lo sucesivo también denominado HA) ha demostrado en cambio que no influye significativamente en los procesos de proliferación celular de fibroblastos y condrocitos en ninguna de las concentraciones empleadas ni en ninguno de los tiempos de incubación considerados, excepto por un efecto inhibitorio, ya a 0.75 mg/ml y significativo a la concentración más alta (1.25 mg/ml) y después de seis días de incubación en sinoviocitos. Este efecto no parece estar relacionado con un efecto barrera del ácido hialurónico porque la fracción de HA utilizada tiene un peso molecular que no es significativamente elevado.

Sin embargo, para fines de solicitud, el efecto sobre la proliferación celular es particularmente relevante cuando se combinan los dos polisacáridos.

De hecho, cabe señalar que: i) la combinación de HA a una concentración de 0.5 mg/ml no afecta significativamente el efecto inhibidor que ejerce el chitlac a ninguna de las concentraciones probadas ni a los tres o seis días de incubación sobre los condrocitos y sinoviocitos; ii) la combinación de HA a la concentración de 1.0 mg/ml evita totalmente el efecto inhibidor de chitlac a todas las concentraciones sobre los condrocitos y reduce parcialmente el efecto inhibidor de chitlac a concentraciones más altas sobre los sinoviocitos; iii) la combinación de HA a la concentración de 1.25 mg/ml previene el efecto inhibidor de chitlac a concentraciones de 0.1 a 0.75 mg/ml sobre los condrocitos pero no a la concentración más alta de chitlac y reduce el efecto de chitlac pero no lo suprime sobre sinoviocitos, mientras que sobre fibroblastos no inhibe el efecto de chitlac.

Los resultados sugieren, por tanto, que el efecto inhibidor del chitlac sobre la proliferación celular implicada en la síntesis de colágeno, como fibroblastos y sinoviocitos, no es abolido completamente por el ácido hialurónico, mientras que el mismo es capaz de prevenirlo sobre las células cuya proliferación es prodrómica a reparación de tejidos.

También se comprobó que el efecto inhibidor de la proliferación celular no cambia la migración fisiológica de los fibroblastos dérmicos incluso cuando se usa chitlac a una concentración más alta donde el efecto inhibidor de la

proliferación es más significativo. Por lo tanto, este proceso no afecta negativamente al proceso de reparación de tejidos.

5 Sin querer limitarse a ninguna teoría, se puede hipotetizar que los dos polisacáridos intervienen en los procesos de reparación y remodelado celular a través de mecanismos diferenciados y por tanto su combinación da como resultado una modulación de los procesos de proliferación celular útil para inducir la reparación de tejidos, previniendo los procesos fibróticos por una sobreproducción de colágeno.

10 En un aspecto, la presente invención por lo tanto se relaciona con una composición de polisacárido que comprende ácido hialurónico y un derivado de oligosacárido de quitosano con lactosa obtenida por una reacción de aminación reductora de D-glucosamina que tiene un grado de sustitución del grupo funcional amina de la misma con lactosa de al menos un 40 % para uso en la reparación de tejidos y en la inhibición de procesos fibróticos a través de la modulación de la proliferación celular, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 Como es sabido, los dos polisacáridos tienen buenas propiedades de solubilidad en agua y son compatibles entre sí, ya que las soluciones acuosas de los mismos al mezclarse no dan lugar a precipitados en forma de coacervados, con separación de fases, debido a las interacciones entre grupos aniónicos de ácido hialurónico y grupos catiónicos de residuos amino aún presentes en el derivado de oligosacárido obtenido a partir de quitosano y lactosa (chitlac). En cambio, dan composiciones, especialmente soluciones caracterizadas por viscosidad y viscoelasticidad, en donde el ácido hialurónico es una matriz en la que el derivado de oligosacárido chitlac está disperso homogéneamente.

20 En determinadas realizaciones, el quitosano utilizado para obtener el derivado de oligosacárido con lactosa (chitlac) se obtiene de diversas fuentes naturales (por ejemplo, mediante desacetilación de quitina) o con métodos de tecnología recombinante y tiene un peso molecular promedio (en lo sucesivo, MW) de hasta 1,000 kDa. El peso molecular promedio del quitosano de partida está preferiblemente en el intervalo de 500 kDa a 700 kDa y más preferiblemente entre 200 y 400 kDa. Dicho quitosano tiene preferentemente un grado de desacetilación de hasta el 90 % y el preferido tiene un grado de acetilación residual de entre el 10 y 20 %.

25 Además, para los fines de la presente invención, el grado de sustitución de los grupos amino del quitosano D-glucosamina con lactosa es de al menos el 40 %. Preferentemente, el grado de sustitución de los grupos amino del quitosano con dicho oligosacárido está en el intervalo del 50 % al 70 % y más preferentemente es 60 %. En cuanto al ácido hialurónico, también este polisacárido se puede obtener de diversas fuentes naturales o con métodos de tecnología recombinante vía fermentación. Sin embargo, el peso molecular promedio de este polisacárido es significativo y para los fines de la invención no es superior a 2,000 kDa y está comprendido entre 1,000 kDa y 1,600 kDa, para tener, tras la esterilización por calor húmedo, un proceso que, como se conoce, provoca cierta degradación del biopolímero, un ácido hialurónico con un peso molecular de entre 800 kDa y 1,000 kDa.

El aspecto más importante de las composiciones de polisacáridos objeto de la invención es el contenido de los dos polisacáridos porque, como se ha observado experimentalmente, este contenido tiene un efecto significativo para lograr los fines de la invención.

35 En particular, el ácido hialurónico en las composiciones de polisacáridos utilizados con fines reparadores y para la prevención de procesos fibróticos está en una concentración de 10 a 20 mg/ml (1-2 % p/v) y el derivado de oligosacárido chitlac de 2.5 a 7.5 mg/ml (0.25 %-0.75 p/v). Preferiblemente, el ácido hialurónico es de 10 mg/ml o 12.5 mg/ml y el chitlac es de 2.5 a 7.5 mg/ml. En la realización preferida, el ácido hialurónico es de 10 mg/ml mientras que el chitlac puede oscilar entre 2.5 a 5 mg/ml dependiendo de los efectos deseados.

40 De acuerdo con algunas realizaciones, las composiciones de la invención se utilizan para promover la reparación de tejidos y/o prevenir procesos fibróticos en lesiones tisulares traumáticas y posquirúrgicas y procesos fibróticos crónicos asociados a enfermedades autoinmunes. Dichos usos están dirigidos preferentemente a la reparación de tejidos y prevención de procesos fibróticos que involucran principalmente tejidos seleccionados de dermis cutánea, tejidos endoteliales abdominales, tendones y cartílagos.

45 En particular, uno de los usos es en secuelas traumáticas y posquirúrgicas que involucran la dermis y tejidos abdominales. Otros usos más se encuentran en secuelas posquirúrgicas de tendones y tejidos cartilaginosos y procesos fibróticos asociados a enfermedades autoinmunes que afectan a la dermis y tejidos cartilaginosos, más preferentemente seleccionadas de psoriasis y osteoartritis psoriásica.

50 En determinadas realizaciones, las composiciones objeto de la invención se utilizan en combinación con otros ingredientes y/o disolventes adecuados para uso farmacéutico para la preparación de biomateriales, aptos para ser administrados por vía tópica, intradérmica o intraarticular como soluciones acuosas, tela no tejida, membranas, hidrogeles o preparados obtenidos mediante liofilización.

