



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 412**

51 Int. Cl.:
A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98913183 .4**

86 Fecha de presentación : **20.03.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0968012**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2000**

54 Título: **Dispositivos osteogénicos y sus métodos de uso para reparar huesos.**

30 Prioridad: **20.03.1997 US 822186**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **STRYKER CORPORATION**
2725 Fairfield Road
Kalamazoo, Michigan 49002, US

72 Inventor/es: **Rueger, David, C.;**
Tucker, Marjorie, M. y
Chang, An-Cheng

74 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

Dispositivos osteogénicos y sus métodos de uso para reparar huesos.

5 **Campo de la invención**

La invención dada a conocer en la presente memoria se refiere a materiales y usos para reparar defectos óseos y cartilagosos utilizando proteínas osteogénicas.

10 **Antecedentes de la invención**

Se ha identificado ahora una clase de proteínas que es competente para actuar como verdaderos morfógenos tisulares condrogénicos. Es decir, estas proteínas son capaces, por sí mismas, de inducir la proliferación y diferenciación de células progenitoras en tejido óseo, cartilaginoso, tendinoso y/o ligamentoso funcional. Esta clase de proteínas, designadas en la presente memoria como “proteínas osteogénicas” o “proteínas morfogénicas” o “morfógenos”, incluye miembros de la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) que se identificaron inicialmente por su capacidad de inducir morfogénesis ósea ectópica endocondral. Las proteínas osteogénicas se clasifican generalmente en la técnica como un subgrupo de la superfamilia de TGF- β de factores de crecimiento (Hogan (1996) *Genes & Development* 10: 1580-1594). Los miembros de la familia morfogénica de proteínas incluyen la proteína osteogénica 1 de mamífero (OP-1, también conocida como BMP-7, y el homólogo de *Drosophila* 60A), la proteína osteogénica 2 (OP-2, también conocida como BMP-8), la proteína osteogénica 3 (OP-3), BMP-2 (también conocida como BMP-2A o CBMP-2A y el homólogo de *Drosophila* DPP), BMP-3, BMP-4 (también conocida como BMP-2B o CBMP-2B), BMP-5, BMP-6 y su homólogo de murino Vgr-1, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, GDF3 (también conocida como Vgr2), GDF8, GDF9, GDF10, GDF11, GDF12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, GDF-5 (también conocida como CDMP-1 o MP52), GDF-6 (también conocida como CDMP-2), GDF-7 (también conocida como CDMP-3), el homólogo de *Xenopus* Vgl y NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP y NEURAL. Los miembros de esta familia codifican cadenas polipeptídicas secretadas que comparten rasgos estructurales comunes, incluyendo el procesamiento a partir de un precursor “de forma pro”, proporcionando una cadena polipeptídica madura competente para dimerizar y que contiene un dominio activo carboxi-terminal de aproximadamente 97-106 aminoácidos. Todos los miembros comparten un patrón conservado de cisteínas en este dominio, y la forma activa de estas proteínas puede ser un homodímero unido por disulfuro de un solo miembro de la familia o un heterodímero de dos miembros diferentes (véanse, por ejemplo, Massague (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6: 597; Sampath *et al.*, (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 13198). Véanse también los documentos U.S. 5.011.691, U.S. 5.266.683, Ozkaynak *et al.* (1990), *EMBO J.* 9: 2085-2093, Wharton *et al.*, (1991) *PNAS* 88: 9214-9218), (Ozkaynak (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 25220-25227 y U.S. 5.266.683); (Celeste *et al.*, (1991) *PNAS* 87: 9843-9847); (Lyons *et al.* (1989), *PNAS* 86: 4554-4558). Estas descripciones describen las secuencias aminoacídicas y de ADN, así como las características químicas y físicas, de estas proteínas osteogénicas. Véanse también Wozney *et al.*, (1988) *Science* 242: 1528-1534); BMP-9 (documento WO 93/00432, publicado el 7 de enero de 1993); DPP (Padgett *et al.*, (1987) *Nature* 325: 81-84; y Vg-1 (Weeks (1987) *Cell* 51: 861-867).

Por tanto, ahora se han identificado, aislado y clonado proteínas osteogénicas verdaderas capaces de inducir la cascada anteriormente descrita de eventos morfogénicos resultante en la formación de hueso endocondral. Tanto de origen natural como preparados sintéticamente, estos factores osteogénicos, cuando se implantan en un mamífero asociados con una matriz o sustrato que permita la unión, proliferación y diferenciación de células progenitoras migratorias, pueden inducir el reclutamiento de células progenitoras accesibles y estimular su proliferación, induciendo así la diferenciación en condrocitos y osteoblastos, e induciendo adicionalmente la diferenciación de cartílago intermedio, la vascularización, la formación de hueso, la remodelación y, finalmente, la diferenciación medular. Además, numerosos profesionales han demostrado la capacidad de estas proteínas osteogénicas, cuando se mezclan con materiales de matriz de fuente natural tales como colágeno o materiales de matriz poliméricos preparados sintéticamente, de inducir la formación de hueso, incluyendo la formación de hueso endocondral, en condiciones en las que de otro modo no ocurriría un verdadero reemplazo óseo. Por ejemplo, cuando se combinan con un material de matriz, estas proteínas osteogénicas inducen la formación de hueso nuevo en defectos óseos segmentarios grandes, fusiones vertebrales y fracturas.

Las matrices de fuente natural, tales como colágeno, pueden reemplazarse por materiales inertes tales como plástico, pero el plástico no es un sustituto adecuado ya que no se reabsorbe y está limitado a aplicaciones que requieran configuraciones geométricas simples. Hasta la fecha, se han utilizado también polímeros y copolímeros biodegradables como matrices mezclados con proteínas osteogénicas para reparar defectos sin unión. Aunque dichas matrices pueden superar algunas de las insuficiencias anteriormente descritas, el uso de estas matrices exige la determinación y el control de rasgos tales como química polimérica, tamaño de partícula, biocompatibilidad y otros particulares críticos para la operabilidad. Por ejemplo, deben formarse poros en el polímero de una manera que asegure la adsorción de la proteína en la matriz y la biodegradación de la matriz. Por lo tanto, antes del uso de la matriz polimérica, es necesario llevar a cabo la etapa adicional de tratar el polímero para inducir la formación de poros del tamaño apropiado.

Los dispositivos osteogénicos estándar, que incluyen colágeno o matrices poliméricas mezclados con proteína osteogénica, se prestan menos fácilmente a manipulación durante la cirugía. Los dispositivos osteogénicos estándar tienen a menudo una consistencia seca arenosa y pueden retirarse por lavado siempre que el sitio de defecto se irriga durante cirugía, y/o por sangre y/u otros fluidos que infiltran el sitio después de la cirugía. La adición de ciertos materiales a estas composiciones puede ayudar a proporcionar una composición más manejable para tratar durante

la cirugía. Las patentes de EE.UU. n° 5.385.887, 5.520.923, 5.597.897 y la publicación internacional WO 95/24210 describen composiciones que contienen una matriz polimérica sintética, proteína osteogénica y un vehículo con dicho fin. Dichas composiciones se han limitado, sin embargo, a matrices poliméricas sintéticas debido al deseo de superar ciertas supuestas reacciones inmunológicas adversas que se contempla que están asociadas a otros tipos de matrices, especialmente matrices derivadas biológicamente, incluyendo algunas formas de colágeno. Por lo tanto, estas composiciones sufren los mismos problemas de practicabilidad para optimizar la química de polímeros, el tamaño de partícula, la biocompatibilidad, etc., descritos anteriormente. El documento WO 94/13653 describe formulaciones para inducir el crecimiento óseo que comprenden TGF- β , TCP y un vehículo tal como colágeno, CMC y derivados de celulosa. El documento WO 94/20133 describe sellantes de tejido que comprenden cola de fibrina, hueso desmineralizado y BMP. Sigue existiendo la necesidad de composiciones y métodos para reparar defectos óseos y cartilagosos que proporcionen una mayor facilidad de tratamiento durante la cirugía y que no se basen en matrices poliméricas sintéticas. Sigue existiendo también la necesidad de métodos y composiciones que puedan potenciar la velocidad y calidad de formación de hueso y cartílago nuevos.

En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar dispositivos osteogénicos mejorados y métodos de uso de los mismos para reparar defectos óseos, defectos cartilagosos y/o defectos osteocondrales que: sean más fáciles de manipular durante la cirugía, eviten los problemas de la química de polímeros, el tamaño de partícula y la biocompatibilidad asociados al uso de matrices poliméricas sintéticas; y que permitan la formación acelerada de hueso y una reparación cartilaginosa más estable utilizando menores dosis de proteína osteogénica que las que pueden conseguirse utilizando dispositivos y métodos de la técnica. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar dispositivos osteogénicos y métodos de uso de los mismos para reparar defectos sin curación y sin unión y para promover la reparación cartilaginosa articular en defectos condrales u osteocondrales. Es aún otro objeto de la presente invención proporcionar dispositivos y usos de dispositivos para la reparación de defectos óseos y cartilagosos sin intervención quirúrgica. Estos y otros objetos, junto con las ventajas y rasgos de la invención dados a conocer en la presente memoria, resultarán manifiestos a partir de la descripción, dibujos y reivindicaciones siguientes.

Sumario de la invención

La presente invención está basada en el descubrimiento de que mezclar proteína osteogénica y una matriz no sintética no polimérica tal como colágeno o β -fosfato de tricalcio (β -TCP) con un agente aglutinante seleccionado del grupo consistente en carboximetilcelulosa y una sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90, proporciona un dispositivo osteogénico mejorado con capacidades de reparación de hueso y cartílago mejoradas. No sólo dichos dispositivos mejorados pueden acelerar la velocidad de reparación, sino que estos dispositivos pueden promover también la formación de tejido de reparación estable de alta calidad, particularmente tejido cartilaginoso. Adicionalmente, los beneficios anteriores pueden conseguirse utilizando significativamente menos proteína que la necesaria para dispositivos osteogénicos estándar. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, las propiedades inesperadas anteriormente citadas pueden atribuirse probablemente a una interacción complementaria o sinérgica entre la matriz no polimérica y dicho agente aglutinante. En vista de las tecnologías ortopédica y reconstructiva existentes, estos descubrimientos son inesperados y no se habían apreciado hasta el momento.

La invención proporciona, en un aspecto, un nuevo dispositivo para inducir la formación de hueso y cartílago local que comprende proteína osteogénica, matriz derivada de material no sintético no polimérico y agente aglutinante seleccionado del grupo consistente en carboximetilcelulosa y una sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90. Como se contempla en la presente memoria, el dispositivo comprende preferiblemente proteínas osteogénicas tales como, pero sin limitación, OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-4, BMP-5 y BMP-6. Una proteína osteogénica actualmente preferida es OP-1. Como se utiliza en la presente memoria, los términos "morfógeno", "morfógeno óseo", "proteína morfogénica ósea", "BMP", "proteína osteogénica" y "factor osteogénico" abarcan la clase de proteínas tipificada por la proteína osteogénica 1 humana (hOP-1). Las secuencias nucleotídica y aminoácídica de hOP-1 se proporcionan en las SEC ID N° 1 y 2, respectivamente. Para facilitar la descripción, hOP-1 se denomina a continuación en la presente memoria como una proteína osteogénica representativa. Sin embargo, se apreciará por el experto en la técnica que la OP-1 es simplemente una representante de la subclase TGF- β de morfógenos tisulares verdaderos competentes para actuar como proteínas osteogénicas, y no se pretende que limite la descripción. Otras proteínas conocidas, y útiles, incluyen BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-15, GDF-1, GDF-2, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, GDF-12, NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP, NEURAL y variantes aminoácídicas osteogénicamente activas de las mismas. En una realización preferida, las proteínas útiles en la invención incluyen variantes de especie biológicamente activas de cualquiera de estas proteínas, incluyendo variantes de secuencia aminoácídica conservativa, proteínas codificadas por variantes de secuencia nucleotídica degenerada y proteínas osteogénicamente activas que comparten el esqueleto de siete cisteínas conservado como se define en la presente memoria y codificado por una secuencia de ADN competente para hibridar con una secuencia de ADN que codifica una proteína osteogénica dada a conocer en la presente memoria incluyendo, sin limitación, OP-1, BMP-5, BMP-6, BMP-2, BMP-4 o GDF-5, GDF-6 o GDF-7. En otra realización, las proteínas osteogénicas útiles incluyen aquellas que comparten el dominio de siete cisteínas conservado y que comparten al menos un 70% de homología de secuencia aminoácídica (similitud) en el dominio activo C-terminal, como se define en la presente memoria. En aún otra realización, las proteínas osteogénicas de la invención pueden definirse como proteínas osteogénicamente activas que tienen una cualquiera de las secuencias genéricas definidas en la presente memoria, incluyendo OPX (SEC ID N° 3) y las secuencias genéricas 7 y 8, o las secuencias genéricas 9 y 10.

La OPX da cabida a las homologías entre las diversas especies de proteínas OP-1 y OP-2 osteogénicas, y se describe por la secuencia aminoacídica presentada en la presente memoria a continuación y en la SEC ID N° 3. La secuencia genérica 9 es una secuencia de 96 aminoácidos que contiene el esqueleto de 6 cisteínas definido por hOP-1 (residuos 335-431 de la SEC ID N° 2) y en la que los residuos restantes dan cabida a las homologías de OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-15, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, UNIVIN, NODAL, DORSALIN, NURAL, SCREW y ADMP. Es decir, cada uno de los residuos no de cisteína se selecciona independientemente del correspondiente residuo de este grupo enumerado de proteínas. La secuencia genérica 9 es una secuencia de 102 aminoácidos que incluye una secuencia de 5 aminoácidos añadida a la terminación N de la secuencia genérica 9 y define el esqueleto de siete cisteínas de hOP-1 (330-431, SEC ID N° 2). Las secuencias genéricas 7 y 8 son secuencias de 96 y 102 aminoácidos, respectivamente, que contienen el esqueleto de 6 cisteínas (secuencia genérica 7) o el esqueleto de 7 cisteínas (secuencia genérica 8) definidos por hOP-1, y en las que los residuos no de cisteína restantes dan cabida a las homologías de OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, 60A, DPP, Vg1, BMPS, BMP6, Vgr-I y GDF-1.

Como se enseña a continuación, las matrices preferidas son materiales no sintéticos no poliméricos y pueden ser de fuente natural o derivados de materiales biológicos. Los ejemplos de matrices preferidas incluyen, pero sin limitación, colágeno, hueso desmineralizado y β -TCP. Una matriz actualmente preferida es el colágeno. Otra matriz actualmente preferida es el β -TCP. Por tanto, los dispositivos de la presente invención no comprenden como componente primario matrices poliméricas sintéticas tales como homopolímeros o copolímeros de ácido α -hidroxiacético y/o ácido α -hidroxipropiónico, incluyendo mezclas racémicas de los mismos.

Con respecto a los agentes aglutinantes, los presentes dispositivos comprenden agentes útiles como agentes formadores de gel, aumentadores de la viscosidad, de suspensión y/o de emulsión, en los que dicho agente se selecciona del grupo consistente en carboximetilcelulosa y una sal de sodio de la misma, en los que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90. Dicho agente aglutinante es alquilcelulosa, especialmente metilcelulosas tales como carboximetilcelulosa. Otros agentes aglutinantes que se describen en la presente memoria pueden ser otras gomas de celulosa, alginato de sodio, dextranos y gelatina en polvo. Otro agente aglutinante descrito en la presente memoria puede ser cola de fibrina.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “cola de fibrina” significa una composición que comprende fibrinógeno y trombina de mamífero. En ciertas realizaciones, los dispositivos mejorados de la presente invención comprenden adicionalmente un agente humectante tal como, pero sin limitación, solución salina u otras soluciones fisiológicas acuosas.

Los dispositivos mejorados de la presente invención pueden asumir una variedad de configuraciones. La configuración dependerá en parte del tipo de agente aglutinante y agente humectante empleados. Como se da a conocer en la presente memoria, una realización actualmente preferida puede tener una consistencia de masilla. Esta configuración particular es especialmente adecuada para tratar defectos abiertos según los métodos de la presente invención. Otra realización actualmente preferida del dispositivo osteogénico mejorado puede tener una consistencia fluida viscosa. Esta configuración particular es especialmente adecuada para tratar defectos cerrados según los métodos dados a conocer en la presente memoria. Dependiendo de la configuración del dispositivo mejorado, la provisión a un sitio de defecto puede conseguirse mediante una variedad de modos de suministro. Por ejemplo, puede compactarse una masilla en y/o alrededor del defecto o extruirse en forma de una perla a partir de un aparato de gran calibre. Como alternativa, puede inyectarse un líquido viscoso en y/o alrededor del defecto, o como alternativa cepillarse y/o pintarse sobre la(s) superficie(s) del defecto. Se ejemplifica en la presente memoria la explotación de la variedad de estas posibles realizaciones para reparar defectos óseos y cartilagosos.

Entre las características del agente aglutinante seleccionado del grupo consistente en carboximetilcelulosa y una sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90, está la capacidad de hacer al dispositivo:

plegable, conformable y/o maleable; inyectable; adherente a hueso, cartílago, músculo y otros tejidos; resistente a disgregación tras lavado y/o irrigación durante cirugía; y resistente al desalojo durante cirugía, sutura y después de la operación, por nombrar sólo unas pocas. Adicionalmente, en ciertas realizaciones preferidas, dicho agente aglutinante puede conseguir los rasgos y beneficios anteriormente citados cuando está presente en bajas proporciones. Por ejemplo, un dispositivo mejorado actualmente preferido comprende aproximadamente 1 parte de agente aglutinante y aproximadamente 5 partes de matriz. Ciertas otras realizaciones preferidas comprenden aproximadamente 1 parte de agente aglutinante y aproximadamente 10 partes de matriz, mientras que aún otras comprenden aproximadamente 1 parte de agente aglutinante y aproximadamente 25 partes de matriz. Otro dispositivo actualmente preferido comprende aproximadamente 3 partes de agente aglutinante por 5 partes de matriz. Ciertos agentes aglutinantes pueden utilizarse en proporciones iguales o mayores respecto a la matriz. Otro dispositivo actualmente preferido comprende 1 parte de agente aglutinante y 3 partes de matriz. Como se ejemplifica en la presente memoria, dispositivos mejorados de proporciones ampliamente divergentes pueden inducir la formación de hueso y cartílago. Se ejemplifican en la presente memoria dispositivos mejorados que tienen partes de agente aglutinante a partes de matriz en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 4:1, así como de aproximadamente 1:2 a 1:5 y 1:10 a 1:25, así como 1:25 a 1:50. Puede utilizarse cualquier proporción de agente aglutinante a matriz para practicar la presente invención.

Además, la presente invención contempla que un dispositivo osteogénico mejorado puede comprender más de un material de matriz en combinación; las proporciones relativas pueden variarse para conseguir el resultado clínico deseado, y pueden determinarse rutinariamente utilizando la experiencia normal. Es una matriz actualmente preferida el colágeno, especialmente colágeno bovino. Es otra matriz adecuada el hueso desmineralizado. Son aún otras matrices adecuadas hidroxiapatitos (HAp) de relaciones molares de calcio:fosfato (Ca/P), porosidad y cristalinidad variables; cerámicas bioactivas; y cerámicas de fosfato de calcio, por nombrar sólo unas pocas. Adicionalmente, están también contempladas en la presente memoria las mezclas de los anteriores en las que se manipulan las relaciones de HAp/fosfato de tricalcio. En una realización particularmente preferida, la matriz es β -fosfato de tricalcio (β -TCP).

En otro aspecto, la presente invención proporciona usos del dispositivo descrito en la presente memoria para inducir la formación de hueso o cartílago local para reparación de defectos óseos, cartilaginosos u osteocondrales. Los presentes usos se contemplan como útiles para inducir la formación de al menos hueso endocondral, hueso intramembranoso y cartílago articular. Como se da a conocer en la presente memoria, los usos para reparación incluyen el tratamiento de defectos tanto cerrados como abiertos con los dispositivos osteogénicos mejorados anteriormente descritos. Como se enseña en la presente memoria, los usos de la presente invención pueden practicarse utilizando dispositivos mejorados que son de volumen suficiente para rellenar el sitio de defecto, así como utilizando dispositivos mejorados que no lo son. Además, como resultado de este descubrimiento, están ahora disponibles realizaciones para promover la reparación de defecto de hueso y/o cartílago sin requerir intervención quirúrgica. La disponibilidad de dichos usos tiene implicaciones para individuos comprometidos tales como individuos diabéticos, fumadores, obesos y otros cuya salud global y flujo sanguíneo deficiente a sus extremidades suponen un riesgo cuando se requiere intervención quirúrgica. Los ejemplos de defectos incluyen, pero sin limitación, defectos de tamaño crítico, defectos de tamaño no crítico, fracturas sin unión, fracturas, defectos osteocondrales, defectos condrales y defectos periodontales.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para la práctica de los usos anteriormente descritos. Como se contempla en la presente memoria, una realización de un kit para inducir la formación de hueso o la formación de cartílago local comprende un dispositivo mejorado en el que la proteína osteogénica y la matriz se envasan en el mismo recipiente. En otras realizaciones, proteína osteogénica, matriz y agente aglutinante están en el mismo recipiente. En aún otras realizaciones, se proporciona también agente humectante y se envasa separadamente de los otros componentes del kit.

Debido a que la presente invención proporciona a los profesionales materiales y usos mejorados para reparación de hueso y cartílago, incluyendo reparación de cartílago articular presente en articulaciones de mamífero, supera los problemas encontrados de otro modo utilizando los métodos y dispositivos de la técnica. Por ejemplo, la presente invención puede inducir la formación de cartílago de hialina genuina en lugar de fibrocartílago en un sitio de defecto. El cartílago de hialina funcional se forma sobre la superficie articular de hueso en un sitio de defecto y no degenera con el tiempo a fibrocartílago. En contraposición, los métodos de la técnica anterior generalmente dan como resultado en última instancia el desarrollo de fibrocartílago en el sitio de defecto. Al contrario que el cartílago de hialina, el fibrocartílago carece de la capacidad fisiológica de restaurar las articulaciones a su entera capacidad. Por tanto, cuando se utilizan dispositivos osteogénicos mejorados según los presentes métodos, el profesional puede restaurar sustancialmente un defecto osteocondral o condral a una articulación funcional y evitar la formación indeseable de fibrocartílago típica de los métodos de la técnica anterior. Como se contempla en la presente memoria, la invención incorpora adicionalmente materiales de reemplazo alogénicos para reparar tejido avascular en una articulación esquelética que dan como resultado la formación de tejidos de reemplazo mecánica y funcionalmente viables en una articulación.

En resumen, los usos, dispositivos y kits de la presente invención pueden utilizarse para inducir la formación de hueso endocondral o intramembranoso para reparar defectos óseos que no se curan espontáneamente, así como para promover y potenciar la velocidad y/o calidad de formación de hueso nuevo, particularmente en la reparación de fracturas y fusiones, incluyendo fusiones vertebrales. Los usos, dispositivos y kits pueden inducir también la reparación de defectos osteocondrales y/o subcondrales, concretamente, pueden inducir la formación de hueso nuevo y/o el cartílago de superficie superpuesto. La presente invención es particularmente adecuada para uso en la reparación de defectos resultantes de enfermedades deteriorantes o degenerativas tales como, pero sin limitación, osteocondritis disecante. Es también particularmente adecuada para uso en pacientes que requieren cirugías reconstructivas repetitivas, así como pacientes de cáncer. Otras aplicaciones incluyen, pero sin limitación, reparación protésica, fusión vertebral, escoliosis, reparación craneal/facial y reparación por aloinjerto masivo.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos y rasgos de la invención, así como la invención misma, pueden entenderse más completamente a partir de la siguiente descripción cuando se lee junto con los dibujos adjuntos, en los que:

la Figura 1 es una gráfica que representa las propiedades de cohesividad de partes variables (p/p) de agente aglutinante a partes (p/p) de dispositivo de OP estándar.

La Figura 2 es una gráfica que representa el efecto de volúmenes variables de agente humectante sobre la integridad de un dispositivo osteogénico mejorado.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Para describir más clara y concisamente la materia en cuestión de la invención reivindicada, se pretende que las siguientes definiciones proporcionen directrices del significado de términos específicos utilizados en la siguiente descripción escrita y reivindicaciones adjuntas.

“Formación de hueso” significa formación de hueso endocondral o formación de hueso intramembranoso. En seres humanos, la formación de hueso empieza durante las primeras 6-8 semanas de desarrollo fetal. Las células madre progenitoras de origen mesenquimático migran a sitios predeterminados donde (a) se condensan, proliferan y se diferencian en células formadoras de hueso (osteoblastos), un proceso observado en el cráneo y designado como “formación de hueso intramembranoso”; o (b) se condensan, proliferan y se diferencian en células formadoras de cartílago (condroblastos) como intermedios, que se reemplazan posteriormente por células formadoras de hueso. Más específicamente, las células madre mesenquimáticas se diferencian en condrocitos. Los condrocitos se calcifican después, experimentan hipertrofia y se reemplazan por hueso recién formado preparado por osteoblastos diferenciados, que están ahora presentes en el sitio. Posteriormente, se remodela extensamente el hueso mineralizado, ocupándose después de ello por un osículo relleno con elementos de médula ósea funcionales. Este proceso se observa en huesos largos y se designa como “formación de hueso endocondral”. En la vida postfetal, el hueso tiene la capacidad de repararse a sí mismo tras lesión imitando el proceso celular de desarrollo de hueso endocondral embrionario. Es decir, las células madre progenitoras mesenquimáticas de médula ósea, periostio y músculo pueden inducirse a migrar al sitio de defecto y empezar la cascada de eventos descrita anteriormente. Allí se acumulan, proliferan y se diferencian en cartílago, que se reemplaza posteriormente por hueso recién formado.

“Hueso” designa un tejido conectivo calcificado (mineralizado) que comprende principalmente una combinación de calcio y fosfato depositada en forma de hidroxipatito, colágeno (principalmente colágeno de tipo I) y células óseas tales como osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, así como tejido de médula ósea que se forma en el interior de hueso endocondral verdadero. El tejido óseo difiere significativamente de otros tejidos, incluyendo tejido de cartílago. Específicamente, el tejido óseo es tejido vascularizado compuesto por células y un medio bifásico que comprende un componente mineralizado inorgánico (principalmente cristales de hidroxipatito) y un componente orgánico (principalmente colágeno de tipo I). Los glicosaminoglicanos constituyen menos de un 2% de este componente orgánico y menos de un 1% del medio bifásico mismo, o del tejido óseo *per se*. Además, respecto al tejido cartilaginoso, el colágeno presente en el tejido óseo existe en una disposición paralela altamente organizada. Los defectos óseos, tanto de etiologías degenerativa, traumática, como cancerosa, plantean un enorme reto al cirujano plástico. Es particularmente difícil la reconstrucción o reparación de partes esqueléticas que comprenden parte de un complejo multitejido, tal como ocurre en las articulaciones de mamífero.

“Formación de cartílago” significa formación de tejido conectivo que contiene condrocitos embebidos en una red extracelular que comprende fibrillas de colágeno (predominantemente colágeno de tipo II junto con otros tipos minoritarios tales como tipos IX y XI), diversos proteoglicanos, otras proteínas y agua. “Cartílago articular” designa específicamente hialina o cartílago articular, un tejido no mineralizado avascular que cubre las superficies de articulación de las porciones de los huesos en articulaciones y permite el movimiento en articulaciones sin contacto directo hueso-hueso, evitando así el desgaste y el daño de las superficies óseas opuestas. El cartílago articular sano normal se designa como “hialina”, concretamente, tiene una apariencia cristalina deslustrada característica. En condiciones fisiológicas, el tejido de cartílago articular permanece sobre la superficie ósea mineralizada subyacente llamada hueso subcondral, que contiene osículos altamente vascularizados. El cartílago articular, o de hialina, encontrado en el extremo de los huesos de articulación es un tejido especializado histológicamente distinto, y es responsable de la distribución de la resistencia a la carga ante fuerzas compresivas, y del deslizamiento suave que es parte de la función de la articulación. El cartílago articular tiene pocas o ninguna propiedad autorregenerativa. Por tanto, si el cartílago articular se desgarró o se desgasta su grosor o se daña de otro modo en función del tiempo, enfermedad o traumatismo, se compromete su capacidad de proteger la superficie ósea subyacente. En cartílago articular normal, existe un equilibrio entre síntesis y destrucción de la red extracelular anteriormente descrita. Sin embargo, en tejido sometido a traumatismo repetido, por ejemplo, debido a la fricción entre huesos mal alineados en contacto entre sí, o en enfermedades articulares caracterizadas por la pérdida neta de cartílago articular, por ejemplo osteoartritis, aparece un desequilibrio entre síntesis y degradación.

Otros tipos de cartílago en articulaciones esqueléticas incluyen fibrocartílago y cartílago elástico. Las articulaciones cartilaginosas secundarias están formadas por discos de fibrocartílago que unen vértebras en la columna vertebral. En el fibrocartílago, la red de mucopolisacárido está entrelazada con haces de colágeno prominentes y los condrocitos están más ampliamente dispersados que en cartílago de hialina. El cartílago elástico contiene fibras de colágeno que son histológicamente similares a las fibras de elastina. El tejido cartilaginoso, incluyendo cartílago articular, al contrario que otros tejidos conectivos, carece de vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos y membrana basal. El cartílago está compuesto por condrocitos, que sintetizan un medio extracelular abundante compuesto por agua, colágenos, proteoglicanos y proteínas no colagenosas y lípidos. El colágeno sirve para atrapar los proteoglicanos y para proporcionar resistencia a la tracción al tejido. El colágeno de tipo II es el colágeno predominante en el tejido de cartílago. Los proteoglicanos están compuestos por un número variable de cadenas de glicosaminoglicano, sulfato de queratina, sulfato de condroitina y/o sulfato de dermatano, y oligosacáridos ligados por N y ligados por O unidos covalentemente a un núcleo proteico.

El cartílago articular, o de hialina, puede distinguirse de otras formas de cartílago tanto por su morfología como por su bioquímica. Ciertos colágenos tales como los tejidos cartilaginosos fibróticos, que se encuentran en tejido de

cicatriz, por ejemplo, son queloides y típicos de tejido de tipo cicatriz, concretamente, compuestos por capilares y haces abundantes irregulares y desorganizados de colágeno de tipo I y tipo II. En contraposición, el cartílago articular se caracteriza morfológicamente por zonas superficiales frente a medias frente a profundas que muestran una graduación característica de rasgos desde la superficie del tejido hasta la base del tejido adyacente al hueso. En la zona superficial, por ejemplo, los condrocitos están aplanados y yacen paralelos a la superficie embebidos en una red extracelular que contiene colágeno dispuesto tangencialmente y unos pocos proteoglicanos. En la zona media, los condrocitos son esféricos y están rodeados por una red extracelular rica en proteoglicanos y fibras de colágeno organizadas oblicuamente. En la zona profunda, cerca del hueso, las fibras de colágeno están orientadas verticalmente. Los proteoglicanos ricos en sulfato de queratina aumentan en concentración al aumentar la distancia desde la superficie del cartílago. Para una descripción detallada de la microestructura de cartílago articular, véanse, por ejemplo, (Aydelotte y Kuettner, (1988), *Conn. Tiss. Res.* 18: 205; Zanetti *et al.* (1985), *J. Cell. Biol.* 101: 53 y Poole *et al.*, (1984), *J. Anat.* 138: 13. Bioquímicamente, el colágeno articular puede identificarse por la presencia de colágeno de tipo II y tipo IX, así como por la presencia de proteoglicanos bien caracterizados y por la ausencia de colágeno de tipo X, que está asociado a la formación de hueso endocondral.

Se reconocen dos tipos de defectos en superficies articulares, concretamente, defectos de grosor completo y defectos superficiales. Estos defectos difieren no sólo en la extensión del daño físico al cartílago, sino también en la naturaleza de la respuesta de reparación que cada tipo de lesión puede desencadenar. Los defectos de grosor completo, designados también en la presente memoria como “defectos osteocondrales”, de una superficie articular incluyen daño en el cartílago de hialina, la capa de cartílago calcificada y el tejido óseo subcondral con sus vasos sanguíneos y médula ósea. Los defectos de grosor completo pueden causar un fuerte dolor, puesto que la placa ósea contiene terminaciones nerviosas. Dichos defectos surgen generalmente de traumatismo grave y/o durante las etapas tardías de una enfermedad articular degenerativa tal como osteoartritis. Los defectos de grosor completo pueden conducir, en ocasiones, a hemorragia y a la inducción de una reacción de reparación del hueso subcondral. Sin embargo, en dichos casos el tejido de reparación formado es un tipo de cartílago fibroso vascularizado con propiedades biomecánicas insuficientes, y no persiste a largo plazo. En contraposición, los defectos superficiales en el tejido de cartílago articular están limitados al tejido de cartílago mismo. Dichos defectos, también designados en la presente memoria como “defectos condrales” o “subcondrales”, son conocidos porque no se curan y no muestran tendencia a reacciones de reparación. Los defectos superficiales pueden aparecer como fisuras, huecos o hendiduras en la superficie del cartílago. No contienen vasos sangrantes (puntos de sangre) tales como los observados en defectos de grosor completo. Los defectos superficiales pueden no tener una causa conocida, pero a menudo son el resultado de alteraciones mecánicas que conducen a un desgaste del tejido cartilaginoso. Dichas alteraciones mecánicas pueden estar causadas por traumatismo en la articulación, por ejemplo, un desplazamiento del tejido de menisco roto en la articulación, menisectomía, una relajación de la articulación por un ligamento roto, mal alineamiento de articulaciones o fractura ósea, o por enfermedades hereditarias. Los defectos superficiales son también característicos de las etapas tempranas de enfermedades articulares degenerativas tales como osteoartritis. Puesto que el tejido cartilaginoso no está innervado ni vascularizado, los defectos superficiales no se curan y a menudo degeneran en defectos de grosor completo.

