



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 267 145**

⑮ Int. Cl.:

**A61L 24/00** (2006.01)

**A61L 27/00** (2006.01)

**A61L 27/22** (2006.01)

**A61L 27/44** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **97932329 .2**

⑯ Fecha de presentación : **24.06.1997**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **0912204**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.1999**

⑭ Título: **Composiciones para el tratamiento y reparación de defectos en el cartílago usando una barrera funcional.**

⑯ Prioridad: **28.06.1996 US 672618**

⑯ Titular/es: **Robert Francis Shaw  
The Shaw Group  
336 Bon Air Center, No. 407  
Greenbrae, California 94904, US**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

⑯ Inventor/es: **Hunziker, Ernst, B.**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

⑯ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 para el tratamiento y reparación de defectos en el cartílago usando una barrera funcional.

5 **Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere al tratamiento y reparación de defectos o lesiones en el cartílago y defectos de espesor en el cartílago. Más concretamente, esta invención se refiere a medicamentos para tratar defectos (utilizados de forma intercambiable en la presente) en el cartílago y a composiciones de reparación del cartílago que comprenden una matriz que contiene un agente antiangiogénico como “barrera funcional” para evitar el recrecimiento de vasos sanguíneos desde el tejido óseo subyacente hacia el interior del nuevo tejido de cartílago. La composición de reparación del cartílago también puede contener uno o más agentes proliferativos y un factor transformante para estimular la proliferación y transformación de células de reparación del cartílago para formar nuevo tejido de cartílago estable. Las composiciones de esta invención son particularmente útiles en el tratamiento de defectos de espesor que aparecen en 10 osteoartritis graves, y en otras enfermedades y traumatismos que producen lesiones en el cartílago.

15 **Antecedentes de la técnica**

Las articulaciones son una de las maneras habituales en las que los huesos del esqueleto se conectan. Los extremos 20 de los huesos articulados normales están cubiertos por tejido de cartílago articular, que permite un movimiento prácticamente sin fricción de los huesos entre sí (L. Weiss, ed., *Cell and Tissue Biology* (Munich, Urban and Schwarsenburg, 1988), p. 247).

El cartílago articular se caracteriza por una organización estructural particular. Consiste en células especializadas 25 (condrocitos) inmersas en un material intercelular (que a menudo se denomina en la bibliografía “matriz del cartílago”) que es rico en proteoglicanos, fibras de colágeno predominantemente de tipo II, otras proteínas y agua (Buckwalter *et al.*, “Articular Cartilage: Injury and Repair”, en *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues* (Park Ridge, III.: American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium, 1987), p. 465). El tejido de cartílago no está inervado ni penetran en su interior los sistemas vascular o linfático. Sin embargo, en las articulaciones maduras de adultos, el 30 tejido óseo subcondrial subyacente, que forma una placa estrecha y continua entre el tejido óseo y el cartílago, está inervado y vascularizado. Por debajo de esta placa ósea, el tejido óseo forma trabéculas, que contienen la médula. En articulaciones inmaduras, bajo el cartílago articular sólo hay trabéculas óseas primarias. Una porción del tejido de menisco en las articulaciones también consiste en cartílago cuya estructura es similar al cartílago articular (Beaupre, A. *et al.*, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, pp. 72-76 (1986)).

35 Se reconocen dos tipos de defectos en la superficie articular, es decir, defectos de espesor y defectos superficiales. Estos defectos se diferencian no sólo en el grado de daño físico al cartílago, sino también en la naturaleza de la respuesta de reparación que puede producir cada tipo de lesión.

40 Los defectos de espesor de una superficie articular incluyen daños al cartílago hialino, la capa de cartílago calcificado y el tejido óseo subcondrial con sus vasos sanguíneos y médula ósea. Los daños al tejido óseo pueden variar desde una fisura o grieta hasta un hueco grande en el tejido óseo. Los defectos de espesor pueden provocar un dolor grave, puesto que la placa ósea contiene terminaciones nerviosas sensoriales. Estos defectos surgen, en general, de 45 traumatismos graves o durante las etapas tardías de una enfermedad de articulaciones degenerativa, como la osteoartritis. A veces, los defectos de espesor pueden conducir al sangrado y la inducción de una reacción de reparación desde el hueso subcondrial (Buckwalter *et al.*, “Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitating Repair”, en *Articular Cartilage and Knee Joint Function. Basic Science and Arthroscopy* (Nueva York, Raven Press, 1990), pp. 19-56). El tejido de reparación formado es un tipo fibroso vascularizado de cartílago con propiedades biomecánicas insuficientes, y no persiste a largo plazo (Buckwalter *et al.* (1990), *supra*).

50 Los defectos superficiales en el tejido de cartílago articular están limitados al tejido de cartílago en sí mismo. Estos defectos son notorios, porque no se curan y no muestran propensión hacia las reacciones de reparación.

55 Los defectos superficiales pueden aparecer como fisuras, muescas o hendiduras en la superficie del cartílago, o pueden tener un aspecto de “carne de cangrejo” en el tejido afectado. No contienen vasos sanguíneos (manchas de sangre), como se observan en los defectos de espesor. Los defectos superficiales pueden no tener causa conocida, pero a menudo son el resultado de desarreglos mecánicos que conducen al desgaste del tejido cartilaginoso. Los desarreglos mecánicos pueden ser provocados por traumatismos en la articulación, por ejemplo, un desplazamiento de tejido de menisco desgarrado hacia la articulación, meniscectomía, una distensión de la articulación por una mala alineación 60 del ligamento desgarrado de las articulaciones, o fractura ósea, o por enfermedades hereditarias. Los defectos superficiales también son característicos de etapas tempranas de enfermedades degenerativas de las articulaciones, como la osteoartritis. Puesto que el tejido de cartílago no está inervado (*Ham's Histology* (9<sup>a</sup> edición) (Filadelfia, J.B. Lippincott Co., 1987), pp. 266-272) o vascularizado, los defectos superficiales no son dolorosos. Sin embargo, aunque no son dolorosos, los defectos superficiales no se curan y a menudo degeneran en defectos de espesor.

65 En general, se cree que debido a que el cartílago articular carece de vasculatura, el tejido de cartílago dañado no recibe estímulos suficientes o apropiados para provocar una respuesta de reparación (Webber *et al.*, “Intrinsic Repair Capabilities of Rabbit Meniscal Fibrocartilage: A Cell Culture Model” (30th Ann. Orthop. Res. Soc., Atlanta, febrero

1984); Webber *et al.* *J. Orthop. Res.*, 3, pp. 36-42 (1985)). La teoría es que los condrocitos en el tejido cartilaginoso normalmente no están expuestos a cantidades suficientes de agentes estimulantes de la reparación, como factores del crecimiento y coágulos de fibrina que están presentes, de forma típica, en tejido vascularizado dañado.

5 Un enfoque que se ha utilizado para exponer tejido de cartílago dañado a estímulos de reparación implica taladrar o raspar el cartílago hasta alcanzar el hueso subcondrial para provocar el sangrado (Buckwalter *et al.* (1990), *supra*). Por desgracia, la respuesta de reparación del tejido a este traumatismo quirúrgico normalmente es comparable al que se observa que se produce de modo natural en los defectos de espesor que provocan sangrado, es decir, la formación de un tipo fibroso de cartílago que muestra propiedades biomecánicas insuficientes y que no persiste a largo plazo 10 (Buckwalter *et al.* (1990), *supra*).

Se ha aislado una diversidad de factores del crecimiento y, en la actualidad, están disponibles para aplicaciones de investigación y biomédicas (véase, por ejemplo, Rizzino, A., *Dev. Biol.*, 130, pp. 411-422 (1988)). Se ha indicado que algunos de estos factores del crecimiento, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) estimulan la 15 formación de moléculas específicas de cartílago, como colágeno de tipo II y proteoglicanos específicos de cartílago en células mesenquimáticas de rata embrionarias *in vitro* (por ejemplo, Seyedin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, pp. 2267-2271 (1985); Seyedin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 261, pp. 5693-5695 (1986); Seyedin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262, pp. 1946-1949 (1987).

20 Además, se ha identificado una serie de factores proteicos que, aparentemente, estimulan la formación de hueso. Estos factores osteogénicos incluyen proteínas morfogenéticas óseas, osteogenina, proteína osteogénica ósea (BOP), TGF- $\beta$ , y proteínas inductoras de hueso recombinantes.

Millones de pacientes han sido diagnosticados con osteoartritis, es decir, que tienen lesiones o defectos degenerativos 25 en su cartílago articular. No obstante, a pesar de que diversos métodos pretenden provocar una respuesta de reparación en el cartílago dañado, ninguno de estos tratamientos ha recibido una aplicación sustancial (Buckwalter *et al.* (1990), *supra*; Knutson *et al.*, *J. Bone and Joint Surg.*, 68-B, p. 795 (1986); Knutson *et al.*, *J. Bone and Joint Surg.*, 67-B, p. 47 (1985); Knutson *et al.*, *Clin. Orthop.*, 191, p. 202 (1984); Marquet, *Clin. Orthop.*, 146, p. 102 (1980)). Y estos tratamientos proporcionan, en general, sólo un alivio temporal. También se ha propuesto que el uso sistémico de 30 "agentes condroprotectores" detiene la progresión de la osteoartritis e induce el alivio del dolor. Sin embargo, no se ha demostrado que estos agentes estimulen la reparación de lesiones o defectos en el tejido de cartílago.

Hasta la fecha, el tratamiento de pacientes que padecen osteoartritis se ha dirigido, en gran medida, al alivio sintomático mediante el uso de analgésicos y agentes antiinflamatorios. Sin un tratamiento que provoque la reparación de 35 los defectos superficiales en el cartílago articular, el cartílago a menudo se desgasta hasta la placa ósea subcondrial. En esta fase de la enfermedad, es decir, la osteoartritis grave, la naturaleza no remitente del dolor y el compromiso significativo de la función a menudo dicta que se extraiga la articulación completa para ser sustituida por una articulación artificial de metal y/o plástico. En la actualidad, se realizan alrededor de medio millón de procedimientos anuales que comprenden la resección de articulaciones y la sustitución por una articulación artificial en rodillas y caderas (véase, 40 por ejemplo, Graves, E.J., "1988 Summary. National Hospital Discharge Survey", *Advanced Data From Vital and Health Statistics*, 185, pp. 1-12 (19 de junio, 1990)). El documento WO 9213565 describe un factor del crecimiento que contiene una matriz para el tratamiento de lesiones de cartílago. El documento US 5382514 describe ensayos de angiogénesis *in vivo* utilizando matriz y compuestos angiogénicos o antiangiogénicos.

45 Por tanto, existe la necesidad de un tratamiento fiable para el tejido de cartílago en defectos superficiales del cartílago, y para el tejido de cartílago y hueso en defectos de espesor, por ejemplo, como los que aparecen en la osteoartritis grave.

Además de los defectos en el tejido de cartílago hay otros defectos para los que se requiere un tratamiento mejor. 50 Un área en la que se necesitan métodos de tratamientos mejores es en la reparación y regeneración periodontal. En la actualidad se utilizan barreras físicas, normalmente con una base de membrana, para evitar el recrecimiento de tejido no deseado entre compartimentos, por ejemplo, en casos de parodontitis grave (véase, por ejemplo, Robert, P.M. y Frank, R.M., "Peridental guided tissue regeneration with a new resorbable polyactic acid membrane", *J. Periodonto.*, 65, pp. 414-422 (1994)). También se utilizan membranas físicas en regeneraciones de tejido guiadas ortopédicas 55 (véase, por ejemplo, Farso, R. *et al.*, "Guided tissue regeneration in long bone defects in rabbits", *Acta Orthop.*, 63, pp. 66-69 (1992)). Sin embargo, estos procedimientos no son deseables porque las membranas normalmente no son biodegradables y, por tanto, es necesaria una segunda intervención quirúrgica. Además, las membranas físicas que son biodegradables a menudo están asociadas con efectos adversos de larga duración, incluyendo la inflamación, y la reacción crónica a cuerpos extraños, porque los productos de la degradación de la membrana conducen a respuestas inflamatorias crónicas locales y, asociado a esto, conducen a la inhibición de procesos de diferenciación de tejido circundantes. Por tanto, existe una necesidad de un método mejorado para ayudar en la regeneración ósea para la 60 reparación periodontal y ortopédica.