Ejemplos

Las pruebas experimentales descritas en los ejemplos siguientes se realizaron utilizando los siguientes polisacáridos:

Ácido hialurónico (HA): 1-1.6 MDa (1000-1600 kDa) de grado farmacéutico apropiado para administración intraarticular e intraocular obtenido por biofermentación;

Clorhidrato de Chitlac (CTL): El clorhidrato de chitlac se obtuvo mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso a una solución de Chitlac en agua hasta que se alcanzó un pH de 2.5.

- 5 Posteriormente, la sal del polímero se precipitó con metanol, se filtró sobre un filtro de vidrio sinterizado (gooch) y el sólido recolectado se lavó con metanol (3x) y se secó. El chitlac utilizado para la preparación de sal se caracteriza por un grado de sustitución de lactosa entre 50 y 70 % y se obtuvo a partir de un quitosano de 200-400 kDa con un grado de acetilación residual de aproximadamente el 15 %.

- 10 Se prepararon soluciones madre de polisacáridos de título conocido usando agua para soluciones inyectables como se describe a continuación.

Ácido Hialurónico al 1 % en PBS 1X: Se disolvieron 800 mg de ácido hialurónico en 72 ml de agua para preparaciones inyectables. A la solución así obtenida se le añadieron 8 mL de regulador fosfato salino 10X (PBS 10 X: NaCl 1370 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 81 mM, NaH₂PO₄ 17.6 mM) y luego esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos (EP 5.1.1).

- 15 Chitlac al 1 % en PBS 1X: Se disolvieron 800 mg de clorhidrato de chitlac en 69.04 mL de agua para soluciones inyectables y a la solución se le añadieron gota a gota 2.96 mL de NaOH 0.5 M. A continuación, se añadió a la solución 8 ml de regulador de fosfato salino 10X (PBS 10 X: NaCl 1370 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 81 mM, NaH₂PO₄ 17.6 mM) y posteriormente esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos (EP 5.1.1).

Ejemplo 1: ensayo sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos

- 20 Se aislaron fibroblastos humanos de muestras de piel de donantes sanos (57-62 años) sometidos a cirugía plástica.

En resumen, la piel se colocó durante 1 hora en PBS estéril con penicilina al 3 % y estreptomycin, para romper la carga bacteriana. Posteriormente, las muestras se cortaron en pequeños trozos y se colocaron en una solución de dispasa II (2.5 mg/ml de HBSS, solución salina equilibrada de Hank) durante 4 horas a 37°C, para obtener el desprendimiento del epitelio de la dermis subyacente. Los fragmentos de dermis se digirieron con collagenasa I (80 U/ml en HBSS) durante 12 horas en una incubadora a 37°C, pCO₂ al 5 %. La digestión se bloqueó con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FCS), glutamina 4 mM, 100 UI/ml de penicilina/estreptavidina y la suspensión se filtró y centrifugó a 1200 rpm. Los fibroblastos presentes en el sedimento se resuspendieron en medio DMEM completo y se sembraron en placas de cultivo estériles en incubadora a 37°C, con un porcentaje de CO₂ del 5 % y una humedad relativa del 90 %.

- 30 El fenotipo celular se confirmó observando la forma de las células en el microscopio óptico invertido y mediante análisis inmunocitoquímico para prolil-4-hidroxilasa. El medio se cambió cada dos días y los cultivos confluentes se separaron del fondo de la placa con una solución de tripsina al 0.05 % y EDTA al 0.02 % y posteriormente se dividieron en 1:3. Para los experimentos se utilizaron células del tercer al quinto pase.

- 35 Los fibroblastos se sembraron a una concentración de 2500 células por pozo en una placa de 48 pozos. Al día siguiente de la siembra, las células se trataron con las sustancias bajo estudio a las siguientes concentraciones: (HA) 0.1 a 1.25 mg/ml de ácido hialurónico; 0.1 a 1.0 mg/ml de Chitlac (CTL); una mezcla de HA y CTL, que consiste en una concentración fija de 1.25 mg/ml de HA y cantidades crecientes de CTL (0.1 a 1.0 mg/ml). El medio se renovó cada dos días con las sustancias bajo análisis. Los efectos del tratamiento sobre la viabilidad celular se analizaron después de 1 día, 3 días, 6 días mediante ensayo de bromuro de MTT (4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, de acuerdo con el método de Denizot y Lang (Denizot et al., J Immunol Meth, 1986, 89, 271-277). Este ensayo mide la actividad del succinato deshidrogenasa presente en las mitocondrias celulares y se basa en la reducción del bromuro de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol a sales de formazona insolubles. La cantidad de sales de formazona producida se determina por espectrofotometría y es proporcional a la cantidad de enzima y, por tanto, indirectamente, al número de células vitales.

- 45 En resumen, después de retirar el medio de cultivo, las monocapas celulares se lavaron con PBS y se añadió la solución de MTT durante 3 horas a 37°C. Al final de la incubación, se eliminó el MTT y se reemplazó con una solución de extracción (isopropanol al 90 %, DMSO al 10 %) durante 15 minutos a 37°C. La medida de la absorbancia se realizó con un espectrofotómetro a 570 nm.

- 50 El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de dos colas y las diferencias con un valor de prueba t <0.05 se consideraron significativas.

Se prepararon experimentos triples y se realizaron tres veces.

La Figura 1A y la Tabla 1A muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con ácido hialurónico a las concentraciones mencionadas.

Tabla 1A

	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control	0.134	0.017	0.274	0.033	0.678	0.161
0.1 mg/ml	0.135	0.01	0.284	0.039	0.637	0.027
0.25 mg/ml	0.118	0.003	0.285	0.013	0.696	0.002
0.5 mg/ml	0.131	0.01	0.276	0.006	0.713	0.009
1 mg/ml	0.122	0.006	0.301	0.006	0.731	0.44
1.5 mg/ml	0.124	0.004	0.275	0.014	0.752	0.023

La Figura 1B y la Tabla 1B muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con chitlac a las concentraciones mencionadas.

Tabla 1B

	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control	0.116	0.004	0.271	0.015	0.662	0.003
0.1 mg/ml	0.121	0.013	0.266	0.025	0.598	0.058
0.25 mg/ml	0.133	0.018	0.289	0.027	0.554	0.026
0.5 mg/ml	0.139	0.011	0.274	0.027	0.512	0.031
1 mg/ml	0.130	0.008	0.270	0.011	0.406	0.043
1.5 mg/ml	0.127	0.002	0.282	0.009	0.370	0.024

5

La Figura 1C y la Tabla 1C muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con ácido hialurónico a una concentración de 1.25 mg/ml y chitlac a concentraciones crecientes de 0.1 a 1.0 mg/ml a las concentraciones mencionadas.

Tabla 1C

CHITLAC	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control	0.100	0.002	0.300	0.001	0.627	0.002
0.1 mg/ml	0.114	0.008	0.273	0.021	0.579	0.006
0.25 mg/ml	0.129	0.016	0.289	0.002	0.471	0.025
0.5 mg/ml	0.127	0.012	0.241	0.046	0.401	0.028
0.75 mg/ml	0.122	0.003	0.238	0.029	0.345	0.039
1.0 mg/ml	0.122	0.008	0.231	0.043	0.328	0.014

10

Ejemplo 2: Ensayo de proliferación de condrocitos de cartílago articular

Se han aislado condrocitos humanos de una biopsia de cartílago tomada de pacientes sometidos a cirugía para reemplazar el cartílago de la rodilla.