“Defecto” o “sitio de defecto”, como se contempla en la presente memoria, puede definir una desestabilización estructural ósea que requiere reparación. El defecto puede definir adicionalmente un defecto osteocondral, incluyendo la desestabilización estructural tanto del hueso como del cartílago superpuesto. Un defecto puede asumir la configuración de un “vacío”, que se entiende que significa un defecto tridimensional tal como, por ejemplo, un hueco, cavidad, agujero u otra desestabilización sustancial de la integridad estructural de un hueso o articulación. Un defecto puede ser el resultado de accidente, enfermedad, manipulación quirúrgica y/o fallo protésico. En ciertas realizaciones, el defecto es un vacío que tiene un volumen incapaz de reparación endógena o espontánea. Dichos defectos son generalmente de dos veces el diámetro del hueso en cuestión y se denominan también defectos “de tamaño crítico”. Por ejemplo, en un modelo de defecto de cúbito canino, la técnica reconoce que dichos defectos son un hueco de aproximadamente 3-4 cm, generalmente de al menos aproximadamente 2,5 cm, incapaz de reparación espontánea. Véanse, por ejemplo, Schmitz *et al.*, “Clinical Orthopaedics and Related Research” 205: 299-308 (1986); y Vukicevic *et al.*, en “Advances in Molecular and Cell Biology”, vol. 6, págs. 207-224 (1993) (JAI Press, Inc.).

En modelos de defecto segmentario de conejo y mono, el hueco es de aproximadamente 1,5 cm y 2,0 cm, respectivamente. En otras realizaciones, el defecto es un defecto segmentario de tamaño no crítico. Generalmente, estos son capaces de cierta reparación espontánea, aunque biomecánicamente inferior a la posibilitada por la práctica de la presente innovación. En ciertas otras realizaciones, el defecto es un defecto osteocondral tal como un tapón osteocondral. Dicho defecto atraviesa la totalidad del cartílago superpuesto y entra, al menos en parte, en la estructura ósea subyacente. En contraposición, un defecto condral o subcondral atraviesa el cartílago superpuesto, parcial o totalmente, respectivamente, pero no implica al hueso subyacente. Otros defectos susceptibles de reparación utilizando la presente invención incluyen, pero sin limitación, fracturas sin unión, cavidades óseas, resección de tumor, fracturas recientes (desplazadas o no desplazadas), anomalías craneales/faciales, defectos e irregularidades periodontales, fusiones vertebrales, así como aquellos defectos resultantes de enfermedades tales como cáncer, artritis, incluyendo osteoartritis, y otros trastornos degenerativos óseos tales como osteocondritis disecante.

“Reparar” se pretende que signifique formación de hueso y/o cartílago nuevo, que es suficiente para rellenar al menos parcialmente el vacío o discontinuidad estructural en el defecto. Sin embargo, reparar no significa, ni exige por lo demás, un proceso de curación completa o un tratamiento que sea 100% eficaz en la restauración de un defecto a su estado fisiológico/estructural/mecánico previo al defecto.

“Matriz”, como se contempla en la presente memoria, significa un material no polimérico no sintético que puede actuar como sustrato osteoconductor y tiene una estructura de soporte sobre la que pueden unirse, proliferar y participar en el proceso morfogénico las células infiltrantes, culminando en la formación de hueso. Como se contempla en la presente memoria, matriz no incluye materiales poliméricos sintéticos tales como matrices poliméricas que comprenden homopolímeros o copolímeros de ácido α -hidroxiacético y/o ácido α -hidroxipropiónico, incluyendo mezclas racémicas de los mismos. Específicamente, las matrices como se contemplan en la presente memoria no incluyen homopolímeros ni copolímeros de ácido glicólico, ácido láctico ni ácido butírico, incluyendo derivados de los mismos. Por ejemplo, la matriz de la presente invención puede derivar de materiales de fuente biológica o natural o de origen natural. Una matriz adecuada debe ser particulada y porosa, siendo la porosidad un rasgo crítico para su efectividad en la inducción de la formación de hueso, particularmente la formación de hueso endocondral. Se entiende que el término “matriz” significa un componente estructural o sustrato que tiene intrínsecamente una forma tridimensional sobre la que ocurrirán ciertos eventos celulares implicados en la morfogénesis de hueso endocondral; una matriz actúa como una estructura de soporte temporal para células infiltrantes que tiene intersticios para la unión, proliferación y diferenciación de dichas células. La presente invención contempla que un dispositivo osteogénico mejorado puede comprender más de un material de matriz en combinación; las proporciones relativas pueden variar para conseguir los resultados clínicos deseados y pueden determinarse rutinariamente utilizando experiencia normal. Es una matriz actualmente preferida el colágeno, especialmente colágeno bovino. Es otra matriz adecuada el hueso desmineralizado. Son aún otras matrices adecuadas hidroxiapatitos (HAp) de relaciones molares de calcio:fosfato (Ca/P), porosidad y cristalinidad variables; cerámicas bioactivas; y cerámicas de fosfato de calcio, por nombrar sólo unas pocas. Adicionalmente, se contemplan también en la presente memoria mezclas de los anteriores en las que se manipulan las relaciones HAp/fosfato de tricalcio. Estas matrices pueden obtenerse comercialmente en forma de gránulos, bloques y polvos. Por ejemplo, Pyrost® es un bloque de HAp derivado de hueso bovino (Osteo AG, Suiza); Collapta® es una esponja de HAp que contiene colágeno (Osteo G, Suiza); pueden obtenerse fosfatos de tricalcio (β -TCP) en Pharma GmbH (Alemania) en forma de Cerasob®, así como en Clarkson Chromatography Products, Inc. (S. Williamsport, PA) u Osteonics (Holanda); pueden obtenerse mezclas de gránulos de TCP/HAp en Osteonics (Holanda); y pueden obtenerse polvo o gránulos de HAp al 100% en CAM (una filial de Osteotech, NJ). La preparación y caracterización de ciertas de las matrices anteriormente citadas se han descrito extensamente en la técnica y sólo exigen experimentación rutinaria y experiencia normal. Véanse, por ejemplo, los documentos US 4.975.526, US 5.011.691, US 5.171.574, US 5.266.683, US 5.354.557 y US 5.468.845.

Están bien descritas en la técnica también otras de las matrices anteriormente citadas. Véanse, por ejemplo, tratados de biomateriales tales como LeGeros y Daculsi en “Handbook of Bioactive Ceramics II”, pág. 17-28, (1990, CRC Press) y otras descripciones publicadas tales como Yang Cao, Jie Weng, *Biomaterials* 17 (1996), pág. 419-424; LeGeros, Adv. Dent. Res. 2, 164 (1988); Johnson *et al.*, *J. Orthopaedic Research*, 1996, vol. 14, pág. 351-369; y Piatelli *et al.*, *Biomaterials*, 1996, vol. 17, pág. 1767-1770.

El β -TCP (β -fosfato de tricalcio) sinterizado calentado a alta temperatura es una matriz actualmente preferida. El β -TCP sinterizado tiene una mayor velocidad de disolución que los HAp sinterizados y fosfato de calcio bifásico sinterizado (BCP). La capacidad del β -TCP de soportar la formación de hueso parece estar basada, en parte, en el tamaño de los gránulos de Ca/P en la matriz. Los β -TCP sinterizados que tienen tamaños de partícula de entre aproximadamente 212 μ m y aproximadamente 425 μ m son los más preferidos, y pueden obtenerse en Clarkson Chromatography Products, Inc. (S. Williamsport, PA) u Osteonics (Holanda). Tras la implantación, los dispositivos que contienen partículas de tamaño dentro de este intervalo muestran altas velocidades de resorción por análisis de imágenes y bajas respuestas inflamatorias cuando se implantan en un sitio subcutáneo de rata, como se describe en otro lugar en la presente memoria.

“Dispositivo osteogénico” se entiende que significa una composición que comprende al menos una proteína osteogénica dispersada en una matriz. Como se da a conocer en la presente memoria, un “dispositivo osteogénico mejorado” comprende proteína osteogénica, una matriz como se define anteriormente y un agente aglutinante como se define anteriormente. En contraposición, un “dispositivo osteogénico estándar” comprende proteína osteogénica y una matriz, pero no un agente aglutinante; los dispositivos osteogénicos estándar pueden comprender una matriz sintética, polimérica o como se define anteriormente. En los ejemplos y enseñanzas expuestos a continuación, los dispositivos osteogénicos estándar se designan adicionalmente: dispositivos estándar, dispositivo de OP, dispositivo de OP-1 u OP. Los dispositivos osteogénicos mejorados se designan adicionalmente: dispositivo que contiene CMC, dispositivo estándar que contiene CMC, dispositivo de CMC/OP-1, OP-1/CMC/colágeno, OPCMC/colágeno y dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina. Como se utiliza en la presente memoria, un “dispositivo ficticio” no contiene proteína osteogénica y se formula libre de cualquier factor osteoinductor conocido. La presente invención contempla también dispositivos mejorados que comprenden al menos dos proteínas osteogénicas diferentes y/o al menos dos matrices diferentes como se definen en la presente memoria. Otras realizaciones de dispositivos mejorados pueden comprender adicionalmente al menos dos agentes aglutinantes diferentes como se definen en la presente memoria. En aún otras realizaciones, cualquiera de los dispositivos mejorados anteriormente citados puede comprender adicionalmente un agente humectante como se define en la presente memoria. Cualquiera de las realizaciones anteriormente citadas puede incluir también componentes radioopacos tales como agentes de contraste disponibles comercialmente. Generalmente, hay tres tipos bien conocidos de dichos agentes: hidroxiapatitos, sulfato de bario y yodo orgánico. Los dispositivos que contienen componentes radioopacos son particularmente útiles para la administración de dispositivo en un sitio de defecto cerrado, como se discute en otro lugar en la presente memoria. La identificación de un componente radioopaco adecuado requiere sólo experiencia normal y experimentación rutinaria. Véanse, por ejemplo, tratados radiográficos, incluyendo Ehrlich y McCloskey, “Patient Care in Radiography” (Mosby Publisher, 1993); “Radiographic Exposure,

Processing and Quality Control” de Carol Fuch (Charles C. Thomas Publisher, 1993) y “Fundamentals of Special Radiographic Procedures” de Snopek (W.B. Saunders Company, 1992).

Las realizaciones preferidas de dispositivos mejorados son adhesivas a hueso, cartílago, músculo y/u otro tejido. Tienen propiedades de manejo mejoradas y son resistentes al desalojo tras irrigación durante cirugía y tras sutura. De forma similar, son cohesivos y no se eliminan por lavado, se disgregan ni se diluyen por irrigación y/o infiltración de fluidos corporales tales como la sangre. Las realizaciones preferidas permanecen adheridas después de la cirugía, incluso en una articulación. Es de particular importancia que los dispositivos mejorados se confinan fácilmente en el sitio de defecto. Funcionalmente, el dispositivo osteogénico mejorado de la presente invención induce la formación acelerada de hueso y/o cartílago, así como un tejido de reparación de mayor calidad y más estable, y puede conseguir estos beneficios a dosis de proteína osteogénica menores que la necesaria con un dispositivo osteogénico estándar. Por tanto, la mezcla de proteína osteogénica con matriz no sintética no polimérica y un agente aglutinante tiene propiedades inesperadas que el profesional experto puede ahora aprovechar como se ejemplifica en la presente memoria. Una realización actualmente preferida comprende OP-1, matriz de colágeno y el agente aglutinante carboximetilcelulosa (CMC). Como se discute a continuación, una ventaja asociada al agente aglutinante, CMC, es su efectividad incluso cuando está presente en cantidades relativas bajas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones ejemplificadas en la presente memoria, puede utilizarse OP-1 en cantidades en el intervalo de aproximadamente 1,25 a 2,50 mg por aproximadamente 1.000 mg de colágeno y por aproximadamente 180 a 200 mg de CMC.

Estas matrices y el agente aglutinante como se describen en la presente memoria exhiben todas las características de manejo preferidas anteriormente citadas asociadas a un dispositivo osteogénico mejorado.

En ciertas otras realizaciones, estas cantidades de proteína, matriz y agente aglutinante pueden aumentarse o reducirse según las condiciones y las circunstancias relacionadas con la reparación de defecto. Puede añadirse adicionalmente un agente humectante tal como solución salina. Como se ejemplifica a continuación, una configuración preferida para implantación en un sitio de defecto abierto asume una consistencia de masilla. Puede moldearse y conformarse por el cirujano antes de la implantación. Esta configuración se consigue ajustando la proporción de matriz a agente aglutinante a agente humectante de manera similar a la enseñada en la presente memoria. Como se ejemplifica adicionalmente a continuación, los defectos cerrados pueden tratarse con una configuración de dispositivo más suelta y más fluida, que parece un líquido viscoso. Dichas configuraciones pueden inyectarse sin intervención quirúrgica en el sitio de defecto. De nuevo, simplemente ajustando las proporciones de matriz a agente aglutinante a agente humectante, puede conseguirse esta realización. Actualmente, un dispositivo mejorado preferido comprende aproximadamente 1 parte de agente aglutinante (p/p) por aproximadamente 5 partes de matriz (p/p). Como se describe en la presente memoria a continuación, pueden utilizarse otras proporciones para preparar dispositivos mejorados, dependiendo de la naturaleza del agente aglutinante y/o la matriz.

Por supuesto, un rasgo esencial de cualquier formulación de dispositivo osteogénico mejorado es que debe ser efectiva para proporcionar al menos una fuente local de proteína osteogénica en el sitio de defecto, aunque transitoria. Como se ejemplifica a continuación, el contenido de agente aglutinante de un dispositivo osteogénico mejorado no afecta a la cinética de liberación/retención de proteína. Esto es inesperado en vista de las observaciones contrarias de que los dispositivos estándar que contienen polímero no consiguieron mostrar efectos osteoinductores clínicamente significativos en ausencia de material secuestrante (definido por incluir materiales celulósicos) debido a que la desorción de proteína era demasiado grande. (Véase, por ejemplo, el documento US 5.597.897). Como se ejemplifica a continuación, incluso cuando está presente un agente aglutinante como se define en la presente memoria, la proteína se sigue desorbiendo del dispositivo mejorado, aunque los efectos osteoinductivos son fácilmente manifiestos. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, los rasgos y beneficios inesperados asociados a la presente invención parecen relacionarse menos con una interacción proteína-agente aglutinante y más con una interacción agente aglutinante-matriz. Específicamente, el agente aglutinante como se define en la presente memoria parece complementar y/o interaccionar sinérgicamente con la matriz necesaria para la presente invención. Esto no ha sido observado hasta el momento, y esta combinación se desalienta por las enseñanzas de la técnica anterior. (Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.520.923, 5.597.897 y WO 95/24210).

El término dispositivo “unitario” designa un dispositivo osteogénico mejorado proporcionado al profesional en forma de una formulación premezclada única que comprende proteína osteogénica, matriz y agente aglutinante. El término dispositivo “no unitario” designa un dispositivo osteogénico mejorado proporcionado al profesional en al menos dos envases separados para mezclar antes del uso. Típicamente, un dispositivo no unitario comprende al menos agente aglutinante envasado separadamente de la proteína osteogénica y la matriz. El término “vehículo” designa una mezcla de agente aglutinante y matriz, como se define cada uno en la presente memoria. Por tanto, por ejemplo, un dispositivo osteogénico mejorado como se da a conocer en la presente memoria comprende proteína osteogénica y un vehículo.

Además de las proteínas osteogénicas, pueden estar contenidos también en un dispositivo osteogénico mejorado diversos factores de crecimiento, hormonas, enzimas, composiciones terapéuticas, antibióticos u otros agentes bioactivos. Por tanto, pueden combinarse diversos factores de crecimiento conocidos tales como EGF, PDGF, IGF, FGF, TGF- α y TGF- β con un dispositivo osteogénico mejorado y suministrarse al sitio de defecto. Puede utilizarse también un dispositivo osteogénico mejorado para suministrar agentes quimioterapéuticos, insulina, enzimas, inhibidores enzimáticos y/o factores quimioattractores/quimiotácticos.

“Proteína osteogénica” o proteína morfogénica ósea, se entiende generalmente que significa una proteína que puede inducir la cascada completa de eventos morfogénicos que culminan en la formación de hueso endocondral. Como se describe en otro lugar en la presente memoria, la clase de proteínas está tipificada por la proteína osteogénica humana (hOP-1). Otras proteínas osteogénicas útiles en la práctica de la invención incluyen formas osteogénicamente activas de OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9, DPP, Vgl, Vgr, proteína 60A, GDF-1, GDF-3, GDF-5, 6, 7, BMP10, BMP11, BMP13, BMP15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP o NEURAL, y variantes de secuencia aminoacídica de las mismas. En una realización actualmente preferida, la proteína osteogénica incluye una cualquiera de: OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9 y variantes de secuencia aminoacídica y homólogos de las mismas, incluyendo homólogos de especie de las mismas. Las proteínas osteogénicas particularmente preferidas son aquellas que comprenden una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 70% de homología con los 102-106 aminoácidos C-terminales que definen el dominio de siete cisteínas conservado de OP-1 humana, BMP2 y proteínas relacionadas. Ciertas realizaciones preferidas de la presente invención comprenden la proteína osteogénica OP-1. Ciertas otras realizaciones preferidas comprenden OP-1 madura solubilizada en una solución salina fisiológica. Como se describe con más detalle en otro lugar en la presente memoria, las proteínas osteogénicas adecuadas para uso con la invención de los solicitantes pueden identificarse mediante experimentación rutinaria utilizando el bioensayo reconocido en la técnica descrito por Reddi y Sampath. “Homología de secuencia aminoacídica” se entiende en la presente memoria que significa similitud de secuencia aminoacídica. Las secuencias homólogas comparten residuos de aminoácidos idénticos o similares, siendo residuos similares sustituciones conservativas, o mutaciones puntuales permitidas, de los correspondientes residuos de aminoácidos en una secuencia de referencia alineada. Por tanto, una secuencia polipeptídica candidata que comparte un 70% de homología aminoacídica con una secuencia de referencia es aquella en la que un 70% cualquiera de los residuos alineados son idénticos, o son sustituciones conservativas, de los correspondientes residuos en una secuencia de referencia. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro tal como la sustitución de arginina por lisina, ácidos glutámico por aspártico o glutamina por asparagina, y similares. El término “variación conservativa” incluye también el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido, a condición de que los anticuerpos creados por el polipéptido sustituido inmunoreaccionen también con el polipéptido no sustituido.

Las proteínas útiles en esta invención incluyen proteínas eucarióticas identificadas como proteínas osteogénicas (véase la patente de EE.UU. 5.011.691) tales como proteínas OP-1, OP-2, OP-3 y CBMP-2, así como proteínas de secuencia aminoacídica relacionada tales como DPP (de *Drosophila*), Vgl (de *Xenopus*), Vgr-1 (de ratón), GDF-1 (de seres humanos, véase Lee (1991) *PNAS*, 88: 4250-4254), 60A (de *Drosophila*, véase Wharton *et al.*, (1991) *PNAS* 88: 9214-9218), dorsalina-1 (de pollo, véase Basler *et al.* (1993) *Cell* 73: 687-702 y número de acceso a GenBank L12032 y GDF-5 (de ratón, véase Storm *et al.* (1994) *Nature* 368: 639-643). Se prefiere también la BMP-3. Las proteínas útiles adicionales incluyen constructos morfogénicos biosintéticos dados a conocer en la patente de EE.UU. n° 5.011.691, por ejemplo, COP-1, 3-5, 7 y 16, así como otras proteínas conocidas en la técnica. Aún otras proteínas incluyen formas osteogénicamente activas de BMP-3b (véase Takao *et al.* (1996), *Biochem. Biophys. Comm.* 219: 656-662), BMP-9 (véase el documento WO95/33830), BMP-15 (véase el documento WO 96/35710), BMP-12 (véase el documento WO 95/16035), CDMP-1 (véase el documento WO 94/12814), CDMP-2 (véase el documento WO 94/12814), BMP-10 (véase el documento WO 94/26893), GDF-1 (véase el documento WO 92/00382), GDF-10 (véase el documento WO 95/10539), GDF-3 (véase el documento WO 94/15965) y GDF-7 (documento WO 95/01802).

Aún otras proteínas útiles incluyen proteínas codificadas por ADN competentes para hibridar con un ADN que codifica una proteína osteogénica como se describe en la presente memoria, y análogos, homólogos, muteínas (variantes biosintéticas) y similares relacionados (véase a continuación). Ciertas realizaciones de los dispositivos osteogénicos mejorados contempladas en la presente memoria comprenden proteína osteogénica ligada funcional y/o establemente a matriz.

“Agente aglutinante”, como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier material fisiológicamente compatible que, cuando se mezcla con proteína osteogénica y matriz como se definen en la presente memoria, promueve la formación de hueso y/o cartílago. El agente aglutinante preferido como se describe en la presente memoria promueve dicha reparación utilizando menos proteína osteogénica que los dispositivos osteogénicos estándar. El agente aglutinante preferido puede promover la reparación utilizando la misma cantidad de proteína osteogénica que los dispositivos osteogénicos estándar, mientras que algunos requieren más para promover la reparación. Como se enseña en la presente memoria, el experto en la técnica puede determinar la cantidad efectiva de proteína para uso con cualquier agente aglutinante adecuado utilizando sólo experimentación rutinaria. Entre las otras características del agente aglutinante preferido está la capacidad de volver al dispositivo:

plegable, conformable y/o maleable; inyectable; adherente a hueso, cartílago, músculo y otros tejidos; resistente a la disgregación tras lavado y/o irrigación durante cirugía; y resistente al desalojo durante cirugía, sutura y después de la operación, por nombrar sólo unas pocas. Adicionalmente, en ciertas realizaciones preferidas, un agente aglutinante puede conseguir los rasgos y beneficios anteriormente citados cuando está presente a bajas proporciones. Por ejemplo, un dispositivo mejorado actualmente preferido comprende aproximadamente 1 parte de agente aglutinante y aproximadamente 5 partes de matriz. Otro dispositivo actualmente preferido comprende aproximadamente 3 partes de agente aglutinante por 5 partes de matriz. Aún otros dispositivos preferidos comprenden aproximadamente 1 parte de agente aglutinante y aproximadamente 10 partes de matriz, mientras que otros comprenden aproximadamente 1 parte de agente aglutinante y aproximadamente 25 ó 50 partes de matriz. Ciertos agentes aglutinantes pueden utili-

zarse en proporciones iguales o mayores respecto a la matriz, pero dichos agentes deben ensayarse como se enseña a continuación para identificar posibles efectos de dilución de matriz.

El agente comercial utilizado según la invención es carboximetilcelulosa, incluyendo la sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90.

“Agente humectante”, como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier solución acuosa fisiológicamente compatible, a condición de que no interfiera con la formación de hueso y/o cartílago. En ciertas realizaciones de la presente invención, el agente humectante se mezcla con un dispositivo mejorado para conseguir la consistencia exigida por el modo de reparación de defecto. Como se enseña en la presente memoria, puede utilizarse el agente humectante para conseguir una configuración de masilla o, como alternativa, una configuración de líquido viscoso. Es un agente humectante actualmente preferido la solución salina fisiológica. Pueden identificarse equivalentes por el experto utilizando sólo experimentación rutinaria y experiencia normal.

Los medios para preparar y aplicar los usos, implantes y dispositivos de la invención, así como otros aspectos materiales referentes a su naturaleza y utilidad, incluyendo cómo preparar y cómo usar la materia en cuestión reivindicada, se entenderán adicionalmente a partir de lo siguiente, que constituye el mejor modo contemplado actualmente para practicar la invención. Se apreciará que la invención no está limitada a dicho trabajo ejemplar o a los detalles específicos expuestos en estos ejemplos.

I. Consideraciones de proteína

A. Propiedades bioquímicas, estructurales y funcionales de proteínas morfogénicas óseas

Las proteínas de origen natural identificadas y/o apreciadas en la presente memoria por ser proteínas osteogénicas o morfogénicas óseas forman un subgrupo distinto dentro del agrupamiento evolutivo amplio de proteínas de secuencia relacionada conocido como la superfamilia o familia de supergenes de TGF- β . Los morfógenos óseos de origen natural comparten una secuencia aminoacídica sustancial en sus regiones C-terminales (dominios). Típicamente, las proteínas osteogénicas de origen natural anteriormente citadas se traducen en forma de un precursor que tiene una secuencia de péptido señal N-terminal de típicamente menos de aproximadamente 30 residuos, seguida de un dominio “pro” que se escinde, proporcionando el dominio C-terminal maduro. El péptido señal se escinde rápidamente tras la traducción en un sitio de escisión que puede predecirse en una secuencia dada utilizando el método de Von Heijne (1986) “Nucleic Acids Research” 14: 4683-4691. El dominio pro es típicamente aproximadamente tres veces más grande que el dominio C-terminal maduro totalmente procesado.

En realizaciones preferidas, el par de polipéptidos morfogénicos tiene secuencias aminoacídicas que comprenden cada una una secuencia que comparte una relación definida con una secuencia aminoacídica de un morfógeno de referencia. En la presente memoria, los polipéptidos osteogénicos preferidos comparten una relación definida con una secuencia presente en OP-1 humana osteogénicamente activa, la SEC ID N° 2. Sin embargo, una cualquiera o más de las secuencias de origen natural o biosintéticas dadas a conocer en la presente memoria podrían utilizarse de forma similar como secuencia de referencia. Los polipéptidos osteogénicos preferidos comparten una relación definida con al menos el dominio de seis cisteínas C-terminal de OP-1 humana, los residuos 336-431 de la SEC ID N° 2. Preferiblemente, los polipéptidos osteogénicos comparten una relación definida con al menos el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana, residuos 330-431 de la SEC ID N° 2. ES decir, los polipéptidos preferidos en una proteína dimérica con actividad morfogénica ósea comprenden cada uno una secuencia que corresponde con una secuencia de referencia o es funcionalmente equivalente a la misma.

Las secuencias funcionalmente equivalentes incluyen disposiciones funcionalmente equivalentes de residuos de cisteína dispuestas en la secuencia de referencia, incluyendo inserciones o deleciones de aminoácidos que alteran la disposición lineal de estas cisteínas, pero que no perjudican materialmente su relación en la estructura plegada de la proteína morfogénica dimérica, incluyendo su capacidad de formar dichos enlaces disulfuro intra- o intercatenarios que pueden ser necesarios para la actividad morfogénica. Las secuencias funcionalmente equivalentes incluyen adicionalmente aquellas en las que uno o más residuos de aminoácidos difieren del residuo equivalente de una secuencia de referencia, por ejemplo, el dominio de siete cisteínas C-terminal (también designado en la presente memoria como el esqueleto de siete cisteínas conservado) de OP-1 humana, a condición de que esta diferencia no destruya la actividad morfogénica ósea. En consecuencia, se prefieren las sustituciones conservativas de los correspondientes aminoácidos en la secuencia de referencia. Los residuos de aminoácidos que son sustituciones conservativas de los correspondientes residuos en una secuencia de referencia son aquellos que son física o funcionalmente similares a los correspondientes residuos de referencia, por ejemplo, que tienen similar tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Son sustituciones conservativas particularmente preferidas aquellas que satisfacen los criterios definidos para una mutación puntual aceptados en Dayhoff *et al.* (1978), 5, “Atlas of Protein Sequence and Structure”, supl. 3, cap. 22 (pág. 354-352), Natl. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 20007.

Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen: las sustituciones conservativas incluyen típicamente la sustitución de un aminoácido por otro de características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, gluta-

mina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. La expresión “variación conservativa” incluye también el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido, a condición de que los anticuerpos creados por el polipéptido sustituido inmunoreaccionen también con el polipéptido no sustituido.

5 La proteína osteogénica de fuente natural en su forma nativa madura es un dímero glicosilado que tiene típicamente un peso molecular aparente de 30-36 kDa como se determina por PAGE-SDS. Cuando se reduce, la proteína de 30 kDa da lugar a dos subunidades peptídicas glicosiladas que tienen pesos moleculares aparentes de aproximadamente 16 kDa y 18 kDa. En estado reducido, la proteína no tiene actividad osteogénica detectable. La proteína no glicosilada, que
10 tiene también actividad osteogénica, tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 27 kDa. Cuando se reduce, la proteína de 27 kDa da lugar a dos polipéptidos no glicosilados que tienen pesos moleculares de aproximadamente 14 kDa a 16 kDa, capaces de inducir la formación de hueso endocondral en un mamífero. Como se describe anteriormente, las secuencias particularmente útiles incluyen aquellas que comprenden las secuencias de 96 ó 102 aminoácidos C-terminales de DPP (de *Drosophila*), Vgl (de *Xenopus*), Vgr-1 (de ratón), las proteínas OP-1 y OP-2 (véase la patente de EE.UU. n° 5.011.691 y Oppermann *et al.*), así como las proteínas designadas como BMP2, BMP3, BMP4 (véanse los
15 documentos WO 88/00205, patente de EE.UU. n° 5.013.649 y WO 91/18098), BMP5 y BMP6 (véanse los documentos WO 90/11366, PCT/US 90/01630), BMP8 y BMP9.

Otras proteínas morfogénicas útiles en la práctica de la invención incluyen formas morfogénicamente activas de OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BNT5, BMP6, BMP9, GDF-5, GDF-6, GDF-7, DPP, Vgl, Vgr, proteína
20 60A, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, BMP10, BMP11, BMP13, BMP15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP o NURAL, y variantes de secuencia aminoacídica de las mismas. En una realización actualmente preferida, la proteína osteogénica incluye una cualquiera de OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9 y variantes de secuencia aminoacídica y homólogos de las mismas, incluyendo homólogos de especie de las mismas.

25 Las publicaciones que dan a conocer estas secuencias, así como sus propiedades químicas y físicas, incluyen: OP-1 y OP-2: documentos US 5.011.691, US 5.266.683, Ozkaynak *et al.* (1990) *EMBO J.* 9: 2085-2093; OP-3: documento WO 94/10203 (PCT US 93/10520); BMP2, BMP3, BMP4: documento WO 88/00205, Wozney *et al.* (1988) *Science* 242: 1528-1534; BMP5 y BMP6: Celeste *et al.* (1991) *PNAS* 87: 9843-9847; Vgr-1: Lyons *et al.* (1989) *PNAS* 86: 4554-4558; DPP: Padgett *et al.*, (1987) *Nature* 325: 81-84; Vg-1: Weeks (1987) *Cell* 51: 861-867; BMP-
30 9: documento WO 95/33830 (PCT/US 95/07084); BMP-10: documento WO 94/26893 (PCT/US 94/05290); BMP-11: documento WO 94/26892 (PCT/US 94/05288); BMP-12: documento WO 95/16035 (PCT/US94/14030); BMP-13: documento WO 95/16035 (PCT/US 94/14030); GDF-1: documento WO 92/00382 (PCT/US 91/04096) y Lee *et al.* (1991) *PNAS* 88: 4250-4254; GDF-8: documento WO 94/2168 (PCT/US 94/03019); GDF-9: documento WO 94/15966 (PCT/US 94/00685); GDF-10: documento WO 95/10539 (PCT/US 94/11440); GDF-11: documento WO 96/01845 (PCT/US 95/08543); BMP-15: documento WO 96/36710 (PCT US 96/06540); MP021: documento WO 96/01316 (PCT/EP 95/02552); GDF-5 (CDMP-1, MP52): documentos WO 94/15949 (PCT/US 94/00657) y WO 96/1433 (PCT/US 94/12814) y WO 93/16099 (PCT/EP 93/00350); GDF-6 (CDMP-2, BMP-13): documentos WO 95/01801 (PCT/US 94/07762) y WO 96/14335 y WO 95/10635 (PCT/US 94/14030); GDF-7 (CDMP-3, BMP12): docu-
40 cumentos WO 95/10802 (PCT/US 94/07799) y WO 95/10635 (PCT/US 94/14030). En otra realización, las proteínas útiles incluyen constructos biosintéticos biológicamente activos, incluyendo nuevas proteínas morfogénicas biosintéticas y proteínas quiméricas diseñadas utilizando secuencias de dos o más morfógenos conocidos. Véanse también los constructos biosintéticos dados a conocer en la patente de EE.UU. 5.011.691 (por ejemplo, COP-1, COP-3, COP-4, COP-5, COP-7 y COP-16).

45 En ciertas realizaciones preferidas, las proteínas morfogénicas óseas útiles en la presente memoria incluyen aquellas en las que las secuencias aminoacídicas comprenden una secuencia que comparte al menos un 70% de homología de secuencia aminoacídica o “similitud” y, preferiblemente, un 80% de homología o similitud, con una proteína morfogénica de referencia seleccionada de las proteínas de origen natural anteriores. Preferiblemente, la proteína de referencia es OP-1 humana, y la secuencia de referencia de la misma es el dominio de siete cisteínas C-terminal presente en formas osteogénicamente activas de OP-1 humana, residuos 330-431 de la SEC ID N° 2. En ciertas realizaciones, se alinea con la misma un polipéptido sospechoso de ser equivalente funcional de un polipéptido morfogénico de referencia utilizando el método de Needleman *et al.* (1970), *J. Mol. Biol.* 48: 443-453, implementado convenientemente mediante programas informáticos tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). Como se observa anteriormente, los
55 huecos internos e inserciones aminoacídicas en la secuencia candidata se ignoran con el fin de calcular la relación definida, expresada convencionalmente como el nivel de homología o identidad de secuencia aminoacídica entre las secuencias candidata y de referencia. “Homología de secuencia aminoacídica” se entiende en la presente memoria que incluye tanto identidad como similitud de secuencia aminoacídica. Las secuencias homólogas comparten residuos de aminoácidos idénticos y/o similares, siendo los residuos similares sustituciones conservativas, o “mutaciones puntuales permitidas”, de los correspondientes residuos de aminoácidos en una secuencia de referencia alineada. Por tanto, una secuencia polipeptídica candidata que comparte un 70% de homología aminoacídica con una secuencia de referencia es aquella en la que cualquier 70% de los residuos alineados son idénticos, o son sustituciones conservativas, de los correspondientes residuos en una secuencia de referencia. En una realización actualmente preferida, la secuencia de referencia es OP-1. Las proteínas morfogénicas óseas útiles en la presente memoria incluyen en consecuencia
60 contrapartidas alélicas, filogenéticas y otras variantes de la secuencia de referencia preferida, tanto de origen natural como producidas biosintéticamente (por ejemplo, incluyendo “mutéfnas” o “proteínas mutantes”), así como nuevos miembros de la familia morfogénica general de proteínas, incluyendo aquellas expuestas e identificadas anteriormente. Ciertos polipéptidos morfogenéticos particularmente preferidos comparten al menos un 60% de identidad aminoacídica.

ca con la secuencia de referencia preferida de OP-1 humana, aún más preferiblemente al menos un 65% de identidad aminoacídica con la misma.