## Sumario de la invención

65 La presente invención resuelve los problemas indicados anteriormente proporcionando composiciones terapéuticas eficaces para inducir la reparación de lesiones en el cartílago de seres humanos y otros animales. El uso de las composiciones de esta invención también estimula la curación de lesiones traumáticas y de formas de osteoartritis que, de

otro modo, conducirían a la pérdida de la función eficaz de la articulación que conduciría a una probable resección y sustitución de la articulación.

En términos generales, las composiciones de esta invención para tratar defectos superficiales en el cartílago o la porción de cartílago de defectos de espesor comprenden llenar la porción de cartílago del defecto con una matriz de reparación del cartílago que contiene un agente antiangiogénico para inhibir el recrecimiento de la vasculatura, como un factor antiinvasivo, un inhibidor de metaloproteasas, o anticuerpos contra factores inductores de la angiogénesis. La matriz de reparación del cartílago se incorpora al tejido del animal y, en general, es biodegradable; también puede 10 contener un agente de proliferación y un factor transformante. Las matrices de reparación del cartílago de esta invención son particularmente útiles para tratar defectos de espesor y defectos superficiales aparentes del cartílago cuando existe la posibilidad de una grieta o fisura en el hueso que se encuentra por debajo.

En otra realización, las composiciones de esta invención se utilizan en métodos que comprenden el tratamiento con calor de áreas en un defecto de espesor en las que se ha producido sangrado para crear una barrera transitoria, y 15 después llenar el defecto con una matriz de reparación del cartílago.

Las composiciones de esta invención para la reparación de defectos de espesor en articulaciones también comprenden, cuando sea necesario o deseable debido a daños óseos extensos, llenar el defecto en la porción ósea de un defecto de espesor hasta el nivel de la interfase hueso-cartílago con una matriz que se incorpora en el tejido del animal 20 y, en general, es biodegradable. La matriz de reparación del hueso puede contener factores angiogénicos y osteogénicos. El resto de la porción de cartílago del defecto se llena hasta la parte superior de la superficie del cartílago con una matriz de reparación del cartílago que contiene un agente antiangiogénico para inhibir el recrecimiento vascular. La matriz de reparación del cartílago también puede contener un agente de proliferación y un factor transformante.

25 El tratamiento de defectos superficiales y de espesor puede realizarse durante procedimientos artroscópicos, de cirugía abierta o percutáneos utilizando las composiciones de esta invención. Según ciertos usos de esta invención, después de la identificación de un defecto de espesor, el defecto se trata mediante las etapas de (1) llenar la porción ósea del defecto con una composición que comprende una matriz que contiene un factor angiogénico y un factor osteogénico encapsulados en un sistema de administración apropiado, por ejemplo, liposomas; y (2) llenar la porción 30 de cartílago del defecto con una composición que comprende una matriz, preferiblemente biodegradable, que contiene un agente angiogénico y un factor transformante encapsulados en un sistema de administración apropiado. En esta segunda etapa, la matriz puede estar unida a la superficie de la porción de cartílago del defecto de espesor, por ejemplo, utilizando un factor estimulante de la adhesión, como transglutaminasa.

### 35 Descripción detallada de la invención

Para que esta invención pueda entenderse con más detalle se proporciona la siguiente descripción detallada. En la descripción se utilizan los siguientes términos y expresiones.

40 *Factor angiogénico*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier péptido, polipéptido, proteína o cualquier otro compuesto o composición que induce o estimula la formación de vasos sanguíneos y células asociadas (como células endoteliales, perivasculares, mesenquimáticas y del músculo liso) y membranas de base asociadas a vasos sanguíneos. Los ensayos *in vivo* e *in vitro* para factores angiogénicos son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, Gimbrone, M.A. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 52, pp. 413-419 (1974); Klagsbrun, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 36, 45 pp. 110-113 (1976); Gross *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 80, pp. 2623-2627 (1983); Gospodarowicz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 73, pp. 4120-4124 (1976); Folkman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76, pp. 5217-5221 (1979); Zetter, B.R., *Nature* (Londres), 285, pp. 41-43 (1980); Azizkhan, R.G. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 152, pp. 931-944 (1980)).

50 *Agente antiangiogénico*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto o composición con actividad biológica que evita el recrecimiento de vasos sanguíneos desde el tejido óseo subyacente hacia el interior del tejido de cartílago, como factores antiinvasivos, inhibidores de la angiogénesis derivados de cartílago, angiostatina, inhibidores de metaloproteasas, anticuerpos contra factores inductores de la angiogénesis (incluyendo bFGF y el factor angiogénico estimulante de células endoteliales (ES-AF)), suramina (Germanin®, Bayer Co., Alemania), fumagilina, 55 análogos de fumagilina y AGM-1470 (Peacock, D.J. *et al.*, *Cellular Immunology*, 160, pp. 178-184 (1995)). Los ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar agentes antiangiogénicos son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, Moses, M.A., *Clinical & Exptl. Rheumatology*, 11 (supl. 8), pp. 567-569 (1993); Moses, M.A. *et al.*, *J. Cell. Bio.*, 119(2), pp. 475-482 (1992); Moses, M.A. *et al.*, *Science*, 248, pp. 1408-1410 (1990); Ingber, D. *et al.*, *Nature*, 348(6), pp. 555-557 (1990)).

60 *Factores antitejido*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto o composición con actividad biológica que evita, de forma selectiva, el crecimiento no deseado de un tejido concreto. Por ejemplo, los factores antiepiteliales para inhibir de forma selectiva la formación de epitelio incluyen anticuerpos antiepiteliales, inhibidores de la vitamina A, antirretinol, anticuerpos antimembrana basal, inhibidores del factor del crecimiento epidérmico, 65 matrices enriquecidas con fibronectina, y cualquier otro factor que inhibe la proliferación, crecimiento o diferenciación de células epiteliales o la formación de epitelio (véase, por ejemplo, Adams, J.C. y Watt, F.M., "Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes", *Nature*, 340, pp. 307-309 (1989)). Los factores antitejido conectivo para inhibir de forma selectiva la formación de tejido conectivo incluyen anticuerpos antitejido conectivo, anticuerpos

contra factores del crecimiento específicos del tejido conectivo, anticuerpos contra proteínas de la superficie de células mesenquimáticas, y factores que inhiben la proliferación de células mesenquimáticas. Los factores antióseos para inhibir de forma selectiva la formación de tejido óseo incluyen factores antiangiogénicos, y anticuerpos monoclonales o policlonales, o sus combinaciones, contra miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ .

5

*Artroscopía*: tal como se utiliza en la presente, se refiere al uso de un artroscopio para examinar o llevar a cabo una cirugía en una articulación.

10 *Hueso*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a un tejido conectivo calcificado que comprende principalmente una red de calcio y fosfato depositado en forma de hidroxiapatito, colágeno (predominantemente colágeno de tipo I) y células óseas, como osteoblastos y osteoclastos.

15 *Célula de reparación ósea*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a una célula que, cuando se expone a estímulos apropiados, se diferencia y se transforma en una célula ósea, como un osteoblasto o un osteocito, que forma hueso. Las células de reparación ósea incluyen células perivasculares, células mesenquimáticas, fibroblastos, células del tipo de los fibroblastos y condrocitos desdiferenciados.

20 *Cartílago*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a un tipo de tejido conectivo que contiene condrocitos inmersos en un material intercelular (a menudo denominado "matriz del cartílago") que comprende fibras de colágeno (predominantemente colágeno de tipo II, junto con otros tipos minoritarios, por ejemplo, tipos IX y XI), diversos proteoglicanos (por ejemplo, proteoglicanos de condroitinsulfato, queratansulfato y dermatansulfato), otras proteínas y agua. El cartílago, tal como se utiliza en la presente, incluye cartílago articular y de menisco. El cartílago articular cubre las superficies de las porciones de hueso en las articulaciones y permite el movimiento en las articulaciones sin un contacto directo hueso a hueso y, con ello, evita el desgaste y el daño en las superficies óseas opuestas. La mayoría del cartílago articular sano normal también se describe como "hialino", es decir, que tiene un aspecto de vidrio escarchado característico. El cartílago de menisco se encuentra normalmente en articulaciones que están expuestas a concusiones, así como a movimientos. Estos emplazamientos de cartílago de menisco incluyen las articulaciones temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, de muñeca y de rodilla (*Gray's Anatomy* (Nueva York, Bounty Books, 1977)).

30

*Célula de reparación de cartílago*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a una célula que, cuando se expone a estímulos apropiados, se diferencia y se transforma en un condrocito. Las células de reparación de cartílago incluyen células mesenquimáticas, fibroblastos, células del tipo de los fibroblastos, macrófagos y condrocitos desdiferenciados.

35 *Factor estimulante de la adhesión celular*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto o composición, incluyendo la fibronectina y otros péptidos tan pequeños como tetrapéptidos, que comprenden el tripéptido Arg-Gly-Asp, que median en la adhesión de las células al material extracelular (Ruoslahti et al., *Cell*, 44, pp. 517-518 (1986)).

40 *Agente quimiotáctico*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto o composición, incluyendo péptidos, proteínas, glicoproteínas y cadenas de glicosaminoglicanos, que es capaz de atraer células en ensayos convencionales *in vitro* quimiotácticos (por ejemplo, Wahl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, pp. 5788-5792 (1987); Postlewaite et al., *J. Exp. Med.*, 165, pp. 251-256 (1987); Moore et al., *Int. J. Tiss. Reac.*, XI, pp. 301-307 (1989)).

45 *Condrocitos*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a células que son capaces de producir componentes del tejido de cartílago, por ejemplo, fibras cartilaginosas de tipo II y proteoglicanos.

50 *Factor del crecimiento de fibroblastos (FGF)*: cualquier miembro de la familia de polipéptidos FGF (Giménez-Gallego et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135, pp. 541-548 (1986); Thomas et al., *Trends Biochem. Sci.*, 11, pp. 81-84 (1986)) o sus derivados, obtenidos de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes, que muestran la capacidad de estimular la síntesis de ADN y la división celular *in vitro* (para los ensayos, véase, por ejemplo, Giménez-Gallego et al., 1986, *supra*; Canalis et al., *J. Clin. Invest.*, 81, pp. 1572-1577 (1988)) de una diversidad de células, incluyendo fibroblastos primarios, condrocitos, células endoteliales vasculares y corneales, osteoblastos, mioblastos, células del músculo liso y gliales (Thomas et al., 1986, *supra*). Los FGF pueden clasificarse como ácidos (aFGF) o básicos (bFGF), dependiendo de sus puntos isoeléctricos (pI).