La biopsia se cortó finamente y luego se transfirió a una solución de tripsina al 0.25 % durante 15 minutos a 37°C. Al final, el cartílago se transfirió a una solución de collagenasa de 1 300 U/ml durante 12 horas en una incubadora a 37°C, pCO₂ al 5 %. Después de la filtración, la solución se centrifugó a 1200 rpm y las células del sedimento se resuspendieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) completado con suero bovino fetal (FCS) al 10 %, glutamina 4 mM, 100 UI/ml de penicilina/estreptavidina, en presencia de 50 mg/ml de ácido ascórbico. Las células se mantuvieron en cultivo cambiando el medio cada dos días. En la confluencia, las células se separaron del fondo de la placa de cultivo con una solución de tripsina al 0.05 % y EDTA al 0.02 %, se dividieron en 1:3 y se usaron para los experimentos de la segunda a la tercera etapa.

Los condrocitos se sembraron a una concentración de 3000 células por pozo en una placa de 48 pozos. Al día siguiente de la siembra, las células se trataron con las sustancias bajo estudio a las siguientes concentraciones: 0.1 a 1.5 mg/ml de CTL; 0.1 a 1.25 mg/ml de HA; una mezcla de HA y CTL, que consta de una concentración fija (0.5 mg/ml, 1 mg/ml o 1.25 mg/ml) de HA y cantidades variables de CTL. El medio se renovó cada dos días con las sustancias bajo análisis.

25

Los efectos del tratamiento sobre la viabilidad celular se analizaron después de 1 día, 3 días, 6 días mediante ensayo de bromuro de MTT (4-5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, de acuerdo con el método de Denizot y Lang como en el ejemplo anterior.

- 5 En resumen, después de retirar el medio de cultivo, las monocapas celulares se lavaron con PBS y se añadió la solución de MTT durante 3 horas a 37°C. Al final de la incubación, se eliminó el MTT y se reemplazó con una solución de extracción (isopropanol al 90 %, DMSO al 10 %) durante 15 minutos a 37°C. La medida de la absorbancia se realizó con un espectrofotómetro a 570 nm.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de dos colas y las diferencias con un valor de prueba $t < 0.05$ se consideraron significativas.

- 10 Se prepararon experimentos triples y se realizaron tres veces.

La Figura 2A y la Tabla 2A muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular después de la incubación y 1, 3 y 6 días con ácido hialurónico a las concentraciones mencionadas.

Tabla 2A

	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control	0.069	0.012	0.169	0.019	0.250	0.024
0.25 mg/ml	0.086	0.003	0.173	0.016	0.278	0.007
0.5 mg/ml	0.091	0.009	0.177	0.005	0.264	0.017
0.75 mg/ml	0.087	0.011	0.145	0.008	0.251	0.001
1 mg/ml	0.081	0.006	0.135	0.019	0.226	0.005
1.25 mg/ml	0.087	0.008	0.146	0.011	0.235	0.004

- 15 La Figura 2B y la Tabla 2B muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con chitlac a las concentraciones mencionadas.

Tabla 2B

	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control	0.066	0.008	0.178	0.011	0.426	0.020
0.1 mg/ml	0.065	0.006	0.170	0.019	0.402	0.24
0.25 mg/ml	0.067	0.007	0.169	0.018	0.313	0.014
0.5 mg/ml	0.065	0.002	0.180	0.016	0.266	0.009
1 mg/ml	0.076	0.008	0.166	0.026	0.199	0.009
1.5 mg/ml	0.064	0.009	0.131	0.021	0.218	0.004

- 20 La Figura 2C y la Tabla 2C muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con ácido hialurónico a una concentración de 0.5 mg/ml y chitlac a concentraciones crecientes de 0.1 a 1.5 mg/ml a las concentraciones mencionadas.

Tabla 2C

CHITLAC	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control (0 mg)	0.076	0.009	0.12	0.09	0.212	0.010
0.1 mg/ml	0.081	0.007	0.132	0.001	0.179	0.024
0.25 mg/ml	0.089	0.007	0.125	0.001	0.173	0.026
0.5 mg/ml	0.094	0.005	0.0106	0.007	0.158	0.014
1 mg/ml	0.085	0.005	0.0119	0.001	0.130	0.005
1.5 mg/ml	0.087	0.007	0.097	0.007	0.115	0.010

La Figura 2D y la Tabla 2D muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con ácido hialurónico a una concentración de 1.0 mg/ml y chitlac a concentraciones crecientes de 0.1 a 1.0 mg/ml a las concentraciones mencionadas.

Tabla 2D

CHITLAC	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control (0 mg)	0.085	0.003	0.173	0.008	0.23	0.016
0.1 mg/ml	0.09	0.001	0.148	0.013	0.265	0.006
0.25 mg/ml	0.094	0.007	0.165	0.007	0.267	0.008
0.5 mg/ml	0.097	0.01	0.151	0.017	0.277	0.1019
0.75 mg/ml	0.088	0.009	0.162	0.004	0.277	0.067
1.0 mg/ml	0.092	0.01	0.154	0.015	0.232	0.585

5

La Figura 2E y la Tabla 2E muestran los resultados obtenidos sobre proliferación celular con ácido hialurónico a una concentración de 1.25 mg/ml y chitlac a concentraciones crecientes de 0.1 a 1.0 mg/ml a las concentraciones mencionadas.

Tabla 2E

CHITLAC	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control (0 mg)	0.089	0.006	0.149	0.005	0.29	0.003
0.1 mg/ml	0.093	0.002	0.147	0.004	0.313	0.016
0.25 mg/ml	0.099	0.015	0.176	0.008	0.312	0.004
0.5 mg/ml	0.094	0.006	0.175	0.021	0.264	0.037
0.75 mg/ml	0.100	0.041	0.176	0.019	0.271	0.008
1.0 mg/ml	0.092	0.007	0.166	0.013	0.229	0.012

10

Ejemplo 3: ensayo sobre la proliferación de sinoviocitos de la sinovia humana

Se obtuvieron sinoviocitos humanos de sinovias de pacientes sometidos a cirugía para reparar ligamentos.

Las células se extrajeron por tratamiento con una primera solución de colagenasa I de 40U/ml durante 12 horas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5 % y 90 % de porcentaje de humedad. Se bloqueó la acción enzimática agregando el medio DMEM completo, la solución filtrada y centrifugada a 1200 rpm. Las células del sedimento se resuspendieron en DMEM, suero de ternera fetal al 10 %, glutamina 4 mM, 100 UI/ml de penicilina/estreptavidina y se sembraron sobre placas de cultivo estériles en una incubadora a 37°C, con CO₂ al 5 % y humedad relativa del 90 %. El fenotipo celular se confirmó por análisis morfológico con microscopía óptica y por análisis inmunocitoquímico para prolil-4-hidroxilasa. El medio se cambió cada dos días y los cultivos confluentes se separaron con una solución de tripsina al 0.05 % y EDTA al 0.02 % y se pasaron a nuevas placas dividiéndolas 1:3. Para los experimentos se utilizaron células del cuarto al sexto pase.

Los sinoviocitos se sembraron a una concentración de 3000 células por pozo en una placa de 48 pozos. Al día siguiente de la siembra, las células se trataron con las sustancias bajo estudio a las siguientes concentraciones: 0.1 a 1 mg/ml de CTL; 0.1 a 1.25 mg/ml de HA; una mezcla de HA y CTL, que consta de una concentración fija (0.5 mg/ml, 1 mg/ml o 1.25 mg/ml) de HA y cantidades variables de CTL. El medio se renovó cada dos días con las sustancias bajo análisis.