En otras realizaciones preferidas, la familia de polipéptidos morfogénicos óseos útiles en la presente invención, y los miembros de la misma, se definen por una secuencia aminoacídica genérica. Por ejemplo, la secuencia genérica 7 (SEC ID N° 4) Y la secuencia genérica 8 (SEC ID N° 5), dadas a conocer a continuación, proporcionan las homología compartidas entre los miembros de la familia de proteínas preferidos identificados hasta la fecha, incluyendo al menos OP-1, OP-2, OP-3, CBMP-2A, CBMP-2B, BMP-3, 60A, DPP, Vgl, BMP-5, BMP-6, Vgr-1 y GDF-1. Las secuencias aminoacídicas para estas proteínas se describen en la presente memoria y/o en la técnica, como se resume anteriormente. Las secuencias genéricas incluyen tanto la identidad aminoacídica compartida por estas secuencias en el dominio C-terminal, definida por los esqueletos de seis y siete cisteínas (secuencias genéricas 7 y 8, respectivamente), así como residuos alternativos para las posiciones variables dentro de la secuencia. Las secuencias genéricas proporcionan un esqueleto de cisteína apropiado en el que pueden formarse enlaces disulfuro inter- o intramoleculares, y contienen ciertos aminoácidos críticos que es probable que influyan en la estructura terciaria de las proteínas plegadas. Además, las secuencias genéricas permiten una cisteína adicional en posición 36 (secuencia genérica 7) o posición 41 (secuencia genérica 8), abarcando así las secuencias morfogénicamente activas de OP-2 y OP-3.

Secuencia genérica 7

20				Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa
				1				5		
	Xaa	Gly	Trp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro
25			10					15		
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Tyr	Cys	Xaa	Gly
			20					25		
30	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			30					35		
	Xaa	Xaa	Xaa	Asn	His	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
35			40					45		
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			50					55		
	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa
40			60					65		
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			70					75		
45	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			80					85		
	Xaa	Met	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys	Xaa
50			90					95		

en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados definidos del modo siguiente: "res" significa "residuo" y Xaa en res.2= (Tyr o Lys); Xaa en Res.3= (Val o Ile); Xaa en res.4= (Ser, Asp o Glu); Xaa en res.6= (Arg, Gln, Ser, Lys o Ala); Xaa en res.7= (Asp o Glu); Xaa en res.8= (Leu, Val o Ile); Xaa en res.11= (Gln, Leu, Asp, His, Asn o Ser); Xaa en res.12= (Asp, Arg, Asn o Glu); Xaa en res.13= (Trp o Ser); Xaa en res.14= (Ile o Val); Xaa en res.15= (Ile o Val); Xaa en res.16= (Ala o Ser); Xaa en res.18= (Glu, Gln, Leu, Lys, Pro o Arg); Xaa en res.19= (Gly o Ser); Xaa en res.20= (Tyr o Phe); Xaa en res.21= (Ala, Ser, Asp, Met, His, Gln, Leu o Gly); Xaa en res.23= (Tyr, Asn o Phe); Xaa en res.26= (Glu, His, Tyr, Asp, Gln, Ala o Ser); Xaa en res.28= (Glu, Lys, Asp, Gln o Ala); Xaa en res.30= (Ala, Ser, Pro, Gln, Ile o Asn); Xaa en res.31= (Phe, Leu o Tyr); Xaa en res.33= (Leu, Val o Met); Xaa en res.34= (Asn, Asp, Ala, Thr o Pro); Xaa en res.35= (Ser, Asp, Glu, Leu, Ala o Lys); Xaa en res.36= (Tyr, Cys, His, Ser o Ile); Xaa en res.37= (Met, Phe, Gly o Leu); Xaa en res.38= (Asn, Ser o Lys); Xaa en res.39= (Ala, Ser, Gly o Pro); Xaa en res.40= (Thr, Leu o Ser); Xaa en res.44= (Ile, Val o Thr); Xaa en res.45= (Val, Leu, Met o Ile); Xaa en res.46= (Gln o Arg); Xaa en res.47= (Thr, Ala o Ser); Xaa en res.48= (Leu o Ile); Xaa en res.49= (Val o Met); Xaa en res.50= (His, Asn o Arg); Xaa en res.51= (Phe, Leu, Asn, Ser, Ala o Val); Xaa en res.52= (Ile, Met, Asn, Ala, Val, Gly o Leu); Xaa en res.53= (Asn, Lys, Ala, Glu, Gly o Phe); Xaa en res.54= (Pro, Ser o Val); Xaa en res.55= (Glu, Asp, Asn, Gly, Val, Pro o Lys); Xaa en res.56= (Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser, Gly, Ile o His); Xaa en res.57= (Val, Ala o Ile); Xaa en res.58= (Pro o Asp); Xaa en res.59= (Lys, Leu o Glu); Xaa en res.60= (Pro, Val o Ala); Xaa en res.63= (Ala o Val); Xaa en res.65= (Thr, Ala o Glu); Xaa en res.66= (Gln, Lys, Arg o Glu); Xaa

ES 2 273 412 T3

en res.67= (Leu, Met o Val); Xaa en res.68= (Asn, Ser, Asp o Gly); Xaa en res.69= (Ala, Pro o Ser); Xaa en res.70= (Ile, Thr, Val o Leu); Xaa en res.71= (Ser, Ala o Pro); Xaa en res.72= (Val, Leu, Met o Ile); Xaa en res.74= (Tyr o Phe); Xaa en res.75= (Phe, Tyr, Leu o His); Xaa en res.76= (Asp, Asn o Leu); Xaa en res.77= (Asp, Glu, Asn, Arg o Ser); Xaa en res.78= (Ser, Gln, Asn, Tyr o Asp); Xaa en res.79= (Ser, Asn, Asp, Glu o Lys); Xaa en res.80= (Asn, Thr o Lys); Xaa en res.82= (Ile, Val o Asn); Xaa en res.84= (Lys o Arg); Xaa en res.85= (Lys, Asn, Gln, His, Arg o Val); Xaa en res.86= (Tyr, Glu o His); Xaa en res.87= (Arg, Gln, Glu o Pro); Xaa en res.88= (Asn, Glu, Trp o Asp); Xaa en res.90= (Val, Thr, Ala o Ile); Xaa en res.92= (Arg, Lys, Val, Asp, Gln o Glu); Xaa en res.93= (Ala, Gly, Glu o Ser); Xaa en res.95= (Gly o Ala) y Xaa en res.97= (His o Arg).

La secuencia genérica 8 (SEC ID N° 5) incluye toda la secuencia genérica 7 e incluye además la siguiente secuencia (SEC ID N° 8) en su terminación N:

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5

En consecuencia, empezando por el residuo 7, cada "Xaa" en la secuencia genérica 8 es un aminoácido especificado definido como para la secuencia genérica 7, con la diferencia que cada número de residuo descrito para la secuencia genérica 7 se desplaza en cinco en la secuencia genérica 8. Por tanto, "Xaa en res.2= (Tyr o Lys)" en la secuencia genérica 7 designa Xaa en el res.7 en la secuencia genérica 8. En la secuencia genérica 8, Xaa en res.2= (Lys, Arg, Ala o Gln); Xaa en res.3= (Lys, Arg o Met), Xaa en res.4= (His, Arg o Gln) y Xaa en res.5= (Glu, Ser, His, Gly, Arg, Pro, Thr o Tyr).

En otra realización, las proteínas osteogénicas útiles incluyen aquellas definidas por las secuencias genéricas 9 y 10, definidas a continuación.

Específicamente, las secuencias genéricas 9 y 10 son secuencias aminoacídicas combinadas de las siguientes proteínas: OP-1 humana, OP-2 humana, OP-3 humana, BMP-2 humana, BMP-3 humana, BMP-4 humana, BMP-5 humana, BMP-6 humana, BMP-8 humana, BMP-9 humana, BMP-10 humana, BMP-11 humana, 60A de *Drosophila*, Vg-1 de *Xenopus*, UNIVIN de erizo de mar, CDMP-1 humana (GDF-5 de ratón), CDMP-2 humana (GDF-6 de ratón, BMP-13 humana), CDMP-3 humana (GDF-7 de ratón, BMP-12 humana), GDF-3 de ratón, GDF-1 humana, GDF-1 de ratón, DORSALIN de pollo, dpp, SCREW de *Drosophila*, NODAL de ratón, GDF-8 de ratón, GDF-8 humana, GDF-9 de ratón, GDF-10 de ratón, GDF-11 humana, GDF-11 de ratón, BMP-15 humana y BMP-3b de rata. Como la secuencia genérica 7, la secuencia genérica 9 proporciona el esqueleto de seis cisteínas C-terminal y, como la secuencia genérica 8, la secuencia genérica 10 proporciona el esqueleto de siete cisteínas.

Secuencia genérica 9 (SEC ID N° 6)

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5						10
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				15						20
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Xaa
				25						30
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				35						40
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				45						50
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				55						60
Xaa	Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				65						70
Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				75						80
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				85						90
Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys	Xaa				
				95						

en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados definidos como a continuación: “Res” significa “residuo” y Xaa en el res.1= (Phe, Leu o Glu); Xaa en res.2= (Tyr, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val o Glu); Xaa en res.3= (Val, Ile, Leu o Asp); Xaa en res.4= (Ser, Asp, Glu, Asn o Phe); Xaa en res.5= (Phe o Glu); Xaa en res.6= (Arg, Gln, Lys, Ser, Glu, Ala o Asn); Xaa en res.7= (Asp, Glu, Leu, Ala o Gln); Xaa en res.8= (Leu, Val, Met, Ile o Phe); Xaa en res.9= (Gly, His o Lys); Xaa en res.10= (Trp o Met); Xaa en res.11= (Gln, Leu, His, Glu, Asn, Asp, Ser o Gly); Xaa en res.12= (Asp, Asn, Ser, Lys, Arg, Glu o His); Xaa en res.13= (Trp o Ser); Xaa en res.14= (Ile o Val); Xaa en res.15= (Ile o Val); Xaa en res.16= (Ala, Ser, Tyr o Trp); Xaa en res.18= (Glu, Lys, Gln, Met, Pro, Leu, Arg, His o Lys); Xaa en res.19= (Gly, Glu, Asp, Lys, Ser, Gln, Arg o Phe); Xaa en res.20= (Tyr o Phe); Xaa en res.21= (Ala, Ser, Gly, Met, Gln, His, Glu, Asp, Leu, Asn, Lys o Thr); Xaa en res.22= (Ala o Pro); Xaa en res.23= (Tyr, Phe, Asn, Ala o Arg); Xaa en res.24= (Tyr, His, Glu, Phe o Arg); Xaa en res.26= (Glu, Asp, Ala, Ser, Tyr, His, Lys, Arg, Gln o Gly); Xaa en res.28= (Glu, Asp, Leu, Val, Lys, Gly, Thr, Ala o Gln); Xaa en res.30= (Ala, Ser, Ile, Asn, Pro, Glu, Asp, Phe, Gln o Leu); Xaa en res.31= (Phe, Tyr, Leu, Asn, Gly o Arg); Xaa en res.32= (Pro, Ser, Ala o Val); Xaa en res.33= (Leu, Met, Glu, Phe o Val); Xaa en res.34= (Asn, Asp, Thr, Gly, Ala, Arg, Leu o Pro); Xaa en res.35= (Ser, Ala, Glu, Asp, Thr, Leu, Lys, Gln o His); Xaa en res.36= (Tyr, His, Cys, Ile, Arg, Asp, Asn, Lys, Ser, Glu o Gly); Xaa en res.37= (Met, Leu, Phe, Val, Gly o Tyr); Xaa en res.38= (Asn, Glu, Thr, Pro, Lys, His, Gly, Met, Val o Arg); Xaa en res.39= (Ala, Ser, Gly, Pro o Phe); Xaa en res.40= (Thr, Ser, Leu, Pro, His o Met); Xaa en res.41= (Asn, Lys, Val, Thr o Gln); Xaa en res.42= (His, Tyr o Lys); Xaa en res.43= (Ala, Thr, Leu o Tyr); Xaa en res.44= (Ile, Thr, Val, Phe, Tyr, Met o Pro); Xaa en res.45= (Val, Leu, Met, Ile o His); Xaa en res.46= (Gln, Arg o Thr); Xaa en res.47= (Thr, Ser, Ala, Asn o His); Xaa en res.48= (Leu, Asn o Ile); Xaa en res.49= (Val, Met, Leu, Pro o Ile); Xaa en res.50= (His, Asn, Arg, Lys, Tyr o Gln); Xaa en res.51= (Phe, Leu, Ser, Asn, Met, Ala, Arg, Glu, Gly o Gln); Xaa en res.52= (Ile, Met, Leu, Val, Lys, Gln, Ala o Tyr); Xaa en res.53= (Asn, Phe, Lys, Glu, Asp, Ala, Gln, Gly, Leu o Val); Xaa en res.54= (Pro, Asn, Ser, Val o Asp); Xaa en res.55= (Glu, Asp, Asn, Lys, Arg, Ser, Gly, Thr, Gln, Pro o His); Xaa en res.56= (Thr, His, Tyr, Ala, Ile, Lys, Asp, Ser, Gly o Arg); Xaa en res.57= (Val, Ile, Thr, Ala, Leu o Ser); Xaa en res.58= (Pro, Gly, Ser, Asp o Ala); Xaa en res.59= (Lys, Leu, Pro, Ala, Ser, Glu, Arg o Gly); Xaa en res.60= (Pro, Ala, Val, Thr o Ser); Xaa en res.61= (Cys, Val o Ser); Xaa en res.63= (Ala, Val o Thr); Xaa en res.65= (Thr, Ala, Glu, Val, Gly, Asp o Tyr); Xaa en res.66= (Gln, Lys, Glu, Arg o Val); Xaa en res.67= (Leu, Met, Thr o Tyr); Xaa en res.68= (Asn, Ser, Gly, Thr, Asp, Glu, Lys o Val); Xaa en res.69= (Ala, Pro, Gly o Ser); Xaa en res.70= (Ile, Thr, Leu o Val); Xaa en res.71= (Ser, Pro, Ala, Thr, Asn o Gly); Xaa en res.72= (Val, Ile, Leu o Met); Xaa en res.74= (Tyr, Phe, Arg, Thr, Tyr o Met); Xaa en res.75= (Phe, Tyr, His, Leu, Ile, Lys, Gln o Val); Xaa en res.76= (Asp, Leu, Asn o Glu); Xaa en res.77= (Asp, Ser, Arg, Asn, Glu, Ala, Lys, Gly o Pro); Xaa en res.78= (Ser, Asn, Asp, Tyr, Ala, Gly, Gln, Met, Glu, Asn o Lys); Xaa en res.79= (Ser, Asn, Glu, Asp, Val, Lys, Gly, Gln o Arg); Xaa en res.80= (Asn, Lys, Thr, Pro, Val, He, Arg, Ser o Gln); Xaa en res.81= (Val, Ile, Thr o Ala); Xaa en res.82= (Ile, Asn, Val, Leu, Tyr, Asp o Ala); Xaa en res.83= (Leu, Tyr, Lys o Ile); Xaa en res.84= (Lys, Arg, Asn, Tyr, Phe, Thr, Glu o Gly); Xaa en res.85= (Lys, Arg, His, Gln, Asn, Glu o Val); Xaa en res.86= (Tyr, His, Glu o Ile); Xaa en res.87= (Arg, Glu, Gln, Pro o Lys); Xaa en res.88= (Asn, Asp, Ala, Glu, Gly o Lys); Xaa en res.89= (Met o Ala); Xaa en res.90= (Val, Ile, Ala, Thr, Ser o Lys); Xaa en res.91= (Val o Ala); Xaa en res.92= (Arg, Lys, Gln, Asp, Glu, Val, Ala, Ser o Thr); Xaa en res.93= (Ala, Ser, Glu, Gly, Arg o Thr); Xaa en res.95= (Gly, Ala o Thr); Xaa en res.97= (His, Arg, Gly, Leu o Ser). Adicionalmente, después del res.53 en rBMP3b y mGDF-10, hay una Ile; después del res.54 en GDF-1 hay una T; después del res. 54 en BMP3 hay una V; después del res.78 en BMP-8 y dorsalina hay una G; después del res.37 en hGDF-1 hay Pro, Gly, Gly, Pro.

La secuencia genérica 10 (SEC ID N° 7) incluye toda la secuencia genérica 9 (SEC ID N° 6) y además incluye la siguiente secuencia (SEC ID N° 9) en su terminación N:

SEC ID N° 9:

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5

En consecuencia, empezando por el residuo 6, cada “Xaa” en la secuencia genérica 10 es un aminoácido especificado definido como para la secuencia genérica 9, con la diferencia de que cada número de residuo descrito para la secuencia genérica 9 está desplazado en cinco en la secuencia genérica 10. Por tanto, “Xaa en res.1= (Tyr, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val o Glu)” en la secuencia genérica 9 designa Xaa en el res.6 en la secuencia genérica 10. En la secuencia genérica 10, Xaa en res.2= (Lys, Arg, Gln, Ser, His, Glu, Ala o Cys; Xaa en res.3= (Lys, Arg, Met, Lys, Thr, Leu, Tyr o Ala); Xaa en res.4= (His, Gln, Arg, Lys, Thr, Leu, Val, Pro o Tyr); y Xaa en res.5= (Gln, Thr, His, Arg, Pro, Ser, Ala, Gln, Asn, Tyr, Lys, Asp o Leu).

Como se observa anteriormente, ciertas secuencias polipeptídicas morfogénicas óseas actualmente preferidas en esta invención tienen más de un 60% de identidad, preferiblemente más de un 65% de identidad, con la secuencia aminoacídica que define la secuencia de referencia preferida de hOP-1. Estas secuencias particularmente preferidas incluyen contrapartidas alélicas y filogenéticas variantes de las proteínas OP-1 y OP-2, incluyendo la proteína 60A de *Drosophila*. En consecuencia, en ciertas realizaciones particularmente preferidas, las proteínas morfogénicas útiles incluyen proteínas activas que comprenden pares de cadenas polipeptídicas dentro de la secuencia aminoacídica genérica designada en la presente memoria como “OPX” (SEC ID N° 3), que define el esqueleto de siete cisteínas y da cabida a las homologías entre varias variantes identificadas de OP-1 y OP-2. Como se describe en la misma, cada Xaa en una posición dada se selecciona independientemente de los residuos que aparecen en la correspondiente posición en la secuencia C-terminal de OP-1 u OP-2 de ratón o humana.

ES 2 273 412 T3

		Cys	Xaa	Xaa	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Xaa	Asp	Leu	Gly	Trp	Xaa	Asp	Trp	
		1			5					10					15					
		Xaa	Ile	Ala	Pro	Xaa	Gly	Tyr	Xaa	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Xaa	Phe	Pro
		20					25						30					35		
5		Leu	Xaa	Ser	Xaa	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Xaa	Gln	Xaa	Leu	Val	His	Xaa
		40					45						50					55		
		Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Val	Pro	Lys	Xaa	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Xaa	Leu	Xaa	Ala	
				60					65						70					
10		Xaa	Ser	Val	Leu	Tyr	Xaa	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Asn	Val	Ile	Leu	Xaa	Lys	Xaa	Arg	
		75					80					85					90			
15					Asn	Met	Val	Val	Xaa	Ala	Cys	Gly	Cys	His						
					95							100								

20 en la que Xaa en res.2= (Lys o Arg); Xaa en res.3= (Lys o Arg); Xaa en res.11= (Arg o Gln); Xaa en res.16= (Gln o Leu); Xaa en res.19= (Ile o Val); Xaa en res.23= (Glu o Gln); Xaa en res.26= (Ala o Ser); Xaa en res.35= (Ala o Ser); Xaa en res.39= (Asn o Asp); Xaa en res.41= (Tyr o Cys); Xaa en res.50= (Val o Leu); Xaa en res.52= (Ser o Thr); Xaa en res.56= (Phe o Leu); Xaa en res.57= (Ile o Met); Xaa en res.58= (Asn o Lys); Xaa en res.60= (Glu, Asp o Asn); Xaa en res.61= (Thr, Ala o Val); Xaa en res.65= (Pro o Ala); Xaa en res.71= (Gln o Lys); Xaa en res.73= (Asn o Ser); Xaa en res.75= (Ile o Thr); Xaa en res.80= (Phe o Tyr); Xaa en res.82= (Asp o Ser); Xaa en res.84= (Ser o Asn); Xaa en res.89= (Lys o Arg); Xaa en res.91= (Tyr o His); y Xaa en res.97= (Arg o Lys).

En aún otra realización preferida, las proteínas activas osteogénicamente útiles tienen cadenas polipeptídicas con secuencias aminoácídicas que comprenden una secuencia codificada por un ácido nucleico que hibrida, en condiciones de bajo, medio o alto rigor, con ADN o ARN que codifica secuencias morfogénicas de referencia, por ejemplo, secuencias C-terminales que definen los dominios de siete cisteínas conservados de OP-1, OP-2, BMP2, 4, 5, 6, 60A, GDF3, GDF6, GDF7 y similares. Como se utiliza en la presente memoria, las condiciones de hibridación de alto rigor se definen como hibridación según técnicas conocidas en formamida al 40%, 5 x SSPE, 5 x solución de Denhardt y SDS al 0,1% a 37°C durante una noche, y lavado en 0,1 x SSPE, SDS al 0,1% a 50°C. Las condiciones de rigor estándar están bien caracterizadas en textos de clonación molecular estándar disponibles comercialmente. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); "DNA Cloning", volúmenes I y II (D.N. Glover ed., 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed., 1984); "Nucleic Acid Hybridization", (B.D. Hames & S.J. Higgins ed., 1984); y B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", (1984).

Como se observa anteriormente, las proteínas útiles en la presente invención son generalmente proteínas diméricas 40 que comprenden un par plegado de los polipéptidos anteriores. Dichas proteínas morfogénicas son inactivas en forma reducida, pero son activas en forma de homodímeros oxidados, y cuando se oxidan en combinación con otras de esta invención produciendo heterodímeros. Por tanto, los miembros de un par plegado de polipéptidos morfogenéticos en una proteína morfogénicamente activa pueden seleccionarse independientemente de cualquiera de los polipéptidos específicos citados anteriormente.

Las proteínas morfogénicas óseas útiles en los materiales y métodos de esta invención incluyen proteínas que comprenden cualquiera de las cadenas polipeptídicas descritas anteriormente, tanto aisladas de fuentes de origen natural, como producidas mediante ADN recombinante u otras técnicas sintéticas, e incluyen contrapartidas alélicas y filogenéticas variantes de estas proteínas, así como muteínas de las mismas, y diversos constructos truncados y de fusión. Los mutantes de delección o adición se prevé también que sean activos, incluyendo aquellos que pueden alterar el dominio de seis o siete cisteínas C-terminal conservado, a condición de que la alteración no desestabilice funcionalmente la relación de estas cisteínas en la estructura plegada. En consecuencia, dichas formas activas se consideran el equivalente de los constructos descritos específicamente dados a conocer en la presente memoria. Las proteínas pueden incluir formas que tienen patrones de glicosilación variables, terminaciones N variables, una familia de proteínas relacionadas que tienen regiones de homología de secuencia aminoacídica, y formas truncadas o mutadas activas de proteínas nativas o biosintéticas, producidas mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras.

Las proteínas morfogénicas óseas contempladas en la presente memoria pueden expresarse a partir de ADNc intacto o truncado o de ADN sintéticos en células hospedadoras procarióticas o eucarióticas, y purificarse, escindirse, replegarse y dimerizarse, formando composiciones morfogénicamente activas. Las células hospedadoras actualmente preferidas incluyen, sin limitación, procariotas incluyendo *E. coli* o eucariotas incluyendo levadura, o células de mamífero tales como células CHO, COS o BSC. Un experto en la técnica apreciará que pueden utilizarse ventajosamente otras células hospedadoras. Las descripciones detalladas de las proteínas morfogénicas óseas útiles en la práctica de esta invención, incluyendo cómo prepararlas, utilizarlas y ensayar la actividad osteogénica, se dan a conocer en numerosas publicaciones, incluyendo las patentes de EE.UU. n° 5.266.683 y 5.011.691.

Por tanto, en vista de esta descripción y el conocimiento disponible en la técnica, los expertos en ingeniería genérica pueden aislar genes a partir de ADNc o bibliotecas genómicas de diversas especies biológicas diferentes que

codifican secuencias aminoacídicas apropiadas, u oligonucleótidos, y expresarlos después en diversos tipos de células hospedadoras, incluyendo tanto procariotas como eucariotas, produciendo grandes cantidades de proteínas activas capaces de estimular la morfogénesis de hueso endocondral en un mamífero.

5 II. Consideraciones de agente aglutinante

Como ya se ha explicado, “agente aglutinante”, como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier material fisiológicamente compatible del grupo consistente en carboximetilcelulosa y una sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90 que, cuando se mezcla con proteína osteogénica y matriz como se definen en la presente memoria, promueve la formación de hueso y/o cartílago. En ciertas realizaciones actualmente preferidas, dicho agente aglutinante promueve dicha reparación utilizando menos proteína osteogénica que los dispositivos osteogénicos estándar. Entre las otras características del agente aglutinante preferido como se describe en la presente memoria están la capacidad de volver al dispositivo:

plegable, conformable y/o maleable; inyectable; adherente a hueso, cartílago, músculo y otros tejidos; resistente a disgregación tras lavado y/o irrigación durante cirugía; y resistente al desalojo durante cirugía, sutura y después de la operación, por nombrar sólo unas pocas. Adicionalmente, en una realización actualmente preferida, el agente aglutinante puede conseguir los rasgos y beneficios anteriormente citados cuando está presente en proporciones relativamente bajas. Por ejemplo, un dispositivo mejorado actualmente preferido comprende aproximadamente 1 parte de agente aglutinante y aproximadamente 5 partes de matriz. Otro dispositivo actualmente preferido comprende 1 parte de agente aglutinante y 3 partes de matriz. Como se ejemplifica en la presente memoria, dispositivos mejorados de proporciones ampliamente divergentes pueden inducir la formación de hueso y cartílago. Se ejemplifican en la presente memoria dispositivos mejorados que tienen partes de agente aglutinante por partes de matriz en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 4:1 hasta, e incluyendo, al menos 10:1, así como de aproximadamente 1:2 a 1:5 hasta, e incluyendo, al menos 1:10, e incluyendo adicionalmente 1:25 a 1:50. Puede utilizarse cualquier proporción de agente aglutinante a matriz para practicar la presente invención. Todo lo necesario es mezclar agente aglutinante con matriz y proteína osteogénica para conseguir la formación de hueso y cartílago. Como se discute a continuación, los agentes aglutinantes pueden utilizarse en proporciones iguales o mayores respecto a la matriz, pero dichos agentes deben ensayarse como se enseña en la presente memoria para medir cualquier efecto de dilución de matriz.

Aquellos agentes aglutinantes contemplados como útiles en la presente memoria se seleccionan del grupo consistente en carboximetilcelulosa y una sal de sodio de la misma, en los que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90, como se ejemplifica y describe a continuación. Otros agentes aglutinantes incluyen, pero sin limitación, dextrano, manitol, vaselina blanca, aceite de sésamo y mezclas de los mismos. Como se ejemplifica y se describe a continuación, otros agentes aglutinantes incluyen, pero sin limitación, dextrano, manitol, vaselina blanca, aceite de sésamo y mezclas de los mismos.

Finalmente, otro agente aglutinante descrito en la presente memoria es la cola de fibrina, que comprende una mezcla de fibrinógeno y trombina de mamífero. Como se ejemplifica en la presente memoria, la cola de fibrina puede comprender amplios intervalos de fibrinógeno y trombina, por ejemplo, 1 parte de cola de fibrina y 25 partes de matriz de β -TCP; el contenido de trombina puede estar en el intervalo de aproximadamente 2,0 U a 25 U, 5 U a 10 U y aproximadamente 2,5 U a 5 U.

El contenido de fibrinógeno puede estar en el intervalo de aproximadamente 40 mg por 1.000 mg de β -TCP, por ejemplo. En un dispositivo mejorado que contiene colágeno, el contenido de fibrinógeno puede estar en el intervalo de aproximadamente 20 mg por 1.000 mg de colágeno a aproximadamente 180 mg por 1.000 mg de colágeno, por ejemplo.

En vista de las enseñanzas expuestas en la presente memoria, el experto puede identificar los equivalentes adecuados de los agentes aglutinantes identificados anteriormente utilizando simplemente experimentación rutinaria y experiencia normal. Los candidatos a agente aglutinante adecuados pueden identificarse, caracterizarse, ensayarse y después utilizarse en dispositivos osteogénicos como se expone a continuación.

Por tanto, el experto en la técnica puede identificar en consecuencia candidatos a agente aglutinante y puede reconocer de modo similar equivalentes de los agentes aglutinantes preferidos identificados específicamente en la presente memoria utilizando sólo experiencia normal y experimentación rutinaria. Habiendo identificado un(os) candidato(s) adecuado(s), el experto en la técnica puede seguir después las directrices indicadas a continuación para la selección final de un agente aglutinante preferido.

Basándose en estudios similares a los descritos en la presente memoria, son ejemplos de agentes aglutinantes adecuados, sin limitación: combinación de manitol/dextrano; dextrano solo; combinación de manitol/vaselina blanca; y aceite de sésamo. Se formuló del modo siguiente un dispositivo mejorado que contiene manitol/dextrano: Una parte de dextrano 40, 3 partes de manitol, 1 parte de dispositivo OP. Se formularon dichos dispositivos mejorados con 2,5 mg de proteína osteogénica por g de colágeno o por 0,5 g de colágeno, variando así la dosis de proteína osteogénica. Para uso en el presente método, se humedeció la formulación con aproximadamente 0,8 ml de solución salina por 2,5 g de dispositivo que contiene manitol/dextrano. A continuación, se formuló un dispositivo que contiene dextrano solo a partir de 4 partes de dextrano o 1 parte de dextrano por 1 parte de dispositivo de OP, y se humedeció con

aproximadamente 0,8 ml de solución salina por 2,0 g de dispositivo. El dextrano puede estar en el intervalo de 3.000 a 40.000 de PM. A continuación, se formuló un dispositivo de manitol/vaselina blanca a partir de 1,5 partes de manitol, 1,5 partes de vaselina y 1 parte de dispositivo de OP. Esta formulación no requiere humectación. Finalmente, se formuló un dispositivo mejorado que contiene aceite de sésamo a partir de 1 parte de aceite y 1 parte de dispositivo de OP. Esta formulación no requiere humectación. Los dispositivos mejorados anteriormente descritos ilustran el intervalo de agentes aglutinantes específicos, proporciones en dispositivos mejorados y volúmenes de agente humectante que pueden utilizarse en los dispositivos mejorados de la presente invención. Las químicas, proporciones y requisitos de humectación son variados, pero todos están dentro de la experiencia en la técnica. Cada uno de los dispositivos mejorados anteriormente citados indujo la formación de hueso (medido por el contenido de calcio y % de hueso) cuando se ensayó en el bioensayo subcutáneo de rata descrito en la presente memoria.

A. CMC como agente aglutinante

Como se enseña en la presente memoria, la carboximetilcelulosa (CMC) es el agente aglutinante preferido. La CMC está comercialmente disponible en suministradores tales como, pero sin limitación: Hercules Inc., Aqualon® Division, Delaware; FMC Corporation, Pensilvania; British Celanese, Ltd., Reino Unido; y Henkel KGaA, Reino Unido. La carboximetilcelulosa de sodio es la sal de sodio de un éter policarboximetílico de celulosa con un peso molecular típico en el intervalo de 90.000-700.000. La CMC se identificó como un agente aglutinante candidato basándose, en parte, en lo siguiente: la CMC se utiliza ampliamente en formulaciones farmacéuticas orales y tópicas como agente aumentador de la viscosidad. La CMC se utiliza también en cosméticos, artículos de limpieza y alimentos como agente emulsionante (0,25-1,0%), agente formador de gel (4,0-6,0%), inyectable (0,05-0,75%) y aglutinante de comprimido (1,0-6,0%).

Aunque las características anteriores sugieren la adecuabilidad como agente aglutinante, los experimentos detallados a continuación confirmaron que la CMC era adecuada para uso en los dispositivos osteogénicos mejorados dados a conocer en la presente memoria. Dichos experimentos confirmatorios fueron necesarios porque ninguna de las aplicaciones anteriormente citadas es similar a la reparación de hueso o cartílago para la que son útiles los dispositivos osteogénicos mejorados dados a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, ninguna de las aplicaciones anteriormente citada requiere CMC por encima de un 6%, pero un dispositivo mejorado implantable actualmente preferido de la presente invención comprende más de aproximadamente un 6% (p/p) de CMC y, preferiblemente, al menos aproximadamente un 10%, más preferiblemente aproximadamente un 12-20%, estando aproximadamente un 16% (p/p) o 1 parte de CMC por 5 partes de dispositivo osteogénico estándar entre lo más actualmente preferido para un dispositivo implantable. Estos porcentajes aproximados están basados en cálculos del peso total de matriz mezclada con agente aglutinante, excluyendo proteína osteogénica y agente humectante.

Resulta significativo en la práctica de la presente invención el hecho de que estén comercialmente disponibles diversas graduaciones de carboximetilcelulosa de sodio que tienen viscosidades diferentes. Las viscosidades de diversas graduaciones de carboximetilcelulosa de sodio se reseñan y muestran en la Tabla 1 a continuación (véase "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (2ª edición), American Pharmaceutical Association & Royal Pharmaceutical Society of Great Britain).

TABLA 1

Graduaciones de viscosidad estándar de carboximetilcelulosa

Graduación	Concentración (% p/v)	Viscosidad (Pa.s)
Viscosidad baja	4	0,05-0,2
Viscosidad media	2	0,40-0,80
Viscosidad alta	1	1,50-3,00

Están comercialmente disponibles una serie de graduaciones de carboximetilcelulosa, teniendo la graduación más frecuentemente usada un grado de sustitución (GS) de 0,7. El GS se define como el número medio de grupos hidroxilo sustituidos por unidad de anhidroglucosa. Es este GS el que determina la solubilidad acuosa del polímero. El grado de sustitución y la viscosidad estándar de una solución acuosa de concentración indicada se indican en cualquier etiquetado de carboximetilcelulosa de sodio. Se prefiere actualmente la CMC de viscosidad baja (Aqualon® Division, Hercules Inc., Wilmington, DE). Los grados actualmente preferidos de sustitución están en el intervalo de 0,65-0,90 (GS= 0,7, Aqualon® tipo 7L).