55 *Matriz*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a una sustancia porosa compuesta, sólida o semisólida que tiene poros o espacios suficientemente grandes para permitir que las células pueblen la matriz. El término matriz incluye materiales formadores de matriz, es decir, materiales que pueden formar matrices dentro de un sitio de defecto en el cartílago o hueso. Los materiales formadores de matriz pueden requerir la adición de un agente polimerizante para formar una matriz, como la adición de trombina a una disolución que contiene fibrinógeno para formar una matriz de fibrina. Otros materiales de matriz incluyen colágeno, combinaciones de colágeno y fibrina, agarosa (por ejemplo, Sepharose<sup>®</sup>) y gelatina. Los fosfatos de calcio, como fosfato de tricalcio, hidroxiapatito u otras sales de calcio que forman matrices sólidas pueden utilizarse por sí solos o en combinación con otros materiales de matriz para tratar los defectos en huesos.

60 *Membrana*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier material que puede colocarse entre la porción de defecto ósea y la porción de defecto de cartílago de un defecto de espesor, y que evita la migración celular y la

infiltración de vasos sanguíneos desde la porción de defecto ósea hacia la porción de defecto de cartílago del defecto de espesor. Las membranas utilizadas en las composiciones de esta invención para la reparación de defectos de espesor son preferiblemente biodegradables.

5 *Factor osteogénico*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier péptido, polipéptido, proteína o cualquier otro compuesto o composición que induce o estimula la formación de hueso. El factor osteogénico induce la diferenciación de las células de reparación ósea para formas células óseas, como osteoblastos u osteocitos. Este proceso puede realizarse mediante un estado intermedio de tejido de cartílago. El tejido óseo formado a partir de células óseas contendrá sustancias específicas óseas, como fibras de colágeno de tipo I, mineral de hidroxiapatito y diversas 10 glicoproteínas y pequeñas cantidades de proteoglicanos óseos.

15 *Agentes de proliferación (mitogénicos)*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto o composición, incluyendo péptidos, proteínas y glicoproteínas, que es capaz de estimular la proliferación de células *in vitro*. Los ensayos *in vitro* para determinar la actividad de proliferación (mitogénica) de péptidos, polipéptidos y otros compuestos son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Canalis *et al.*, *J. Clin. Invest.*, pp. 1572-1577 1988; Giménez-Gallego *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135, pp. 541-548 (1986); Rizzino, "Soft Agar Growth Assays for Transforming Growth Factors and Mitogenic Peptides", en *Methods Enzymol.*, 146A (Nueva York, Academic Press, 1987), pp. 341-352; Dickson *et al.*, "Assay of Mitogen-Induced Effects on Cellular Incorporation of Precursors for Scavengers, de Novo, and Net DNA Synthesis", en *Methods Enzymol.*, 146A (Nueva York, Academic 20 Press, 1987), pp. 329-340). Un método convencional para determinar la actividad de proliferación (mitogénica) de un compuesto o composición es ensayarlo *in vitro* para determinar su capacidad para inducir el crecimiento independiente de anclaje de células no transformadas en agar blando (por ejemplo, Rizzino, 1987, *supra*). Otros sistemas de ensayo de actividad mitogénica también son conocidos (por ejemplo, Giménez-Gallego *et al.*, 1986, *supra*; Canalis *et al.*, 1988, *supra*; Dickson *et al.*, 1987, *supra*). Los efectos mitogénicos de los agentes a menudo son muy dependientes de 25 la concentración, y sus efectos pueden revertirse a concentraciones más bajas o más altas que el intervalo óptimo de concentración para la eficacia mitogénica.

30 *Factor transformante*: tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier péptido, polipéptido, proteína o cualquier otro compuesto o composición que induce la diferenciación de una célula de reparación de cartílago para producir un condrocito. La capacidad del compuesto o composición para inducir o estimular la producción de proteoglicanos específicos de cartílago y de colágeno de tipo II por las células puede determinarse mediante ensayos *in vitro* conocidos en la técnica (Seyedin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, pp. 2267-2271 (1985); Seyedin *et al.*, *Path. Immunol. Res.*, 7, pp. 38-42 (1987)).

35 *Factor del crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )*: cualquier miembro de la familia de polipéptidos TGF- $\beta$  (Deryck, R. *et al.*, *Nature*, 316, pp. 701-705 (1985); Roberts *et al.*, "The transforming growth factor- $\beta$ 's", en *Peptide growth factors and their receptors I* (Berlín, Springer Verlag, 1990), p. 419)) o sus derivados, obtenidos de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes, que muestran la característica capacidad de TGF- $\beta$  para estimular a las células de riñón de rata normales (NRK) para que crezcan y formen colonias en un ensayo de agar blando (Roberts *et al.*, 40 "Purification of Type B Transforming Growth Factors From Nonneoplastic Tissues", en *Methods for Preparation of Media, Supplements and Substrata for Serum-Free Animal Cell Culture* (Nueva York, Alan R. Liss, Inc., 1984)), y que son capaces de inducir la transformación de células de reparación del cartílago en condrocitos, según se evidencia por su capacidad para inducir o estimular la producción de proteoglicanos específicos de cartílago y de colágeno de tipo II por células *in vitro* (Seyedin *et al.*, 1985, *supra*).

45 Esta invención se refiere a composiciones para tratar defectos o lesiones en el cartílago y el hueso. Las composiciones de esta invención comprenden matrices que tienen poros suficientemente grandes para permitir que las células pueblen las matrices.

50 Para su utilización en la reparación de cartílago, así como en defectos superficiales o de la capa de cartílago en un defecto de espesor, la matriz contiene un agente antiangiogénico que tiene actividad biológica que evita el crecimiento de vasos sanguíneos hacia el interior del tejido de cartílago, evitando, con ello, la formación de hueso y la reparación inadecuada del tejido de cartílago. La matriz también puede contener un agente de proliferación para estimular la proliferación de células de reparación del cartílago en la matriz. Preferiblemente, el agente de proliferación también 55 actúa como agente quimiotáctico para atraer a las células de reparación del cartílago hacia la matriz. Como alternativa, la matriz puede contener un agente quimiotáctico además del agente de proliferación. En una realización preferida de esta invención, la matriz también contiene una concentración apropiada de un factor transformante, estando el factor transformante contenido dentro o asociado a un sistema de administración que lleva a cabo la liberación del factor transformante en el momento apropiado para transformar las células de reparación del cartílago proliferadas 60 en la matriz en condrocitos que producen tejido de cartílago estable. La matriz también puede contener un factor estimulante de la adhesión celular.

65 Para las matrices de reparación del cartílago que se van a utilizar en la reparación de defectos de espesor puede no requerirse un agente quimiotáctico o de proliferación, y puede no ser necesario retrasar sustancialmente la liberación del factor transformante. En los defectos de espesor existe un acceso adecuado a las células de reparación en el hueso subyacente y no es necesario reclutar células sinoviales para este fin. Las células de reparación del espacio óseo migrarán con rapidez hacia el sitio del defecto del cartílago. Sin embargo, si se desea, pueden incluirse agentes de proliferación y quimiotácticos, en especial cuando el área del defecto es grande. Debido a que las células de

reparación pueblan con rapidez el sitio del defecto, una exposición sustancialmente retrasada al factor transformante no es tan importante como en los defectos superficiales, en los que se requiere más tiempo para atraer y proliferar las células de reparación. Sin embargo, si el área del defecto es grande, el factor transformante puede secuestrarse para asegurar la suficiente proliferación de células de reparación a lo largo del área del defecto, antes de la exposición al factor transformante. Además, para el tratamiento de defectos de espesor, el agente antiangiogénico y el factor transformante pueden estar contenidos en la matriz, ambos en forma libre y asociados con un sistema de administración para proporcionar concentraciones sostenidas a lo largo del tiempo.

En el caso de defectos de espesor que se extienden de forma significativa hacia el hueso subyacente, la porción ósea del defecto se rellena preferiblemente con una matriz de reparación ósea antes de llenar la porción de cartílago del defecto con una matriz de reparación del cartílago de esta invención.

Los materiales de matriz útiles en las composiciones de esta invención para llenar o cubrir de otra manera los defectos del cartílago o del hueso incluyen fibrinógeno (activado con trombina para formar fibrina en el defecto o lesión), 15 colágeno, agarosa, gelatina y cualquier otro material biodegradable que forma una matriz con poros suficientemente grandes para permitir que las células de reparación de cartílago u óseas pueblen y proliferen dentro de la matriz, y que puede degradarse y reemplazarse por cartílago o hueso durante el proceso de reparación. En algunos casos, pueden utilizarse compuestos que contienen fosfato de calcio, como fosfato de tricalcio, e hidroxiapatito, así como otras sales 20 de calcio que forman matrices sólidas, por sí solos o en combinación con otros materiales de matriz biodegradables para el tratamiento de defectos óseos.

Las matrices útiles en las composiciones de esta invención pueden preformarse o formarse *in situ*, por ejemplo, mediante la polimerización de compuestos y composiciones, como fibrinógeno, para formar una matriz de fibrina. Las matrices que pueden preformarse incluyen colágeno (por ejemplo, esponjas de colágeno y lana de colágeno), 25 colágeno químicamente modificado, esferas o esponjas de gelatina, una sustancia formadora de gel, como agarosa, y cualquier otra sustancia compuesta o formadora de gel que esté compuesta de un material de matriz que rellene el defecto y permita a las células de reparación del cartílago u óseas que pueblen la matriz, o mezclas de los anteriores.

30 En una realización de esta invención, la matriz se forma utilizando una disolución de fibrinógeno, a la cual se añade trombina para iniciar la polimerización un poco antes del uso. Puede utilizarse una concentración de fibrinógeno de 0,5-5 mg/ml de una disolución tampón acuosa. Preferiblemente se utiliza una concentración de fibrinógeno de 1 mg/ml de una disolución tampón acuosa. La polimerización de esta disolución de fibrinógeno en el área del defecto produce una matriz con un tamaño de poro suficientemente grande (por ejemplo, aproximadamente 50-200  $\mu\text{m}$ ) de forma que 35 las células de reparación del cartílago u óseas pueden poblar la matriz y proliferar para llenar el volumen del defecto que ocupa la matriz. Preferiblemente se añade una cantidad suficiente de trombina a la disolución de fibrinógeno un poco antes de la aplicación, para dar al cirujano el tiempo suficiente para depositar el material en el área del defecto antes de que se complete la polimerización. De forma típica, la concentración de trombina debe ser tal que se logre la polimerización en unos pocos a varios minutos (2-4), puesto que se ha demostrado que la exposición del cartílago 40 al aire durante períodos de tiempo largos provoca daños (Mitchell *et al.*, *J. Bone Joint Surg.*, 71A, pp. 89-95 (1989)). No deben utilizarse unas cantidades excesivas de trombina, puesto que la trombina tiene la capacidad de romper moléculas del factor del crecimiento e inactivarlas. Pueden prepararse disoluciones de trombina de 10-500 unidades por ml, y preferiblemente 100 unidades por ml de una disolución tampón acuosa para la adición a la disolución de fibrinógeno. En una realización preferida de esta invención se mezclan aproximadamente 20  $\mu\text{l}$  de trombina (100 U/ml) 45 con cada ml de disolución de fibrinógeno (1 mg/ml) aproximadamente 200 segundos antes de llenar el defecto. La polimerización se produce con mayor lentitud si se añade una concentración menor de trombina. Se apreciará que la cantidad de disolución de trombina necesaria para lograr la polimerización de la fibrina en 2-4 minutos sólo puede ser aproximada, puesto que depende de la temperatura ambiental, la temperatura de la disolución de trombina, la temperatura de la disolución de fibrinógeno, etc. Como alternativa, cuando sea conveniente, la trombina puede añadirse 50 colocándola en la parte superior de la disolución de matriz después de que la disolución se haya colocado en el sitio del defecto y de permitir que difunda a través de la disolución. La polimerización de la disolución de matriz activada con trombina que rellena el defecto puede controlarse con facilidad observando la polimerización inducida por trombina de una muestra externa de la disolución de fibrinógeno. Preferiblemente, en las composiciones de esta invención, las 55 matrices de fibrina se forman a partir de moléculas de fibrina autólogas, es decir, moléculas de fibrinógeno derivadas de la sangre de la misma especie de mamífero que la especie que se está tratando. También puede utilizarse fibrinógeno no inmunogénico de otra especie.