Los efectos del tratamiento sobre la viabilidad celular se analizaron después de 1 día, 3 días, 6 días mediante el ensayo de bromuro de MTT (4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, de acuerdo con el método de Denizot y Lang como se describe en el ejemplo 1.

En resumen, después de retirar el medio de cultivo, las monocapas celulares se lavaron con PBS y se añadió la solución de MTT durante 3 horas a 37°C. Al final de la incubación, se eliminó el MTT y se reemplazó con una solución de extracción (isopropanol al 90 %, DMSO al 10 %) durante 15 minutos a 37°C. La medida de la absorbancia se realizó con un espectrofotómetro a 570 nm.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de dos colas y las diferencias con un valor de prueba t <0.05 se consideraron significativas.

Se prepararon experimentos triples y se realizaron tres veces.

La Figura 3A y la Tabla 3A muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con ácido hialurónico a las concentraciones mencionadas.

Tabla 3A

	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control	0.116	0.012	0.234	0.010	0.370	0.028
0.25 mg/ml	0.140	0.005	0.218	0.009	0.373	0.010
0.5 mg/ml	0.134	0.016	0.208	0.011	0.357	0.006
0.75 mg/ml	0.132	0.023	0.229	0.012	0.302	0.011
1 mg/ml	0.139	0.014	0.227	0.016	0.274	0.023
1.25 mg/ml	0.124	0.018	0.211	0.003	0.280	0.003

5 La Figura 3B y la Tabla 3B muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con chitlac a las concentraciones mencionadas.

Tabla 3B

	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control	0.090	0.005	0.183	0.015	0.319	0.005
0.1 mg/ml	0.096	0.007	0.195	0.020	0.303	0.023
0.25 mg/ml	0.092	0.006	0.154	0.011	0.282	0.020
0.5 mg/ml	0.087	0.007	0.132	0.011	0.257	0.004
1 mg/ml	0.093	0.012	0.114	0.011	0.184	0.008
1.5 mg/ml	0.087	0.009	0.117	0.002	0.166	0.026

10 La Figura 3C y la Tabla 3C muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con ácido hialurónico a una concentración de 0.5 mg/ml y chitlac a concentraciones crecientes de 0.1 a 1.5 mg/ml a las concentraciones mencionadas.

Tabla 3C

CHITLAC	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control (0 mg)	0.086	0.016	0.142	0.014	0.227	0.003
0.1 mg/ml	0.092	0.009	0.141	0.007	0.211	0.012
0.25 mg/ml	0.095	0.003	0.134	0.019	0.226	0.016
0.5 mg/ml	0.091	0.001	0.120	0.015	0.177	0.009
1 mg/ml	0.080	0.001	0.105	0.006	0.148	0.012
1.5 mg/ml	0.079	0.007	0.107	0.008	0.124	0.009

15 La Figura 3D y la Tabla 3D muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con ácido hialurónico a una concentración de 1.0 mg/ml y chitlac a concentraciones crecientes a las concentraciones mencionadas.

Tabla 3D

CHITLAC	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control (0 mg)	0.102	0.003	0.224	0.013	0.487	0.001
0.1 mg/ml	0.109	0.001	0.217	0.006	0.46	0.014
0.25 mg/ml	0.108	0.001	0.202	0.008	0.410	0.007
0.5 mg/ml	0.107	0.006	0.211	0.012	0.401	0.011
0.75 mg/ml	0.113	0.009	0.208	0.012	0.367	0.023
1 mg/ml	0.104	0.007	0.205	0.007	0.372	0.010

La Figura 3E y la Tabla 3E muestran los resultados obtenidos sobre la proliferación celular con ácido hialurónico a una concentración de 1.25 mg/ml y chitlac a concentraciones crecientes a las concentraciones mencionadas.

Tabla 3E

CHITLAC	24 horas	SD	3 días	SD	6 días	SD
Control (0 mg)	0.101	0.006	0.228	0.024	0.535	0.021
0.1 mg/ml	0.108	0.005	0.206	0.013	0.476	0.002
0.25 mg/ml	0.114	0.004	0.208	0.007	0.409	0.011
0.5 mg/ml	0.106	0.003	0.199	0.013	0.385	0.008
0.75 mg/ml	0.104	0.003	0.201	0.013	0.381	0.001
1 mg/ml	0.108	0.008	0.197	0.011	0.346	0.008

5 Ejemplo 4: ensayo sobre la migración de fibroblastos dérmicos in vitro: prueba de rayado

La influencia del tratamiento con HA y CTL sobre la velocidad de migración y proliferación de fibroblastos cultivados se evaluó en células preparadas como se describe en el Ejemplo 1 y se llevaron a semiconfluencia en placas de cultivo celular de 6 pozos. La monocapa celular se cortó para dividirla en dos partes y luego se trató con las sustancias estudiadas solas (HA a una concentración de 1 mg/ml; CTL a una concentración de 0.75 mg/ml) o con la mezcla de 1 mg/ml de HA y CTL a una concentración de 0.75 mg/ml). El cierre del intervalo creado en la monocapa celular se monitorizó en el microscopio óptico 48 y 72 horas después del tratamiento. Se prepararon experimentos triples y se realizaron tres veces.

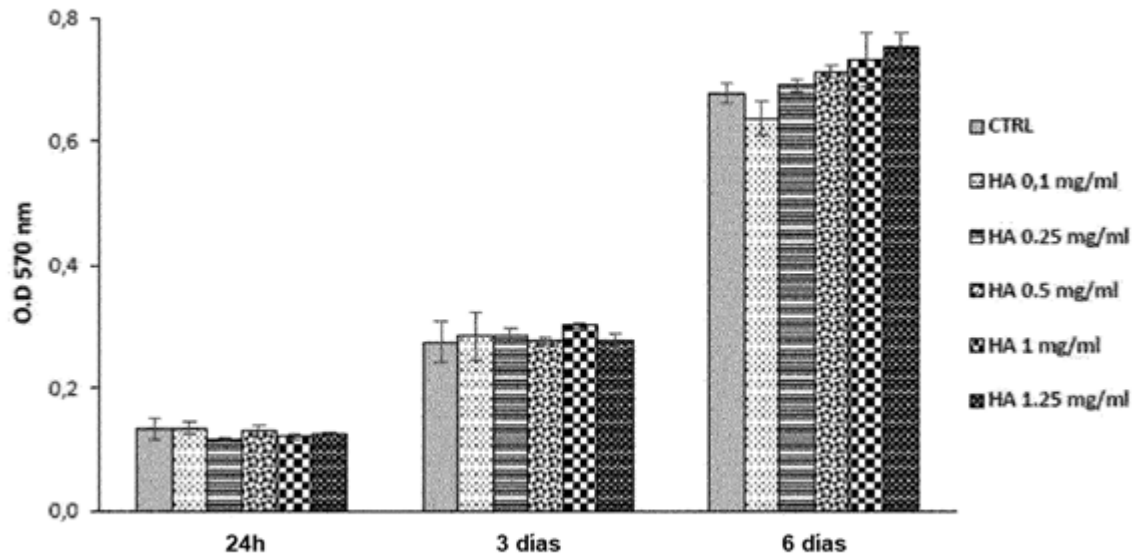
Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4A como % de la velocidad de migración celular en el tiempo, mientras que en la Figura 4B los resultados se reportan como proceso de cierre del corte en μm en el tiempo después de 48 y 72 horas.