Como se describe anteriormente, la CMC está disponible en varias graduaciones, viscosidad baja, media y alta. A este respecto, se determinó que la viscosidad de la carboximetilcelulosa (CMC) utilizada para formular un dispositivo osteogénico mejorado era crítica para la formación de hueso. Contrariamente a las enseñanzas en la técnica, se ha descubierto ahora que la CMC de viscosidad alta afecta adversamente la formación de hueso cuando se utiliza en

un dispositivo osteogénico mejorado que comprende una matriz como se define en la presente memoria. La patente de EE.UU. n° 5.587.897 ("la patente 897") enseña el uso de CMC de viscosidad alta (2,480 Pa.s) (véase la Tabla 1 anterior) para inducir la formación de hueso. Sin embargo, los dispositivos en la patente 897 requieren una matriz polimérica sintética, en lugar de una matriz biológica tal como colágeno. Inesperadamente, cuando se utiliza un material biológico tal como colágeno como matriz, el dispositivo mejorado puede formularse con CMC de viscosidad baja (aproximadamente 0,01-0,05 cP, o 0,05-0,20) para inducir la formación de hueso y/o cartílago, como se enseña en la presente memoria.

Estudio de toxicidad utilizando un dispositivo de CMC

Se realizó un estudio de toxicidad comparando un dispositivo mejorado que contiene CMC con un dispositivo estándar. Se preparó el dispositivo estándar con 2,5 mg de OP-1/g de matriz de colágeno. Se preparó el dispositivo mejorado que contiene CMC añadiendo CMC de viscosidad baja (Aqualon®) a un dispositivo estándar a una relación de 1:5, seguido de irradiación. Se implantaron alícuotas de 25 mg de un dispositivo estándar o dispositivo ficticio (concretamente, sin proteína osteogénica) y alícuotas de 30 mg de dispositivo mejorado que contiene CMC o dispositivo de CMC ficticio en un sitio subcutáneo de rata como se describe en otro lugar en la presente memoria (un implante por animal). Se retiraron tres implantes de cada formulación a los 7 días, 14 días, 21 días y 28 días después de la implantación, y se evaluó histológicamente la formación de hueso y cartílago y la reacción de tejido local. No se observó reacción celular adversa, y no había evidencias que indicaran ningún efecto adverso de la CMC, determinado evaluando la inflamación y la formación fibrosa. El perfil histológico del dispositivo mejorado que contiene CMC era generalmente similar al dispositivo de OP estándar. Los niveles séricos de calcio y fosfatasa alcalina, medidos utilizando enseñanzas estándar, siguieron también los del dispositivo osteogénico estándar. Finalmente, utilizando análisis de toxicidad estándar en ratas inmaduras y maduras, no se detectaron lesiones significativas.

Estudios de bioactividad de dispositivo mejorado

Basándose en una serie de estudios rutinarios descritos a continuación, la bioactividad de un dispositivo osteogénico estándar no se afectó adversamente por mezclado con CMC. En lugar de ello, la bioactividad es al menos comparable para ambas configuraciones de dispositivo, pero la capacidad de manipular el dispositivo intraoperatoriamente y de retener el dispositivo en el sitio de defecto durante cirugía y cierre de herida está potenciada por la CMC. Para estos estudios, se añadió CMC irradiada al dispositivo estándar antes de la implantación.

Brevemente, se realizaron dos estudios que medían la liberación *in vivo* de OP-1 a partir de un dispositivo estándar $\pm$ CMC. En un experimento, se implantaron 75 mg de dispositivo irradiado $\pm$ 15 mg de CMC irradiada en un sitio subcutáneo en ratas como se describe en la presente memoria. Se retiraron los dispositivos implantados 1 hora, 1 día, 3 días y 6 días después de la implantación, seguido de extracción con tampón urea 8 M; se analizó el contenido de OP-1 mediante análisis de ELISA y transferencia Western rutinarios. Se extrajo el dispositivo de OP-1 (no implantado en los animales) con tampón urea 8 M y se utilizó como patrón interno. En general, la cinética de la liberación *in vivo* de OP-1 a partir del dispositivo de OP estándar y del dispositivo mejorado que contiene CMC eran similares. La observación de que no hay diferencia en la captación o retención de OP-1 por un dispositivo estándar frente a un dispositivo mejorado que contiene una combinación de matriz de colágeno y CMC es un resultado inesperado. Se ha reseñado que, cuando se combina con matrices poliméricas no biológicas, la CMC actúa captando proteína osteogénica. (Véase, por ejemplo, el documento US 5.597.897).

Se realizaron también estudios *in vitro*. En estos estudios, se midió la OP-1 liberada en contraposición con los estudios *in vivo* anteriormente descritos, en los que se midió la OP-1 restante en el dispositivo. En un estudio, se humedecieron 25 mg de dispositivo de OP o dispositivo de CMC con solución salina. Se añadió después 1 ml de suero bovino a cada dispositivo, y se incubaron los dispositivos a 37°C. Se retiró el sobrenadante y se reemplazó por suero reciente a las 1 y 3 horas. A las 6 horas, se añadió urea 8 M para extraer cualquier OP-1 aún asociada al dispositivo. Se analizaron las concentraciones de OP-1 en los sobrenadantes mediante técnicas de ELISA y transferencia Western rutinarias. Tanto el dispositivo de OP estándar como el dispositivo mejorado que contiene CMC tenían una cinética de liberación de proteína similar durante las seis horas estudiadas. De nuevo, estos resultados eran inesperados a la vista de los informes anteriores de que la CMC actúa captando la proteína osteogénica, y retardando y/o previniendo así su liberación a partir de mezclas con matrices poliméricas sintéticas. (Véase, por ejemplo, el documento US 5.597.897).

En conclusión, la CMC no inhibe sustancialmente la retención o liberación de OP-1 a partir de un dispositivo osteogénico que contiene una matriz de colágeno *in vivo* o *in vitro*.

Estudios de estabilidad

Se realizó un estudio (véase la Tabla 2) comparando la estabilidad del dispositivo de OP estándar con un dispositivo estándar que contiene CMC. Basándose tanto en análisis *in vitro* como en un bioensayo de formación de hueso (descrito en otro lugar en la presente memoria), se observó que el dispositivo mejorado que contiene CMC era al menos tan estable como el dispositivo estándar cuando se almacenaba a 30°C durante 1 año. Los datos sugieren también que la CMC puede premezclarse con el dispositivo de OP estándar y esterilizarse terminalmente para una configuración de producto unitario. Dicho producto unitario es útil para reparar defectos de hueso y cartílago locales como se ejemplifica a continuación.

TABLA 2

Estabilidad de diversas formulaciones de dispositivo osteogenico

Formulación	Rec. de OP-1 antes de irrad.*	Rec. de OP-1 después de irrad.	Rec. de OP-1 después de 4 semanas	Rec. de OP-1 después de 3 meses	Rec. de OP-1 después de 6 meses	Rec. de OP-1 después de 12 meses
Dispositivo estándar	91%	63%	66%	58%	47,4%	37,4%
Dispositivo de CMC	77%	57%	53%	50%	43,5%	34,8%
*Basado en el contenido teórico de OP-1 de 2,5 mg/g						

Durante la formulación de un dispositivo estándar que contiene CMC, la CMC y las proteínas osteogénicas pueden esterilizarse separadamente, por ejemplo, mediante exposición a irradiación gamma, y después combinarse los componentes esterilizados para producir el dispositivo estándar que contiene CMC. Además, la CMC puede premezclarse con el dispositivo de OP estándar y esterilizarse la formulación resultante, por ejemplo, mediante exposición a irradiación gamma. Este último proceso se designa en la técnica como esterilización terminal, y se ha utilizado para esterilizar otros dispositivos osteogénicos. Véanse, por ejemplo, los documentos PCT/US 96/10377, publicado como WO 96/40297 el 19 de diciembre de 1996, y US 5.674.292, expedido el 7 de octubre de 1997. Como se utiliza en la presente memoria, los términos “esterilización” y “esterilizado” designan un proceso que utiliza medios físicos o químicos para eliminar sustancialmente todos los organismos viables, especialmente microorganismos, virus y otros patógenos, asociados al dispositivo de la invención. Los dispositivos esterilizados de la invención tienen preferiblemente un nivel de aseguramiento de la esterilidad de 10^{-6} , determinado por los patrones de la Federal Drug Administration (FDA). En el caso de dispositivos irradiados con radiación gamma, por ejemplo, las dosificaciones de irradiación apropiadas necesarias para esterilizar un dispositivo particular pueden determinarse fácilmente consultando el texto de referencia “Associate for the Advancement of Medical Instrumentation Guidelines”, publicado en 1992. Se proporcionan directrices en el mismo para determinar la dosis de radiación necesaria para conseguir un nivel de aseguramiento de la esterilidad dado para una carga biológica particular del dispositivo. Las dosificaciones para esterilizar dispositivos de la invención están preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4,0 megarad, y lo más preferiblemente, están dentro del intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,5 megarad.

Adicionalmente, se realizó un estudio para evaluar la estabilidad a corto plazo de un dispositivo osteogenico al que se habían añadido CMC y solución salina. El estudio utilizó un dispositivo estándar al que se añadieron 200 mg de CMC irradiada envasada separadamente. Se retiraron muestras de dispositivo mejorado que contiene CMC y se humedecieron con solución salina. Se extrajo a las 0, 1, 3, 6 y 22 horas la OP-1 con tampón urea 8 M y se analizó mediante HPLC en fase inversa en condiciones reductoras. Se analizó también en los extractos la actividad biológica de OP-1 con un ensayo basado en célula estándar para medir la fosfatasa alcalina. Los datos indicaron que la OP-1 retiene la actividad biológica en estas condiciones. Estos datos sugirieron también que la configuración del dispositivo mejorado que contiene CMC resultante del mezclado de estas partes componentes (dispositivo osteogénico estándar/CMC/solución salina) es utilizable durante varias horas después de haber sido preparado, proporcionando al profesional un tiempo intraoperativo significativo durante el cual el producto permanece eficaz.

Ensayo de integridad del agente aglutinante y otras características

Se utilizaron métodos USP reconocidos en la técnica para la identificación y caracterización de agentes aglutinantes en bruto tales como CMC. Los ensayos incluían ensayos de identidad química, viscosidad, pH, pérdida por secado y metales pesados. Se ensayó también en el material la carga biológica antes de esterilización, así como endotoxinas, pH, apariencia y esterilidad después de irradiación. Se realizó un estudio de estabilidad para monitorizar la viscosidad, la apariencia y el pH del material irradiado. Todos los niveles y características eran aceptables, determinados utilizando métodos y técnicas estándar.

Por ejemplo, se evaluó en CMC (Aqualon® de viscosidad baja) la carga biológica y el contenido de endotoxina. Se evaluó en CMC Aqualon®, lote FP10 12342, la presencia de endotoxinas (LAL) utilizando el ensayo cromogénico cinético LAL de BioWhittaker (Walkersville, MD, 21793).

La “carga biológica” puede medirse del modo siguiente. Por ejemplo, se solubilizaron muestras de 200 mg de CMC en 100 ml de agua tamponada con fosfato y se filtraron a través de filtros de 0,45 µm. Se dispusieron los filtros en una placa TSA y se incubaron durante 48 horas. Se inocularon dos muestras de CMC solubilizada con 10-100 UFC de *Bacillus subtilis* para utilizar como controles de crecimiento. Los datos sugieren que la carga biológica de la CMC es baja, y que la CMC no interfiere en el análisis matando bacterias o inhibiendo el crecimiento celular.

Caracterización de CMC después de irradiación

Se realizó un estudio comparando la viscosidad de CMC antes y después de irradiación (irradiación gamma, 2,5-3,0 megarad). Los datos indicaron que, como se reseña en la técnica, la viscosidad se reduce después de la irradiación. Aunque esto no afecta a la biodisponibilidad o a su utilidad global como agente aglutinante (véanse los estudios expuestos en la presente memoria), el profesional experto deberá tener en consideración este rasgo cuando evalúe las propiedades de viscosidad o fluidez de un dispositivo osteogénico mejorado. Se realizó también un estudio para evaluar la estabilidad de la CMC irradiada. Los resultados indicaron que la CMC irradiada era estable durante al menos 6 meses tanto a 4 como a 30°C. Se midió la viscosidad como el parámetro de estabilidad. Pueden llevarse a cabo análisis y evaluaciones similares para otros agentes aglutinantes o materiales de dispositivo utilizados en una formulación deseada.

B. Cola de fibrina como agente aglutinante

Como se describe en la presente memoria, la “cola de fibrina” es otro agente aglutinante. La cola de fibrina comprende una mezcla de fibrinógeno y trombina de mamífero. El fibrinógeno humano está comercialmente disponible en productos tales como, pero sin limitación: Tissucol® (ImmunoAG, Viena, Austria), Beriplase® (Behringwerke, Marburg, Alemania), Biocoll® (Centre de Transfusion Sanguine de Lille (Tours, Francia) y Transglutine® (CNTS Fractionation Centre, Estrasburgo, Francia). La trombina humana está comercialmente disponible en ImmunoAG, Viena, Austria. La cola de fibrina puede prepararse también con fibrinógeno y trombina de otras fuentes de mamífero tales como, por ejemplo, fuentes bovina y murina.

Se identificó la cola de fibrina como un agente aglutinante candidato basándose en sus propiedades similares a gel y sus características de manejo mejoradas cuando se mezcla con un material de matriz tal como, por ejemplo, colágeno o β -TCP. Se mostró también que la cola de fibrina desencadena una baja respuesta inflamatoria (véase a continuación) y promueve la formación de hueso.

Estudio de toxicidad utilizando un dispositivo de cola de fibrina

Se realizó un estudio de toxicidad comparando un dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina con un dispositivo estándar. Se preparó el dispositivo estándar mezclando 10 µg de OP-1 en etanol al 47,5%/TFA al 0,01% y 25 mg de colágeno, y liofilizando la mezcla durante una noche. Se humedeció el dispositivo estándar con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la implantación. Se preparó el dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina añadiendo 50 µl de fibrinógeno bovino (Sigma F8630, 10 mg/ml) y 50 µl de trombina bovina (50 U/ml) al dispositivo estándar, preparado como se describe anteriormente, inmediatamente antes de la implantación. Se implantaron después el dispositivo estándar y el dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina en un sitio subcutáneo de rata como se describe en otro lugar en la presente memoria. Se evaluó histológicamente en los implantes la formación de hueso y cartílago, y la reacción de tejido local. El dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina desencadenó una baja respuesta inflamatoria y una baja formación fibrosa. El perfil histológico del dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina era generalmente similar al del dispositivo estándar. No apareció ninguna correlación entre la respuesta inflamatoria y la capacidad del dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina de promover la formación ósea.

Estudios de bioactividad de dispositivo mejorado

Se realizó un estudio para evaluar la cinética de liberación de OP-1 a partir de un dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina a diferentes concentraciones de trombina *in vitro*. Se mejoró la cinética de liberación mediante la adición de mayores cantidades de trombina. Para este estudio, se mezclaron 12,5 µl de OP-1 en una solución de lactosa al 5% con 50 mg de β -TCP, 25 µl de fibrinógeno humano y 25 U/ml de trombina humana o 50 U/ml de trombina humana. Se transfirieron las mezclas a un vial de vidrio y se añadió 1 ml de suero de ternero a cada uno. Se dejaron después incubar las muestras a 37°C/60 rpm. Se tomaron muestras de suero y se analizaron mediante ELISA rutinaria a las 0-1 horas, 1-3 horas, 3-5 horas y 5-24 horas. Se resumen los resultados en la tabla siguiente.

TABLA 2A

Conc. de trombina	% de lib. de OP-1 a las 0-1 horas	% de lib. de OP-1 a las 1-3 horas	% de lib. de OP-1 a las 3-5 horas	% de lib. de OP-1 a las 5- 24 horas	% total de lib. de OP-1
25 U/ml	6,4±0,7	5,2±0,4	3,0±0,6	13,0±0,6	27,5±2,2
50 U/ml	9,9±2,1	5,8±0,7	3,3±0,5	15,1±1,7	34,1±4,8

III. Consideraciones de formulación y suministro

Consideraciones generales

Los dispositivos de la invención pueden formularse utilizando métodos rutinarios. Todo lo que se necesita es la determinación de la concentración final deseada de proteína osteogénica por dispositivo, teniendo presente que el volumen de dispositivo suministrado puede ser, pero no debe ser necesariamente, menor que el volumen del sitio de defecto. La concentración final deseada de proteína dependerá de la actividad específica de la proteína, así como del tipo, volumen y/o localización anatómica del defecto. Adicionalmente, la concentración final deseada de proteína puede depender de la edad, el sexo y/o la salud global del receptor. Típicamente, para un defecto segmentario de tamaño crítico de aproximadamente al menos 2,5 cm de longitud, se ha observado que 0,5-1,75 mg de proteína osteogénica, utilizando el dispositivo estándar, inducen la formación de hueso necesaria para reparar el hueco. En el caso de un defecto de tamaño no crítico o una fractura reciente, se ha observado que aproximadamente 0,1-0,5 mg de proteína, utilizando el dispositivo osteogénico estándar, reparan el defecto. En general, las concentraciones de proteína para uso con matrices preferidas descritas en la presente memoria pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 3,0 mg por dispositivo. La optimización de las dosificaciones sólo requiere experimentación rutinaria y está dentro del nivel de experiencia de un experto en la técnica.

Como se ejemplifica en la presente memoria, pueden mezclarse una proteína osteogénica y un agente aglutinante tal como carboximetilcelulosa (viscosidad baja, Aqualon®) o cola de fibrina formando una masilla. En algunas realizaciones, se añade solución salina al agente aglutinante para formar una pasta o masilla en la que está dispersada una proteína osteogénica tal como OP-1. Puede utilizarse una configuración de pasta para pintar las superficies de un defecto tal como una cavidad. Pueden utilizarse pastas para pintar defectos de fractura, defectos condrales u osteocondrales, así como defectos óseos en un sitio de implante protésico. Puede inyectarse o extruirse una configuración más fluida en o a lo largo de las superficies de un defecto, de manera similar a extruir pasta de dientes o estopa a partir de un tubo, de tal modo que se libere una perla de dispositivo a lo largo de la longitud del sitio de defecto. Típicamente, el diámetro de la perla extruida se determina por el tipo de defecto, así como el volumen de vacío en el sitio de defecto.

Como se cita anteriormente, pueden utilizarse otros agentes aglutinantes como se definen en la presente memoria para formular un dispositivo con una configuración similar a masilla. Como resultará obvio para el experto en la técnica, dicha configuración es el resultado de ajustar la proporción de vehículo a agente humectante, produciendo menos agente humectante un dispositivo más seco y produciendo más un dispositivo más húmedo. La configuración adecuada de dispositivo precisa para reparar un defecto dependerá al menos del tipo de defecto y del tamaño del defecto. El experto en la técnica apreciará las variables.

A. Estudios de formulación de CMC como agente aglutinante

Basándose en el siguiente tipo de estudios, se estableció que aproximadamente 0,2 g de CMC a aproximadamente 1,0 g de dispositivo osteogénico estándar proporcionan un dispositivo mejorado con las propiedades de manejo actualmente preferidas. Se combinaron relaciones variables de CMC y colágeno y después se humedecieron con solución salina. Se suspendió cada mezcla resultante de CMC y matriz en un tubo centrífugo cónico de 15 ml de agua y se dispuso en un agitador rotativo (100 rpm). Se registró el tiempo de asentamiento, cuando las partículas de matriz de colágeno sueltas o liberadas se asentaron hasta una marca predeterminada en el tubo. Los datos resumidos en la Tabla 1 y la Figura 3 sugieren que un intervalo de aproximadamente 0,15 a 0,25 g CMC/g de colágeno puede maximizar la cohesividad, integridad y propiedades de manejo.

ES 2 273 412 T3

TABLA 3

Efecto de la relación CMC/colágeno sobre el tiempo de dispersión

<u>g de CMC/g de colágeno</u>	<u>Tiempo de asentamiento</u>
0,20 g	19 min
0,19	17
0,18	6
0,15	4
0,12	0,5 s

Se estudió también la cantidad preferida de solución salina para humedecer el dispositivo de CMC. En este estudio, se mezclaron aproximadamente 0,2 g de CMC con aproximadamente 1 g de dispositivo osteogénico estándar. Se añadieron cantidades variables de solución salina, y se anotó la consistencia del dispositivo resultante. Se resumen los resultados cualitativos y cuantitativos de este estudio en la Tabla 4 y la Figura 2, respectivamente. Generalmente, estos datos ilustran que hay un intervalo de volúmenes de agente humectante a los que puede dar cabida el profesional que posibilitan que el dispositivo retenga su integridad y cohesividad. Para un agente aglutinante tal como CMC, los datos sugieren que más de aproximadamente 1,5 ml, aproximadamente 1,8 a 2,5 ml de solución salina, es el volumen de humectación actualmente preferido (para aproximadamente 1 g de dispositivo mezclado con aproximadamente 200 mg de un agente aglutinante tal como CMC) para conseguir un dispositivo implantable con la consistencia de masilla actualmente preferida. Cantidades de solución salina en exceso de ésta consiguen un dispositivo inyectable con la consistencia fluida actualmente preferida. Como se ejemplifica en otro lugar en la presente memoria, una configuración de dispositivo implantable es adecuada para uso en un sitio de defecto abierto, mientras que una configuración de dispositivo inyectable es adecuada para uso en un sitio de defecto cerrado. En términos de equivalentes gramo, se ha determinado que aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 3,0 g de solución salina proporcionan dispositivos mejorados con consistencias deseables; cuanto mayor es el peso, más inyectable es la configuración.

TABLA 4

Humectación del dispositivo que contiene CMC

1 g de dispositivo estándar más 200 mg de CMC	Cantidad de solución salina añadida	Observaciones
	1,5 ml	Seco
	1,75	Se amasa en una bola, pasta
	2,0	Consistencia de manejo actualmente preferida, masilla, se amasa en una bola
	2,5	Consistencia de manejo aceptable, aún similar a masilla
	2,75	Deja partículas pequeñas de matriz sobre la pared del recipiente
	3,0	Pegajoso, pasta blanda
	3,5	Pegajoso, pasta blanda
	3,75	Pasta suelta

ES 2 273 412 T3

	4,0	Consistencia igual a la anterior
	4,25	Líquido

5

En ciertas realizaciones de la presente invención, la preparación del dispositivo osteogénico mejorado actual puede ocurrir inmediatamente antes de su suministro al sitio de defecto. Como se ejemplifica en la presente memoria, los dispositivos mejorados que contienen CMC pueden prepararse en el sitio, adecuadamente para mezclado inmediatamente antes de la cirugía. En una realización, se envasó y se irradió CMC de viscosidad baja (Aqualon®) separadamente de la proteína osteogénica OP-1 y la matriz de colágeno. Se mezcló después la proteína OP-1 en matriz de colágeno con el agente aglutinante. Se observó que los dispositivos preparados de esta manera eran al menos tan activos biológicamente como el dispositivo estándar sin CMC.

10

15

B. Cola de fibrina como agente aglutinante. Estudios de formulación

20

Basándose en el siguiente tipo de estudios, se estableció que aproximadamente 500 μ l de fibrinógeno (80 mg/ml en PBS a pH 7,4) y 500 μ l de trombina (50 U/ml o 25 U/ml en NaCl al 0,9%) añadidos aproximadamente a 1 g de β -TCP proporcionan un dispositivo mejorado con las propiedades de manejo actualmente preferidas. Los temas referidos a propiedades de manejo incluyen el tiempo de coagulación de la cola de fibrina y la consistencia del dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina. Se prefiere un dispositivo que tiene la consistencia de una masilla moldeable. Una vez coagula la cola, se vuelve más difícil cambiar la forma de la masilla. Por lo tanto, un tiempo de coagulación más largo es también un rasgo preferido del dispositivo.

25

Se determinó el tiempo de coagulación de cola de fibrina bovina mezclando continuamente 20 μ l de solución de fibrinógeno bovino (80 mg/ml en PBS a pH 7,4) con 20 μ l de solución de trombina bovina (500 U/ml o 25 U/ml en solución salina) en una navecilla de pesada utilizando una barra de vidrio capilar. Se evaluaron también los tiempos de coagulación con o sin la adición de solución de CaCl_2 al 0,6%. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

30

TABLA 4A

35

40

45

Trombina (U/ml)	Tiempo de coagulación en segundos sin CaCl_2	Tiempo de coagulación en segundos con CaCl_2 al 0,6%
500	23 $\pm$ 2	20 $\pm$ 2
250	40 $\pm$ 5	29 $\pm$ 2
100	61 $\pm$ 2	49 $\pm$ 1
50	90 $\pm$ 2	74 $\pm$ 1
25	-	185 $\pm$ 5

50

Se evaluó la consistencia del dispositivo que contiene cola de fibrina utilizando un dispositivo que contiene β -TCP como matriz ejemplar. Se añadieron cantidades diferentes de cola de fibrina a 100 mg o 1.000 mg de gránulos de β -TCP y se determinó la consistencia. Se resumen los resultados en la tabla siguiente:

55

TABLA 4B

60

65

Cantidad de β -TCP	μ l de fibrinógeno (80 mg/ml en PBS pH 7,4)	μ l de trombina	Consistencia
100 mg	12,5	12,5 (100 U/ml en solución salina con CaCl_2 al 0,6%)	β -TCP no humedecido completamente

ES 2 273 412 T3

5	100 mg	25	25 (100 U/ml en solución salina con CaCl_2 al 0,6%)	Ligeramente moldeable
10	100 mg	50	50 (100 U/ml en solución salina con CaCl_2 al 0,6%)	Masilla moldeable a los 1-2 min
15				
20	100 mg	50	50 (50 U/ml en solución salina con CaCl_2 al 0,6%)	Masilla moldeable
25				
30	100 mg	50	50 (5 U/ml en solución salina con CaCl_2 al 0,6%)	Coagulación muy lenta, partículas separadas
35	1.000 mg	500	500 (100 U/ml en solución salina con CaCl_2 al 0,6%)	Mezclado demasiado lento, no homogéneo, partículas separadas
40				
45	1.000 mg	500	500 (50 U/ml en solución salina)	Masilla, moldeable a los 1-2 min
50				
55	1.000 mg	500	500 (25 U/ml en solución salina)	Masilla, moldeable a los 2-3 min

Como puede observarse por estos dos estudios, un dispositivo que contiene cola de fibrina de aproximadamente 500 μl de fibrinógeno (80 mg/ml en PBS a pH 7,4) y 500 μl de trombina (50 U/ml o 25 U/ml en NaCl al 0,9%) añadidos a aproximadamente 1 g de β -TCP, tiene un tiempo de coagulación y una consistencia adecuados para el dispositivo osteogénico mejorado.

TABLA 4C

Información representativa relativa a la composición de cola de fibrina

	Autocolle®	Tissucol®	Beriplast®	Transglutine®	Biocoll®
Fibrinógeno (mg/ml)	50-65	70-110	20-140	>70	116 ± 2,4
Fibronectina (mg/ml)	4-10	3-9			5,9 ± 0,51
Factor XII (PEU)	25-30	10-50	40-60		35 ± 2,86
Tromboglobulina (µg/ml)	250-400				
PDGF (ng/ml)	350				
TGF (ng/ml)	750				
Plasminógeno (µg/ml)		40-120			31
Aprotinina (UIK/ml)		3.000			
Albúmina (mg/ml)			10		
1. Autocolle® y Biocoll® son del Centre de Transfusion Sanguine de Lille (Tours, Francia)					
2. Tissucol® es de Immuno AG (Viena, Austria)					
3. Beriplast® es de Behringswerke (Marburg, Alemania)					
4. Transglutine® es de CNTS Fractionation Centre (Estrasburgo, Francia)					

Basándose en los estudios anteriormente descritos, se estableció que aproximadamente 40 mg de cola de fibrina por aproximadamente 1.000 mg de β -TCP proporcionan un dispositivo mejorado como se contempla en la presente memoria. Basándose en los mismos estudios, se estableció que aproximadamente 20 mg de cola de fibrina por aproximadamente 1.000 mg de colágeno proporcionan un dispositivo con las propiedades preferidas expuestas en la presente memoria. Generalmente, los datos sugieren que un intervalo de aproximadamente 20-220 mg de cola de fibrina/1.000 mg de matriz puede maximizar la cohesividad, integridad y propiedades de manejo, dependiendo de las circunstancias precisas y del uso pretendido.

IV. Consideraciones de otros materiales

En ciertas realizaciones de la invención, el material de matriz preferido es β -TCP. Las características preferidas de un material no sintético no polimérico para uso como matriz en la invención reivindicada incluyen, pero sin limitación: una alta velocidad de resorción de la matriz por el tejido circundante y una baja respuesta inflamatoria. Como se discute anteriormente, se prefiere actualmente β -TCP sinterizado calentado a alta temperatura que tenga tamaños de partícula en el intervalo de aproximadamente 212 µm a aproximadamente 425 µm, pero pueden utilizarse también otros tamaños de partícula para practicar la presente invención.

Método de análisis por imágenes

Se determinó la velocidad de resorción de la matriz de β -TCP utilizando un método de análisis de imágenes estándar. El análisis de imágenes es un método de evaluación de la distribución del tamaño de partícula de los gránulos de Ca/P. Se compara el tamaño de partícula de los gránulos de Ca/P antes y después de implantación en ratas. Se disuelven los tejidos blandos de los tejidos extirpados mediante hipoclorito de sodio, y se lavan los gránulos de Ca/P restantes varias veces con agua y se secan a temperatura ambiente. Se mezclan las partículas con glicerol y se montan sobre portaobjetos de vidrio. Se determina el tamaño de partícula mediante microscopía utilizando un sistema de análisis de imágenes estándar tal como Bioquant OS/2 ligado mediante cámara de vídeo al microscopio. Se seleccionan las series que denotan el área y diámetro más largo para expresar las dimensiones de partícula individuales. Se eligieron las imágenes de partícula que muestran escalas de gris de 0 a 88 en un ajuste de nivel de 256, y se midieron. Se utilizaron los datos brutos de partículas individuales para calcular la media y la desviación típica. Se miden al menos 50 partículas en cada conjunto de datos.

Estudio subcutáneo en rata

En el estudio expuesto a continuación, se formula β -TCP (Clarkson, n° 211096, BD= 0,86, 212-425 μm , 9/6/97) en una pasta de CMC/sangre con o sin 10 μg de OP-1 y se implanta en sitios subcutáneos de rata. Se retiran los implantes después de 6 y 12 semanas *in vivo* y se analizan utilizando el método de análisis de imágenes descrito anteriormente. Los resultados a las 6 semanas se resumen en la tabla 4D a continuación. Los resultados indican que después de 6 semanas el tamaño de β -TCP se reduce de 334 μm a 184 μm (sin OP-1) y a 166 μm (con OP-1). La diferencia de tamaño entre muestras tratadas con OP-1 y no tratadas no es significativa. Sin embargo, hay aproximadamente un 50% de reducción en el diámetro de la β -TCP después de 6 semanas.

TABLA 4D

RESORCIÓN <i>IN VIVO</i> DE β -TCP A LAS 6 SEMANAS				
Muestras (n= 4)	Tiempo <i>in vivo</i>	OP-1 (μg)	Tamaño de partícula (μm)	Área de partícula (mm^2)
β -TCP/CMC/sangre	6 semanas	0	184 $\pm$ 29	0,022 $\pm$ 0,008
β -TCP/CMC/sangre	6 semanas	10	166 $\pm$ 22	0,016 $\pm$ 0,004
β -TCP sola (212-415 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	-	334 $\pm$ 16	0,068 $\pm$ 0,007

TABLA 4E

Fuente y composición de algunos materiales de matriz preferidos y componentes preferidos de cola de fibrina

Artículo	Fuente	Composición
Partículas de Ca/P	Clarkson Chromatography Products Inc. (S. Williamsport, PA)	Intervalo de 50-2.000 μm , por ejemplo, hidroxiapatito ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) o β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
Fibrinógeno bovino	Sigma (F8630) (St. Louis, MO)	75% de proteína, 10% de citrato de sodio, 15% de NaCl
Trombina humana	Immuno AG (Viena, Austria)	500 U o 4 U por vial, reconstituida en 2 ml de CaCl_2 40 mM
Gránulos de p-TCP	Clarkson Chromatography Products Inc. (S. Williamsport, PA)	Intervalo de 50-2.000 μm , la composición es ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
Suero de ternero	Life Technologies (16170-078) (Gaithersburg, MD)	n.a.
Trombina bovina	Sigma (T4648) (St. Louis, MO)	50-100 U/mg de proteína
Trombina de rata	Sigma (T5772) (St. Louis, MO)	1.000 U/mg de proteína
Fibrinógeno de rata	Sigma (F6755) (St. Louis, MO)	70% de proteína, 12% de citrato de sodio, 18% de NaCl

Inflamación

En general, puede suponerse que las partículas pequeñas se resorberán más rápido que las partículas grandes. Los resultados indicaron que, sin OP-1, el β -TCP (212-415 μm) desencadenaba una respuesta inflamatoria ligeramente elevada. Sin embargo, la reacción inflamatoria se redujo a medida que aumentó la dosis de OP-1 de 10 μg a 20 μg . Los estudios animales previos han mostrado que las partículas pequeñas menores de 10 μm desencadenan una alta

respuesta inflamatoria. Por lo tanto, el uso de partículas de β -TCP (al 100%) sinterizadas del tamaño de 212 a 425 μm es un equilibrio entre la velocidad de resorción, la baja inflamación y la capacidad de soportar la formación de hueso en el modelo subcutáneo de rata.

5 V. Bioensayo

A. Bioensayo de actividad osteogénica: formación de hueso endocondral y propiedades relacionadas

10 A continuación se exponen protocolos ejemplares para identificar y caracterizar proteínas osteogénicas o morfo-
génicas óseas genuinas, así como dispositivos osteogénicos dentro del alcance de la invención de los solicitantes.

Se utiliza el bioensayo reconocido en la técnica para inducción ósea como se describe por Sampath y Reddi (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80: 6591-6595) y la patente de EE.UU. n° 4.968.590, para establecer la eficacia de los
15 protocolos de purificación. Brevemente, este ensayo consiste en depositar las muestras de ensayo en sitios subcutáneos
en ratas receptoras alogénicas bajo anestesia con éter. Se hace una incisión vertical (1 cm) en condiciones estériles en
la piel sobre la región torácica, y se prepara una bolsa mediante disección roma. En ciertas circunstancias, se implantan
aproximadamente 25 mg de la muestra de ensayo profundamente en la bolsa y se cierra la incisión con un clip cutáneo
metálico. El sitio heterotrópico permite el estudio de la inducción ósea sin las posibles ambigüedades resultantes del
uso de sitios ortotópicos.