Las matrices que comprenden fibrina y colágeno o, más preferiblemente, fibrina y gelatina también pueden utilizarse en las composiciones de esta invención. Las matrices colagenosas también pueden utilizarse en la reparación 60 de defectos del cartílago, incluyendo defectos de espesor. En una realización preferida de esta invención se utilizan matrices más sólidas, como las que contienen hidroxiapatito o fosfato de tricalcio, para reparar la porción ósea de defectos de espesor profundos.

Cuando se utiliza colágeno como material de matriz pueden fabricarse disoluciones suficientemente viscosas, por 65 ejemplo, empleando Collagen-Vliess® ("lana"), Spongostan® o mezclas de gelatina-sangre, y no se necesita un agente polimerizante. Las matrices de colágeno también pueden utilizarse con una disolución de fibrinógeno activada con un agente polimerizante de forma que se produce una matriz combinada.

Los agentes polimerizantes también pueden ser innecesarios cuando se utilizan otros compuestos biodegradables para formar la matriz. Por ejemplo, pueden elegirse disoluciones de Sepharose® que sean disoluciones de matriz líquidas a 39-42°C y se vuelvan sólidas (es decir, de tipo gel) a 35-38°C. El Sepharose debe tener una concentración tal que el gel que rellene el defecto tenga un tamaño de malla para permitir que las células de reparación óseas o de cartílago pueblen la matriz y el área del defecto.

En las composiciones de esta invención empleadas en la reparación del cartílago se añaden uno o más agentes antiangiogénicos a la disolución de matriz en un intervalo de concentración apropiada para evitar el crecimiento de vasos sanguíneos hacia el interior del tejido de cartílago. Los agentes antiangiogénicos que pueden utilizarse incluyen cualquier agente con actividad biológica que evite el recrecimiento de vasos sanguíneos desde el tejido óseo subyacente hacia el interior del tejido de cartílago. Algunos ejemplos de agentes antiangiogénicos que pueden ser útiles para esta invención se indicaron anteriormente. El agente antiangiogénico debe estar totalmente disponible para proporcionar una actividad inmediata en la matriz, y también puede estar presente en una forma de liberación sostenida, por ejemplo, asociado a un sistema de administración como se describe a continuación, para una actividad prolongada.

También pueden añadirse uno o más agentes de proliferación (mitogénicos) a la disolución de matriz empleada en la reparación del cartílago. El agente o agentes de proliferación deben estar presentes en un intervalo de concentración apropiado para tener un efecto proliferativo sobre las células de reparación del cartílago en la matriz que rellena el defecto. Preferiblemente, el mismo agente también debe tener un efecto quimiotáctico sobre las células (como en el caso del TGF- $\beta$ ); sin embargo, puede utilizarse un factor que tenga un efecto exclusivamente proliferativo. Como alternativa, para producir la inmigración quimiotáctica de células, seguido de la inducción de la proliferación celular, pueden emplearse dos agentes diferentes, teniendo cada uno sólo uno de estos efectos específicos (quimiotáctico o proliferativo).

Los agentes de proliferación (mitogénicos) útiles en las composiciones de esta invención para estimular la proliferación de las células de reparación del cartílago incluyen factores del crecimiento tranformantes ("TGF"), como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factores del crecimiento del tipo de la insulina ("IGF I"); factores del crecimiento de fibroblastos ácidos o básicos ("FGF"); factores del crecimiento derivados de plaquetas ("PDGF"); factor del crecimiento epidérmico ("EGF"); factores del crecimiento hematopoyéticos, como interleuquina-3 ("IL-3"); y proteínas morfogénicas óseas, como la proteína morfogénica ósea-2 ("BMP-2") (Rizzino, 1987, *supra*; Canalis *et al.*, *supra*, 1988, *Growth factors in biology and medicine, Ciba Foundation Symposium, 116* (Nueva York, John Wiley & Sons, 1985); Baserga, R., ed., *Cell growth and division* (Oxford, IRL Press, 1985); Sporn, M.A. y Roberts, A.B., eds., *Peptide growth factors and their receptors*, vol. I y II (Berlín, Springer-Verlag, 1990)). Sin embargo, estos ejemplos particulares no son limitantes. Cualquier compuesto o composición que sea capaz de estimular la proliferación de células, según se demuestra mediante un ensayo *in vitro* para la proliferación celular, es útil como agente de proliferación en esta invención. Estos ensayos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Canalis *et al.*, 1988, *supra*; Giménez-Gallego *et al.*, 1986, *supra*; Dickson *et al.*, 1987, *supra*; Rizzino, 1987, *supra*).

Los agentes quimiotácticos útiles en las composiciones y métodos de esta invención para atraer a las células de reparación del cartílago hacia el defecto del cartílago incluyen, por ejemplo, TGF- $\beta$ , FGF (ácidos o básicos), PDGF, factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) y productos de la degradación de proteoglicanos, como cadenas de glicosaminoglicano (Roberts *et al.* (1990), *supra*; *Growth factors in biology and medicine, Ciba Foundation Symposium, 116* (Nueva York, John Wiley & Sons, 1985); R. Baserga, ed., *Cell growth and division* (Oxford, IRL Press, 1985)). Los ensayos para determinar la capacidad quimiotáctica de los polipéptidos y otros compuestos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Postlewaite *et al.*, 1987, *supra*; Wahl *et al.*, 1987, *supra*; Moore *et al.*, 1989, *supra*).

En una realización preferida de esta invención, la matriz utilizada en la reparación del cartílago contiene TGF- $\beta$  como agente de proliferación y como agente quimiotáctico. En particular puede utilizarse TGF- $\beta$ I o TGF- $\beta$ II como agente de proliferación y quimiotáctico. Otras formas de TGF- $\beta$  (por ejemplo, TGF- $\beta$ III, TGF- $\beta$ IV, TGF- $\beta$ V, etc.) o polipéptidos que tienen actividad TGF- $\beta$  (véase Roberts, 1990, *supra*) también pueden ser útiles para este fin, así como otras formas de esta sustancia que se detecten en el futuro, y otros factores del crecimiento. Para su uso como agente de proliferación y agente quimiotáctico, las moléculas de TGF- $\beta$  se disuelven o suspenden en la matriz a una concentración preferiblemente de 2-50 ng/ml de disolución de matriz, y más preferiblemente 2-10 ng/ml de disolución de matriz. Como alternativa puede utilizarse BMP-2 a una concentración menor que 1 ng/ml como agente de proliferación. Se apreciará que la concentración preferida de TGF- $\beta$  o BMP-2 que estimule la proliferación de las células de reparación del cartílago puede variar según el animal concreto que se está tratando.

También pueden estar presentes un factor o factores tranformantes en la disolución de matriz utilizada en la reparación del cartílago, de forma que después de que las células de reparación del cartílago haya poblado la matriz, el factor tranformante se libere en el sitio del defecto a una concentración suficiente para estimular la diferenciación (es decir, la transformación) de las células de reparación del cartílago para producir condrocitos que forman nuevo tejido de cartílago estable. El momento adecuado para la liberación del factor transformante es particularmente importante si el factor transformante puede inhibir o interferir con la eficacia del agente de proliferación (véase Roberts *et al.* (1990), *supra*).

Los factores transformantes útiles en las composiciones de esta invención para estimular la reparación del cartílago incluyen cualquier péptido, polipéptido, proteína o cualquier otro compuesto o composición que induce la diferencia-

ción de las células de reparación del cartílago para producir condrocitos, que producen proteoglicanos específicos de cartílago y colágeno de tipo II. La capacidad de un compuesto o composición para inducir o estimular la producción de proteoglicanos específicos de cartílago y colágeno de tipo II en células puede determinarse utilizando ensayos conocidos en la técnica (por ejemplo, Seyedin *et al.*, 1985, *supra*; Seyedin *et al.*, 1987, *supra*). Los factores transformantes útiles en las composiciones de esta invención incluyen, por ejemplo, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , FGF (ácidos o básicos) y BMP, incluyendo BMP-2. Estos factores transformantes pueden utilizarse por sí solos o en combinación. También pueden emplearse dímeros y multímeros de estos factores. Además, puede utilizarse TGF- $\beta$  en combinación con EGF.

Cuando sea necesario, la liberación en el momento adecuado del factor transformante puede lograrse encapsulando el factor transformante en un sistema de administración apropiado o junto con éste. Los sistemas de administración útiles en las composiciones de esta invención incluyen liposomas, polímeros bioerosionables, corpúsculos con una base de carbohidratos, emulsiones de agua y aceite, fibras como colágeno que puede estar químicamente enlazado con sulfato de heparina, proteoglicanos u otras moléculas de este tipo a las cuales los factores transformantes se unen de manera espontánea, y bombas osmóticas. Los sistemas de administración como liposomas, polímeros bioerosionables, fibras con factores transformantes unidos y corpúsculos con una base de carbohidratos que contienen el agente transformante pueden mezclarse con la disolución de matriz utilizada para llenar el defecto. Estos sistemas son conocidos y están disponibles en la técnica (véase P. Johnson y J.G. Lloyd-Jones, eds., *Drug Delivery Systems* (Chichester, Reino Unido, Ellis Horwood Ltd., 1987)). Los liposomas pueden prepararse según el procedimiento de Kim *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 728, pp. 339-348 (1983). También pueden utilizarse otros procedimientos de preparación de liposomas. Otros factores para estimular a los condrocitos para que sinteticen los componentes del tejido de cartílago pueden incluirse con el factor transformante en el sistema de administración. El momento en que esté disponible el factor transformante debe coordinarse con la velocidad a la cual las células de reparación proliferan y llenen el sitio del defecto que se va a tratar. Cuando no se requiere un retraso sustancial en la liberación del factor transformante, el factor transformante puede incluirse en la matriz en una forma libremente disponible y asociado a un sistema de administración para proporcionar una liberación sostenida a las concentraciones apropiadas.

En una realización preferida de esta invención, la matriz utilizada en la reparación del cartílago contiene un agente antiangiogénico, TGF- $\beta$  o BMP como el agente de proliferación y quimiotáctico, y TGF- $\beta$  o BMP introducidos en un sistema de administración como el factor transformante. En particular, TGF- $\beta$ I o TGF- $\beta$ II o BMP-2 pueden utilizarse como el agente de proliferación y quimiotáctico, y como el factor transformante. Otras formas de TGF- $\beta$  (por ejemplo, TGF- $\beta$ III, TGF- $\beta$ IV, TGF- $\beta$ V o cualquier miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$ ) o polipéptidos que tienen actividad TGF- $\beta$  (véase Roberts, 1990, *supra*) también pueden ser útiles para este fin, así como otras formas de esta sustancia que se detecten en el futuro, y otros factores del crecimiento. El agente antiangiogénico está contenido, preferiblemente, dentro del sistema de administración que contiene la concentración transformante de TGF- $\beta$  o BMP, así como en forma libre en la matriz.