REIVINDICACIONES

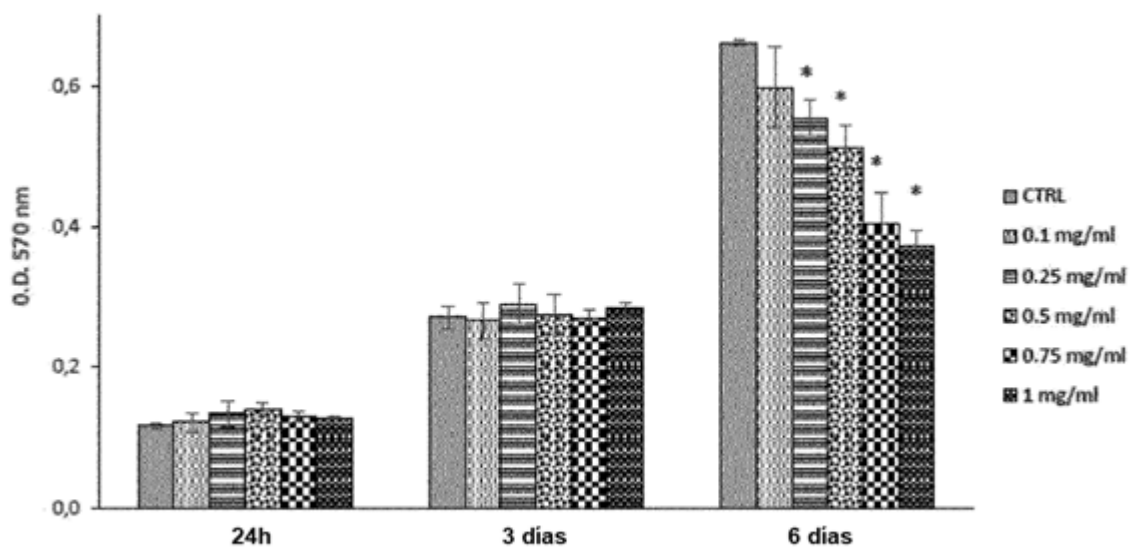
- 5 1. Una composición de polisacárido que comprende ácido hialurónico y un oligosacárido derivado de quitosano con lactosa obtenido por una reacción de aminación reductora de D-glucosamina que tiene un grado de sustitución del grupo funcional amina del mismo con lactosa de al menos 40 % para uso en reparación de tejidos y/o en la prevención de fibrosis y/o adherencias, a través de la inhibición de la proliferación celular, donde la célula es fibroblasto o sinoviocitos, mientras se previene la inhibición de la proliferación de condrocitos, que es prodrómica para la reparación de tejidos.
2. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido hialurónico es una matriz en la que se dispersa homogéneamente el derivado oligosacárido de quitosano con lactosa.
- 10 3. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido hialurónico es al menos el 1 % en peso y el derivado de oligosacárido de quitosano con lactosa no es superior al 0.75 % en peso.
4. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido hialurónico está en el intervalo comprendido entre 1 y 2 % en peso y el derivado oligosacárido de quitosano con lactosa está en el intervalo comprendido entre 0.25 y 0.75 % en peso.
- 15 5. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el ácido hialurónico es 1 % en peso o 1.25 % en peso.
6. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el derivado de oligosacárido de quitosano con lactosa es 0.25 % en peso o 0.5 % en peso o 0.75 % en peso.
- 20 7. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio de entre 1,000 y 1,600 kDa, o entre 800 y 1,000 kDa.
8. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el quitosano del derivado de oligosacárido con lactosa tiene un peso molecular promedio de entre 500 y 600 kDa, o entre 200 y 400 kDa.
9. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de oligosacárido de quitosano con lactosa tiene un grado de sustitución comprendido entre 50 y 70 %.
- 25 10. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el derivado oligosacárido de quitosano con lactosa es una sal clorhidrato, que tiene un grado de reemplazo de lactosa entre 50 y 70 % y se obtiene a partir de un quitosano de 200-400 kDa con un grado de acetilación residual de aproximadamente el 15 %, y en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio de entre 1,000 y 1,600 kDa.
- 30 11. La composición de polisacáridos para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uso es en procesos tisulares traumáticos y/o posquirúrgicos y/o procesos fibróticos crónicos asociados a enfermedades autoinmunes.
12. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el uso es en secuelas traumáticas y posquirúrgicas que afectan a la dermis y los tejidos abdominales.
- 35 13. La composición de polisacáridos para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el uso es en secuelas posquirúrgicas de tendones y/o tejidos cartilaginosos.
14. La composición de polisacárido para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el uso es en procesos fibróticos asociados a enfermedades autoinmunes que afectan a la dermis y/o tejidos cartilaginosos.
15. La composición de polisacáridos para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dichas enfermedades autoinmunes se seleccionan de psoriasis y osteoartritis psoriásica.