20 Las reacciones celulares secuenciales que ocurren en el sitio heterotrópico son complejas. La cascada multietapa
de formación de hueso endocondral incluye: unión de fibrina y fibronectina a la matriz implantada, quimiotactismo
de células, proliferación de fibroblastos, diferenciación en condroblastos, formación de cartílago, invasión vascular,
formación de hueso, remodelación y diferenciación de médula ósea.

25 En ratas, el modelo de bioensayo exhibe una progresión controlada a través de las etapas de desarrollo de hueso
endocondral inducido por matriz que incluye: (1) infiltración transitoria por leucocitos polimorfonucleares el día 1;
(2) migración y proliferación de células mesenquimáticas los días 2 y 3; (3) aparición de condrocitos los días 5 y 6;
(4) formación de matriz de cartílago el día 7; (5) calcificación de cartílago el día 8; (6) invasión vascular, aparición de
30 osteoblastos y formación de hueso nuevo los días 9 y 10; (7) aparición de remodelación osteoblástica y ósea los días
12 a 18; y (8) diferenciación de médula ósea hematopoyética en el osículo el día 21.

Se prefiere el seccionamiento histológico y tinción para determinar la extensión de la osteogénesis en los im-
plantes. La tinción con azul de toluidina o hematoxilina/eosina demuestra claramente el desarrollo último de hueso
35 endocondral. Son suficientes bioensayos de 12 días para determinar si la actividad inductora de hueso está asociada a
la muestra de ensayo.

Adicionalmente, puede utilizarse la actividad fosfatasa alcalina como marcador para la osteogénesis. La actividad
enzimática puede determinarse espectrofotométricamente después de la homogeneización del material de ensayo ex-
40 tirpado. La actividad alcanza un pico en los días 9-10 *in vivo*, y después de ello se reduce lentamente. Las muestras
que no muestran desarrollo óseo por histología no deberían tener actividad fosfatasa alcalina en estas condiciones de
ensayo. El ensayo es útil para la cuantificación y obtención de una estimación de la formación ósea muy rápidamente
después de retirar las muestras de ensayo de la rata. Por ejemplo, se han ensayado muestras que contienen proteína
45 osteogénica a diversos niveles de pureza para determinar el nivel de dosis/pureza más efectivo para buscar una for-
mulación que pueda producirse a escala industrial. Los resultados medidos por el nivel de actividad fosfatasa alcalina
y evaluación histológica pueden representarse como “unidades de formación de hueso”. Una unidad de formación de
hueso representa la cantidad de proteína que es necesaria para una actividad de formación de hueso semimáxima el día
12. Adicionalmente, pueden construirse curvas de dosis para la actividad inductora de hueso *in vivo* en cada etapa de
un esquema de purificación ensayando diversas concentraciones de proteína. En consecuencia, el experto en la técnica
50 puede construir curvas de dosis representativas utilizando sólo experimentación rutinaria.

B. Formación de cartílago: inmunohistoquímica, histología y microscopía de luz polarizada

1. Inmunohistoquímica e histología

55 Brevemente, es bien conocido en la técnica que la identificación de cartílago articular genuino puede conseguirse
utilizando parámetros ultraestructurales y/o bioquímicos. Por ejemplo, el cartílago articular forma una capa continua
de tejido cartilaginoso que posee zonas identificables. La zona superficial se caracteriza por condrocitos que tienen
una morfología aplanada y una red extracelular que no se tiñe, o se tiñe poco, con azul de toluidina, indicando la
60 ausencia relativa de proteoglicanos sulfatados. El azul de toluidina se utiliza habitualmente para la tinción de hueso y
cartílago. Es un tinte metacromático que proporciona diferentes colores basándose en la presencia de cargas negativas
espaciadas densamente en los tejidos, que conducen a la agregación y polimerización del tinte, que desplaza el color
de azul a púrpura. El hueso se tiñe de azul, mientras que el cartílago, con sus mucopolisacáridos ácidos, se tiñe de
púrpura oscuro. Los condrocitos en las zonas media y profunda tienen una apariencia esférica, y la matriz contiene
65 abundantes proteoglicanos sulfatados, como se evidencia por la tinción con azul de toluidina. Las fibras de colágeno
están presentes difusamente a lo largo de la matriz. Los condrocitos poseen abundante retículo endoplasmático
rugoso y están rodeados por una red extracelular. La red pericelular contiene numerosas fibras de colágeno finas
sin bandas. El colágeno en la red interterritorial está menos compactado y embebido en material amorfo translúcido

a electrones, similar a cartílago articular. Las fibras de colágeno en la región interterritorial de la red exhiben la característica de bandas periódicas de fibras de colágeno en la zona interterritorial de tejido de cartílago.

La tinción de Von Kossa muestra una densa tinción negra del tejido mineralizado. Esta tinción representa claramente el hueso existente y recién regenerado mediante la deposición de plata sobre las sales de calcio. Típicamente, la contratinción es safranina O, que tiñe el cartílago rojo anaranjado. Habitualmente, el hueso nuevo y existente pueden distinguirse fácilmente morfológicamente en secciones teñidas en consecuencia. La safranina O/Fast Green es capaz de distinguir más rasgos que el azul de toluidina. La safranina O es un tinte básico que tiñe los mucopolisacáridos ácidos en el cartílago articular rojo anaranjados, y el hueso subcondral subyacente sólo ligeramente. Fast Green es un tinte ácido que tiñe el citoplasma gris verdoso. Esta tinción no es sólo capaz de identificar claramente el cartílago existente y regenerado, sino que puede distinguir también diferencias entre dos regiones en el tejido reparativo indicando las diferencias en el contenido de proteoglicanos.

Pueden utilizarse también tinciones con hematoxilina/eosina, que representan hueso con un rojo más oscuro y el cartílago rico en carbohidrato sólo muy ligeramente. El tricromo de Masson es capaz de distinguir diferencias en el tejido reparativo. El cartílago y el tejido reparativo rico en polisacárido ácido, músculo y eritrocitos se tiñen de rojo, con el colágeno del hueso teñido de azul.

Las evaluaciones histológicas pueden implicar también la valoración de: contenido de glicosaminoglicano en el cartílago de reparación; morfología de cartílago y condrocito; e integridad estructural y morfología en la interfase de defecto. La morfología del cartílago de reparación puede identificarse por el tipo de cartílago formado: articular frente a fibrótico, evaluando el contenido de glicosaminoglicano, el grado de deposición de cartílago, y similares.

Las evaluaciones histológicas que utilizan metodologías estándar bien caracterizadas en la técnica permiten también la valoración de la formación de hueso y médula ósea nuevos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.266.683.

Adicionalmente, es bien conocido en la técnica que, bioquímicamente, la presencia de colágeno de tipo B y tipo IX en el tejido cartilaginoso es indicativa de fenotipo diferenciado de condrocitos. La presencia de colágeno de tipo II y/o tipo IX puede determinarse mediante electroforesis en gel estándar, análisis de transferencia Western y/o tinción inmunohistoquímica utilizando, por ejemplo, anticuerpo comercialmente disponible como se describe a continuación. Otros marcadores bioquímicos incluyen hematoxilina, eosina, tricromo de Goldner y safranina O.

Pueden utilizarse métodos inmunohistoquímicos tales como los siguientes para identificar la formación de tejido cartilaginoso, incluyendo cartílago articular. Se preparan secciones de tejido utilizando técnicas de imbibición y seccionamiento rutinarias conocidas en la técnica. En primer lugar, se exponen los epítomos de colágeno de tipo II a pretratamiento con proteasa. Por ejemplo, se pretratan muestras de tejido con pronasa de tipo XIV 1 mg/ml de Sigma (St. Louis, MO; número de catálogo P5147) en solución salina tamponada con Tris (TBS) durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente. Se lavan después las muestras con TBS con 0,2% de glicina. Se bloquean las muestras durante 30 min en una solución salina tamponada con Tris que contiene 1% de Tween 20 (TBST) y albúmina de suero bovino (BSA), y se lavan con TBST. Se incuban después las muestras con anticuerpos policlonales purificados por afinidad de cabra anti-colágeno humano de tipos I y II durante aproximadamente 1 hora, o durante una noche, a temperatura ambiente. En ciertos de los ejemplos expuestos a continuación, el anticuerpo de cabra anti-colágeno humano de tipo I se obtuvo en Southern Biotechnology Associates (Birmingham, Alabama), número de catálogo 310-01, por ejemplo, número de lote L055-X916; el anticuerpo de cabra anti-colágeno humano de tipo II se obtuvo también en Southern Biotechnology Associates, número de catálogo 1320-01, por ejemplo, número de lote C153-T826. Pueden utilizarse también anticuerpos anti-colágeno humano de tipos I y II generados en ratón o conejo. El experto en la técnica apreciará las circunstancias en las cuales es apropiado el uso de una especie frente a otra. Para ciertos de los ejemplos expuestos a continuación, las concentraciones de anticuerpos de cabra anti-colágeno humano de tipos I y II utilizadas para incubación son, por ejemplo, 20 µg/ml para cada anticuerpo diluido en 1% de BSA en TBST. Después de incubación con anticuerpos, se aclaran las muestras con TBST y se mantienen en un baño. Se añade después un anticuerpo de enlace comercialmente disponible. Por ejemplo, las muestras tratadas con anticuerpos de cabra anti-colágeno humano de tipos I y II pueden incubarse con anticuerpo de enlace de cabra de BioGenex Laboratories (San Ramón, CA); número de catálogo HK209-5G) durante al menos 10 min a temperatura ambiente. Para aquellas muestras incubadas con anticuerpos de ratón o conejo, puede utilizarse el kit Dako LSAB2 número K0610 de Dako Corporation (Carpintería, CA) como anticuerpo de enlace. Se aclaran de nuevo las muestras con TBST y se mantienen en un baño. A continuación, se dejan incubar las muestras con estreptavidina/fosfatasa alcalina comercialmente disponible en cualquiera de las fuentes anteriormente identificadas durante al menos aproximadamente 10 min a temperatura ambiente. Se aclaran de nuevo las muestras con TBST. Se desarrollan después las muestras mediante tratamiento con una solución de sustrato apropiado durante aproximadamente 10 min o menos. Por ejemplo, para detección de fosfatasa alcalina, se utilizan aproximadamente 100 µl de lavamasol 50 x. Para el desarrollo de color, se utiliza Fast Red de Dako Corporation. Después del desarrollo, se contratiñen las muestras lavando durante 2 min con hematoxilina de Harris y carbonato de litio al 1%. Se montan después las muestras en un medio acuoso de montaje, y se evalúa posteriormente la formación de cartílago.

La tinción para colágeno de tipos I y II es útil para determinar el límite entre el hueso subcondral regenerado y el tejido reparativo. Generalmente, el tejido reparativo que es fibroso se tiñe menos intensamente. Adicionalmente, el hueso subcondral recién formado puede identificarse mediante la localización del colágeno de tipo II en pequeñas

espículas del cartílago restante. El azul de toluidina y la safranina O son también útiles para teñir proteoglicanos ácidos en una capa de cartílago, así como tejidos reparativos.

2. Microscopía de luz polarizada

La microscopía de luz polarizada puede utilizarse para valorar la interdigitación fibrilar en la unión entre los márgenes del tejido de reparación y el cartílago articular residual adyacente al defecto. Dicha microscopía puede realizarse utilizando secciones teñidas con safranina O de un defecto. En ciertos casos, la microscopía de luz polarizada ofrece al experto en la técnica una visión más exacta del proceso de reparación. Por ejemplo, utilizando microscopía de luz, el tejido de reparación en la periferia de un defecto puede aparecer bien yuxtapuesto con el cartílago residual. Sin embargo, utilizando microscopía de luz polarizada, puede observarse que las fibrillas de colágeno del tejido de reparación no están bien integradas con las del cartílago residual. La falta de continuidad de fibrilla entre el cartílago de reparación y el persistente es indicativa de una reparación subóptima. Por tanto, cuando se evalúa cualitativamente la interfase entre cartílago de reparación y cartílago viable residual, la continuidad fibrilar se valora preferiblemente utilizando microscopía de luz polarizada como se ejemplifica en la presente memoria a continuación. (Véase, también, Shapiro *et al.*, *Journal of Bone and Joint Surgery* 75: 532-553, (1993)).

La práctica de la invención se entenderá más completamente a partir de los siguientes ejemplos, que se presentan en la presente memoria sólo para ilustración, y no debe considerarse que limiten la invención en modo alguno.

VI. Estudios animales: métodos de uso de dispositivos osteogénicos mejorados

A. Reparación de defectos segmentarios de tamaño crítico utilizando dispositivos osteogénicos mejorados que contienen carboximetilcelulosa

1. Experimento 1: Configuración de dispositivo unitario (perros)

Este estudio ilustra la eficacia de la OP-1 combinada con matriz de colágeno y carboximetilcelulosa para reparar defectos segmentarios de cúbito de tamaño crítico en el modelo canino reconocido en la técnica.

Brevemente, los datos expuestos a continuación indican una curación radiográfica al menos comparable en sitios que recibieron un dispositivo de CMC/OP-1 respecto a defectos segmentarios tratados con el dispositivo de OP estándar. La graduación radiográfica final (máximo= 6,0) para defectos tratados con CMC/OP-1 era de $5,33 \pm 0,58$, comparada con $4,67 \pm 0,58$ para defectos que recibieron el dispositivo de OP-1 estándar. En general, la formación de hueso nuevo era evidente tan tempranamente como dos semanas después de la operación en todos los defectos. El hueso nuevo siguió densificando, consolidándose y remodelándose hasta el sacrificio a las 12 semanas después de la operación. La carga de rotura media de los defectos tratados con el dispositivo de CMC/OP-1 era de $59,33 \text{ N} \pm 26,77$. Esto era un 70% de la carga de rotura media en los lados contralaterales que recibieron los implantes de OP-1 estándar. Histológicamente, el volumen final, la calidad y el grado de remodelación eran al menos equivalentes en defectos tratados con el dispositivo de CMC/OP-1 y de OP-1 estándar, aunque se observó una variación de la formación de hueso nuevo final y del grado de remodelación en comparaciones de animal a animal. La graduación histológica media para defectos tratados con el dispositivo de CM/OP-1 era de $12,67 \pm 1,04$ de 16 puntos totales posibles. La graduación histológica media para defectos tratados con el dispositivo de OP-1 estándar era de $11,41 \pm 0,95$ de 16 puntos totales posibles.

Descripción del dispositivo de ensayo

Como ya se ha descrito, los dispositivos estándar consistían en proteína osteogénica 1 humana recombinante (rhOP-1) mezclada con matriz de colágeno de tipo I óseo bovino a una relación de 2,5 mg de rhOP-1 por g de matriz de colágeno. El dispositivo mejorado consistía en rhOP-1 mezclada con matriz de colágeno de tipo I óseo bovino y carboximetilcelulosa (CMC). Los dispositivos unitarios se suministraron en viales estériles.

Como se describe anteriormente, el dispositivo que contiene CMC actualmente preferido para defectos abiertos tiene una consistencia de masilla. Se dispuso el dispositivo de CMC/OP-1 unitario seco en un recipiente pequeño y se mezcló con solución salina. Utilizando los dedos, el profesional mezcló y conformó el dispositivo a la forma general del defecto y después dispuso el dispositivo en el sitio de defecto. Se reseñó que el dispositivo mejorado se manejaba y conformaba más fácilmente, y no se pegaba a los guantes quirúrgicos. El dispositivo mantuvo su integridad cuando se dispuso en el defecto durante irrigación y durante/después de sutura.

Diseño experimental

Se utilizaron perros mestizos macho adultos debido a sus características de reparación y remodelación óseas bien conocidas. Todos los animales eran de al menos 2 años de edad y pesaban de 18,14 a 22,68 kg. Todos los animales se suministraron por Martin Creek Kennels, número USDA 71-B-108, Willowford, AK. Se prestó una atención especial a seleccionar animales de tamaño y peso uniforme para limitar la variabilidad de la geometría y carga óseas. Se examinaron radiográficamente los animales antes de la operación para asegurar un tamaño apropiado, madurez esquelética y que no existieran anormalidades óseas obvias.

ES 2 273 412 T3

Se utilizaron un total de 3 perros macho adultos. Se crearon defectos segmentarios bilaterales de cúbito de 2,5 cm. Todos los defectos del lado derecho recibieron el dispositivo mejorado (dispositivo de CMC/OP-1). Todos los defectos del lado izquierdo recibieron el dispositivo de OP-1 estándar. Se tomaron radiografías cada dos semanas para estudiar la progresión de la curación y se graduaron en una escala de 0-6. En el sacrificio, se recuperaron todos los cúbitos en bloque y, en aquellos que se habían curado suficientemente tras manipulación manual, se ensayó mecánicamente la torsión. Se evaluaron en los segmentos mediante histología la respuesta de tejido, la arquitectura y remodelación óseas, y la calidad y cantidad de formación y curación de hueso nuevo; la graduación estaba en una escala de 0-16.

Cirugía

Utilizando técnicas asépticas estándar, se realizó cirugía bajo anestesia con gas halotano. Se hizo una incisión lateral de aproximadamente 4,0 cm de longitud y se obtuvo la exposición del cúbito utilizando disección roma y aguda. Se creó un defecto osteoperiosteal segmentario de 2,5 cm en el cúbito medio utilizando una sierra oscilante. Este defecto era de aproximadamente 2-2,5 veces el diámetro de eje medio, y representa un defecto de tamaño crítico, concretamente, el defecto no se curaría espontáneamente. Se hicieron medidas intraoperativas del segmento de hueso retirado. Se mantuvo el radio para estabilidad mecánica, pero no se utilizó fijación interna ni externa. Se irrigó el sitio con solución salina para retirar los restos de hueso y células de médula vertidas. Después de secar el sitio y conseguir la homeostasis, se dispusieron cuidadosamente los implantes en los defectos. Se cerraron meticulosamente los tejidos blandos en capas para contener el implante. Se repitió después el procedimiento en el lado contralateral.

Radiografías

Se obtuvieron radiografías de los miembros anteriores cada dos semanas hasta 8 semanas después de la operación, y después de nuevo en el sacrificio a las 12 semanas después de la operación. Se utilizaron tiempos de exposición e intensidades estandarizadas, y se utilizaron bolsas de arena para posicionar las extremidades de manera consistente. Se evaluaron las radiografías y se compararon con radiografías anteriores para apreciar la calidad y velocidad de curación de defecto. La graduación de las radiografías era según la siguiente escala:

TABLA 5

Escala de graduación radiográfica	
	Graduación:
Sin cambios desde la apariencia inmediata después de la operación	0
Trazas de material radiodenso en el defecto	1
Radiodensidad floculenta con manchas de calcificación	2
Defecto con puente en al menos un punto con material de radiodensidad no uniforme	3
Defecto con puente tanto en los lados medial como lateral con material de radiodensidad uniforme, el extremo cortado de la corteza permanece visible	4
Igual que la graduación 3, al menos una de las cuatro cortezas está oscurecida por hueso nuevo	5
Defecto con puente de hueso nuevo uniforme, los extremos cortados de la corteza no son ya distinguibles	6

Sacrificio

Al final del periodo de estudio, se sacrificaron los animales utilizando una sobredosis de barbiturato intravenoso. Se recogieron inmediatamente el cúbito y el radio en bloque y se dispusieron en gasas empapadas con solución salina. Se macrofotografiaron ambos cúbitos y se tomaron radiografías de contacto con marcadores. Se separaron cuidadosamente por disección los tejidos blandos del sitio de defecto. Se utilizó una sierra enfriada con agua para cortar el cúbito a una longitud uniforme de 9 cm con el sitio de defecto centrado en la mitad de la muestra de ensayo.

Ensayo mecánico

Inmediatamente después del seccionamiento, si la curación se consideró suficiente por manipulación manual, se ensayó en las muestras la rotura por torsión utilizando procedimientos rutinarios en una máquina de ensayo hidráulica de bucle cerrado MTS (Minneapolis, MN) operada por control de impactos a una velocidad de desplazamiento constante de 50 mm/min. Brevemente, se montó cada extremo del segmento óseo en un manguito de aluminio cilíndrico y se cementó con metacrilato de metilo. Se fijó rígidamente un extremo y se giró el otro en sentido contrario a las agujas del reloj. Puesto que el cúbito de perro tiene una ligera curvatura, se montaron las muestras para mantener la rotación de la muestra coaxial con la del dispositivo de ensayo. Se aplicó la fuerza de torsión con un brazo de palanca de 6 cm, mediante un sistema de ensayo de materiales servohidráulico. Se hicieron registros simultáneamente del desplazamiento del implante, medidos mediante el controlador de impactos de la máquina, mientras que se registraba la carga en la celda de carga. Se generaron curvas de fuerza-desplazamiento angular, a partir de las cuales se obtuvieron el momento y la deformación angular de rotura, y se calculó la absorción de energía hasta rotura como el área bajo la curva de carga-desplazamiento.

Histología

Se fijaron las muestras individuales mediante inmersión en solución de formalina tamponada al 10% inmediatamente después del ensayo mecánico o después del seccionamiento en muestras no ensayadas. Se dividieron las muestras con una sierra de diamante enfriada con agua, biseccionando la muestra a lo largo de su eje largo. Este procedimiento daba como resultado dos porciones de cada muestra para diferentes preparaciones histológicas, incluyendo secciones rectificadas no descalcificadas y secciones de microtomo no descalcificadas.

Después de la fijación, se deshidrataron las muestras designadas para secciones no descalcificadas en soluciones graduadas de alcohol etílico de 70 a 100%. Se dispusieron después las muestras en metacrilato de metilo monomérico y se dejó polimerizar. Se obtuvieron las secciones rectificadas cortando las muestras con una sierra de seccionamiento de alta velocidad enfriada con agua Mark V CS600-A (Grandby, CT) en secciones de aproximadamente 700 a 1.000 μm de grosor. Se montaron las secciones en portaobjetos acrílicos y se rectificaron hasta 100 μm de grosor utilizando una muela abrasiva metalúrgica, y se hicieron microrradiografías utilizando técnicas estandarizadas. Después de la microrradiografía, se rectificaron adicionalmente las secciones hasta aproximadamente 50 μm y se tiñeron con fuchsina básica y azul de toluidina para graduación histológica que evaluara los siguientes parámetros de reparación: calidad de la unión, apariencia y calidad del hueso cortical y reticular, presencia de elementos de médula ósea, remodelación ósea y respuesta inflamatoria. La graduación de los parámetros histológicos era según la siguiente escala:

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 273 412 T3

TABLA 6

5	Escala de graduación histológica	
	Calidad de la unión:	Gradua- ción:
10	Sin signos de unión fibrosa u otra	0
	Unión fibrosa	1
15	Unión osteocondral	2
	Unión ósea	3
	Unión ósea con reorganización de cortezas	4
20	Desarrollo de corteza:	
	Ninguna presente en el defecto	0
25	Densificación de bordes	1
	Formación reconocible	2
30	Cortezas intactas, pero no completas	3
	Formación completa de cortezas normales	4
35	Material de implante residual/arquitectura interna	
	Grandes cantidades de material de implante visible	0
40	Cantidad moderada de material de implante residual	1
45	Cantidad pequeña de material de implante residual/arquitectura no organizada	2
50	Sin implante residual/vuelta de cavidad medular/algunos elementos medulares	3
	Elementos medulares y arquitectura normales	4
55	Respuesta inflamatoria:	
	Grave	0
	Grave/moderada	1
60	Respuesta moderada	2
	Leve	3
	Sin respuesta	4
65	PUNTOS TOTALES	16

Resultados

Evaluación radiográfica

En este estudio, no había diferencias significativas en las características de curación ósea radiográfica de sitios que recibieron un dispositivo de CMC/OP-1 comparados con defectos segmentarios tratados con el dispositivo de OP estándar. En general, era evidente la formación de hueso nuevo tan tempranamente como dos semanas después de la operación en todos los defectos. El hueso nuevo siguió densificando, consolidándose y remodelándose hasta el sacrificio a las 12 semanas después de la operación. Ocurrió el desarrollo de corteza nueva con formación de cavidad medular temprana entre las evaluaciones de las semanas 6 y 8. La graduación radiográfica final para defectos tratados con el dispositivo de CMC/OP-1 era de $5,33 \pm 0,58$. La graduación radiográfica final para defectos que recibieron el dispositivo de OP-1 estándar era de $4,67 \pm 0,58$.

Como ejemplo, se exponen a continuación las observaciones representativas específicas de uno de los animales de ensayo:

Defecto derecho (dispositivo de CMC/OP-1)

A las 2 semanas después de la operación, estaban presentes trazas de material radiodenso en el defecto derecho, pero el defecto no tenía un puente completo ni estaba relleno con hueso nuevo. A las 4 semanas después de la operación, aumentó significativamente la cantidad de radiodensidad de hueso nuevo. El defecto estaba cubierto, pero el hueso nuevo no estaba bien contenido. Había cierta consolidación de hueso nuevo a lo largo de los bordes periostiales. Se había formado una cantidad equivalente de hueso nuevo comparada con el defecto izquierdo de este animal. A las 6 semanas después de la operación, aumentó la radiodensidad del hueso nuevo y el defecto estaba completamente cubierto y extensamente relleno con hueso nuevo. Era evidente una remodelación temprana, con los extremos del hueso del hospedador empezando a incorporarse al hueso nuevo. A las 8 semanas después de la operación, el hueso nuevo siguió remodelándose y el volumen de hueso nuevo se aproximó mejor a los bordes del defecto. Se incorporaron los extremos del hueso del hospedador al hueso nuevo con densificación del hueso nuevo a lo largo de los bordes, sugiriendo la formación de corteza nueva. No había evidencias radiográficas de ningún material vehículo residual. En el sacrificio, estaba presente una región radioluscente en el centro del defecto del lado derecho, pero la densificación de los bordes de hueso nuevo sugería la formación de corteza nueva. La graduación radiográfica final era de 5 de 6 puntos posibles.

Defecto izquierdo (dispositivo de OP-1)

A las 2 semanas después de la operación, estaban presentes trazas de material radiodenso en los defectos, pero el defecto no tenía puente ni estaba relleno con hueso nuevo. A las 4 semanas después de la operación, aumentó significativamente la cantidad y radiodensidad del hueso nuevo, y el defecto estaba cubierto y relleno con hueso nuevo. A las 6 semanas después de la operación, aumentó la radiodensidad del hueso nuevo y el defecto estaba completamente cubierto y extensamente relleno con hueso nuevo. Era evidente remodelación temprana, y el volumen de hueso nuevo se aproximaba mejor a los bordes del defecto. El hueso nuevo era uniformemente denso, y los extremos del hueso del hospedador estaban empezando a incorporarse. A las 8 semanas después de la operación, siguió remodelándose hueso nuevo, se incorporaron los extremos de hueso del hospedador y había empezado la densificación del hueso nuevo a lo largo de los bordes del defecto. En el sacrificio, la densificación de hueso nuevo a lo largo de los bordes del defecto sugería una reformatión temprana de cortezas nuevas. La densidad del hueso nuevo en el centro del defecto era mayor que el hueso nuevo que se había formado en el defecto del lado derecho, aunque no había diferencias significativas en las apariencias radiográficas de los lados derecho e izquierdo en este animal. La graduación radiográfica final era de 5 de 6 puntos posibles.

Observaciones macroscópicas

Ambas muestras derecha e izquierda de todos los animales tenían apariencias macroscópicas similares. En dos animales, los defectos derecho e izquierdo estaban firmemente unidos y tenían aproximadamente el mismo volumen de hueso nuevo. En un tercer animal, el lado derecho e izquierdo tenían un volumen de hueso nuevo similar, pero el lado izquierdo no estaba completamente unido.

Ensayo mecánico

La carga de rotura media para defectos tratados con el dispositivo de CMC/OP-1 era de $59,33 \text{ N} \pm 26,77$ ($n=3$). La carga de rotura media era un 79% de la carga de rotura media de los lados contralaterales, que recibieron los dispositivos de OP-1 estándar. Esto representaba un 91% de la resistencia de los controles intactos ensayados anteriormente. La deformación angular media era de $38,22 \pm 0,69$ grados. La energía absorbida hasta rotura media era de $97,47 \pm 47,21 \text{ N.m/grado}$.

La carga de rotura media de los defectos tratados con el dispositivo de OP-1 estándar era de $75,39 \text{ N} \pm 1,88$ ($n=2$). Esto representaba un 115% de la resistencia de los controles intactos ensayados anteriormente. La deformación angular media era de $59,06 \pm 27,80$ grados. La energía absorbida hasta rotura media era de $93,40 \pm 17,49 \text{ N.m/grado}$. Como se observa, un defecto tratado con el dispositivo de OP-1 estándar no se ensayó debido a inestabilidad macroscópica.

Histología

En general, se observó la formación de hueso nuevo consistente con los defectos tratados con el dispositivo de rhOP-1 estándar con una matriz de colágeno. Tanto el volumen final como la calidad y el grado de remodelación eran equivalentes en la comparación de dispositivos de CMC/OP-1 y OP-1 estándar. Se observó una variación de la formación de hueso nuevo final y del grado de remodelación en comparaciones de animal a animal. La graduación histológica media para defectos tratados con el dispositivo de CMC/OP-1 era de $12,67 \pm 1,04$ de 16 puntos posibles totales. La graduación histológica media para defectos tratados con el dispositivo de OP-1 estándar era de $11,41 \pm 0,95$ de un total de 16 puntos posibles.

Generalmente, ambos defectos izquierdo y derecho estaban cubiertos por un gran volumen de hueso nuevo. El hueso nuevo estaba empezando a reorganizarse y tenía características lamelares. A lo largo de los bordes del defecto, el hueso nuevo se volvió más denso, sugiriendo cortezas nuevas. En ciertos casos, la remodelación no estaba tan uniformemente avanzada en el lado izquierdo como en el derecho. El volumen de hueso nuevo en el lado izquierdo era ligeramente menor que en el derecho en ciertos casos. En el centro de todos los defectos, era evidente la vuelta de componentes medulares.

En conclusión, se utilizaron dispositivos osteogénicos mejorados (configuración unitaria) para reparar defectos segmentarios de tamaño crítico. Las velocidades de reparación ósea endocrondral, evidencias de resistencia mecánica, evidencias radiográficas y evidencias histológicas sugerían que los dispositivos mejorados dan como resultado una reparación de defecto al menos comparable con los dispositivos osteogénicos estándar.

2. Experimento 2: Respuesta a la dosis de OP-1 utilizando la configuración de dispositivo no unitario (perros)

Este estudio ilustra adicionalmente la eficacia de un dispositivo osteogénico estándar mezclado con carboximetilcelulosa (CMC) utilizando tanto las formulaciones de dosis estándar como baja de OP-1 para curar defectos segmentarios grandes de tamaño crítico en el modelo de defecto segmentario de cúbito canino.

Como se describe con detalle a continuación, se emplearon diversas dosificaciones de OP-1 en este estudio. Brevemente, las formulaciones de dosis baja del dispositivo de OP-1 sin CMC se encontraron efectivas en la inducción de la formación de hueso nuevo, pero menos que el dispositivo de OP-1 de dosis estándar. Sin embargo, e inesperadamente, los defectos tratados con el dispositivo que contiene CMC de dosis baja demostraron volúmenes más tempranos y mayores de formación de hueso nuevo comparados con el dispositivo de OP-1 sin CMC de dosis baja. El dispositivo de OP-1 de dosis estándar o baja se preparó combinando 1 g de dispositivo de OP-1 con 3,2 ml de solución salina estéril. El dispositivo de OP-1 de dosis estándar o baja que contiene CMC se preparó combinando 1 g de dispositivo de OP-1 con 0,2 g de CMC y aproximadamente 2 ml de solución salina estéril. Se prepararon los dispositivos intraoperativamente. Los sitios tratados con OP-1 de dosis estándar con y sin CMC tenían radiográficamente apariencias radiográficas similares. Los sitios de OP-1 de dosis estándar tenían volúmenes más tempranos y mayores de formación de hueso nuevo comparados con los sitios de dosis baja. Los resultados histológicos demostraron una curación de defecto segmentario de hueso más avanzada en sitios tratados con el dispositivo que contiene CMC comparados con el dispositivo de OP-1 estándar. Los sitios tratados con dispositivo de OP-1 de dosis baja que contiene CMC consiguieron un grado equivalente de remodelación e incorporación al hueso del hospedador respecto a sitios tratados con el dispositivo de OP-1 de dosis estándar, pero el volumen de hueso nuevo inducido fue menor. Los sitios de defecto tratados con el dispositivo de dosis estándar que contiene CMC obtuvieron la mayor carga torsional de rotura media a las 12 semanas después de la operación, comparados con todos los demás grupos de tratamiento ($61,91 \pm 35,37$ N, un 95% de la resistencia a la torsión de controles intactos). La resistencia a la torsión de los sitios de dispositivo de dosis baja que contiene CMC era similar a la del dispositivo de OP-1 estándar, que tiene un 78% de la resistencia de cúbitos intactos y un 99% de la resistencia de los sitios ensayados anteriormente tratados con el dispositivo estándar. En contraposición, la resistencia a la torsión de los sitios de OP-1 de dosis baja sin CMC era sólo un 44% de la resistencia a la torsión de cúbitos intactos y un 56% de los defectos segmentarios ensayados anteriormente tratados con el dispositivo de OP-1 estándar.

Material de ensayo

El dispositivo de OP-1 estándar (designado OP en la Tabla 11) consistía en proteína osteogénica 1 humana recombinante (rhOP-1) mezclada con matriz de colágeno de tipo I óseo bovino a una relación de 2,5 mg de rhOP-1/g de matriz de colágeno. Un dispositivo de CMC (dosis estándar, designado OP-1/CMC, OPCMC en la Tabla 11) consistía en un dispositivo de OP-1 combinado con carboximetilcelulosa. El dispositivo de OP-1 de dosis baja consistía en 1,25 mg de rhOP-1/g de matriz de colágeno (designado LOP en la Tabla 10). Cada dispositivo de OP-1 a dosis tanto estándar como baja consistía en 1 g de dispositivo envasado separadamente de la CMC. La CMC se envasó a 200 mg por vial. Esto está en contraposición con el dispositivo unitario descrito anteriormente, en el que la CMC se coenvasaba con los demás componentes de matriz de colágeno y proteína osteogénica.