En una realización preferida para la reparación del cartílago, se utiliza una concentración de TGF- $\beta$  de preferiblemente 2-50 ng/ml de disolución de matriz, y más preferiblemente 2-10 ng/ml de disolución de matriz como agente de proliferación y como agente quimiotáctico. Una concentración sustancialmente mayor de TGF- $\beta$  también está presente en la forma de liberación posterior en la composición de matriz como factor transformante. Preferiblemente, la concentración posterior de TGF- $\beta$  es mayor que 200 ng/ml de matriz, y más preferiblemente, es mayor o igual a 500 ng/ml de matriz. Como alternativa puede utilizarse BMP como factor transformante a una concentración preferible de 100-2000 ng por ml. Se apreciará que la concentración preferida de TGF- $\beta$  o BMP para inducir la diferenciación de las células de reparación del cartílago puede variar según el animal concreto que se va a tratar.

Es necesario escalar la exposición de las células de reparación del cartílago a los dos intervalos de concentración de TGF- $\beta$ , puesto que el TGF- $\beta$  a concentraciones relativamente altas (por ejemplo, mayores que 200 ng/ml de disolución de matriz) puede no sólo transformar las células de reparación del cartílago en condrocitos, sino que también inhibe la atracción quimiotáctica de las células de reparación del cartílago; mientras que a concentraciones relativamente bajas (por ejemplo, 2-10 ng/ml), el TGF- $\beta$  atrae a células de reparación del cartílago y estimula su proliferación, pero no induce la transformación de las células de reparación del cartílago en condrocitos que producen tejido de cartílago.

En una realización preferida de esta invención, cuando es necesario obtener la secuencia de quimiotaxis y proliferación, seguidas de transformación, el TGF- $\beta$  está presente en forma libre no encapsulada y en forma encapsulada o secuestrada de otra forma, en la matriz. Preferiblemente, para los fines de atraer e inducir la proliferación de las células de reparación del cartílago en la matriz y el área de defecto, las moléculas de TGF- $\beta$  se disuelven o suspenden en la matriz a una concentración de 2-10 ng/ml de disolución de matriz. Para estimular la transformación de células de reparación del cartílago en la matriz para formar condrocitos, las moléculas de TGF- $\beta$  también están presentes en la matriz secuestradas en liposomas multivesiculares según el método de Kim *et al.*, 1983, *supra*, a una concentración mayor que 200 ng/ml de disolución de matriz, y preferiblemente a una concentración de 500-800 ng/ml. Los liposomas cargados de TGF- $\beta$  se rompen cuando las células de reparación del cartílago atraídas han poblado la matriz y han comenzado a degradar la matriz. Durante la degradación de la matriz, las células de reparación del cartílago ingieren y/o degradan los liposomas, dando como resultado la liberación de TGF- $\beta$  a concentraciones suficientes para inducir la transformación de las células de reparación del cartílago para producir condrocitos.

La administración en dos etapas requerida de concentraciones quimiotácticas y proliferativas frente a concentraciones transformantes de TGF- $\beta$  también puede lograrse combinando concentraciones transformantes de TGF- $\beta$  con

un polímero bioerosionable. Como alternativa, puede utilizarse una bomba, y preferiblemente una bomba osmótica implantada, para controlar la concentración de TGF- $\beta$  en el defecto y la matriz. En esta realización de la invención, la bomba controla la concentración de TGF- $\beta$  en la matriz, es decir, la bomba puede liberar TGF- $\beta$  a una concentración inicial quimiotáctica y estimulante de la proliferación, y a una posterior concentración transformante. Preferiblemente, la concentración transformante de TGF- $\beta$  se administra mediante una bomba aproximadamente 1 a 2 semanas después de la operación. La administración del factor transformante al volumen del defecto se realiza en la matriz preferiblemente en el sitio del defecto.

Los agentes de proliferación y, cuando se utilizan, las factores transformantes en las composiciones de esta invención se aplican en el sitio del defecto dentro de la matriz. Su presencia, por tanto, está restringida a un sitio muy localizado. Esto se hace para evitar su inyección o infusión libre hacia un espacio articular. Esta infusión libre puede producir el efecto adverso de estimular las células de la membrana sinovial para producir una efusión de la articulación.

En ciertas realizaciones de esta invención para tratar los defectos de espesor, la exposición retrasada al factor transformante no es necesaria. En muchos defectos de espesor, existe un acceso adecuado a las células de reparación, y la exposición retrasada al factor transformante es menos crítica que con defectos superficiales, en los que se requiere más tiempo para atraer y proliferar las células de reparación. Sin embargo, en defectos profundos, puede resultar deseable retrasar la exposición al factor transformante para permitir que las células de reparación pueblen el sitio del defecto completo.

En las composiciones de esta invención utilizadas para la reparación ósea en defectos de espesor del cartílago, pueden añadirse uno o más factores angiogénicos a la disolución de matriz para estimular la formación y crecimiento de vasos sanguíneos y células asociadas (por ejemplo, células endoteliales, perivasculares, mesenquimáticas y del músculo liso) y de membranas de base en el área del defecto óseo. Los factores angiogénicos útiles en las composiciones de esta invención para estimular la vascularización a lo largo de la matriz depositada en el área del defecto óseo incluyen bFGF, TGF- $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$ , angiogenina o angiotropina. Se ha descubierto que el sulfato de heparina mejora la actividad angiogénica de bFGF. En una realización preferida de esta invención, el bFGF se disuelve, se suspende o se une a una matriz a una concentración de 5-10 ng/ml de disolución de matriz, junto con una cantidad de sulfato de heparina suficiente para potenciar la actividad angiogénica de bFGF. Las concentraciones preferidas de otros factores angiogénicos son 5 ng/ml de disolución de matriz para TGF- $\beta$ , 10 ng/ml de disolución de matriz para TNF- $\alpha$ , y 10 ng/ml de disolución de matriz para PDGF. Sin embargo, el bFGF en combinación con sulfato de heparina es el factor angiogénico más preferido entre los factores angiogénicos mencionados anteriormente.

Un factor osteogénico también puede estar presente en la disolución de matriz utilizada para la reparación ósea, de forma que después de que los vasos sanguíneos y las células asociadas han poblado la matriz, el factor osteogénico se libera hacia el sitio del defecto óseo a medida que la matriz se degrada en una concentración suficiente para estimular un proceso que conduce al desarrollo final de osteoblastos y osteocitos. El factor osteogénico se secuestra o se encapsula en un sistema de administración apropiado dentro de la matriz, y se libera a medida que la matriz se degrada. Los sistemas de administración utilizados en las composiciones de reparación del cartílago son útiles en las composiciones de reparación del cartílago de esta invención, por ejemplo, liposomas o corpúsculos con una base de carbohidratos (véase *supra*). En una realización de esta invención, la matriz utilizada en la reparación ósea contiene TGF- $\beta$  encapsulado en un sistema de administración como factor osteogénico, a una concentración preferible de 100 ng/ml de disolución de matriz. Pueden utilizarse unas concentraciones menores y mayores de TGF- $\beta$ . En otra realización, la matriz utilizada para la reparación ósea contiene BMP-2 encapsulado en un sistema de administración como factor osteogénico, a una concentración preferible de 100-2000 ng/ml de disolución de matriz. En otra realización, la matriz contiene FGF a una concentración apropiada encapsulado en un sistema de administración como factor osteogénico.

Los factores osteogénicos útiles en las composiciones de reparación ósea de esta invención incluyen cualquier péptido, polipéptido, proteína o cualquier otro compuesto o composición que induce la diferenciación de células de reparación óseas para producir células óseas, como osteoblastos y osteocitos, que producen tejido óseo. Los factores osteogénicos útiles en esta invención incluyen proteínas como TGF- $\beta$  (Sampath, T.R. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265(2), pp. 13198-13205 (1990)), osteogenina (Luyten, F.P. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264(15), pp. 13377-13380 (1989)), proteína morfogénica ósea (BMP) (Wang, E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 2220-2224 (1990)), FGF, y TGF- $\beta$  combinado con el factor del crecimiento epidérmico (EGF).

La diferenciación de células mesenquimáticas inducida por un factor osteogénico puede incluir la formación de tejidos intermedios, como cartílago fibroso, hialino y calcificado, y osificación endocondrial, que conduce a la formación de tejido óseo entrampado, que será remodelado y transformado en tejido óseo lamelar maduro. En algunos casos, puede formarse hueso directamente a partir de células mesenquimáticas sin la aparición de un tejido intermedio. Dentro de la matriz, el proceso de formación de tejido óseo normalmente se produce de 3 a 4 semanas después de que se hayan formado los vasos sanguíneos y se hayan infiltrado en la matriz en respuesta al factor angiogénico presente en la matriz. Aunque el hueso crecerá hacia el interior del sitio del defecto óseo en ausencia de factores angiogénicos y osteogénicos añadidos (el uso de al menos una matriz es deseable en defectos grandes), el uso de estos factores sustancialmente acelera el proceso de reparación.

La fibronectina o cualquier otro compuesto, incluyendo péptidos tan pequeños como tetrapéptidos, que contienen la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp, pueden utilizarse como factores estimulantes de la adhesión celular (Ruoslathi *et al.*, *Cell*, 44, pp. 517-518 (1986)) para potenciar la adhesión inicial de las células de reparación del

cartílago u óseas a una matriz depositada en un sitio de defecto. Las matrices de fibrina y ciertas matrices de colágeno ya contienen esta secuencia (Ruoslathi *et al.*, 1986, *supra*). Cuando se utilizan otras matrices biodegradables, estos factores estimulantes de la adhesión celular pueden mezclarse con el material de matriz antes de utilizar la matriz para llenar o cubrir el defecto. Los péptidos que contienen Arg-Gly-Asp también pueden acoplarse químicamente al material de matriz (por ejemplo, a sus fibras o mallas), o a un compuesto añadido a la matriz, como albúmina.

Las composiciones descritas anteriormente son útiles en métodos para inducir la formación de cartílago o hueso en un sitio de defecto seleccionado en el tejido óseo o de cartílago de un animal.

Las composiciones de esta invención permiten un tratamiento de los defectos de cartílago y óseos en animales, incluyendo seres humanos, que es más sencillo de administrar y se restringe en su emplazamiento a un área afectada de una articulación. El tratamiento completo puede llevarse a cabo mediante procedimientos artroscópicos, cirugía abierta o percutánea.

Para utilizar las composiciones para tratar defectos o lesiones en el cartílago según esta invención, se identifica un defecto o lesión, se prepara y se rellena con las composiciones de matriz según esta invención.

Para la reparación del cartílago, la composición de matriz contiene un agente antiangiogénico para evitar el crecimiento de vasos sanguíneos. También puede estar presente un agente de proliferación (mitogénico) en la composición de matriz a una concentración apropiada para estimular la proliferación de células de reparación del cartílago en la matriz y el defecto o lesión. El mismo agente también puede, a esa concentración, actuar como agente quimiotáctico para atraer a células de reparación del cartílago, con la condición de que el factor utilizado tiene un efecto combinado con respecto a la proliferación celular y la quimiotaxis (al igual que el TGF- $\beta$  a 2-10 ng/ml de matriz). Como alternativa, pueden estar presentes dos agentes diferentes en la matriz, uno con un efecto proliferativo específico, y el otro con un efecto quimiotáctico específico. En una realización alternativa, después de cubrir el área del defecto con la matriz, el agente angiogénico y, si se desea, un agente de proliferación y un agente quimiotáctico, puede inyectarse directamente en el área del defecto rellena con matriz. La inyección debe localizarse en la matriz y el área del defecto rellena para evitar la exposición de las células de la membrana sinovial a factores del crecimiento que puedan conducir a la proliferación celular y a la efusión de la articulación.

Después de que el sitio del defecto se haya cubierto con la composición de matriz (y, en el caso de matrices de fibrina, cuando la matriz haya solidificado) y, si se requiere, el agente antiangiogénico o el agente de proliferación se haya inyectado en el sitio del defecto relleno de matriz, puede cerrarse la cápsula de la articulación y las incisiones en la piel y terminar la artroscopia o cirugía abierta.