40

FIGURA 1
1A



1B



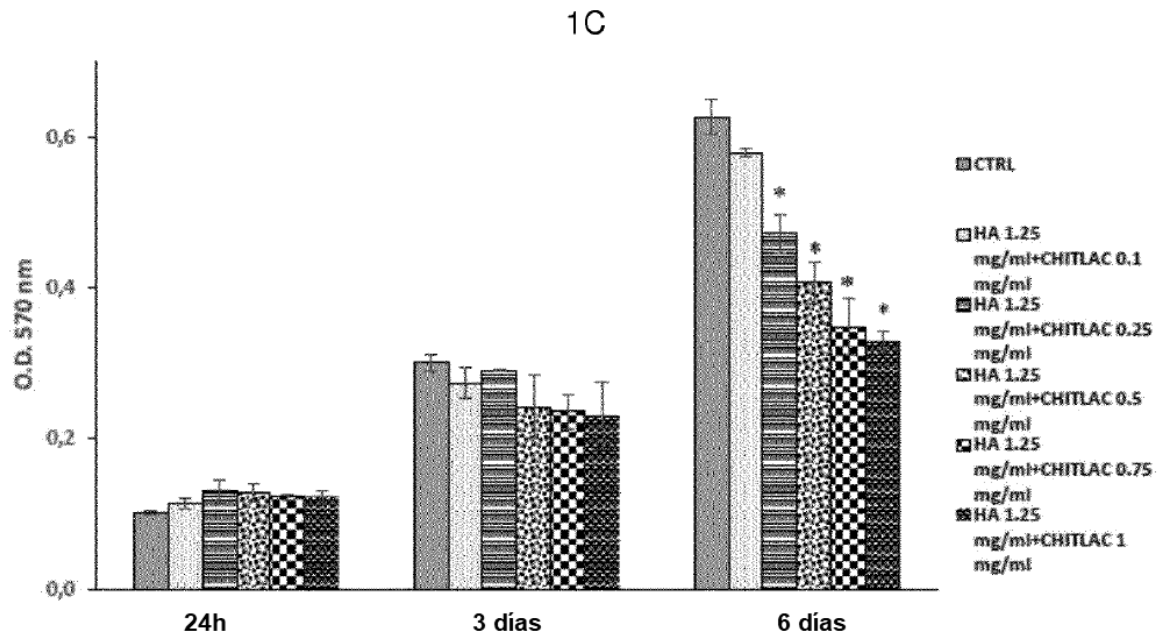
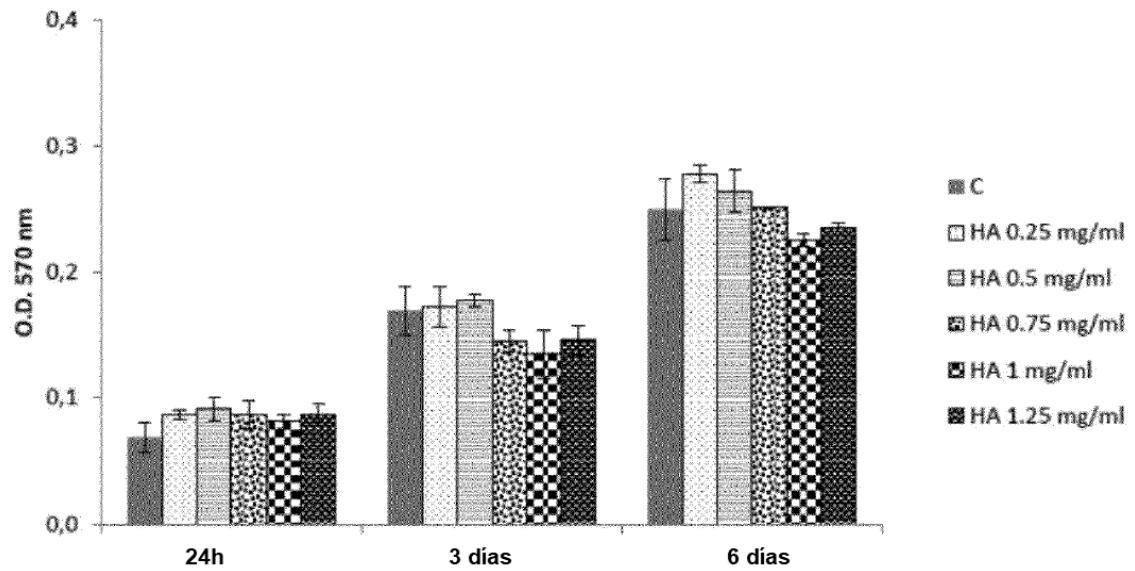
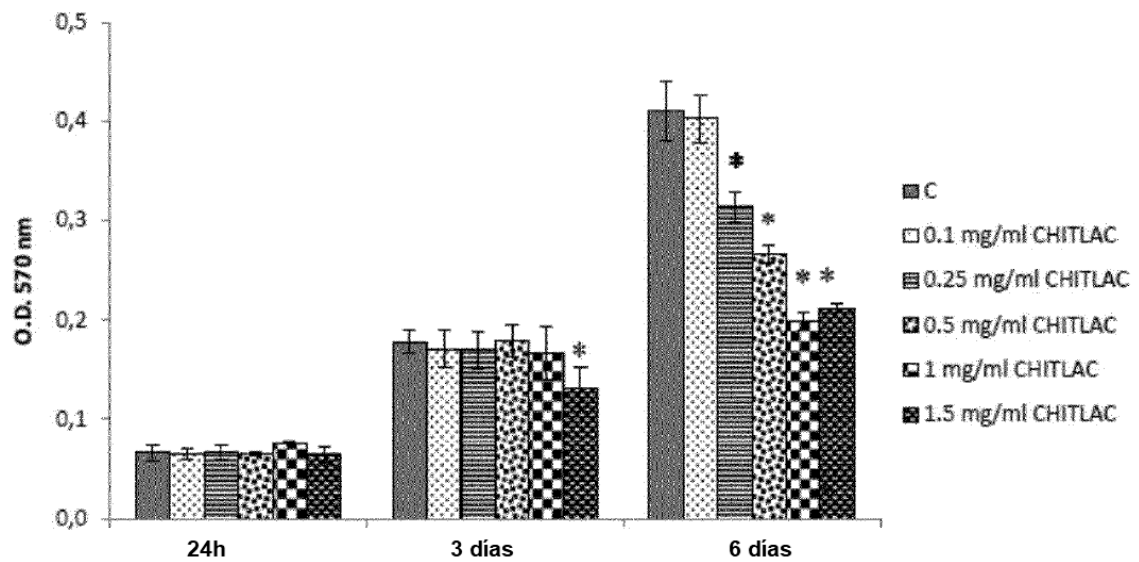