Diseño experimental

Se utilizaron un total de 12 perros mestizos adultos. Se crearon defectos segmentarios bilaterales de cúbito de tamaño crítico de 2,5 cm. Los defectos del lado derecho de seis animales recibieron el dispositivo de OP-1 estándar. Los defectos del lado izquierdo de este grupo recibieron los dispositivos de OP-1/CMC de dosis estándar. El segundo

grupo de seis animales recibió los dispositivos de OP-1 de dosis baja en el defecto del lado derecho, y recibió los dispositivos de OP-1/CMC de dosis baja en los defectos del lado izquierdo. Se tomaron radiografías cada dos semanas para estudiar la progresión de la curación. En el sacrificio, se recuperó todo en bloque y se ensayó mecánicamente la torsión. Se evaluaron en los segmentos de cúbito mediante histología la respuesta de tejido, el implante residual y la

Modelo animal

Como se describe anteriormente, se utilizaron perros mestizos macho adultos debido a su tamaño anatómico y características de reparación y remodelación óseas conocidas. Todos los animales eran esqueléticamente maduros y pesaban de 18,14 a 22,68 kg.

Cirugía

Utilizando técnicas quirúrgicas estándar similares a las descritas anteriormente, se hizo una incisión lateral de aproximadamente 4 cm de longitud y se obtuvo la exposición del cúbito utilizando disección roma y aguda. Se creó un defecto osteoperiosteal segmentario de 2,5 cm en el cúbito medio utilizando una sierra oscilante. El defecto era de aproximadamente 2-2,5 veces el diámetro del eje medio, y representaba un defecto de tamaño crítico, concretamente, el defecto no se curaría espontáneamente. Se hicieron medidas intraoperativas del segmento de hueso retirado. Se registraron la longitud del segmento, los dos diámetros externos del segmento y el diámetro central del segmento en milímetros en los registros quirúrgicos. Se mantuvo el radio para estabilidad mecánica. Se irrigó el sitio con solución salina para retirar los desechos óseos y células de médula vertidas. Después de secar el sitio y conseguir la homeostasis, se dispusieron los implantes en el defecto. Se cerraron los tejidos blandos en capas para contener el implante. Se repitió después el procedimiento en el sitio contralateral.

Radiografías

Como se describe anteriormente, se obtuvieron radiografías de los miembros anteriores cada dos semanas hasta las 8 semanas después de la operación, y después de nuevo en el sacrificio a las 12 semanas después de la operación.

Sacrificio

Los procedimientos fueron similares a los descritos anteriormente. Al final del periodo de estudio, se sacrificaron los animales, se recogieron inmediatamente cúbito y radio en bloque y se dispusieron en gasas empapadas de solución salina. Se separaron cuidadosamente por disección los tejidos blandos del sitio de defecto. Se utilizó una sierra de cinta para cortar el cúbito a una longitud uniforme de 9 cm con el sitio de defecto centrado en la mitad de la muestra de ensayo.

Ensayo mecánico

Los protocolos fueron similares a los descritos anteriormente. Brevemente, se ensayó en muestras la torsión de rotura en una máquina de ensayo hidráulica de bucle cerrado MTS (Minneapolis, MN) operada por control de impactos a una velocidad de desplazamiento constante de 50 ml/min. Se aplicó fuerza de torsión con un brazo de palanca de 6 cm mediante un sistema de ensayo de materiales servohidráulico. Se hicieron registros simultáneos del desplazamiento de implante, medidos por el controlador de impactos de la máquina, mientras se registraba la carga en la celda de carga. Se generaron curvas de fuerza-desplazamiento angular, a partir de las cuales se obtuvieron el momento y la deformación angular de rotura, y se calculó la energía de absorción hasta rotura como el área bajo la curva de carga-desplazamiento.

Histología

Como se describe anteriormente, se deshidrataron muestras fijadas designadas para secciones no descalcificadas en soluciones de alcohol etílico graduadas de 70% a 100%. Se dispusieron después las muestras en metacrilato de metilo monomérico y se dejaron polimerizar. Se obtuvieron las secciones rectificadas cortando las muestras con una sierra de seccionamiento de alta velocidad enfriada con agua en secciones de aproximadamente 700 a 1.000 μm de grosor. Se montaron estas secciones en portaobjetos acrílicos y se rectificaron hasta 100 μm de grosor. Después de la microrradiografía rutinaria, se rectificaron adicionalmente las secciones hasta aproximadamente 50 μm y se tiñeron con fuchsina básica y azul de toluidina para graduación histológica que evaluara los siguientes parámetros de reparación: calidad de la unión, apariencia y calidad del hueso cortical y reticular, presencia de elementos de médula ósea, remodelación ósea y respuesta inflamatoria.

Evaluación radiográfica

A las 12 semanas después de la operación (sacrificio), los sitios de OP-1/CMC de dosis estándar conseguían la mayor graduación radiográfica media, 5,17/6,0 puntos. La graduación radiográfica final para los dispositivos de OP-1 estándar era de 5,00/6,00. Los sitios de OP-1 de dosis baja tenían una graduación radiográfica final media de 3,83/6,00. Los sitios de OP-1/CMC de dosis baja tenían una graduación media de 4,67/6,0. En todos los periodos de tiempo, los sitios de OP-1/CMC de dosis estándar tenían graduaciones radiográficas medias mayores que la OP-1

estándar sin CMC. A todos los periodos de tiempo, los sitios de OP-1/CMC de dosis baja tenían mayores graduaciones radiográficas medias que los sitios de OP-1 de dosis baja sin CMC.

El análisis estadístico demostró un efecto significativo del tipo de implante cuando se combinaban todas las graduaciones (análisis de varianza de un factor de Kruskal-Wallis, $p=0,0049$). Múltiples comparaciones demostraron que las graduaciones radiográficas medias de los dispositivos de OP-1 estándar y OP-1/CMC de dosis estándar para todos los periodos de tiempo eran significativamente mayores que en los sitios de OP-1 de dosis baja sin CMC ($\alpha=0,10$ y $\alpha=0,05$, respectivamente). Múltiples comparaciones demostraron también que la graduación radiográfica media de los sitios de OP-1/CMC de dosis estándar era significativamente mayor que en los sitios de OP-1/CMC de dosis baja ($\alpha=0,10$). Sin embargo, e inesperadamente, las graduaciones radiográficas medias de los dispositivos de OP-1 de dosis estándar no eran significativamente mayores que las graduaciones radiográficas medias de los sitios de OP-1/CMC de dosis baja.

Sitios de OP-1 de dosis baja sin CMC

A las 2 semanas después de la operación, era evidente la formación de hueso nuevo en uno de los seis defectos tratados con OP-1 de dosis baja. Estaban presentes trazas de material radiodenso alrededor del defecto, pero el hueso nuevo no formaba puente ni cubría el defecto. La graduación radiográfica media a las 2 semanas después de la operación era de 0,17/60 puntos. A las 4 semanas después de la operación, el mismo sitio que demostró formación de hueso nuevo a las 2 semanas, demostró un aumento del volumen de hueso nuevo. Estaban cubiertos cuatro defectos y un defecto estaba rellenado con hueso nuevo a las 4 semanas. Dos sitios demostraron poca actividad a las 4 semanas después de la operación. La graduación radiográfica media a las 4 semanas era de 1,83/6,0. A las 6 semanas después de la operación, dos sitios tratados con OP-1 de dosis baja estaban cubiertos y rellenados con hueso nuevo. Dos sitios estaban cubiertos, pero incompletamente rellenados con hueso nuevo. Un animal demostró cierta formación temprana de hueso nuevo. Un animal no demostró ninguna formación de hueso nuevo. La graduación radiográfica media a las 6 semanas era de 2,83/6,00. De 6 a 8 semanas, no era evidente la formación de hueso nuevo adicional, pero se manifestaba cierta densificación de hueso nuevo y había ocurrido cierta remodelación temprana. La graduación radiográfica media a las 8 semanas era de 3,17/6,0. En el sacrificio, 12 semanas después de la operación, todos los defectos demostraron algo de hueso nuevo bien contenido, pero la densidad era significativamente menor que el hueso del hospedador circundante. Estaban presentes radioluscencias ocasionales en la unión de hueso de hospedador/hueso nuevo. La graduación radiográfica media a las 12 semanas era de 3,83/6,0.

Sitios de OP-1/CMC de dosis baja

A las 2 semanas después de la operación, era evidente la formación temprana de hueso nuevo en tres de seis defectos tratados con OP-1/CMC de dosis baja. El hueso nuevo no cubría ni rellenaba los defectos, pero estaba bien contenido en los sitios quirúrgicos. La graduación radiográfica media a las 2 semanas era de 0,83/6,0. A las 4 semanas después de la operación, estaba presente la formación de hueso nuevo en cinco de seis defectos, cubriendo y casi rellenando los defectos. La graduación radiográfica media a las 4 semanas era de 2,33/6,0. A las 6 semanas, aumentó la densidad de hueso nuevo presente en los defectos. Era evidente la incorporación temprana del hueso del hospedador en tres de seis defectos. Un animal no demostró ninguna formación de hueso nuevo bilateralmente a las 6 semanas. La graduación radiográfica media en este momento era de 3,00/6,0. De 6 a 8 semanas, no ocurrió formación adicional de hueso nuevo. Se manifestaron remodelación temprana e incorporación al hueso del hospedador. Un animal no demostró ningún cambio en la apariencia radiográfica. La graduación radiográfica media a las 8 semanas era de 3,33/6,0. Inesperadamente, los sitios de OP-1/CMC a dosis baja demostraron una formación de hueso nuevo y remodelación más extensas que los sitios de OP-1 a dosis baja sin CMC. En sitios en que el defecto estaba completamente rellenado con hueso nuevo, la densidad del hueso nuevo era menor que el hueso del hospedador circundante. La graduación radiográfica media a las 12 semanas (sacrificio) era de 4,67/6,0.

Sitios de dispositivo de OP-1 estándar

Los resultados de este estudio eran consistentes con todos los estudios previos del dispositivo de OP-1 estándar. A las 2 semanas después de la operación, cuatro de seis defectos tratados con el dispositivo de OP-1 demostraron formación temprana de hueso nuevo. En dos defectos, el hueso nuevo cubría extensamente los defectos, pero el hueso nuevo no rellenaba los defectos. Globalmente, el hueso nuevo no estaba bien contenido. La graduación radiográfica media a las 2 semanas era de 1,50/6,0. A las 4 semanas después de la operación, ocurrió un aumento de la cantidad y densidad de hueso nuevo en los seis defectos. El hueso nuevo cubría todos los defectos. En cuatro de seis sitios, el defecto aparecía completamente rellenado con hueso nuevo. La graduación radiográfica media a las 4 semanas era de 3,00/6,0. A las 6 semanas después de la operación, aumentó la densidad de hueso nuevo. El hueso nuevo no estaba bien contenido en los defectos restantes. Generalmente, se observó incorporación temprana en los extremos de hueso del hospedador en tres de seis sitios. La graduación radiográfica media a las 6 semanas era de 3,67/6,0. De 6 a 8 semanas, era evidente una incorporación casi completa al hueso del hospedador en tres de seis sitios, aunque la remodelación hacia los contornos del cúbito había ocurrido en todos los defectos. La graduación radiográfica media a las 8 semanas era de 4,50/6,0. A las 12 semanas después de la operación (sacrificio), había ocurrido una remodelación extensa, aunque el volumen de hueso nuevo no se aproximaba todavía a los contornos del cúbito. A menudo, se extendía hueso nuevo en los tejidos blandos circundantes, aunque se manifestaba cierta reformación de cortezas en todos los defectos tratados con el dispositivo de OP-1 estándar. La graduación radiográfica media a las 12 semanas era de 5,00/6,00.

Sitios de OP-1/CMC de dosis estándar

A las 2 semanas después de la operación, era evidente la formación temprana de hueso nuevo en cuatro de seis defectos tratados con el dispositivo de OP-1/CMC. El hueso nuevo estaba bien contenido en sólo uno de los cuatro defectos. Parecía que el hueso nuevo cubría y rellenaba dos de los seis defectos. La graduación radiográfica media a las 2 semanas era de 1,67/6,0. A las 4 semanas después de la operación, había ocurrido la formación de hueso nuevo extenso en todos los seis defectos. El hueso nuevo no estaba bien contenido, pero se observó la incorporación temprana al hueso del hospedador en dos sitios. La graduación radiográfica media a las 4 semanas era de 1,67/6,0. De 4 a 6 semanas, ocurrió una remodelación extensa e incorporación del hueso del hospedador en todos los defectos. El hueso nuevo no estaba bien contenido, pero había empezado a resorberse hueso nuevo en el tejido blando. La graduación radiográfica media a las 6 semanas era de 4,33/6,0. A las 8 semanas, se apreciaba la incorporación completa al hueso del hospedador en dos sitios, y era evidente la formación temprana de corteza nueva en al menos un sitio. La graduación radiográfica media a las 8 semanas era de 4,67/6,0. A las 12 semanas después de la operación (sacrificio), tres de seis defectos tenían incorporación extensa a los extremos del hueso del hospedador. Estaba todavía presente hueso nuevo fuera de los defectos, aunque había ocurrido una extensa remodelación. La graduación radiográfica media a las 12 semanas era de 5,17/6,0.

Observaciones macroscópicas

Los sitios tratados con implantes de dosis baja con y sin CMC demostraron menos volumen de hueso nuevo comparados con los sitios de OP-1 de dosis alta con y sin CMC. Todos los sitios de dosis alta estaban firmemente unidos macroscópicamente, pero tres de los doce sitios tratados con OP-1 de dosis baja no estaban todavía firmemente unidos en el sacrificio.

Sitios de OP-1 de dosis baja sin CMC

En todos los casos, la cantidad de hueso nuevo formado no superaba el volumen de defecto original. La formación de hueso nuevo estaba bien contenida, aunque en dos de seis segmentos el hueso no estaba completamente unido.

Sitios de OP-1/CMC de dosis baja

De forma similar a los defectos tratados con OP-1 de dosis baja, la formación de hueso nuevo estaba bien contenida. Uno de seis sitios tratados con OP-1/CMC de dosis baja no estaba completamente unido. Típicamente, el volumen de hueso nuevo era menor que el volumen de defecto original.

Sitios de dispositivo de OP-1 estándar

De forma similar a estudios previos, el volumen de hueso nuevo en sitios tratados con el dispositivo de OP-1 estándar era 2 a 3 veces mayor que el volumen de defecto original. Todos los defectos estaban firmemente unidos. En cinco de seis defectos, se extendía hueso nuevo extensivamente en los tejidos blandos y se fusionaba con el radio. En un defecto, el volumen de hueso nuevo formado era menor que en los otros sitios.

Sitios de OP-1/CMC de dosis estándar

El volumen de hueso nuevo en cinco de seis defectos tratados con OP-1/CMC superaba el volumen de hueso del hospedador original y se extendía en los tejidos blandos. El volumen de hueso nuevo era 2 a 3 veces el volumen del defecto original. Como se observa anteriormente en un animal, el volumen de hueso reducido se observó bilateralmente.

Ensayo mecánico

Los resúmenes de ensayo mecánico aparecen en las Tablas 7 y 8.

Inesperadamente, los sitios de defecto tratados con el dispositivo de OP-1/CMC de dosis estándar obtuvieron la carga media de rotura por torsión mayor a las 12 semanas después de la operación, comparados con todos los demás grupos de tratamiento, incluyendo el grupo de dispositivo estándar. La carga de rotura media era de $61,91 \pm 35,37$ N ($n=6$). Esto representaba un 95% de la resistencia a la torsión de los cúbitos intactos anteriormente ensayados y un 121% de la resistencia de defectos segmentarios anteriormente ensayados tratados con el dispositivo de OP-1 estándar. Los sitios tratados con el dispositivo de OP-1 estándar tenían una resistencia a la torsión media de $55,84 \pm 37,26$ N ($n=6$), un 86% de los cúbitos de control intactos anteriormente ensayados y un 110% de los defectos segmentarios anteriormente ensayados tratados con el dispositivo de OP-1. La carga de rotura media para los sitios OP-1/CMC de dosis baja era de $50,66 \pm 31,68$ N ($n=5$) o un 78% de la resistencia de los cúbitos de control intactos y un 99% de los defectos segmentarios anteriormente ensayados tratados con el dispositivo de OP-1 estándar. La carga de rotura media para los sitios de OP-1 de dosis baja era de $28,72 \pm 14,71$ N ($n=4$). Esto representaba un 44% de la resistencia a la torsión de cúbitos de control intactos anteriormente ensayados y un 56% de defectos segmentarios anteriormente ensayados tratados con el dispositivo de OP-1 estándar.

ES 2 273 412 T3

Inesperadamente, los test t apareados de la carga de rotura en animales demostraron un efecto significativo para el tipo de implante cuando se compararon dispositivos estándar de OP-1 de dosis baja con dispositivos de OP-1/CMC de dosis baja ($p=0,0597$). La carga media apareada para sitios OP-1 de dosis baja era de $28,72 \pm 14,71$ (4). La carga de rotura media apareada para los sitios de OP-1/CMC de dosis baja era de $62,89 \pm 18,47$ (4). No se encontró una diferencia significativa en los test t apareados de carga de rotura media de dispositivos de OP-1 estándar comparada con la carga de rotura media de dispositivo de OP-1/CMC de dosis estándar.

TABLA 7

Resultados de ensayo mecánico

Número de animal	Lado	Tipo de implante	Carga de rotura	Momento (N.m)	% de controles intactos (%)	Angulación (°)	Energía absorbida hasta rotura (N.m/grados)
H19	Derecho	LOP	35,17	2,11	53,88	36,74	53,93
H21	Derecho	LOP	9,76	0,59	14,95	66,64	16,96
H24	Derecho	LOP					
H26	Derecho	LOP	25,75	1,55	39,45	41,33	44,42
H30	Derecho	LOP					
H34	Derecho	LOP	44,18	2,65	67,69	25,35	41,51
		MEDIA	28,72	1,72	43,99	42,52	39,21
		DESVIACIÓN TÍPICA	14,71	0,88	22,53	17,43	15,75
		TAMAÑO DE MUESTRA	4	4	4	4	4
H19	Izquierdo	LOPCMC	39,76	2,39	60,92	37,13	55,84
H21	Izquierdo	LOPCMC	57,51	3,45	88,11	52,47	59,47
H24	Izquierdo	LOPCMC	1,74	0,10	2,67	5,54	0,34
H26	Izquierdo	LOPCMC	82,33	4,94	126,14	37,85	120,58
H30	Izquierdo	LOPCMC	*	*	*	*	
H34	Izquierdo	LOPCMC	71,94	4,32	110,22	42,47	127,67
		MEDIA	50,66	3,04	77,61	35,09	72,78
		DESVIACIÓN TÍPICA	31,68	1,90	48,54	17,62	52,46
		TAMAÑO DE MUESTRA	5	5	5	5	5

* Muestra no ensayada

ES 2 273 412 T3

TABLA 8

Resultados de ensayo mecánico

Número de animal	Lado	Tipo de implante	Carga de rotura	Momento (N.m)	% de controles intactos (%)	Angulación (°)	Energía absorbida hasta rotura (N.m/grados)
H22	Derecho	OP	65,44	3,93	100,26	52,95	139,25
H23	Derecho	OP	2,73	0,16	4,18	15,90	8,91
H25	Derecho	OP	52,78	3,17	80,86	31,36	70,65
H28	Derecho	OP	27,24	1,63	41,73	53,04	49,49
H32	Derecho	OP	79,69	4,78	122,08	19,33	57,83
H33	Derecho	OP	107,14	6,43	164,15	29,3	98,59
MEDIA			55,84	3,35	85,54	33,65	70,79
DESVIACIÓN TÍPICA			37,26	2,24	57,08	16,08	44,52
TAMAÑO DE MUESTRA			6	6	6	6	6
H22	Izquierdo	OPCMC	76,52	4,59	117,24	44,86	150,86
H23	Izquierdo	OPCMC	6,53	0,39	10,10	68,10	10,66
H25	Izquierdo	OPCMC	50,22	3,01	76,94	43,94	69,48
H28	Izquierdo	OPCMC	100,44	6,03	153,88	40,9	177,13
H32	Izquierdo	OPCMC	43,82	2,63	67,14	40,2	70,58
H33	Izquierdo	OPCMC	93,93	5,64	143,91	43,96	156,09
MEDIA			61,91	3,71	94,85	46,99	105,80
DESVIACIÓN TÍPICA			33,37	2,12	54,19	10,51	65,21
TAMAÑO DE MUESTRA			6	6	6	5	6

Histología

Inesperadamente, los sitios tratados con el dispositivo de OP-1/CMC de dosis estándar consiguieron la mejor puntuación histológica media, 12,08/16,0 puntos. Los sitios de OP-1/CMC de dosis bajas consiguieron una puntuación de 11,07/16,0, ligeramente mayor que la puntuación histológica media para los sitios de dispositivos de OP-1 estándar, 10,88/16,0. La graduación histológica media para los sitios de OP-1 de dosis baja era de 9,58/16,0 puntos.

El análisis estadístico de las graduaciones histológicas medias por grupo de tratamiento demostró un efecto significativo para el tipo de implante (análisis de varianza de un factor de Kruskal-Wallis, $p=0,0282$). Comparaciones múltiples de medias de grupo demostraron que la graduación total media para los sitios de OP-1/CMC de dosis estándar era significativamente mayor que en los sitios de OP-1 de dosis baja sin CMC ($\alpha=0,05$).

El análisis estadístico de la graduación de la calidad de unión demostró también un efecto significativo para el tipo de implante. Inesperadamente, la calidad media de graduación de unión para los sitios de OP-1/CMC de dosis estándar (3,5/4,0) era de nuevo significativamente mayor que en los sitios de OP-1 de dosis baja (2,6/4,0 a $\alpha=0,05$). No se encontraron diferencias significativas para el tipo de implante cuando se compararon graduaciones medias para desarrollo de corteza, implante residual y respuesta inflamatoria.

Sitios de OP-1 de dosis baja sin CMC

5 Era manifiesta la formación de hueso nuevo en todos los defectos tratados con OP-1 de dosis baja, pero la cantidad de hueso nuevo en el defecto a menudo no rellenaba el defecto y no era continua con los extremos del hueso del hospedador. En un sitio, el defecto se unía histológicamente de forma completa. El hueso nuevo estaba en las etapas tempranas de organización y remodelación. Eran también evidentes algunas zonas de hueso recién mineralizado.

Sitios de OP-1/CMC de dosis baja

10 Los sitios de OP-1/CMC de dosis baja tenían una apariencia histológica similar comparados con los sitios de OP-1 de dosis baja. Sin embargo, e inesperadamente, el hueso nuevo era continuo con el hueso del hospedador más frecuentemente en los sitios de OP-1/CMC de dosis baja comparados con los sitios de OP-1 de dosis baja. En casos en que el hueso era continuo con el hueso del hospedador, eran manifiestas remodelación temprana y densificación de los bordes del hueso nuevo. En casos en que la curación de hueso nuevo no era completa, eran manifiestas zonas de hueso recién mineralizado, así como zonas de tejidos fibrosos en el defecto. En general, el hueso nuevo no estaba bien contenido. Se observaron algunas zonas de remodelación avanzada a lo largo de los bordes del defecto.

Sitios de dispositivo de OP-1 estándar

20 La formación extensa de hueso nuevo formaba puente en todos los defectos. Había ocurrido la densificación temprana de los bordes de hueso nuevo. En algunos casos, las zonas de hueso recién mineralizado se unían a zonas de hueso maduro. En el centro de los defectos, estaban presentes ocasionales zonas pequeñas de material vehículo residual. No se observó respuesta inflamatoria. El hueso nuevo se extendía en los tejidos blandos. La remodelación estaba más avanzada en los bordes de defecto/hueso nuevo. El hueso se había remodelado a una estructura lamelar en estas zonas.

Sitios de OP-1/CMC de dosis estándar

30 No había diferencias marcadas en la apariencia histológica entre los sitios de OP-1 estándar y los sitios de OP-1/CMC de dosis estándar. El hueso nuevo extenso cubría y rellenaba los defectos. La remodelación más extensa ocurría en los bordes de hueso nuevo/hueso del hospedador. El hueso remodelado tenía una estructura lamelar en estas zonas. Era evidente la densificación de nuevas cortezas, pero aún incompleta. Se observaron ocasionales cantidades pequeñas de material vehículo residual atrapado circundadas por la formación de hueso nuevo. No había respuesta inflamatoria asociada.

Conclusión

40 Los dispositivos osteogénicos mejorados indujeron inesperadamente volúmenes más tempranos y más grandes de formación de hueso nuevo a dosis bajas de OP-1 que los inducidos por dispositivos estándar a dosis bajas de OP-1. Además, e inesperadamente, los sitios de defecto tratados con dispositivos osteogénicos mejorados consiguieron la carga de rotura por torsión media mayor a las 12 semanas después de la operación. Histológicamente, los dispositivos mejorados consiguieron inesperadamente la mayor puntuación media y demostraron más frecuentemente hueso nuevo continuo con hueso de hospedador.

45 B. *Reparación de defectos segmentarios de tamaño no crítico utilizando dispositivos osteogénicos mejorados que contienen carboximetilcelulosa*

1. Experimento 1: Curso cronológico de reparación de defecto cerrado tratado con un dispositivo unitario (perros)

50 Se realizó este estudio de hueso de tamaño no crítico para evaluar las configuraciones inyectables de dispositivos osteogénicos mejorados. El diseño de estudio utilizó un hueso de 3 mm en el modelo de 4 semanas. El estudio evaluó la curación del defecto después de la inyección de la configuración de OP-1/CMC/matriz de colágeno. La pata contralateral de cada animal era un control. Además, se evaluó un curso cronológico de curación para un defecto no tratado a las 4, 8 y 12 semanas.

55 Los detalles del protocolo utilizado se resumen a continuación.

Sistema de ensayo

60 Se utilizaron perros mestizos macho (18) criados a propósito en este estudio debido a su tamaño anatómico y características de reparación y remodelación óseas conocidas. Los animales eran de aproximadamente 2 a 4 años de edad al inicio del estudio y pesaban 20 a 30 kg (aproximadamente). Se examinaron radiográficamente los animales para asegurar un tamaño apropiado, madurez esquelética y que no existiera ninguna anomalía ósea obvia.

65 *Descripción del material de ensayo*

Se ensayaron formulaciones osteogénicas mejoradas que comprenden proteína osteogénica 1 humana recombinante (rhOP-1) en una matriz de colágeno mezclada con CMC. Los controles consistían en dispositivo ficticio solo.

ES 2 273 412 T3

Formulación 1: 0,350 mg de rhOP-1 en 100 μ l de gel fr CMC (al 7%) sin matriz de colágeno

Formulación 2: 0,350 mg de rhOP-1 en 100 μ l de tampón acetato/lactosa

5 Formulación 3: 0,350 mg de rhOP-1 en 170 μ l de matriz de colágeno-CMC humedecida con solución salina

Control 1: 0 mg de rhOP-1 en 100 μ l de gel

10 Control 2: 0 mg de rhOP-1 en 100 μ l de tampón acetato/lactosa

Control 3: 0 mg de rhOP-1 en 170 mg de matriz de colágeno-CMC humedecida con solución salina.

Diseño experimental

15 Se crearon defectos segmentarios bilaterales de cúbito de 3 mm en todos los animales. Nueve animales recibieron una de las tres formulaciones de ensayo experimentales en el defecto del lado derecho, de tal modo que se estudiaron tres sitios de cada tipo. El defecto derecho se implantó con dispositivo ficticio. Se sacrificaron estos animales a las 4 semanas después de la operación. Los restantes nueve animales recibieron defectos no implantados bilateralmente y se sacrificaron a periodos de 4, 8 y 12 semanas (tres en cada periodo de tiempo). Como se discute anteriormente, 20 se tomaron radiografías para estudiar la progresión de la curación. La determinación final de las fechas de sacrificio de los nueve animales que reciben formulaciones de rhOP-1 se basó en las radiografías semanales. En el sacrificio, se recuperaron todos los cúbitos en bloque y se ensayó mecánicamente la torsión. Se evaluaron en los segmentos mediante histología, como se describe anteriormente, la respuesta de tejido, y la calidad y cantidad de la formación de hueso nuevo, y la extensión de la curación.

25 Utilizando técnicas quirúrgicas estándar, se hizo una incisión lateral de aproximadamente 2 cm de longitud y se obtuvo la exposición del cúbito utilizando disección roma y aguda. Se creó el defecto de 3 mm en el cúbito medio derecho utilizando una sierra oscilante. Se mantuvo el radio para estabilidad mecánica, pero no se utilizó fijación interna ni externa. Se cerraron meticulosamente los tejidos blandos en capas alrededor del defecto. Se inyectó después 30 la muestra de rhOP-1 o dispositivo ficticio en el sitio como según el esquema de tratamiento. Se repitió después el procedimiento en el lado contralateral con la muestra apropiada.

Se obtuvieron semanalmente radiografías de los miembros anteriores hasta 6 semanas después de la operación y después cada 2 semanas hasta las 12 semanas en los animales supervivientes. Se obtuvo una radiografía de rayos 35 X adicional en los animales restantes en el sacrificio a las 12 semanas después de la operación. Se graduaron las radiografías por el investigador en una escala de graduación de 0 a 6, y se compararon con radiografías anteriores para apreciar la calidad y velocidad de la curación de defecto.

Procedimientos de ensayo

40 Como se discute anteriormente, se sacrificaron los animales en los momentos designados, y se recogieron inmediatamente el cúbito y el radio en bloque. Se macrofotografiaron ambos cúbitos y se tomaron radiografías de contacto. Se separaron meticulosamente por disección los tejidos blandos del sitio de defecto. Se utilizó una sierra enfriada con agua para cortar el cúbito a una longitud uniforme de 9 cm con el sitio de defecto centrado en la mitad de la muestra 45 de ensayo. Inmediatamente después del seccionamiento, se ensayó en la muestra la torsión de rotura en una máquina de ensayo hidráulica de bucle cerrado MTS (Minneapolis, MN) como se describe anteriormente.

Se prepararon tanto las muestras ensayadas como no ensayadas para evaluación histológica como ya se ha descrito anteriormente. Después de la microrradiografía, se rectificaron adicionalmente las secciones hasta aproximadamen- 50 te 50 μ m y se tiñeron con fuchsina básica y azul de toluidina para la evaluación histológica de los parámetros de reparación, incluyendo: la calidad de la unión, la apariencia y calidad del hueso cortical y reticular, y la respuesta inflamatoria.

55 Se evaluaron las estadísticas descriptivas de ensayo mecánico, graduación radiográfica e histología para caracterizar la curación.

Resultados

60 Se recogieron las siguientes observaciones y datos representativos hasta la fecha (4 semanas después de la operación):

Los resúmenes de ensayo mecánico aparecen en las Tablas 9, 10 y 11. La Tabla 11 es un resumen de los sujetos de control en experimentos previos no relacionados. Generalmente, y en conjunto, los resultados de este estudio indican que los animales tratados con OP-1 exhiben una curación acelerada. Los defectos tratados con OP-1 curaron 65 en un tercio a la mitad del tiempo que los controles no tratados. Adicional, e inesperadamente, la formación de CMC/OP-1/colágeno daba como resultado una mejor contención de hueso que la observada en ausencia de CMC. Estas observaciones se confirmaron mecánica, radiográfica e histológicamente.

ES 2 273 412 T3

Conclusión

Los dispositivos osteogénicos que contienen CMC (configuración inyectable) pueden utilizarse para reparar defectos segmentarios de cúbito de 3 mm de tamaño no crítico en un sitio de defecto cerrado.

TABLA 9

Evaluación de formulaciones de dispositivo mejorado de rhOP-1 para la reparación de defectos de tamaño no crítico

Número de animal	Lado	Periodo de tiempo	Implante	Carga de rotura máxima (N)	Mo- mento (N.m)	Porcen- taje de control intacto (%)	Angula- ción	Energía absorb. hasta rotura (N.m/ grados)
18750	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 1	49,37	2,96	75,65	35,72	63,57
18643	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 1	16,56	0,99	25,37	14,04	6,78
18043	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 1	33,32	2,00	51,05	43,62	54,56
		MEDIA		33,08	1,99	50,69	31,13	41,64
		DESVIACIÓN TÍPICA		16,41	0,98	25,14	15,32	30,52
		TAMAÑO DE MUESTRA		3	3	3	3	3
17884*	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 2	32,47	1,95	49,75	50,11	55,91
18473	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 2	43,83	2,63	67,15	37,53	51,77
	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 2	10,79	0,65	16	20,78	5,94
		MEDIA		20,03	1,74	44,48	36,14	37,87
		DESVIACIÓN TÍPICA		16,79	1,01	25,72	14,71	27,73
		TAMAÑO DE MUESTRA		3	3	3	3	3
18772	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 3	42,64	2,56	65,33	55,06	55,74
18640	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 3	20,95	1,26	32,10	24,77	14,62
18508	Derecho	4 semanas	FORMULA- CIÓN 3	7,24	0,43	11,09	17,08	3,04
		MEDIA		23,61	1,42	36,17	32,30	24,47
		DESVIACIÓN TÍPICA		17,85	1,07	27,35	20,08	27,70
		TAMAÑO DE MUESTRA		3	3	3	3	3

*Cálculos basados en los datos brutos a partir del registro de ensayo mecánico

ES 2 273 412 T3

TABLA 10

Evaluación de formulaciones de dispositivo mejorado de rhOP-I para la reparación de defectos de tamaño no crítico

Resultados de ensayo mecánico

Número de animal	Lado	Periodo de tiempo	Implante	Carga de rotura máxima (N)	Mo- mento (N.m)	Porcen- taje de control intacto (%)	Angu- lación	Energía absorb. hasta rotura (N.m/ grados)
18750	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 1	12,81	0,77	19,63	33,26	14,06
18643	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 1	11,00	8,00	16,85	59,35	16,83
18043	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 1	4,14	0,25	6,34	7,46	0,70
		MEDIA		9,32	3,01	14,27	33,36	10,53
		DESVIACIÓN TÍPICA		4,57	4,33	7,01	25,95	8,62
		TAMAÑO DE MUESTRA		3	3	3	3	3
17884*	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 2	4,82	0,29	7,38	11,12	0,73
18473	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 2	4,53	0,27	6,94	30,63	2,50
	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 2	7,52	0,45	11,52	33,29	8,59
		MEDIA		5,62	0,34	8,62	24,91	3,94
		DESVIACIÓN TÍPICA		1,65	0,10	2,53	12,03	4,12
		TAMAÑO DE MUESTRA		3	3	3	3	3
18772	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 3	15,41	0,92	23,61	49,91	15,40
18640	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 3	10,28	0,62	15,75	40,50	11,23
18508	Izquierdo	4 semanas	CONTROL 3	4,32	0,26	6,62	4,89	0,41
		MEDIA		10,00	0,60	15,33	31,77	9,01
		DESVIACIÓN TÍPICA		5,55	0,33	8,50	23,75	7,74
		TAMAÑO DE MUESTRA		3	3	3	3	3

*cálculos basados en los datos brutos del registro de ensayo mecánico

ES 2 273 412 T3

TABLA 11

*Evaluación de formulaciones de dispositivo mejorado de rhOP-1 para reparación de defectos de tamaño no crítico-
controles no relacionados*

Resultados de ensayo mecánico

	Número de animal	Lado	Periodo de tiempo	Implante	Carga de rotura máxima (N)	Momento (N.m)	Porcentaje de control intacto (%)	Angulación	Energía absorb. hasta rotura (N.m/grados)
10									
15	17932	Derecho	8 semanas	Control no relac.	35,40	2,12	54,24	61,58	34,63
20	18926	Derecho	8 semanas	Control no relac.	6,20	0,37	9,50	59,65	6,96
25	18754	Derecho	8 semanas	Control no relac.	25,68	1,54	39,34	33,53	27,87
30	17932	Izquierdo	8 semanas	Control no relac.	29,14	1,54	39,34	33,53	27,87
35	18926	Izquierdo	8 semanas	Control no relac.	5,67	0,34	8,69	47,20	6,20
40	18754	Izquierdo	8 semanas	Control no relac.	12,23	0,73	18,74	39,43	15,10
45									
			MEDIA		19,05	1,14	29,19	44,64	18,43
			DESVIACIÓN TÍPICA		12,68	0,76	19,42	14,14	11,36
			TAMAÑO DE MUESTRA		6	6	6	6	6

2. Experimento 2: reparación acelerada de un defecto de fractura cerrada como se trata con un dispositivo unitario (perros)

El siguiente es un estudio experimental comparativo de la eficacia de formulaciones de rhOP-1 que contienen CMC inyectables para acelerar la curación de fractura en perros.