En una etapa posterior de la reparación del cartílago, las células de reparación del cartílago en la matriz se exponen a un factor transformante en el momento apropiado a una concentración suficiente para transformar las células de reparación del cartílago en condrocitos que producen tejido de cartílago estable. Esto puede lograrse incluyendo un sistema de administración apropiado que contiene el factor transformante dentro de la composición de matriz como se describió anteriormente. Como alternativa, el agente transformante puede administrarse mediante inyección directamente, o mediante una bomba osmótica hacia el área del defecto rellena de matriz en el momento apropiado. En un defecto superficial del cartílago al cual no tengan acceso las células de reparación procedentes del tejido óseo, la concentración transformante debe hacerse disponible para las células aproximadamente 1 ó 2 semanas después de la implantación inicial de la matriz en el área del defecto. En un defecto de espesor del cartílago, dependiendo del tamaño del defecto, el factor transformante puede hacerse disponible antes. Pueden añadirse otros factores al sistema de administración o ser directamente inyectados para estimular mejor la síntesis de los componentes de la matriz del cartílago en este momento. Además, puede incluirse otro agente antiangiogénico en el sistema de administración o inyectarse directamente.

Los defectos de cartílago u óseos en animales se identifican con facilidad de modo visual durante el examen artroscópico de la articulación o durante un examen sencillo de la lesión o defecto durante cirugía abierta. Los defectos en el cartílago u óseos también pueden identificarse inferencialmente mediante la utilización de tomografía con ordenador (barido CTA), examen con rayos X, análisis de la formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) del fluido sinovial o marcadores séricos, mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica.

Cuando se ha identificado un defecto, el cirujano puede elegir modificar quirúrgicamente el defecto para potenciar la capacidad del defecto para retener físicamente las disoluciones y el material de matriz que se añaden a las composiciones descritas en la presente. Preferiblemente, en lugar de tener una geometría lisa o cóncava poco profundo, el defecto tiene una forma para que tenga bordes verticales, o está rebajado para retener mejor las disoluciones y los materiales de matriz añadidos a las composiciones descritas en la presente.

Según los usos de esta invención, el sitio del defecto óseo de un defecto de espesor puede llenarse hasta la capa del cartílago calcificado en la interfase hueso-cartílago con una composición de matriz de reparación ósea, de manera que se forma un plano liso. El relleno del defecto óseo con una matriz de reparación ósea es particularmente útil para defectos de varios milímetros o más profundos. La composición de matriz de reparación ósea puede contener un factor angiogénico y un factor osteogénico envasados en un sistema de administración apropiado.

El resto de la porción de cartílago del defecto está completamente rellena con una composición de matriz utilizada para estimular la reparación del cartílago. La composición para la reparación del cartílago comprende un material de matriz que contiene un agente antiangiogénico y, si se desea, un agente de proliferación y un agente quimiotáctico. Los agentes antiangiogénicos útiles en las composiciones de esta invención incluyen cualquier agente con actividad biológica capaz de inhibir la vascularización. Esta invención contempla que el agente antiangiogénico comprenda una o más moléculas capaces de inhibir la angiogénesis. La composición utilizada en esta etapa también puede contener un factor transformante encapsulado en un sistema de administración y, si resulta apropiado, también en forma libre. En la composición para la reparación del cartílago más preferida de la invención, la matriz contiene un factor antiangiogénico (en forma libre y encapsulado o asociado a un sistema de administración para la liberación sostenida), un agente de proliferación, un agente quimiotáctico (que puede ser idéntico al agente de proliferación), y un factor transformante que está encapsulado o asociado a un sistema de administración que libera el factor transformante en el momento en que las células de reparación que pueblan la matriz han comenzado a remodelar la sustancia intercelular. Las composiciones preferidas se describieron anteriormente.

Como se describe en la patente de EEUU nº 5.270.300, la interfase hueso-cartílago de un defecto de espesor puede separarse mediante una membrana física, preferiblemente una membrana biodegradable, que es impermeable a las células (por ejemplo, un tamaño de poro menor que 5  $\mu\text{m}$ ), ante de llenar la porción de cartílago de un defecto de espesor. La membrana se coloca sobre el defecto óseo lleno con matriz, y los bordes de la membrana deben sellarse en el perímetro del defecto en la región de la unión entre cartílago-hueso para evitar el recrecimiento vascular hacia el interior del área de cartílago del defecto. En este método, las células de reparación del área del hueso no están disponibles con facilidad para que pueblen el área de cartílago del defecto y, por tanto, es necesario un agente de proliferación y/o quimiotáctico en la matriz de reparación del cartílago para atraer y estimular la proliferación de células de reparación desde las sinovias.

En una realización preferida de esta invención para tratar defectos de espesor, no se coloca una membrana en la interfase hueso-cartílago. La porción ósea del defecto puede estar o no rellena con una composición de reparación ósea, como se deseé. La porción de cartílago del defecto se rellena con una composición de matriz que contiene un agente antiangiogénico y un factor transformante y, si se desea, un agente de proliferación y/o un agente quimiotáctico, como se analizó anteriormente. El agente antiangiogénico en la composición de matriz de reparación del cartílago actúa como barrera funcional para evitar el recrecimiento de vasos sanguíneos y la formación de hueso en el área de cartílago, evitando la necesidad de una membrana física y permitiendo la migración de las células de reparación desde el área de hueso.

En otra realización de las composiciones de esta invención, éstas se utilizan en métodos para tratar defectos de espesor, en los que la interfase hueso-cartílago está separada por una membrana biológica no permanente, creada en la interfase hueso-cartílago mediante un instrumento calentado. Un instrumento calentado puede aplicarse en emplazamientos de sangrado para coagular la sangre y formar una capa de proteína precipitada, produciendo, con ello, una barrera física biológica que evite el recrecimiento de vasos sanguíneos y la formación de tejido óseo en el sitio del defecto. Los ejemplos de instrumentos calentados incluyen, pero no se limitan a una cuchilla de escalpelo calentada, tijeras calentadas o fórceps calentados. El instrumento debe calentarse hasta una temperatura de aproximadamente 200°C. El instrumento calentado debe aplicarse a la base del defecto de espesor. En otra realización puede aplicarse calor mediante un láser de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> o neodinio-Yag. Esta membrana biológica no permanente creada mediante calor en la interfase hueso-cartílago puede emplearse además o en lugar de la inclusión de un agente antiangiogénico en la matriz de reparación del cartílago. Cuando se utiliza el método de tratamiento con calor debe incluirse un agente de proliferación y/o un agente quimiotáctico en la matriz de reparación del cartílago.

Las medidas químicas pueden potenciar la adhesión de la matriz. Estas medidas incluyen degradar las capas superficiales de proteoglicanos del cartílago en la superficie del defecto para exponer las fibras de colágeno del cartílago, de modo que puedan interaccionar con las fibras de colágeno de la matriz (cuando se utiliza una matriz colagenosa), o con las fibras de fibrina de la matriz (cuando se utiliza una matriz de fibrina). Los proteoglicanos sobre la superficie del cartílago no sólo tienden a interferir con la adherencia de una matriz de fibrina u otra matriz biodegradable al cartílago, sino que también inhiben la actividad de la trombina de modo local. De modo ventajoso, los productos de la degradación de proteoglicanos también pueden tener efecto quimiotáctico sobre las células de reparación (Moore, A.R. *et al.*, *Int. J. Tiss. Reac.*, XI(6), pp. 301-307 (1989)).

Según una realización de los usos de esta invención, la superficie del defecto se seca cubriendo el área utilizando un tejido absorbente estéril, y el volumen del defecto se rellena con una disolución enzimática estéril durante un periodo de 2-10 minutos para degradar los proteoglicanos presentes sobre la superficie del cartílago, y de manera local hasta una profundidad de aproximadamente 1 a 2  $\mu\text{m}$  desde la superficie del defecto. Pueden utilizarse diversas enzimas, por sí solas o combinadas, en disoluciones acuosas tamponadas estériles para degradar los proteoglicanos. El pH de la disolución debe ajustarse para optimizar la actividad enzimática.

Las enzimas útiles para degradar los proteoglicanos en los usos de esta invención incluyen condroitinasa ABC, condroitinasa AC, hialuronidasa, pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína, pronasa, estromelisina y proteasa de estafilococo V8. La concentración apropiada de una enzima o combinación de enzimas concreta dependerá de la actividad de la disolución enzimática.

En una realización preferida de esta invención, el defecto se rellena con una disolución estéril de condroitinasa AC a una concentración de 1 U/ml, y se deja que la digestión se desarrolle durante 4 minutos. La concentración preferida de condroitinasa AC se determina según el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Cualquier otra enzima utilizada debe emplearse a una concentración y durante un periodo de tiempo suficiente de modo que los proteoglicanos superficiales sólo se degraden hasta una profundidad de aproximadamente 1-2  $\mu\text{m}$ .

La cantidad de tiempo que se aplique la disolución enzimática debe mantenerse a nivel mínimo para que la degradación de los proteoglicanos se produzca predominantemente en el área de reparación. Para la condroitinasa ABC o AC a una concentración de 1 U/ml, un periodo de digestión mayor que 10 minutos puede producir una degradación innecesaria y potencialmente perjudicial de los proteoglicanos fuera del área del defecto. Además, unos tiempos de digestión mayores que 10 minutos contribuyen excesivamente al tiempo global del procedimiento. El tiempo global para el procedimiento debe mantenerse a nivel mínimo en especial durante una artrotomía abierta, porque el cartílago puede dañarse por la exposición al aire (Mitchell *et al.* (1989), *supra*). Por estas razones, en las realizaciones de los usos de esta invención que incluyen la etapa de la degradación de los proteoglicanos mediante digestión enzimática, se prefieren unos tiempos de digestión menores que 10 minutos, y se prefieren más unos tiempos de digestión menores que 5 minutos.

Según los usos de esta invención, después de que la enzima haya degradado los proteoglicanos de la superficie del defecto, la disolución enzimática debe retirarse del área del defecto. La retirada de la disolución enzimática puede realizarse utilizando un aspirador equipado con una punta fina de succión, seguido de una limpieza suave con una esponja de cotonoide. Como alternativa, la disolución enzimática puede retirarse sólo limpiando con la esponja de cotonoide.

Después de la retirada de la disolución enzimática, el defecto debe enjuagarse a fondo, preferiblemente tres veces, con una disolución salina fisiológica estéril (por ejemplo, NaCl 0,15 M). El sitio del defecto enjuagado entonces debe secarse. Puede utilizarse una gasa o cotonoide estéril para secar el sitio del defecto.

La adhesión de la matriz al cartílago del defecto también puede potenciarse utilizando pegamento de fibrina (es decir, factor sanguíneo XIII o factor de estabilización de fibrina) para estimular el enlace químico (reticulación) de las fibras de la matriz a las fibras de colágeno del cartílago sobre la superficie del defecto (véase Gibble *et al.*, *Transfusión*, 30(8), pp. 741-747 (1990)). Puede utilizarse la enzima transglutaminasa para el mismo efecto (véase, por ejemplo, Ichinose *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265(23), pp. 13411-13414 (1990); "Transglutaminase", eds. V.A. Najjar y L. Lorand, Martinus Nijhoff Publishers (Boston, 1984)). También pueden emplearse otros compuestos que puedan estimular la adhesión de materiales extracelulares.

Para que la invención descrita en la presente pueda comprenderse más a fondo se ofrecen los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos sólo tienen fines ilustrativos y no deben considerarse limitantes de la invención de ninguna manera. Algunos ejemplos se han incluido sólo como referencia, y no se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones.