FIGURA 2

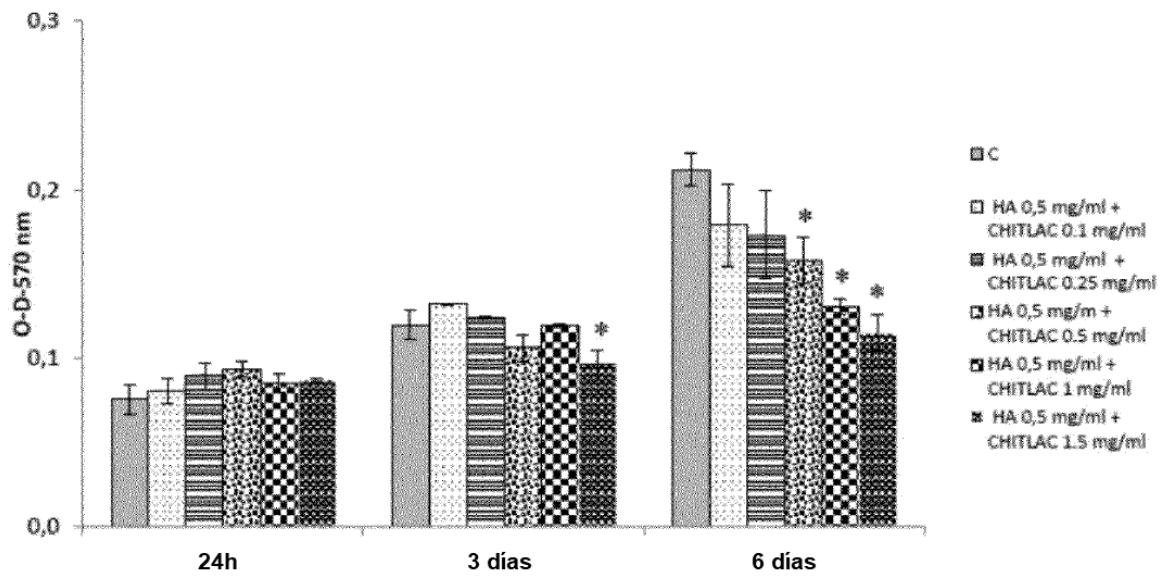
2A



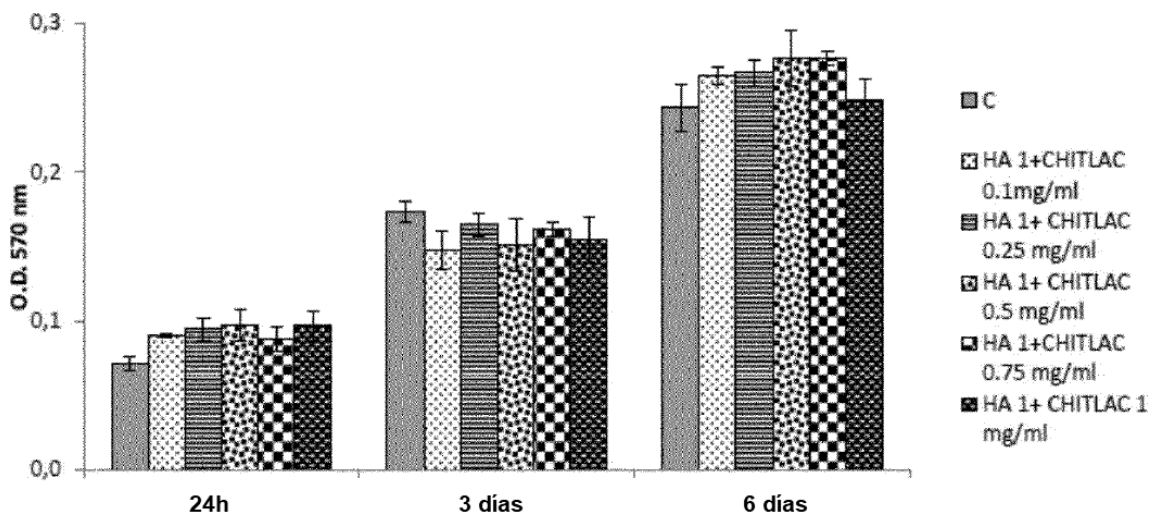
2B



2C



2D



2E

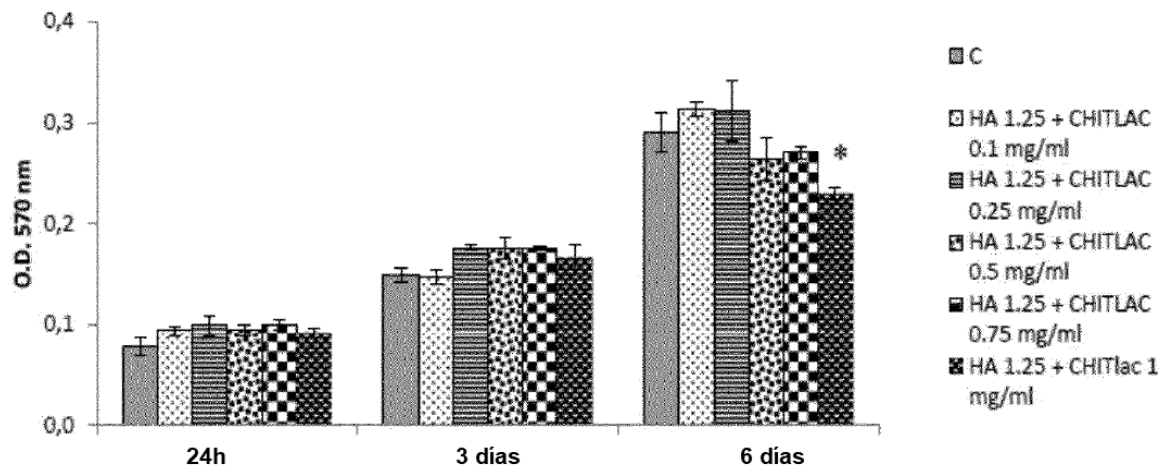
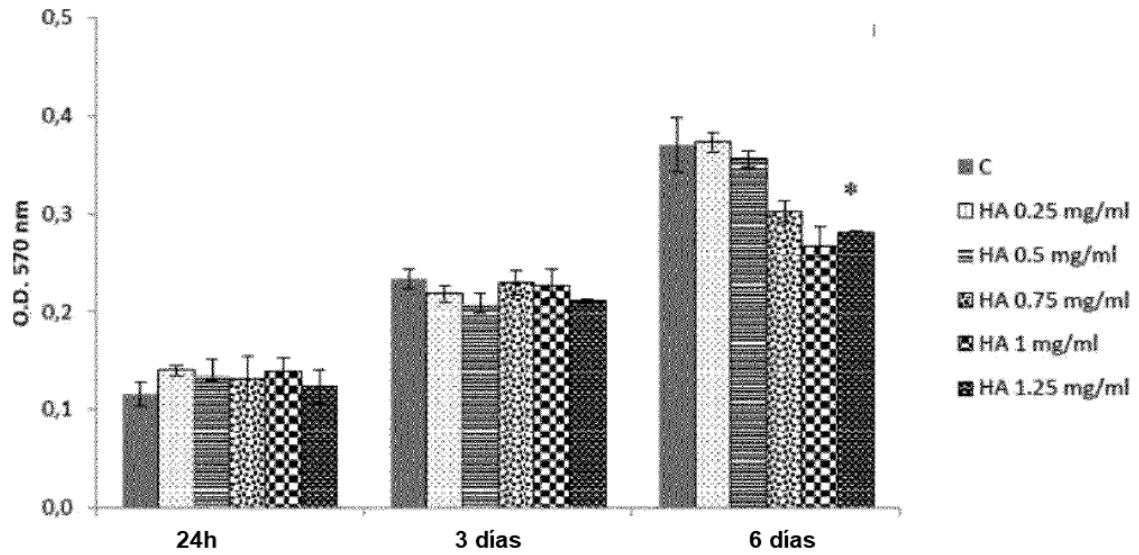
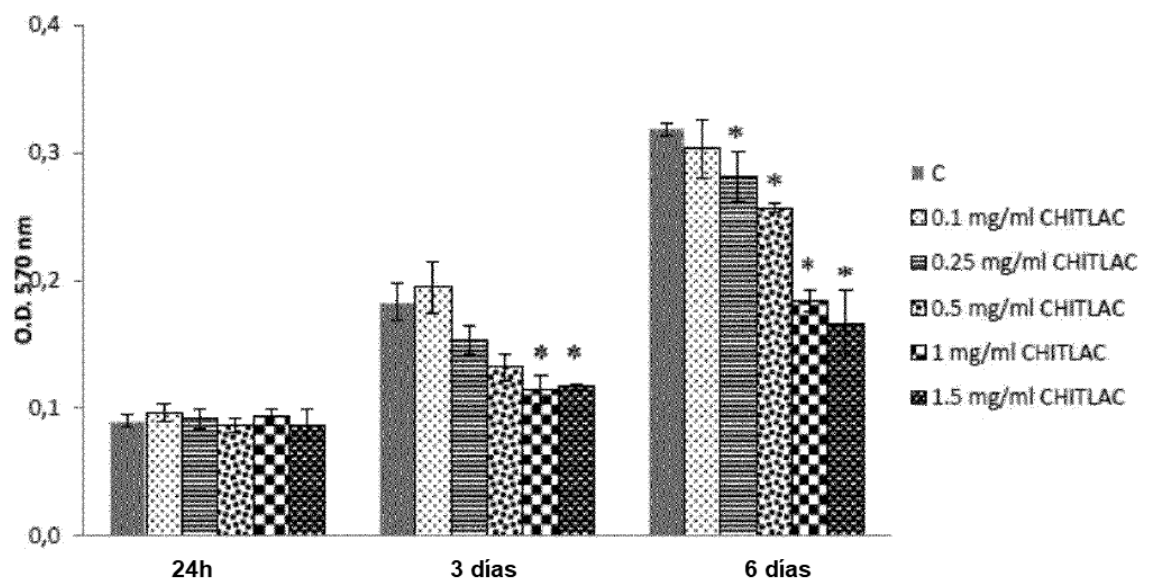