Sistema de ensayo

Se utilizaron perros mestizos macho adultos criados a propósito en este estudio. Se prestó especial atención a seleccionar animales de tamaño y peso uniformes para limitar la variabilidad de la geometría y carga óseas. Se examinaron clínica y radiográficamente los animales para excluir afecciones médicas agudas y crónicas durante un periodo de cuarentena de dos semanas.

Utilizando técnicas asépticas estándar, se realizó cirugía bajo anestesia con gas isoflurano y se monitorizó mediante electrocardiograma y monitores de ritmo cardíaco. Se administró la medicación prequirúrgica aproximadamente 20-30 minutos antes de la inducción de anestesia. La medicación prequirúrgica consistía en atropina (dosificación 0,044 mg/kg de peso corporal) y acepromizina (dosificación de 0,22 mg/kg de peso corporal). Se administró la anestesia mediante inyección intravenosa de pentotal de sodio a la dosificación de 11,04 mg/kg de peso corporal. Después de la inducción, se dispuso un tubo endotraqueal y se mantuvo la anestesia mediante inhalación de isoflurano. Se prepararon ambos miembros anteriores y cubrieron de modo estéril. Se hizo una incisión lateral de aproximadamente 2 cm de longitud y se obtuvo la exposición del cúbito utilizando disección roma y aguda. Se creó el defecto de tamaño no críti-

co de 3,0 mm en el cúbito medio utilizando una sierra oscilante. Se mantuvo el radio para estabilidad mecánica, y no se utilizó fijación interna ni externa. Se irrigó el sitio con solución salina y se cerraron meticulosamente los tejidos blandos en capas alrededor del defecto. Se inyectó el dispositivo de implante apropiado en el sitio de defecto como según el esquema de tratamiento. Se repitió después el procedimiento en el lado contralateral con el implante apropiado.

Se administraron acepromizina ($0,75 \text{ cm}^3/22,65 \text{ kg}$ de peso corporal) y tartrato de butorfanol ($0,055 \text{ mg/kg}$ de peso corporal) según fuera necesario después de la operación. Se administraron antibióticos por vía intramuscular a los animales durante cuatro días después de la cirugía, y se tomaron radiografías anteroposteriores rutinarias inmediatamente después de la cirugía para asegurar una colocación quirúrgica apropiada. Se mantuvieron los animales en jaulas de recuperación de $91,44 \times 121,92 \text{ cm}$ hasta que se demostró que soportaban su peso, después de lo cual se transfirieron a carreras y movimiento no restringido permitidos.

Se obtuvieron semanalmente radiografías de los miembros anteriores hasta las 4 semanas, y después cada dos semanas hasta las 16 semanas en los animales supervivientes utilizando tiempos e intensidades de exposición estandarizados. Se evaluaron las radiografías y se compararon con radiografías anteriores para apreciar la calidad y velocidad de curación del defecto. Se evaluaron los cambios en la apariencia radiográfica basándose en la presencia y densidad de formación de hueso nuevo; la extensión de la formación de puente en el defecto y la incorporación de las cortezas de hueso del hospedador.

Descripción del material de ensayo

Los materiales de implante consistían en proteína osteogénica 1 humana recombinante (rhOP-1) en una formulación de tampón acetato y rhOP-1 en CMC-colágeno. Se compararon las formulaciones de rhOP-1 con controles de sólo vehículo. La formulación de rhOP-1 en tampón acetato consistía en OP-1 $3,5 \text{ mg/ml}$ en un tampón lactosa/acetato suministrado en un volumen de $100 \mu\text{l}$. El control de vehículo consistía en un volumen de $100 \mu\text{l}$ de tampón lactosa/acetato. La formulación de rhOP-1/CMC-colágeno consistía en $0,35 \text{ mg}$ de rhOP-1 en 170 mg de matriz de CMC-colágeno humedecida con aproximadamente $0,43 \text{ ml}$ de solución salina, y tenía la consistencia de una pasta. La CMC-colágeno de control consistía en 170 mg de matriz de CMC-colágeno humedecida con aproximadamente $0,43 \text{ ml}$ de solución salina, y se suministró también en un volumen inyectable de $100 \mu\text{l}$.

Diseño experimental

Se utilizaron un total de 36 perros mestizos adultos. Se crearon defectos segmentarios bilaterales de cúbito de $3,0 \text{ mm}$ de longitud en todos los animales. Catorce animales recibieron una inyección de formulación de $0,35 \text{ mg}$ de rhOP-1/tampón acetato en un defecto y el tampón acetato sin rhOP-1 en el defecto contralateral. Nueve animales recibieron una inyección de $3,5 \text{ mg}$ de formulación de rhOP-1/CMC-colágeno en un defecto y CMC-colágeno solo en el defecto contralateral. Se sacrificaron los 23 animales a periodos de 4, 8 y 12 semanas después de la operación. Trece perros recibieron defectos bilaterales sin implante (sólo defecto) y se evaluaron en periodos de 4, 8, 12 y 16 semanas después de la operación.

Procedimientos de ensayo

Al final del periodo de ensayo, se sacrificaron los animales utilizando una sobredosis de barbiturato intravenoso. Se recogieron inmediatamente el cúbito y el radio en bloque y se dispusieron en gasas empapadas de solución salina. Se macrofotografiaron ambos cúbitos y se tomaron radiografías de contacto antes de separar cuidadosamente por disección los tejidos blandos del sitio de defecto. Se utilizó después una sierra enfriada con agua para cortar el cúbito a una longitud uniforme de 9 cm con el defecto centrado en la mitad de la muestra de ensayo para evaluación de ensayo biomecánico.

Si la curación del defecto era suficiente basándose en manipulación manual, se ensayó en las muestras la torsión de rotura en una máquina de ensayo hidráulica de bucle cerrado MTS (Minneapolis, MN) operada por control de impactos a una velocidad de desplazamiento constante de 50 mm/min . Se montó cada extremo del segmento óseo en un manguito de aluminio cilíndrico y se cementó con metacrilato de metilo. Se fijó rígidamente un extremo y se giró el otro en sentido contrario a las agujas del reloj. Puesto que el cúbito de perro tiene una ligera curvatura, se montaron las muestras excéntricamente para mantener la rotación de la muestra coaxial con la del dispositivo de ensayo. Se aplicó la fuerza de torsión con un brazo de palanca de 6 cm . Se generaron curvas de fuerza-desplazamiento angular, a partir de las cuales se obtuvieron el momento y la deformación angular de rotura, y se calculó la absorción de energía hasta rotura como el área bajo la curva de carga-desplazamiento.

Se prepararon tanto las muestras ensayadas como no ensayadas para evaluación histológica. Se fijaron las muestras individuales mediante inmersión en solución de formalina tamponada al 10% inmediatamente después del ensayo mecánico o después de seccionar en las muestras no ensayadas. Con una sierra de diamante enfriada con agua, se dividieron las muestras biseccionando la muestra a lo largo de su eje largo. Este procedimiento daba como resultado dos porciones de cada muestra para preparaciones histológicas, incluyendo seccionamiento rectificado no descalcificado y seccionamiento de microtomo no descalcificado. Se evaluaron en las secciones histológicas la calidad de unión, la apariencia y la calidad del hueso cortical y reticular, y la remodelación ósea.

*Resultados**Observaciones macroscópicas*

5 Todos los defectos tratados con rhOP-1 tenían formación de hueso nuevo tan tempranamente como 4 semanas después de la operación. Todos los defectos tratados eran manualmente estables y con puente formado con hueso nuevo sólido, que empezaba a remodelarse entre las semanas 8 y 12 después de la operación. En algunos defectos, el hueso nuevo se extendía más allá de los extremos del defecto y en los tejidos blandos superpuestos circundantes de los defectos.

10 La mayoría de los defectos de control no eran completamente estables tras manipulación manual a las 4 semanas después de la operación, aunque la mayoría se ensayaron mecánicamente. A menudo, estaba presente tejido fibroso y los extremos del defecto permanecían visibles con algunos signos de hueso nuevo. A las 12 semanas después de la operación, la mayoría de los defectos de control eran estables, con sólo un ligero movimiento ocasional de los extremos del defecto.

15 *Evaluación radiográfica*

En los defectos tratados con rhOP-1, se observaron trazas de hueso nuevo a las 2 semanas después de la operación dentro y alrededor de los sitios de defecto. La cantidad y densidad de hueso nuevo aumentaron de 2 a 4 semanas, con las cortezas de hueso del hospedador empezando a oscurecerse. Entre las 4 y 8 semanas después de la operación, los defectos tratados con rhOP-1 tenían cantidades significativas de hueso nuevo radiodenso y formación de puente lateral del defecto. A las 12 semanas, las cortezas del hospedador estaban oscurecidas con enlaces de puente radiodensos.

La apariencia radiográfica de los defectos de control tratados y no tratados era significativamente diferente de la apariencia de los defectos tratados con rhOP-1. Entre las 2 y 3 semanas después de la operación, no había cambios significativos en las apariencias radiográficas comparadas con las apariencias después de la operación. A las 4 semanas, eran visibles débiles cambios en la radiodensidad de los extremos del defecto de hueso del hospedador. De 8 a 12 semanas, se extendía algo de hueso desde las regiones periostiales y los extremos de hueso del hospedador, aunque la formación de puente no era completa. A las 16 semanas después de la operación, sólo la mitad de los controles no tratados mostraban signos radiográficos de curación completa del defecto de hueso.

Ensayo mecánico

Se resumen los resultados de ensayo mecánico medio por grupo de tratamiento y periodo de tiempo en las Tablas 11A y 11B. Las resistencias a la torsión de los defectos tratados con rhOP-1 eran significativamente mayores que en los controles no tratados y controles de sólo vehículo, y se aproximaban a la resistencia de los cúbitos intactos anteriormente ensayados. La resistencia mecánica de los defectos de formulación de rhOP-1/tampón acetato era un 59% de la resistencia del cúbito intacto a las 4 semanas después de la operación, un 77% a las 8 semanas después de la operación, y un 98% a las 12 semanas después de la operación. La resistencia mecánica de los defectos de rhOP-1/CMC-colágeno era un 36%, 53% y 66% de la resistencia intacta a las 4 semanas, 8 semanas y 12 semanas, respectivamente.

Mecánicamente, los sitios de defecto de control tenían poca estabilidad mecánica en los periodos de tiempo tempranos, aunque la resistencia del defecto mejoraba con el tiempo. La resistencia mecánica de defectos que reciben la solución de tampón acetato control estaba entre un 23% y un 30% de los defectos tratados con rhOP-1/tampón acetato a periodos de tiempo equivalentes. Los defectos de control tenían una resistencia mecánica equivalente a un 16% de la resistencia de cúbitos intactos a las 4 semanas después de la operación, un 18% a las 8 semanas, y un 29% a las 12 semanas. Los defectos de sólo CMC-colágeno eran similares en resistencia mecánica a los defectos de tampón acetato de control. La resistencia mecánica de defectos no tratados aumentó de un 9% a las 4 semanas a un 70% a las 12 semanas después de la operación. La resistencia mecánica media a las 16 semanas después de la operación se redujo a un 28%, que era similar a la resistencia a las 8 semanas de un 29%.

TABLA 11A

55

Resultados de ensayo mecánico $\pm$ desviación típica (n)						
Implante	Semanas	Carga de rotura máxima (N)	Momento (N.m)	Porcentaje de control intacto (%)	Angulación (grados)	Energía absorb. hasta rotura (N.m/grados)
rhOP-1/tampón acetato	4 semanas	38,46 $\pm$ 17,3 (8)	2,31 $\pm$ 1,0 (8)	58,92 $\pm$ 26,5 (8)	25,18 $\pm$ 16,2 (8)	35,71 $\pm$ 39,3 (8)
rhOP-1/tampón acetato	8 semanas	50,57 $\pm$ 23,0 (3)	3,03 $\pm$ 1,4 (3)	77,48 $\pm$ 35,3 (3)	39,56 $\pm$ 14,6 (3)	70,51 $\pm$ 38,0 (3)

65

ES 2 273 412 T3

rhOP-1/ tampón acetato	12 semanas	63,70 ± 22,1 (3)	3,82 ± 1,3 (3)	97,60 ± 33,8 (3)	18,79 ± 2,4 (3)	40,40 ± 7,2 (3)
Tampón acetato sólo	4 semanas	10,72 ± 6,4 (8)	0,64 ± 0,4 (8)	16,42 ± 9,7 (8)	23,85 ± 22,3 (8)	5,46 ± 7,9 (8)
Tampón acetato sólo	X semanas	11,47 ± 9,4 (3)	0,69 ± 0,6 (3)	17,57 ± 14,5 (3)	39,38 ± 32,4 (3)	11,83 ± 10,2 (3)
Tampón acetato sólo	12 semanas	18,91 ± 29,9 (3)	1,13 ± 1,8 (3)	28,97 ± 45,9 (3)	35,72 ± 11,4 (3)	43,69 ± 72,7 (3)
rhOP-1/CMC- colágeno	4 semanas	23,61 ± 17,9 (3)	1,42 ± 1,1 (3)	36,17 ± 27,4 (3)	32,30 ± 20,1 (3)	24,47 ± 27,7 (3)
rhOP-1/CMC- colágeno	8 semanas	34,33 ± 22,6 (3)	2,06 ± 1,4 (3)	52,60 ± 34,6 (3)	42,76 ± 20,2 (3)	37,08 ± 14,4 (3)
rhOP-1/CMC- colágeno	12 semanas	43,39 ± 22,3 (3)	2,60 ± 1,3 (3)	66,47 ± 34,2 (3)	32,07 ± 10,1 (3)	47,65 ± 21,8 (3)
CMC- colágeno sólo	4 semanas	10,00 ± 5,55 (3)	0,60 ± 0,3 (3)	15,33 ± 8,5 (3)	31,77 ± 23,8 (3)	9,01 ± 7,7 (3)
CMC- colágeno sólo	8 semanas	4,45 ± 4,0 (3)	0,27 ± 0,2 (3)	6,81 ± 6,2 (3)	31,90 ± 25,6 (3)	5,09 ± 6,3 (3)
CMC- colágeno sólo	12 semanas	18,82 ± 8,6 (3)	1,13 ± 0,5 (3)	28,84 ± 13,2 (3)	43,87 ± 11,0 (3)	23,55 ± 16,4 (3)
No tratado (5/8 ensayados)	4 semanas	6,04 ± 1,8 (5)	0,36 ± 0,1 (5)	9,25 ± 2,8 (5)	43,71 ± 12,3 (5)	6,00 ± 1,8 (5)
No tratado	8 semanas	19,05 ± 12,7 (8)	1,14 ± 0,8 (6)	29,19 ± 19,4 (6)	44,64 ± 14,1 (6)	18,43 ± 11,4 (6)
No tratado	12 semanas	45,91 ± 40,6 (6)	2,75 ± 2,4 (6)	70,34 ± 62,1 (6)	38,04 ± 17,8 (6)	38,26 ± 21,4 (6)
No tratado (5/6 ensayados)	16 semanas	18,55 ± 9,3 (5)	1,11 ± 0,56 (5)	28,43 ± 14,2 (5)	39,15 ± 8,3 (5)	20,19 ± 9,8 (5)

TABLA 11B

Resultados de ensayo mecánico en términos de porcentaje de resistencia de cúbito intacto, media $\pm$ desviación típica (n)				
Implante	4	8	12	16
	semanas	semanas	semanas	semanas
rhOP-1 en tampón acetato	59 $\pm$ 26 (8)	77 $\pm$ 35 (3)	98 $\pm$ 34 (3)	-
Tampón acetato sólo	16 $\pm$ 10 (8)	18 $\pm$ 15 (3)	29 $\pm$ 46 (3)	-
rhOP-1 en CMC-colágeno	36 $\pm$ 27 (3)	53 $\pm$ 35 (3)	66 $\pm$ 34 (3)	-
CMC-colágeno sólo	15 $\pm$ 9 (3)	7 $\pm$ 6 (3)	29 $\pm$ 13 (3)	-
No tratado	9 $\pm$ 3 (5)	29 $\pm$ 19 (6)	70 $\pm$ 62 (6)	28 $\pm$ 14 (5)

Evaluación histológica

La histología de los defectos de rhOP-1 y de control se correlacionaba bien con los resultados de ensayo macroscópico, radiográfico y mecánico. En los defectos tratados con rhOP-1, se observó formación de hueso nuevo proliferativo que cubría los defectos y, en algunos casos, se extendía en el tejido subcutáneo. Se formó hueso nuevo a partir de las regiones de cúbito endostiales y a partir del periostio cercano a las cortezas del defecto. La formación de puente con hueso nuevo se completó generalmente a las 8 semanas después de la operación, aunque estaban presentes zonas de cartílago de mineralización. Los defectos tenían puente y estaban rellenos con hueso tejido denso, y se observó la reorganización de las cortezas de hueso del hospedador a las 12 semanas.

Los defectos de control tratados y no tratados mostraban sólo signos de unión de tejido fibroso con pequeñas cantidades de hueso nuevo formado a lo largo del periostio de cúbito lateral o a partir de la región endostial a las 4 semanas después de la operación. A las 8 semanas, el fibrocartílago rellenaba los defectos de control con zonas de cartílago de mineralización presentes entre el crecimiento de hueso nuevo. Se formaron cantidades significativas de hueso nuevo en las cortezas de hueso del hospedador y se extendían a los defectos. Se oscurecieron las cortezas del defecto con formación de hueso nuevo denso y la curación endocondral era avanzada, aunque la unión no era completa. A las 16 semanas, se formaba puente en los nuevos defectos con algunos huecos de cartílago de mineralización presentes. Se extendía hueso nuevo a partir de las cortezas del hospedador y capas de tejido periostial adyacente a través del defecto.

Conclusión

Los resultados de este estudio demuestran que las proteínas osteogénicas inyectadas en defectos de tamaño no crítico pueden acelerar la reparación ósea. La inyección percutánea local de rhOP-1 en el defecto de tamaño no crítico en cúbito canino daba como resultado una formación de hueso nuevo periostial y endostial proliferativa, comparada con los defectos de control no tratados y tratados sólo con vehículo. Radiográficamente, la inyección de rhOP-1 daba como resultado calcificaciones difusas de hueso nuevo y la formación de callo de fractura temprana tan tempranamente como 2 a 3 semanas después de la operación, con formación significativa de puente e incorporación de las cortezas del hospedador a las 8 a 12 semanas después de la operación. La resistencia mecánica de los defectos de tamaño no crítico tratados con rhOP-1 se aproximaba a la resistencia de cúbito intacto a las 12 semanas y era de 2 a 3 veces la observada en la curación de defecto de control.

C. Reparación de defectos de fractura utilizando dispositivos osteogénicos mejorados que contienen carboximetilcelulosa

1. Experimento 1: Estudio de fractura de cabra utilizando dosis variables de OP-1 (sitio de defecto cerrado)

El siguiente es un estudio experimental aleatorizado comparativo de defectos de fractura de eje medio tibiales cerrados recientes (desplazados 5 mm) en cabras.

Elección del animal experimental

Está reconocido generalmente en la técnica que las cabras tienen una velocidad de curación ósea comparable a la de los seres humanos. Por tanto, los resultados de este estudio pueden extrapolarse a una situación clínica. Además, se aprecia por el experto en la técnica que los huesos de las cabras muestran similitud con los de los seres humanos respecto a tamaño, forma y carga mecánica.

Como se da a conocer y se describe en la presente memoria, se ha desarrollado un modelo animal para una fractura diafisaria cerrada. Este modelo promueve el estudio de la curación de fractura natural y acelerada, con o sin dispositivo de fijación de fractura interno, al permitir la creación de una fractura estándar reproducible del miembro posterior. Brevemente, en cabras totalmente anestesiadas se crea una fractura cerrada del eje medio de la tibia con la ayuda de un dispositivo de flexión de tres puntos. Después de reducción cerrada y desplazamiento de 5 mm de la fractura, se aplica una escayola externa. Debido a una reducción del hinchamiento del miembro posterior, se reemplaza la escayola cada dos semanas para mantener la estabilidad. Después de 2 semanas, los animales soportan su peso completo sobre el miembro fracturado, y después de 4-6 semanas, la fractura ha curado clínica y radiográficamente. Se retira la escayola después de 6 semanas.

Se adquieren los animales en Ruiters (Holanda), un especialista en la cría de cabras. Se utilizarán cabras lecheras hembra adultas criadas aleatorias. Para evitar la influencia de un esqueleto en desarrollo sobre los resultados, se utilizarán animales adultos. Los animales son esqueléticamente maduros, de 1 a 2 años de edad, y pesan aproximadamente 50 kg.

Procedimiento experimental

Como premedicación, se administran ketamina 10 mg/kg i.m. y atropina 1,5 mg i.m. (o equivalentes reconocidos en la técnica de las medicaciones anteriores) aproximadamente 15 minutos antes de anestesiarse totalmente los animales. Se consigue esto último con etomidatos (o equivalentes de los mismos reconocidos en la técnica) 0,3 mg/kg i.v. Después de la intubación, se mantiene la anestesia con una mezcla de O₂/N₂ (1:1, vol/vol) suplementada con 1 a 2% de isoflurano (o equivalente del mismo reconocido en la técnica).

Con un dispositivo de flexión de 3 puntos, se aplica un traumatismo en varo a la tibia izquierda hasta que se obtiene una fractura de eje medio cerrada. Se reduce después manualmente la fractura, y se afeita la piel sobre la zona de fractura. Se yoda el miembro posterior izquierdo entero con una solución desinfectante que contiene alcohol para la administración del dispositivo osteogénico cerrado mediante inyección y para secar la piel para la posterior inmovilización con escayola. Se inyecta el dispositivo osteogénico en el sitio de fractura en la cercanía del hueco de fractura, para maximizar el contacto con la cavidad medular. Por ejemplo, se inyecta por vía intramedular un dispositivo osteogénico con una aguja gruesa de aspiración de médula ósea. Después de la inyección, se aplica la inmovilización con escayola.

Diseño del estudio

Se dividen los animales en 5 grupos (I-V) de 3 animales y 1 grupo (VI) de 9 animales según el tratamiento: 0,5 mg de OP-1 en una configuración inyectable de dispositivo osteogénico que contiene al menos OP-1, matriz de colágeno y agente aglutinante tal como CMC, formulado como se describe anteriormente (directamente después de la creación de la fractura) (grupo I), 1,0 mg de OP-1 en un dispositivo inyectable que contiene al menos OP-1, colágeno y agente aglutinante tal como CMC (directamente después de la creación de la fractura) (grupo IV), 1,0 mg de OP-1 en una configuración estándar de dispositivo de OP-1 (correspondiente a 0,4 g de dispositivo de OP-1) inyectado directamente después de la creación de la fractura (grupo V) y sin tratamiento con OP-1 (grupo VI, controles). Los grupos de tratamiento se resumen del modo siguiente:

ES 2 273 412 T3

	Grupo	Tiempo de inyección (días)	Dispositivo	Cantidad de OP-1 (mg)	Número aproximado de animales
5	I	0	Inyectable	0,5	3
10	II	0	Inyectable	1,0	3
	III	3	Inyectable	1,0	3
	IV	0	Inyectable	1,0	3
15	V	0	Dispositivo	1,0	3
			estándar		
20	VI	Ninguno	Ninguno	0	9

Se sacrifican los animales 2, 4 y 6 semanas después de la creación de la fractura. En los grupos I a V, se sacrifica un animal en cada intervalo de tiempo y, en el grupo VI, se sacrifican tres animales en cada intervalo de tiempo. Al comparar los grupos tratados con los controles, puede determinarse el efecto acelerante del tratamiento sobre la curación de fractura. La información sobre el efecto de la dosis de OP-1 y el tiempo de inyección puede obtenerse mediante comparación del grupo I con el grupo II, respectivamente, y del grupo II con el grupo III. Las diferencias en eficacia entre las diferentes configuraciones se valoran evaluando los resultados de los grupos II, IV y V.

En otros experimentos relacionados, las dosis de proteína osteogénica tal como OP-1 estarán en el intervalo de aproximadamente 0,125 a 10,0 mg. Ciertas otras configuraciones de dispositivos osteogénicos mejorados contendrán cantidades variables de agente aglutinante tal como CMC en el intervalo de menos de 200 mg de CMC/1.000 mg de matriz de colágeno a más de 200 mg de CMC/1.000 mg de matriz de colágeno. Los volúmenes de agente humectante variarán como se describe anteriormente para conseguir la consistencia/configuración deseada del dispositivo osteogénico. En aún otros experimentos relacionados, se utilizarán otros agentes aglutinantes tales como cola de fibrina y/u otras matrices tales como β -TCP.

Evaluación de la reparación de defecto

Radiografía

Se realizan las radiografías con rayos X siguiendo un procedimiento estandarizado que representa el sitio de fractura en dos direcciones, anteroposterior y mediolateral. Las primeras radiografías se toman inmediatamente después de la creación de la fractura y, después de ello, cada dos semanas hasta el sacrificio de los animales. Las radiografías en el momento del sacrificio se realizan después de retirar el material de escayolado; todas las demás se realizan con el material de escayolado *in situ*. Se juzgan cualitativamente por dos radiólogos o cirujanos a ciegas y, si es posible, se aplica la siguiente escala de graduación para evaluar el proceso de curación:

Graduación 0: sin diferencia comparado con directamente después de la creación de la fractura.

Graduación 1: cantidad pequeña de callo.

Graduación 2: cantidad moderada de callo.

Graduación 3: cantidad grande de callo.

Grado 4: Desdibujamiento de los extremos de fractura.

Se presta especial atención al tipo de fractura y alineamiento.

Tomografía computerizada

Después de la retirada del miembro posterior izquierdo del material de escayolado, y después de realizar las radiografías, se hace un escáner por TC de la zona de fractura. Los tejidos blandos deben permanecer *in situ* para una mejora calidad de los escáneres. Pueden hacerse visibles de este modo los restos del hueso de fractura y callo. Además, puede calcularse la cantidad de callo. Puede obtenerse información más detallada sobre la progresión del proceso de curación con escáneres por TC que con simples radiografías.

Ensayo biomecánico

Después del escáner por TC y posterior retirada de los tejidos blandos de la tibia, se realizan las investigaciones biomecánicas. Se desarrolla un método para ensayo mecánico avanzado del siguiente modo: se mide la rigidez de flexión en 24 direcciones a incrementos angulares de 15° y se representa como un vector en un sistema de coordenadas X-Y, mediante el que se obtiene una elipse. Se compara la elipse con la de la tibia intacta contralateral. Pueden derivarse parámetros de esta comparación que sirven como medidas de la eficiencia de curación. Finalmente, se realiza un ensayo de rotura por torsión y se expresan resistencia a la torsión, rigidez de torsión, desplazamiento angular y absorción de energía hasta rotura medidos como un porcentaje de la tibia sana contralateral. Esta comparación con la tibia contralateral se hace para reducir la variación interindividual.

Histología

Después del ensayo biomecánico, se mantienen juntos los fragmentos óseos con anillos especiales para examen histológico. Se utilizan técnicas estándar de fijación, imbibición y tinción para hueso y cartílago. Se presta especial atención a señales de unión fibrosa, osteocondral u ósea. Se aplica un sistema de puntuación histológica para cuantificar la cantidad de tejido fibroso, cartílago, hueso recién formado y médula ósea en el hueso de fractura.

Resultados experimentales

Se espera que los datos mecánicos, radiográficos, tomográficos e histológicos indicarán que las configuraciones inyectables de dispositivos osteogénicos mejorados pueden inducir una reparación acelerada de defectos de fractura de sitios cerrados.

Conclusión

Los dispositivos osteogénicos mejorados (configuración inyectable) pueden utilizarse para reparar defectos de fractura de eje medio tibial recientes (desplazados 5 mm) en un sitio de defecto cerrado.

2. Experimento 2: Estudio de fractura de cabra utilizando dosis variables de OP-1 a tiempos variables (sitio de defecto cerrado)

Este estudio independiente utiliza también cabras como modelo animal para estudiar la reparación de defectos de fractura utilizando dispositivos osteogénicos mejorados. Utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, se tratan fracturas diafisarias cerradas recientes (la mayoría transversales y oblicuas simples) con reducción con fijación externa y desplazamiento de 5 mm utilizando dispositivos osteogénicos que contienen CMC.

El diseño del estudio es el siguiente:

Grupo	Tratamiento	Nº de cabras
I	Sin inyección	10
II	CMC + colágeno solo mediante inyección	10
III	CMC + colágeno + OP-1 (2,5 mg de OP-1/1.000 mg de colágeno) mediante inyección	10
IV	CMC + colágeno + OP-1 (dosificación semimáxima de 1,25 mg de OP-1/1.000 mg de colágeno) mediante inyección	10

Se sacrifican 5 cabras en cada grupo a las 2 semanas después del tratamiento y se sacrifican 5 cabras en cada grupo a las 4 semanas después del tratamiento.

Otros estudios relacionados investigan la reparación de defectos de fractura en puntos temporales mayores de 4 semanas, e investigan tanto dosificaciones menores como mayores de OP-1. Adicionalmente, se estudia la reparación de defectos de fractura utilizando cantidades totales diferentes (mg) del dispositivo de OP-1 que contiene CMC administrado al sitio de defecto. Un estudio utiliza un dispositivo de 400 mg de peso total administrado al sitio de defecto. Sin embargo, otros estudios relacionados utilizarán cualquiera de los agentes aglutinantes anteriormente citados tales como: cola de fibrina y/o cualquiera de las matrices anteriormente citadas tales como β -TCP.

Se evalúa la reparación de defecto utilizando una variedad de protocolos clínicos rutinarios, incluyendo radiografía, escáner por TC, ensayo biomecánico e histología, como se describe con más detalle anteriormente.

Resultados experimentales

Se espera que los datos mecánicos, radiográficos, tomográficos e histológicos indicarán que las configuraciones inyectables de dispositivos osteogénicos mejorados pueden inducir la reparación acelerada de defectos de fractura de sitio cerrado. También se prevé que, en ciertas realizaciones preferidas, dosis bajas de proteína osteogénica serán efectivas para inducir la reparación, especialmente en dispositivos osteogénicos mejorados.

Conclusión

Los dispositivos osteogénicos mejorados (configuración inyectable) pueden utilizarse para reparar fracturas diafisarias cerradas recientes (desplazadas 5 mm) en un sitio de defecto cerrado.

D. Reparación de defectos osteocondrales utilizando dispositivos osteogénicos mejorados que contienen carboximetilcelulosa

1. Experimento 1: Defectos osteocondrales de grosor completo (perros)

Se realizó un estudio utilizando el modelo de defecto de tapón osteocondral en perro para demostrar la eficacia de los dispositivos osteogénicos mejorados para reparar defectos osteocondrales/condrales. Se evaluaron cuatro formulaciones de implantes, incluyendo (1) dispositivo osteogénico estándar, que incluye rhOP-1 y matriz de colágeno, (2) dispositivo osteogénico mejorado, que incluye rhOP-1, matriz de colágeno y agente aglutinante carboximetilcelulosa (CMC), (3) sólo matriz de colágeno, o (4) matriz de colágeno y agente aglutinante CMC.

Brevemente, se crearon bilateralmente defectos de grosor completo de 5 mm de diámetro y que se extendían 6 mm en el hueso subcondral del cóndilo femoral medial de 4 perros mestizos adultos. Se eligieron perros mestizos macho adultos debido a su tamaño anatómico y características de reparación y remodelación óseas. Se prestó especial atención a seleccionar animales de tamaño y peso uniformes para limitar la variabilidad de la geometría y carga de articulación óseas. Se examinaron radiográficamente los animales antes de la operación para asegurar un tamaño apropiado, la madurez esquelética y que no existieran anomalías óseas obvias. Los defectos del lado izquierdo recibieron dispositivo osteogénico estándar en dos animales, y el dispositivo osteogénico mejorado en los otros dos animales. Los defectos del lado derecho recibieron matriz sola en un animal, una mezcla de matriz/agente aglutinante en un animal, y no se trataron en los restantes dos animales.

Descripción del dispositivo de ensayo

El dispositivo osteogénico estándar consistía en rhOP-1 mezclada con matriz de colágeno óseo de tipo I bovino (2,5 mg de rhOP-1/g de matriz). El dispositivo osteogénico mejorado comprendía 100 mg del dispositivo osteogénico estándar de OP-1/matriz de colágeno combinados con 20 mg de CMC (total de 120 mg). Los controles consistían en matriz de colágeno óseo de tipo I bovino sola, y la matriz de colágeno con CMC. Ambos se suministraron en cantidades de 100 mg.

Diseño del estudio

Se resume el diseño del estudio en la Tabla 12.