#### Ejemplo 1

##### *Ensayo enzimático para la eliminación de proteoglicanos*

Para estimular y mejorar la adherencia de la matriz a lo largo de la superficie de defectos superficiales del tejido de cartílago articular, las moléculas de proteoglicanos en la matriz del cartílago superficial deben eliminarse de manera enzimática, para exponer la red fibrilar de colágeno a las matrices aplicadas de forma externa y a las células de reparación migrantes. Son adecuadas diversas proteasas y enzimas de degradación de glicosaminoglicanos para su utilización para este fin, pero las condiciones de pH deben controlarse para proporcionar una actividad máxima para cada enzima.

En este ejemplo, se ensayan la condroitinasa ABC (0,5-5 U/ml) y la tripsina (al 0,5-4%) para determinar su capacidad para llevar a cabo la eliminación de los proteoglicanos. Se emplearon articulaciones de la rodilla de conejos recién sacrificados, obtenidos del carnicero local. Los defectos superficiales del cartílago creados de modo mecánico se expusieron a las disoluciones enzimáticas durante un periodo de 4 minutos. Entonces las disoluciones se retiraron con tejido absorbente y los sitios de los defectos se enjuagaron a fondo con disolución salina fisiológica. Despues de este procedimiento, el tejido de cartílago se fijó inmediatamente con una disolución de glutaraldehído al 2% (en v/v) (tamponada con cacodilato de sodio 0,05 M, pH 7,4) que contiene tricloruro de hexamina y rutenio (RTH) al 0,7% (en p/v) para el examen histológico. El medio de posfijación consiste en una disolución de RHT-tetraóxido de osmio al 1% (tamponada con cacodilato de sodio 0,1 M). El tejido se deshidrató en una serie graduada de etanol y se sumergió en Epon 812. Se cortaron secciones finas, se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se estudiaron en un microscopio electrónico. En estas secciones, los proteoglicanos fijados con RHT (es decir, precipitados) aparecían como gránulos teñidos de color oscuro. Las concentraciones enzimáticas que eliminan una capa superficial de proteoglicanos de un espesor no mayor que 1-2  $\mu\text{m}$  se definieron como óptimas (la penetración más profunda de las enzimas puede afectar a los condrocitos subyacentes). Se descubrió que la condroitinasa ABC era óptimamente activa a una concentración de aproximadamente 1 U/ml. Se descubrió que la tripsina era óptimamente activa a una concentración de aproximadamente 2,5%. El intervalo de actividad óptima para otras glicosaminoglicanas o proteasas puede determinarse de una manera similar. Puede utilizarse cualquier tampón junto con la enzima, con la condición de que no sea

tóxico y de que su máxima capacidad tamponante se produzca a un valor de pH cercano al requerido para la máxima actividad enzimática.

Ejemplo 2

5

*Adherencia de la matriz a defectos superficiales*

Se investigó la posibilidad de estimular la adhesión de la matriz a lo largo de las superficies de defectos mediante una digestión enzimática controlada de proteoglicanos de la superficie del cartílago. Se crearon defectos en las articulaciones de la rodilla de tres conejos maduros mediante un corte con un cuchillo aplanador. Estos defectos no se trataron con enzimas. Los defectos se llenaron con una matriz de fibrina formada mezclando 20  $\mu$ l de una disolución de trombina (tampón acuoso 100 U/ml) con cada ml de disolución de fibrinógeno (tampón acuoso 1 mg/ml) aproximadamente 200 segundos antes de llenar el defecto. Los conejos se sacrificaron después de un mes y las articulaciones de la rodilla se estudiaron para determinar el grado en el que la matriz de fibrina se había adherido al sitio del defecto. Los resultados se compararon con los logrados en conejos cuyos defectos habían sido tratados con condroitinasa ABC (1 U/ml durante 4 minutos) antes de llenar el defecto con la matriz de fibrina (véanse los ejemplos 3, 4 y 5).

Las matrices de fibrina depositadas en las áreas del defecto que no se trataron con una enzima mostraban baja afinidad para adherirse a la superficie del defecto. Después del tratamiento enzimático, la capacidad de adhesión de las matrices de fibrina (determinada de modo indirecto midiendo la tensión mecánica a la adhesión, es decir, ensayando la facilidad con que la matriz puede retirarse de modo manual con la punta de un fórceps, y de modo indirecto anotando el número de defectos en los que la matriz se mantuvo adherida a lo largo del experimento) aumentó significativamente. La baja afinidad de las matrices por la superficie de defectos en ausencia de tratamiento enzimático probablemente es debida a una inhibición local de la adhesión de la matriz por las moléculas de proteoglicanos, y a la inhibición de la polimerización de la fibrina. Ambos efectos se evitan mediante la eliminación enzimática de los proteoglicanos superficiales a lo largo del área de la superficie del defecto.

Ejemplo 3

30

*Aplicación de factores del crecimiento a sitios de defecto para proporcionar una estimulación quimiotáctica de la migración de células de reparación hacia áreas de defecto y la inducción de la proliferación de células de reparación*

35 Se ensayaron diversos factores del crecimiento para determinar su utilidad en la estimulación de la migración quimiotáctica de las células de reparación al área del defecto para poder curar el defecto.

40 Los factores del crecimiento empleados incluyen a) factor del crecimiento epidérmico (EGF), b) factor del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), c) factor del crecimiento del tipo de la insulina I (IGF I), d) hormona del crecimiento humana (hGH), y e) factor del crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a concentraciones entre 5-10 ng/ml.

45 Cada uno de estos factores se aplicó de modo local a defectos producidos en la rodilla después del tratamiento con condroitinasa ABC y el enjuagado como se describe en el ejemplo 2. Se utilizó un total de diez animales (dos por cada factor del crecimiento). Cada factor del crecimiento fue capaz de atraer quimiotácticamente o estimular localmente la proliferación de células de reparación hacia la superficie de los defectos de manera suficiente para cubrir por completo las superficies de los defectos. Sin embargo, las células sólo estaban presentes sobre las superficies de los defectos, y en ningún caso la proliferación de las células de reparación fue adecuada para llenar el volumen del defecto.

50

55 (Se cree que los productos de degradación de los proteoglicanos en sí mismos, es decir, sin la adición de cualquier otro agente, ejercen el suficiente efecto quimiotáctico para atraer a las células de reparación hacia el defecto. Moore, A.R. et al. (*Int. J. Tiss. Reac.*, XI(b), pp. 301-107 (1989) han demostrado que los productos de degradación de proteoglicanos tienen efectos quimiotácticos en sí mismos).

Ejemplo 4

60 *Aplicación a sitios de defectos de factores del crecimiento atrapados en matrices biodegradables para proporcionar una estimulación quimiotáctica de la migración de células de reparación hacia áreas de defectos y la inducción de la proliferación de células de reparación*

65 Puesto que la aplicación local de un factor del crecimiento bajo las condiciones del ejemplo 3 en ningún caso induce una proliferación adecuada de las células de reparación para que llenen el volumen del defecto, el experimento se repitió utilizando los mismos factores del crecimiento, pero esta vez los factores del crecimiento estaban atrapados en matrices biodegradables. Las matrices biodegradables utilizadas fueron fibrina, colágeno y Sepharose. Se aplicaron cantidades suficientes de matrices que contienen factores del crecimiento para llenar por completo el volumen de los defectos.

5 Se formaron matrices de fibrina mezclando 20  $\mu$ l de una disolución de trombina (100 U/ml de una disolución tampon acuosa: tampón acetato de veronal, pH 7,0) con cada ml de disolución de fibrinógeno (1 mg/ml de una disolución tampón acuosa: Tris 0,05 M, pH 7,4, NaCl 0,1 M) aproximadamente 200 segundos antes de llenar el defecto. Para matrices de colágeno se prepararon disoluciones suficientemente viscosas utilizando Colagen-Vliess® o mezclas de gelatina-sangre. Para matrices de Sepharose, los defectos se llenaron con disoluciones líquidas de Sepharose a 39-42°C. Después de enfriar (35-38°C) se formó una matriz de Sepharose en el defecto.

10 Se utilizaron treinta conejos (dos por cada tipo de matriz y factor del crecimiento) para este experimento. En todos los casos en los que la matriz depositada permanecía adherida al defecto fue poblada completamente por células de reparación de tipo fibroblasto. Se descubrió que esta situación se producía en un momento tan temprano como ocho a diez días tras la operación. No se produjeron más cambios en la organización estructural del tejido de reparación hasta cuatro semanas después de la operación, excepto que las matrices biodegradables fueron remodeladas por las células de reparación y sustituidas por una matriz extracelular de tipo tejido conectivo suelto.

15 No se produjo la transformación de este tejido a tejido de cartílago.

#### Ejemplo 5

20 *Aplicación a sitios de defectos de factores del crecimiento atrapados en matrices biodegradables para proporcionar una estimulación quimiotáctica para la migración de células de reparación hacia áreas de defectos y la inducción de la proliferación de células de reparación, seguido de la liberación local controlada en el tiempo de un factor transformante en una etapa secundaria para proporcionar la transformación del sitio de defecto en cartílago hialino*

25 La observación de que las matrices dentro del volumen del defecto estaban completamente llenas de células de reparación después de la aplicación del factor del crecimiento, y de que estas células son capaces de remodelar la matriz depositada (véase el ejemplo 4), sugirió la investigación de los efectos de introducir un factor transformante (como TGF- $\beta$ ) en una forma encapsulada (por ejemplo, liposomas) a partir de la cual puede liberarse el factor transformante cuando la matriz esté completamente poblada de células de reparación que han comenzado a remodelar la estructura intercelular.

30 El TGF- $\beta$  se mezcló en la disolución de fibrinógeno (1 mg/ml) a una concentración baja (por ejemplo, 2-10 ng/ml) para estimular los efectos quimiotácticos y proliferativos iniciales. El TGF- $\beta$  también se encapsuló en liposomas según el método de Kim *et al.* (1983), *supra*. Estos liposomas que contienen TGF- $\beta$  se añadieron a la misma disolución de fibrinógeno en una concentración adecuada para proporcionar, cuando los liposomas se rompen y liberan el TGF- $\beta$ , la mayor concentración de 100-1000 ng de TGF- $\beta$  por ml de fibrinógeno para estimular la transformación de las células de reparación en condrocitos, y la transformación del defecto lleno de matriz en cartílago durante una etapa secundaria en la que las células de reparación que pueblan la matriz de fibrina han comenzado a remodelar la sustancia intercelular.

35 40 Diez conejos maduros, en los que se produjeron defectos superficiales en el cartílago articular de la articulación de la rodilla como en el ejemplo 2, se trataron mediante la aplicación al sitio del defecto de esta mezcla de fibrinógeno que contiene TGF- $\beta$  libre y encapsulado en liposomas. En los diversos experimentos de esta serie de experimentos, la concentración de TGF- $\beta$  libre se mantuvo en el intervalo de 2-10 ng/ml de fibrinógeno, mientras que la concentración de TGF- $\beta$  encapsulado variaba para proporcionar (después de la liberación del TGF- $\beta$  de los liposomas) una concentración entre 100 y 1000 ng de TGF- $\beta$ /ml de fibrinógeno en etapas de 100 ng. Se produjo la formación de tejido de cartílago hialino en los sitios de tratamiento en todos los casos. Los resultados más reproducibles se obtuvieron a concentraciones por encima de 200 ng de TGF- $\beta$  encapsulado/ml de disolución de fibrinógeno, y preferiblemente por encima de 500 ng de TGF- $\beta$ /ml de disolución de fibrinógeno.