FIGURA 3

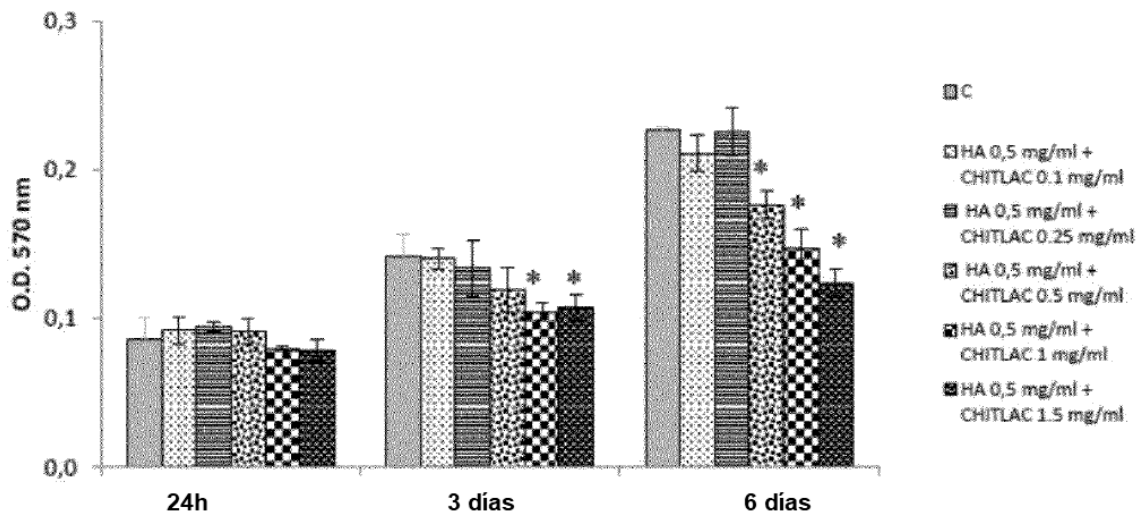
3A



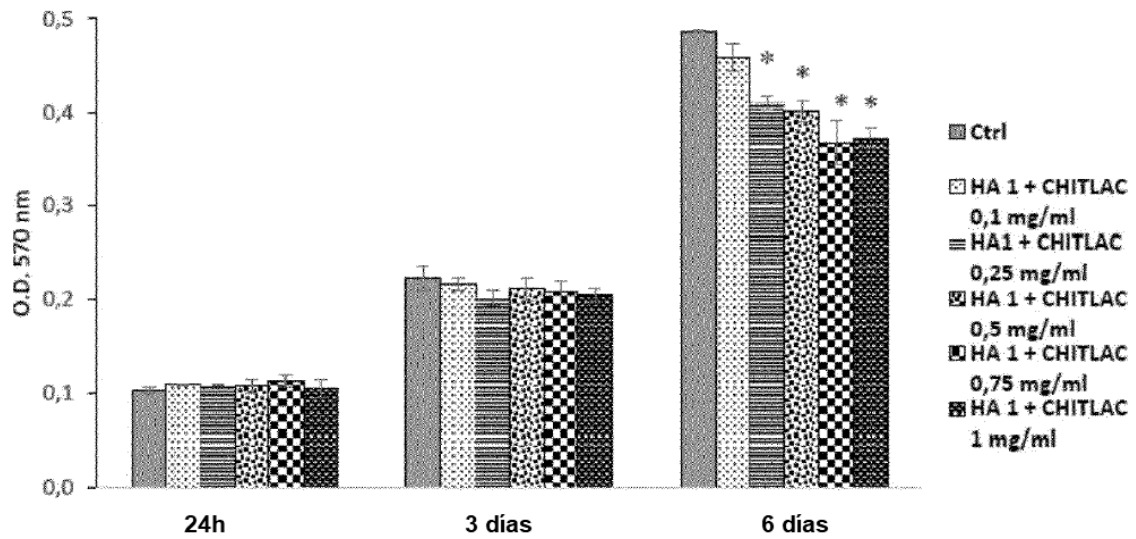
3B



3C



3D



3E

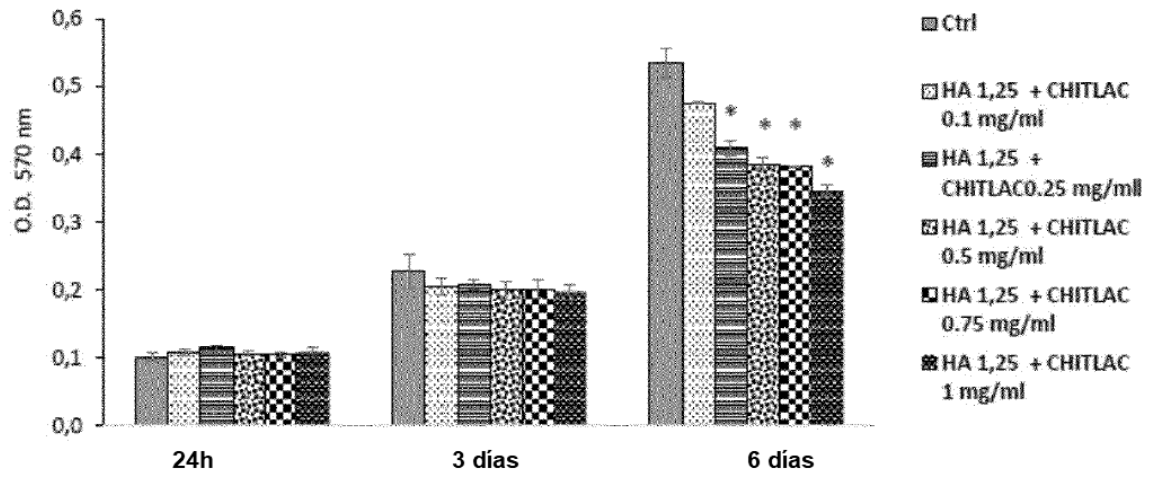
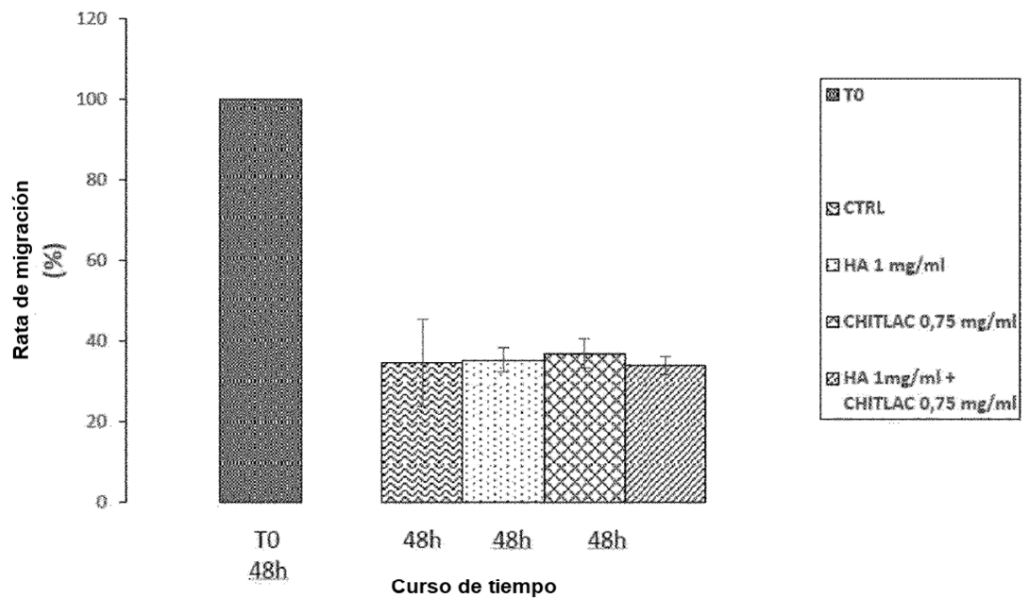


FIGURA 4

4A



4B