45 50 Ejemplo 6

#### *Determinación del momento de la transformación del tejido*

55 En este experimento, un grupo de seis conejos maduros se sometió a una cirugía de rodilla para producir defectos superficiales como en el ejemplo 2. Se aplicó un programa de tratamiento completo para la reparación de defectos superficiales, es decir, un tratamiento con condroitinasa ABC (1 U/ml durante 4 minutos), seguido del relleno del sitio del defecto con matriz de fibrina (disolución de fibrinógeno 1 mg/ml, 20  $\mu$ l de disolución de trombina 100 U/ml por ml de disolución de fibrinógeno) que contiene TGF- $\beta$  libre (2-10 ng/ml) y TGF- $\beta$  encapsulado en liposomas (800 ng/ml).  
60 Tres conejos se sacrificaron a los ocho, diez y doce días después de la operación, y los tres restantes a los veinte, veinticuatro y veintiocho días. La transformación del tejido de células de reparación de tipo fibroblasto primitivo en tejido de cartílago hialino se produjo entre los días doce y veinte en este modelo animal. Esto se determinó basándose en un examen histológico. En los días ocho a doce, aún estaba presente tejido de reparación fibroso suelto (habiéndose sido la matriz de fibrina aplicada parcial o completamente remodelada), mientras que en el día veinte y posteriores el espacio del defecto estaba parcial o completamente llenado con tejido de cartílago hialino.

## Ejemplo 7

*Aplicación de procedimientos de reparación de cartílago en un modelo de minicerdos*

5 Los procedimientos experimentales utilizados en el modelo de conejo anterior se aplicaron a un modelo de animal más grande, el minicердо. Se crearon defectos superficiales (anchura 0,6 mm, profundidad 0,6 mm, y longitud aproximadamente 10-15 mm) en cuatro minicerdos maduros (2-4 años, 3,6-4,5 kg) cortando con un cuchillo aplanador en la hendidura rotular y en el cóndilo medio. Los defectos entonces se trataron con condroitinasa ABC (1 U/ml durante 4 minutos, como se utilizó en los conejos, *supra*). Se retiró la disolución enzimática, el defecto se secó, se enjuagó 10 con disolución salina fisiológica y después se volvió a secar. Los sitios de defectos entonces se llenaron con una disolución de matriz de fibrinógeno. La disolución de matriz de fibrinógeno utilizada en este experimento contenía 2-6 ng de TGF- $\beta$  libre por ml, y 1500-2000 ng de TGF- $\beta$  encapsulado en liposomas por ml de disolución de fibrinógeno. Antes de llenar los defectos se añadió trombina a la disolución de matriz como se describió anteriormente en el 15 experimento con conejos.

15 Los minicerdos se sacrificaron 6 semanas después de la operación, y los sitios de los defectos llenos de matriz se estudiaron de forma histológica. Todos los sitios mostraron curación, es decir, formación de tejido de cartílago hialino en el sitio del tratamiento.

## 20 Ejemplo 8

*Reparación de defectos de espesor en cartílago articular utilizando un agente antiangiogénico*

25 Se crearon defectos de espesor en el cartílago articular (profundidad 1 mm y anchura 10 mm) en el cóndilo medio y la hendidura rotular de articulaciones de rodilla de minicerdos adultos. Se realizaron cinco lesiones en cada uno de dos animales, utilizando un instrumento aplanador. En cada hendidura rotular se realizaron dos defectos en la región craneal, dos defectos en la región caudal, y un defecto en el cóndilo femoral medio. Las extensiones verticales de cada lesión hacia el hueso subcondrial (que contiene vasos sanguíneos y células de la médula ósea) se controlaron de forma macroscópica mediante la aparición de sangrado para asegurar que la lesión de espesor se ha producido 30 en la articulación. Los defectos entonces se trataron con condroitinasa AC (1 U/ml durante 4 minutos). Se retiró la disolución enzimática, se secó el defecto, se enjuagó con disolución salina fisiológica y de nuevo se secó. Los sitios de defectos entonces se llenaron con una disolución de matriz de reparación del cartílago. La disolución de matriz utilizada en este experimento consiste en un copolímero de gelatina (Gelfoam, Upjohn) (utilizado a 100 mg por ml) 35 y fibrinógeno (utilizado a 20 mg por ml). Se añadió trombina (utilizada a 50 I.U.) a la superficie superior del defecto después de colocar la matriz en el defecto, y se dejó difundir hacia el interior de la matriz.

40 La matriz de reparación del cartílago contiene un agente de proliferación libre, el factor del crecimiento del tipo de la insulina-1 (IGF-1) a una concentración de aproximadamente 40 ng/ml de volumen de matriz como factor transformante, y TGF- $\beta$ 1 encapsulado en liposomas a una concentración de 500 ng/ml de volumen de matriz como factor transformante. Además se añadió suramina libre a una concentración de 10 milimolar de volumen de matriz, y se añadió suramina encapsulada en liposomas a una concentración de 10 milimolar de volumen de matriz en los mismos liposomas que contienen el TGF- $\beta$ 1. En lesiones control, los defectos se trataron de la misma manera, excepto que no 45 se añadió suramina.

45 Aproximadamente 8 semanas después de la operación y del tratamiento, los animales se sacrificaron y los sitios de los defectos llenos de matriz se estudiaron de forma histológica. La parte del espacio del defecto adyacente al tejido de cartílago articular, es decir, en la región rellena con la composición de matriz que contiene suramina, estaba rellena de tejido de cartílago articular. La misma parte del espacio del defecto en lesiones control, es decir, las tratadas sin suramina, estaba rellena de tejido óseo recién formado.

50 55 El anterior experimento se repitió con la sustitución de BMP-2 por TGF- $\beta$ 1, a una concentración de 1000 ng/ml de volumen de matriz. Se obtuvieron los mismos resultados.

## Ejemplo 9

*Reparación de defectos de espesor en cartílago articular utilizando un procedimiento de calentamiento*

60 Se crearon defectos de espesor en el cartílago articular (profundidad 1 mm y anchura 10 mm) en el cóndilo medio y la hendidura rotular de articulaciones de rodilla de minicerdos adultos. Se realizaron cinco lesiones en cada articulación de la rodilla de dos minicerdos. En cada emplazamiento, cuando aparecía sangrado, se indujo la coagulación aplicando un instrumento calentado a la parte inferior de los defectos para formar una barrera física biológica. Se utilizó la cuchilla de un escálpelo calentada (calentada hasta 220°C) para crear la barrera de tejido transitoria.

65 En un minicердо, los defectos en el cartílago articular en una articulación se llenaron con una matriz de reparación del cartílago que contiene IGF-1 a una concentración de aproximadamente 40 ng/ml de volumen de matriz, y TGF- $\beta$ 3 encapsulado en liposomas a una concentración de 500 ng/ml de volumen de matriz. En el defecto en la otra articulación, se incluyó suramina en la matriz como se describe en el ejemplo 8.

## ES 2 267 145 T3

En el segundo minicerdo, los defectos de una articulación se llenaron con una matriz de reparación del cartílago que contiene IGF-1 a una concentración de aproximadamente 40 ng/ml de volumen de matriz, y BMP-2 encapsulado en liposomas a una concentración de 1000 ng/m de volumen de matriz. En los defectos de la otra articulación del segundo minicerdo se incluyó suramina en la matriz como se describe en el ejemplo 8.

5

Como en el experimento previo, los animales se sacrificaron y se examinaron ocho semanas después de la operación y del tratamiento. No se formó tejido óseo en el espacio del defecto adyacente al tejido de cartílago articular en ningún animal. En lugar de esto, los espacios de los defectos se llenaron con tejido de cartílago articular.

10 Ejemplo 10

### *Reparación de defectos de espesor profundo en cartílago articular utilizando un agente antiangiogénico*

15 Se crearon defectos de espesor muy profundos en el cartílago articular (profundidad de hasta 5 mm) en el cóndilo medio y la hendidura rotular de articulaciones de rodilla de minicerdos adultos. Las lesiones se realizaron en animales mantenidos bajo anestesia general, utilizando un instrumento aplanador. La porción ósea del defecto se rellena con una composición de matriz de reparación ósea, como las descritas anteriormente. La porción ósea del defecto se rellena con matriz hasta la interfase cartílago-hueso. El espacio del defecto del cartílago articular se rellena con una matriz de reparación del cartílago que contiene un factor antiangiogénico, como las descritas anteriormente, por ejemplo, en los

20 ejemplos 8-9.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. El uso de una matriz que contiene un agente antiangiogénico para evitar el recrecimiento de vasos sanguíneos hacia el interior del cartílago, en el que la matriz contiene opcionalmente uno o más miembros del grupo que consiste en

- 10 (a) un factor transformante para transformar células de reparación en condrocitos;  
(b) un agente de proliferación para estimular la proliferación de las células; y  
(c) un agente de proliferación y un agente quimiotáctico para atraer a las células de reparación,

15 para la preparación de una composición para tratar defectos de espesor en cartílago en animales, en el que la porción de cartílago del defecto se rellena con la matriz.

20 2. El uso de la reivindicación 1, en el que durante el tratamiento se administra un factor transformante al defecto lleno de matriz cuando las células de reparación han poblado la matriz para transformar las células de reparación en condrocitos.

25 3. El uso de una matriz que contiene un agente antiangiogénico para evitar el recrecimiento de vasos sanguíneos hacia el interior del cartílago, y un factor transformante asociado a un sistema de administración que libera el factor transformante para transformar las células de reparación en condrocitos, en el que la matriz contiene opcionalmente uno o más miembros del grupo que consiste en

- 30 (a) un agente de proliferación para estimular la proliferación de las células de reparación; y  
(b) un agente de proliferación y un agente quimiotáctico para atraer a las células de reparación,

35 para la preparación de una composición para tratar defectos de espesor en cartílago en animales, en el que los emplazamientos de sangrado se tratan con calor para crear una membrana biológica transitoria, y la porción de cartílago del defecto se rellena con la matriz.

40 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en combinación con el uso de una segunda matriz, en el que la segunda matriz contiene opcionalmente uno o más miembros del grupo que consiste en

- 45 (a) un factor angiogénico para estimular la formación y recrecimiento de vasos sanguíneos con células asociadas; y  
(b) un factor osteogénico asociado a un sistema de administración que libera el factor osteogénico a una concentración suficiente para inducir la diferenciación de células de reparación ósea para producir células óseas que forman hueso, en el que la porción ósea del defecto se rellena con la segunda matriz.

50 5. El uso de una matriz que contiene un agente antiangiogénico para evitar el recrecimiento de vasos sanguíneos hacia el interior del cartílago, un agente quimiotáctico para atraer a las células de reparación, un agente de proliferación para estimular la proliferación de las células de reparación, y un factor transformante asociado a un sistema de administración que libera el factor transformante para transformar las células de reparación en condrocitos, para la preparación de una composición para tratar defectos en el cartílago en animales, en el que el defecto se rellena con la matriz.

55 6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que durante el tratamiento, el sitio del defecto se trata con una disolución estéril de un agente para degradar los proteoglicanos de la superficie del defecto, y su eliminación antes de llenar el defecto con la matriz.

55 7. El uso de la reivindicación 6, en el que el agente para degradar los proteoglicanos es la condroitinasa AC.

55 8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la matriz se selecciona del grupo que consiste en fibrina, colágeno, gelatina, agarosa y sus combinaciones.

60 9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agente antiangiogénico es suramina.

60 10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el factor transformante se selecciona del grupo que consiste en TGF- $\beta$  y BMP.

65 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en el que el sistema de administración para la administración del factor transformante y/o el agente antiangiogénico se selecciona del grupo que consiste en liposomas, polímeros bioerosionables, fibras de colágeno, corpúsculos con una base de carbohidratos, y emulsiones de agua y aceite.