TABLA 12

Reparación de defecto osteocondral en perro utilizando OP-1

Número de animal	Implante izquierdo	Implante derecho
H122	OP-1	Matriz
H130	OP-1	Ninguno
H125	OP-1/CMC	Ninguno
H132	OP-1/CMC	Ninguno
OP-1	100 mg de dispositivo de OP-1/colágeno (dispositivo osteogénico estándar)	
OP-1/CMC	120 mg de dispositivo de OP-1/CMC/colágeno (dispositivo osteogénico mejorado)	
Matriz	100 mg de colágeno	
CMC/matriz	100 mg de CMC/colágeno	
Los dispositivos y controles se humedecieron con solución salina (aprox. 0,21 a 0,26 ml) para conseguir una consistencia de masilla antes de la implantación		

Cirugía

Utilizando técnicas asépticas estándar, se realizó cirugía bajo anestesia con gas isoflurano. Se administró anestesia mediante inyección intravenosa de pentotal de sodio a una dosificación de 11,04 mg/kg de peso corporal. Se hizo una incisión pararrotuliana medial de aproximadamente 4 cm de longitud. Se retrajo la rótula lateralmente para exponer el cóndilo femoral. Se utilizó una broca de taladro de 5 mm con un manguito diseñado especialmente para evitar el sobretaladrado de la profundidad de defecto (6 mm) para crear el defecto final. Se añadió solución salina estéril al dispositivo osteogénico mejorado y se mezcló justo antes de la implantación. Después de la irrigación del defecto con solución salina para retirar los restos de hueso y células de médula vertidas, se compactó el dispositivo apropiado en el sitio de defecto utilizando una sonda roma. Se dispuso suficiente dispositivo en el defecto de modo que estuviera nivelado con la superficie articular. Se cerraron después la cápsula de articulación y los tejidos blandos en capas. Se repitió el procedimiento en el lado contralateral con el implante apropiado.

Evaluaciones y procedimientos terminales

Se evaluó la curación osteocondral macroscópica e histológicamente utilizando protocolos rutinarios, como se describen a continuación. Se utilizaron radiografías para evaluar la curación.

A las 12 semanas después de la operación, se sacrificó cada animal mediante una sobredosis de barbiturato intravenoso. Se recogieron tanto los fémures derecho como izquierdo distales en bloque y se mantuvieron en solución salina fría hasta completar la graduación macroscópica y microfotografía. Se dispusieron después las muestras en fijador de paraformaldehído al 4%, se marcaron con todas las identificaciones necesarias y se almacenaron a 4°C hasta envío, aproximadamente 10 días después del sacrificio. Justo antes de enviar, se cortaron las muestras en bloques pequeños con el defecto articular en el centro.

Análisis macroscópico

Se graduó cada defecto recogido según su apariencia macroscópica. Este análisis aporta puntos basándose en la formación de adhesiones intraarticulares, la restauración de la superficie articular, la erosión y la apariencia del cartílago. Es posible un total de 8 puntos. La escala de graduación macroscópica se expone en la Tabla 13.

ES 2 273 412 T3

TABLA 13

Escala de graduación macroscópica

5	Adhesiones intraarticulares	Graduaciones
	Ninguna=	2
10	Tejido fibroso suelto mínimo/fino=	1
	Tejido fibroso mayoritario/denso=	0
	Restauración de la superficie articular	
15	Completa=	2
	Parcial=	1
20	Ninguna=	0
	Erosión de cartílago	
25	Ninguna=	2
	Sitio de defecto/borde de sitio=	1
	Sitio de defecto y cartílago normal	
30	adyacente=	0
	Apariencia de cartílago	
35	Translúcido=	2
	Opaco=	1
	Decolorado o irregular=	0
40	PUNTUACIÓN TOTAL	8 puntos posibles

45 *Histología*

Se prepararon todas las muestras para evaluación histológica. Se fijaron las muestras individuales mediante inmersión en solución de paraformaldehído al 4%. Además, utilizando procedimientos rutinarios como se describen en otro lugar en la presente memoria, se realizó análisis del tipo de tejido para caracterizar el tipo de colágeno y la composición de tejido porcentual. Se devolvieron para evaluación secciones no descalcificadas, una de cada muestra, teñidas con los tintes safranina O y Fast Green (para indicar el contenido de glicosaminoglicano en la matriz).

Se basaron las secciones histológicas en la naturaleza del cartílago de reparación, las características estructurales y los cambios celulares. Se expone la escala de graduación histológica en la Tabla 14.

60

65

ES 2 273 412 T3

Tabla 14. Escala de graduación de histología

Naturaleza del tejido predominante:		
Morfología celular		
	Cartílago articular de hialina=	4
	Diferenciado incompletamente=	2
	Tejido fibroso o hueso=	0
Tinción con safranina O de la matriz		
	Normal/casi normal=	3
	Moderada=	2
	Ligera=	1
	Ninguna=	0
CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES:		
Regularidad de superficie		
	Lisa/intacta=	3
	Laminación horizontal superficial=	2
	Fisuras, 25, 100% del grosor=	0
	Desestabilización grave de la fibrilación=	0
Integridad estructural		
	Normal=	2
	Desestabilización ligera, incluyendo quistes=	1
	Disgregación grave=	0
Grosor		
	100% de grosor de cartílago normal=	2
	50-100%=	1
	0-50%=	0

ES 2 273 412 T3

	Unión al cartílago adyacente	
5	Unido a ambos extremos del defecto=	2
10	Unido a un extremo o parcialmente unido a ambos extremos=	1
	No unido=	0
15	AUSENCIA DE CAMBIOS CELULARES DEGENERATIVOS	
	Hipocelularidad	
20	Ninguna=	3
	Ligera=	2
	Moderada=	1
25	Grave=	0
	Agregación de condrocitos	
30	Ninguna=	2
	<25% de células=	1
	>25% de células=	0
35	Ausencia de cambios degenerativos en cartílago adyacente	
40	Celularidad normal, sin agregados, tinción normal=	3
45	Celularidad normal, agregados leves, tinción moderada=	2
50	Hipocelularidad leve o moderada, tinción ligera=	1
	Hipocelularidad grave, poca o ninguna tinción=	0
55	TOTAL	24 puntos posibles

Resultados

Todas las cirugías fueron sin incidentes y sin complicaciones después de la operación. En general, se observó cierto hinchamiento bilateral de la rodilla medial el día después de la operación en los cuatro animales, que desapareció el día 10 después de la operación. Ningún animal experimentó ninguna reacción adversa relacionada con los materiales implantados o procedimientos experimentales.

Evaluación macroscópica

Aparece un resumen de las graduaciones de evaluación macroscópica en la Tabla 15.

TABLA 15

Graduación de la evaluación macroscópica media $\pm$ desviación típica (n)

	Dispos. ostogénico estándar	Dispos. osteogénico mejorado	Sólo matriz de colágeno	Matriz de colágeno/ CMC	Sin tratamiento
Intraarticular	2,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0
Restauración de superficie	1,5 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,0
Erosión	18 $\pm$ 0,5	1,23 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 1,4	1,8 $\pm$ 0,5
Apariencia	0,8 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,6
Total (de 8 puntos posibles)	6,0 $\pm$ 1,4 (2)	5,8 $\pm$ 1,7 (2)	3,5 $\pm$ 0,7 (1)	4,5 $\pm$ 0,7 (1)	7,3 $\pm$ 0,5 (2)

Evaluación histológica

Los defectos no tratados y defectos tratados con el dispositivo osteogénico mejorado de OP-1, matriz de colágeno y CMC recibieron la graduación histológica media mayor, 15 y 16,5 de 24 puntos posibles, respectivamente. Sin embargo, en cada uno de estos grupos una muestra parecía marcadamente mejor que la otra. Sin embargo, los sitios tratados con sólo matriz de colágeno, matriz de colágeno con CMC y el dispositivo osteogénico estándar, puntuaron ligeramente más consistentemente, y menos, que los sitios tratados con dispositivo osteogénico mejorado ($n \leq 2$). Aparece un resumen de las graduaciones histológicas medias en la Tabla 16.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 16

Graduación de la evaluación histológica media $\pm$ desviación típica (n)

	Dispos. osteo- génico estándar	Dispos. osteo- génico mejorado	Sólo matriz de colágeno	Matriz de colágeno/ CMC	No implantado
Naturaleza del tejido predominante	3,5 $\pm$ 0,7 (2)	4,5 $\pm$ 2,1 (2)	1,0 (1)	2,0 (1)	4,0 $\pm$ 2,8 (2)
Caracte- rísticas estruc- turales	1,5 $\pm$ 0,1 (2)	5,5 $\pm$ 0,6 (2)	7,0 (1)	6,0 (1)	5,0 $\pm$ 2,8 (2)
Ausencia de cambios celulares de degeneración	4,5 $\pm$ 0,7 (2)	6,5 $\pm$ 2,1 (2)	3,0 (1)	4,0 (1)	6,0 $\pm$ 1,4 (2)
Total (de 24 puntos posibles)	12,5 $\pm$ 0,7 (2)	16,5 $\pm$ 7,8 (2)	11,0 (1)	12,0 (1)	1,5 $\pm$ 7,1 (2)

Inesperadamente, los sitios tratados con el dispositivo osteogénico mejorado consiguieron las puntuaciones medias mayores para la naturaleza del nuevo tejido de reparación, para las características estructurales de la reparación y para minimizar la degeneración del cartílago de reparación o del cartílago intacto circundante. Los sitios de dispositivo osteogénico mejorado recibieron también la puntuación total global mayor. Se ponderaron estos resultados con la puntuación de un animal en la que la morfología celular y de tejido era consistente con cartílago articular. El cartílago de reparación era continuo con el cartílago intacto y el grosor de la reparación era el mismo que el del cartílago intacto. La capa de hueso subcondral estaba también completamente restaurada. La curación no era tan avanzada como en los otros sitios tratados con OP-1/matriz de colágeno o sin CMC. Las menores puntuaciones eran el resultado de una diferenciación incompleta del tejido de reparación, restauración ósea subcondral incompleta y grosor irregular de la reparación. No se observó implante residual ni material de vehículo en ninguna sección.

Las comparaciones entre animales demostraron que, en tres animales, los defectos que recibían dispositivos que contienen OP-1, con o sin CMC (todos los defectos izquierdos), conseguían graduaciones histológicas iguales o mayores que el defecto contralateral que recibe la matriz de control o sin tratamiento.

Inesperadamente, el dispositivo de OP-1 sin CMC indujo la formación de hueso y cartílago, pero en un modo más desorganizado con considerable tejido fibroso presente. Las muestras no tratadas o con vehículo sólo se rellenaban con cartílago fibroso y tejido conectivo denso.

Estos datos sugieren que la reparación inesperadamente superior conseguida con el dispositivo osteogénico mejorado está asociada a las diferencias en su consistencia respecto a la del dispositivo osteogénico estándar sin agente aglutinante, que a su vez afectan a la contención de los dispositivos *per se* en el sitio de defecto. Las propiedades de adhesión y disgregación de la formulación se espera que sean críticas en defectos de cartílago articular, dada la naturaleza dinámica de la articulación.

Inmunotinción de colágeno de tipo I y tipo II y microscopía de luz polarizada

Este estudio teñía también secciones para comparar la reparación de colágeno en los sitios de defecto tratados con: sin dispositivo, composiciones de sólo dos tipos de matriz (matriz y matriz/agente aglutinante) o composiciones de ambas matrices con OP-1.

En general, al utilizar el anticuerpo de colágeno de tipo I, se observó tinción del hueso subcondral subyacente existente, así como del hueso recién regenerado. El hueso recién regenerado difería ligeramente del hueso existente por la presencia de regiones de matriz más desorganizada cuando se observaba bajo microscopía de contraste de fase. Utilizando el anticuerpo de colágeno de tipo II, el cartílago articular existente se teñía cualitativamente tan bien como el tejido reparativo en los defectos, aunque la tinción del tejido nuevo era menos intensa. En al menos un defecto tratado con dispositivo osteogénico mejorado, se observó la regeneración completa del hueso subcondral con cartílago de tipo articular regenerado a lo largo de la parte superior. La matriz celular de este cartílago regenerado no era idéntica al cartílago articular existente, pero pudo observarse una matriz celular visible compuesta por grandes haces sueltos de bajo contraste de fase.

Defectos tratados con dispositivo osteogénico mejorado. En defectos tratados con dispositivo osteogénico mejorado, al menos un animal evidenciaba reparación de cartílago articular al nivel macroscópico. El hueso subcondral estaba regenerado, y se observó una capa de cartílago nuevo de grosor casi normal mediante tinción histológica con azul de toluidina y safranina O. Estas capas y tejidos se teñían apropiadamente, con anticuerpo de tipo I localizado en el hueso subcondral y colágeno de tipo II localizado en la capa de tipo cartílago nuevo. Había también cierta evidencia de regeneración de una zona de cartílago calcificado y distintas señales en el cartílago regenerado. Sin embargo, se observaron algunas diferencias entre la capa de cartílago articular nuevo y existente. El cartílago nuevo tenía una densidad mayor de condrocitos y contenía haces desorganizados sueltos de fibras visibles por microscopía de contraste de fase o con luz polarizada. Debe observarse que sólo se representa aquí un punto temporal único durante el proceso de reparación, y que los resultados de periodos más largos o más cortos son desconocidos.

Defectos tratados con dispositivo osteogénico estándar. Los defectos tratados con dispositivo osteogénico estándar mostraron que aproximadamente un 50% del hueso estaba regenerado en el sitio de defecto con crecimiento interno de cartílago articular desde los bordes del defecto. Parecía haber algunas zonas adicionales de formación de cartílago articular cerca del hueso recién regenerado, con el resto del defecto rellenado con tejido reparativo. El tejido reparativo se teñía ligeramente con anticuerpos de colágeno de tipo II, y no de tipo I. Estaban presentes más condrocitos con haces sueltos grandes de matriz circundante de las células. El tratamiento con el dispositivo osteogénico estándar difería del tratamiento del dispositivo osteogénico mejorado en que el hueso subcondral no conseguía regenerarse a su nivel normal, y aparecía tejido fibroso desorganizado denso encima del cartílago nuevo, lo que causaba que la parte superior del defecto sobresaliera con una superficie irregular. Este tejido fibroso parecía tener más células de tipo fibroblasto, con haces fibrosos colocados paralelamente a la superficie articular.

Defectos tratados con matriz/agente aglutinante. Un defecto con sólo matriz/agente aglutinante sin OP-1 mostró la regeneración de aproximadamente un tercio del hueso subcondral retirado, con el resto rellenado con tejido reparativo. Este tejido regenerado se teñía ligeramente con anticuerpos de colágeno de tipo I, especialmente cerca de la parte inferior del defecto, y mostraba una tinción más fuerte con el anticuerpo de colágeno de tipo II, con la tinción más fuerte cerca de la superficie. Es manifiesta una matriz visible desorganizada densa en la mitad superior del tejido reparativo, y aparece un patrón horizontal más organizado de fibras en la mitad inferior. El azul de toluidina no teñía el tejido reparativo, mientras que la safranina O teñía la mitad superior e inferior diferencialmente. La mitad cerca de la superficie articular se teñía ligeramente con safranina O, y la mitad inferior se teñía con Fast Green. Se observó una distinción similar entre las dos mitades del tejido reparativo cuando se teñía con tricromo de Masson. Aunque el tejido reparativo no parecía cartílago articular, la región cerca de la superficie articular no parecía contener colágeno de tipo II, una matriz ácida con quizás algún mucopolisacárido. La mitad inferior tenía más colágeno de tipo I con menos carbohidrato, y su naturaleza puede ser más de tipo tejido conectivo.

El único defecto tratado con matriz de colágeno sola no mostró ninguna regeneración del hueso subcondral. El tejido reparativo que rellenó el defecto se teñía ligeramente con anticuerpos tanto de colágeno de tipo I como II. Este tejido tenía una matriz fibrosa aumentada con células de tipo fibroblasto, y en ciertas zonas parecía ser similar a fibrocartílago. Esta muestra era similar al tratamiento con CMC/matriz de colágeno solo, con una ligera localización de colágeno tanto de tipo I como II en el tejido reparativo. Además, el sitio de defecto mostraba la misma tinción diferencial con safranina O/Fast Green, con tinción en la mitad superior del tejido reparativo con safranina O y en la inferior con Fast Green.

Sumario y conclusión

Los defectos osteocondrales tratados con los dispositivos osteogénicos mejorados demostraron inesperadamente más regeneración avanzada de cartílago, fenotipo de condrocito y cartílago comparados con defectos tratados con el dispositivo osteogénico estándar, matriz de colágeno sola o matriz de colágeno mezclada con CMC, todos los cuales demostraron un cartílago de reparación menos organizado y formación de hueso subcondral. Una mala reparación mediante tratamiento con la matriz de colágeno o matriz de colágeno con CMC indica que la presencia de un soporte de colágeno solo no es suficiente para inducir la curación, y puede incluso impedir la progresión de la curación y la organización del tejido de reparación.

Los defectos osteocondrales de grosor completo pueden repararse utilizando dispositivos osteogénicos que contienen CMC según los métodos de la presente invención. Se espera que los defectos osteocondrales de grosor completo puedan repararse también utilizando dispositivos osteogénicos mejorados que contienen cualquiera de los agentes aglutinantes preferidos anteriormente citados tales como cola de fibrina y/o cualquiera de las matrices preferidas anteriormente citadas.

2. Experimento 2: Evaluación a largo plazo de la reparación de defectos osteocondrales de grosor completo (perros)

Se realizó este estudio para evaluar adicionalmente la reparación de defectos osteocondrales/condrales mediante dispositivos osteogénicos mejorados. Hasta la fecha, el estudio examinaba los efectos del dispositivo osteogénico mejorado a las 6 y 12 semanas, y continuará examinando los efectos a las 26 y 52 semanas. Esto proporciona datos de estabilidad de la reparación a largo plazo. Se siguió la organización de cartílago nuevo con el tiempo para determinar si se aproxima al tejido normal con respecto a su estructura y función. Se evaluaron dos formulaciones de dispositivos en defectos osteocondrales/condrales incluyendo: 1) dispositivo osteogénico mejorado, o 2) dispositivos ficticios que contienen sólo CMC y matriz de colágeno.

Brevemente, se crearon bilateralmente defectos de grosor completo de 5 mm de diámetro que se extendían 6 mm en el hueso subcondral del cóndilo femoral medial de 16 perros mestizos adultos. Se utilizaron mestizos adultos en este estudio debido a su tamaño anatómico y características de reparación y remodelación óseas conocidas. Todos los animales tenían entre 1 y 4 años de edad y pesaban aproximadamente 20 a 30 kg. Se prestó una atención específica a seleccionar animales de tamaño y peso uniformes para limitar la variabilidad en la carga de articulación. Se examinaron radiográficamente los animales para asegurar un tamaño apropiado, madurez esquelética y que no existiera ninguna anomalía ósea obvia. En cada grupo de cuatro perros, los defectos del lado izquierdo recibieron dispositivo osteogénico mejorado. Los defectos del lado derecho recibieron matriz/agente aglutinante en dos animales, y los restantes dos animales no se trataron. En el sacrificio, se recuperaron los fémures distales en bloque, y se evaluaron histológicamente y macroscópicamente los sitios de defecto basándose en el esquema descrito anteriormente.

El dispositivo osteogénico mejorado comprende dispositivo estándar (2,5 mg de rhOP-1/1 g de matriz) mezclado con CMC. Para formular el dispositivo mejorado, se mezclaron 100 mg de mezcla de rhOP-1/colágeno con 20 mg de CMC inmediatamente antes de la implantación (total 120 mg). El dispositivo de sólo colágeno consiste en colágeno de tipo I bovino (100 mg). Se resume el diseño del estudio en la Tabla 17.

TABLA 17

Reparación de defecto osteocondral en perro

Grupo	Perros (2 defectos/animal)	Implante izquierdo	Implante derecho	Duración
I	4	OP-1/CMC	Ninguno/vehículo	6 semanas
II	4	OP-1/CMC	Ninguno/vehículo	12 semanas
III	4	OP-1/CMC	Ninguno/vehículo	26 semanas
IV	4	OP-1/CMC	Ninguno/vehículo	52 semanas
OP-1/CMC: 120 mg de dispositivo de OP-1/CMC-colágeno (dispositivo osteogénico mejorado)				
Vehículo: 100 mg de CMC/colágeno				

Cirugía

Utilizando técnicas asépticas estándar, se realizó cirugía bajo anestesia con gas isoflurano. Se hizo una incisión pararrotoiana medial de aproximadamente 4 cm de longitud. Se retrajo la rótula lateralmente para exponer el cóndilo femoral. Utilizando una broca de taladro de 0,32 cm, se hizo un orificio piloto en la región de soporte del peso del cóndilo femoral medial. Se utilizó una broca de taladro de 5 mm con un manguito diseñado especialmente para evitar el sobretaladrado de la profundidad de defecto (6 mm) para crear el defecto final. Después de copiosa irrigación del defecto con solución salina para retirar los restos de hueso y células de médula vertidas, se compactó el dispositivo apropiado en el sitio de defecto utilizando una sonda roma. Se cerraron después la cápsula de articulación y los tejidos blandos en capas. Se repitió el procedimiento en el lado contralateral con el implante apropiado.

Evaluación

Se sacrificaron cuatro animales a las 6 y 12 semanas y cuatro animales a las 26 y 53 semanas después de la operación. Se sacrificaron los animales utilizando una sobredosis de barbiturato intravenoso. Se recogieron inmediatamente los fémures en bloque y se almacenaron en una gasa embebida con solución salina. Se tomaron fotografías de alta potencia de los sitios de defecto. Se separaron meticulosamente los tejidos blandos por disección del sitio de defecto. Se retiró el extremo proximal del fémur.

Se graduó la apariencia macroscópica de los sitios de defecto y tejido de reparación basándose en los parámetros anteriormente descritos por dos observadores independientes, a ciegas de la asignación de tratamiento. Se aportaron puntos según la presencia de adhesiones intraarticulares, la restauración de la superficie articular, la erosión de cartílago y la apariencia.

Se prepararon todas las muestras para evaluación histológica inmediatamente después de graduación macroscópica y fotografía. Se fijaron los fémures distales individuales mediante inmersión en solución de formalina tamponada al 10% o en una solución de paraformaldehído al 4%. Se aisló cada sitio de defecto con una sierra de diamante enfriada con agua. Se cortaron tres secciones de tres niveles de cada bloque. Los niveles 1 y 3 eran los más cercanos al perímetro del defecto. El nivel 2 se localizaba en el centro del defecto. Se tiñeron tres secciones de cada nivel con hematoxilina y eosina, tricromo de Goldner, safranina O o Fast Green. Se graduaron después las secciones basándose en el esquema descrito anteriormente. Este análisis aportaba puntos basándose en la naturaleza del tejido de reparación, las características estructurales y los cambios celulares. Son posibles un total de 24 puntos.

Resultado y conclusión

Después de 6 semanas, se sacrificaron ciertos de los animales anteriormente tratados y se realizaron evaluaciones inmunohistoquímicas como se describe en otro lugar en la presente memoria. Los resultados fueron los siguientes: en todos los casos, los defectos tratados con dispositivo de OP-1 CMC/colágeno exhibían una reparación superior. Con el dispositivo de OP-1 CMC/colágeno, había una formación de puente inesperadamente completa o casi completa del defecto con tejido cartilaginoso. Se observó tinción de colágeno de tipo II en el cartílago reparativo, con poca o ninguna tinción de colágeno de tipo I. La tinción de proteoglicano siguió a la localización del colágeno de tipo II, con una tinción más oscura en zonas que se parecen más estrechamente a cartílago de hialina maduro. Basándose en la tinción con safranina O, la regeneración de la capa de superficie de cartílago no era todavía completa a las 6 semanas después del tratamiento.

Después de 12 semanas, la curación había progresado significativamente en los defectos tratados con dispositivos mejorados. No se observó curación apreciable en los controles. La puntuación de graduación macroscópica media observada con dispositivos mejorados a las 12 semanas era de $6,50 \pm 0,89$ ($n=6$); la del medio de control era de $3,69 \pm 0,70$ ($n=8$). En todos los puntos temporales restantes, se prevé que los defectos tratados con los dispositivos osteogénicos mejorados demostrarán una regeneración de cartílago más avanzada, fenotipo de condrocito y cartílago de manera acelerada respecto a defectos tratados con sólo colágeno/CMC o dejados sin tratar. Los defectos tratados con dispositivo osteogénico mejorado se prevé que exhiban cartílago y tejido óseo subcondral, mientras que los defectos tratados con colágeno/CMC o no tratados se espera que induzcan la formación desorganizada de hueso y cartílago con considerable tejido fibroso presente.

Los defectos osteocondrales de grosor completo pueden repararse establemente utilizando dispositivos osteogénicos que contienen CMC según los métodos de la presente invención. Se espera que experimentos similares a los descritos anteriormente, en los que se evalúen otros agentes aglutinantes preferidos tales como cola de fibrina, demostrarán que los dispositivos mejorados pueden reparar establemente defectos osteocondrales de grosor completo.

E. Reparación de defectos condrales utilizando dispositivos osteogénicos mejorados que contienen carboximetilcelulosa

1. Experimento 1: Evaluación a largo plazo de defectos condrales frente a defectos osteocondrales (oveja)

Este estudio evalúa la reparación de defectos tanto condrales como osteocondrales mediante dispositivos osteogénicos mejorados utilizando un modelo de animal grande. El grosor aumentado del cartílago articular y las similitudes con los seres humanos en tamaño y características de soporte de peso hacen a la oveja un modelo a partir del cual pue-

ES 2 273 412 T3

den extrapolarse aplicaciones clínicas humanas, especialmente para la aplicación clínica de dispositivos osteogénicos mejorados para la reparación de defectos condrales. Los grupos de estudio son los siguientes:

Defectos osteocondrales A (grosor completo) (5 mm de diámetro)

Grupo A I: Sin tratamiento

Grupo A II: Carboximetilcelulosa/colágeno

Grupo A III: Carboximetilcelulosa/OP-1/colágeno

Grupo A IV: Aloinjerto liofilizado

Grupo A V: Aloinjerto liofilizado + OP-1

Defectos osteocondrales B (grosor parcial) (5 mm de diámetro)

Grupo B I: Sin tratamiento

Grupo B II: Carboximetilcelulosa/colágeno

Grupo B III: Carboximetilcelulosa/OP-1/colágeno

Grupo B IV: Ácido hialurónico + pasta de sulfato de condroitina

Grupo B V: Ácido hialurónico + pasta de sulfato de condroitina + OP-1.

Se operan ambas articulaciones de rodilla anteriores de cada oveja, y se crean dos defectos por articulación (uno en el cóndilo medial y otro en el lateral). En una de las articulaciones se crean dos defectos condrales de grosor parcial estandarizado (5 mm de diámetro) en cada cóndilo, mientras que en la otra articulación se crean dos defectos osteocondrales de grosor completo más profundos (aproximadamente 1-2 mm en el hueso subcondral). Cada grupo tiene un subgrupo sacrificado tempranamente a las 8 semanas y otro mantenido para evaluación a más largo plazo durante 6-7 meses.

Hay un total de 20 grupos y 12 defectos por grupo. Por lo tanto, el número total de defectos es 240 y el número total de ovejas es 60. Hay cinco grupos de tratamiento diferentes: tres controles (sin tratamiento y dos dispositivos ficticios diferentes) y dos formulaciones de OP-1 diferentes para cada tipo de defecto. Los dispositivos osteogénicos mejorados que comprenden OP-1 en CMC/colágeno se utilizarán para reparación de defecto osteocondral y reparación de defecto condral. Los dispositivos se formulan de tal modo que se añaden 2,5 mg de OP-1/colágeno a cada sitio de defecto que recibe este dispositivo osteogénico mejorado. La reparación se evalúa a las 8 semanas y los 6-7 meses. El protocolo de tratamiento se muestra en la Tabla 18.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 18

Reparación de defecto condral y osteocondral utilizando OP-1 en oveja

Grupo	Oveja (4 defectos/ oveja)	Osteocondral (2 defectos/ oveja)	Defectos condrales (2 defectos/ oveja)	Duración
I	12	Control no tratado	Control no tratado	8 semanas (6) > 26 semanas (6)
II	12	Control de CMC/colágeno	Control de CMC/colágeno	8 semanas (6) > 26 semanas (6)
III	12	OP-1 + CMC/colágeno	OP-1 + CMC/colágeno	8 semanas (6) > 26 semanas (6)

Se separan dos semanas las cirugías en las dos rodillas para permitir la curación de la primera rodilla antes de la cirugía en la segunda rodilla. Se utiliza la primera cirugía para generar defectos condrales, la segunda es para defectos osteocondrales. Se realiza la cirugía en una sala de operaciones totalmente equipada utilizando técnicas estándar y equipo utilizado en cirugía humana. Se permite a las ovejas deambular libremente en su territorio de pasto después de la operación. Las cirugías separadas dan como resultado tiempos de curación de 8 semanas para defectos condrales y tiempos de curación de 6 semanas para defectos osteocondrales. En el sacrificio, se perfunden las articulaciones, se fijan y se procesan según protocolos citológicos estándar.

Al final de los periodos de estudio, se sacrifican los animales y se recogen las articulaciones en bloque. Se gradúa la apariencia macroscópica de los sitios de defecto y tejido de reparación utilizando métodos rutinarios tales como los descritos anteriormente. Se aportan puntos según la presencia de adhesiones intraarticulares, la restauración de la superficie articular, la erosión de cartílago y la apariencia.

Utilizando métodos similares a los descritos anteriormente, se preparan muestras para evaluación histológica inmediatamente después de graduación macroscópica y fotografía.

Se espera que los defectos tratados con dispositivos de OP-1/CMC/colágeno exhibirán una reparación superior similar a la del experimento D.2 anterior. Se espera adicionalmente que los dispositivos osteogénicos mejorados que contienen cualquiera de los agentes aglutinantes preferidos anteriormente citados, tales como cola de fibrina, exhibirán también reparación de defectos tanto condrales como osteocondrales.

2. Experimento 2: Evaluación a largo plazo de la reparación de defectos subcondrales utilizando dosis variables de OP-1 (cabras)

Se realiza un estudio utilizando cabras lecheras esqueléticamente maduras para demostrar la eficacia del dispositivo osteogénico mejorado para reparar defectos osteocondrales/condrales. Se utilizan formulaciones de dispositivo osteogénico mejorado con concentraciones variables de rhOP-1, junto con controles ficticios o sin dispositivo. El dispositivo ficticio consiste en colágeno mezclado con carboximetilcelulosa (CMC). Además, se sacrifican los grupos de animales a los 4, 12 y 24 meses después de la cirugía para comparar la velocidad y estabilidad de la reparación de defecto. A continuación, se resumen los parámetros experimentales.

Grupos

		Tiempo después de la operación		
		4 meses	12 meses	2 años
5	1. rhOP-1 800 µg/ml	A	B	C
10	2. rhOP-1 1.600 µg/ml	A		
	3. rhOP-1 3.200 µg/ml	A		
15	4. Dispositivo ficticio	A	B	
	5. Sin dispositivo	A	B	

Brevemente, se hacen defectos subcondrales en las rodillas izquierdas de 56 cabras lecheras esqueléticamente maduras. Los defectos son de 8 mm de diámetro y 3 mm de profundidad. Esta configuración de defecto evita tensiones de cizalladura muy altas en el defecto, que conducen a la formación de colágeno de tipo I. Se utilizan en este experimento cabras lecheras holandesas de aproximadamente 2 años de edad y de aproximadamente 50 kg de peso. Se proporcionan dispositivos correspondientes a 2,5 mg de rhOP-1/g de colágeno. En cada caso, se añaden 0,2 g de CMC al dispositivo osteogénico estándar, después se añaden aproximadamente 2,6 ml de solución salina y se mezcla. Esto proporciona material de aproximadamente 3-4 ml de dispositivo osteogénico mejorado. Este material se utiliza después para rellenar el volumen de defecto.

Técnica quirúrgica

Se induce la anestesia y se abre la rodilla izquierda mediante un enfoque pararrotiliano medial. Se disloca la rótula y se expone el lado lateral y el cóndilo medial. Con un tubo hueco afilado, se hacen los contornos de un defecto en la parte de soporte del peso anterior del cóndilo medial. Con un trépano manual de punta cuadrada que está colocado dentro del tubo, se crea un defecto en el hueso subcondral. Se expone después la tibia proximal, y se toma un colgajo periostial del mismo diámetro que el defecto en el cóndilo medial. Se fija parcialmente el colgajo periostial, con su capa de cámbium hacia el defecto, hacia los restos. Se rellena el defecto con el material de ensayo apropiado y se cubre con el colgajo periostial, utilizando una sutura reabsorbible. Se añade un dispositivo de CMC mediante una jeringuilla hasta que el defecto está relleno, y se sutura después completamente el colgajo. En los animales de control, se utiliza un dispositivo ficticio que incluye sólo colágeno y CMC. Un segundo grupo de control no recibió implante en absoluto, sino que recibió sólo un colgajo periostial.

Tratamiento después de la operación

Se permite la actividad no restringida de soporte de su peso todo lo que pueda tolerar después de la operación.

Actuación clínica

Se evalúa el patrón de soporte de peso a las 2, 4 6 y 8 semanas, y después cada 4 semanas.

Análisis macroscópico

Se hacen evaluaciones macroscópicas basándose en el esquema presentado anteriormente. Después de sacrificar el animal, se registra la presencia o ausencia de contracturas de rodilla, y se examinan tanto en la rótula como en los cóndilos adhesiones, contorno de superficie articular, apariencia del cartílago restaurado y presencia o ausencia de erosiones de cartílago. A cada una de estas características se le da una puntuación. Se toman diapositivas en color utilizando una macrolente.

Análisis histológico

Para ayudar a la visualización del hueso subcondral regenerado y a localizar los bordes del defecto durante la evaluación histológica, las cabras reciben una tetraciclina doblemente marcada antes del sacrificio. Esto permite la histomorfometría del relleno óseo de la parte más profunda del defecto. Se observan también las muestras histológicas incorporando microscopía polarizada para proporcionar información sobre rasgos estructurales regulares.

Para análisis histológicos, se fijan las muestras, incluyendo el hueso subcondral, con formalina tamponada con fosfato al 10% y se embeben no descalcificadas en metacrilato de metilo (MMA). Se hacen secciones de 5 µm de grosor con un microtomo de alto rendimiento. Se tiñen las secciones con azul de toluidina para identificar el cartílago y con tricromo de Goldner para identificar el hueso. Se hace la valoración de hialinidad de tejido, afinidad de la matriz por el azul de toluidina (metacromasia), irregularidad de la superficie, hueso subcondral regenerado por agregación de con-

drocitos, unión al cartílago articular adyacente, infiltración de células inflamatorias alrededor del implante y ausencia de cambios degenerativos en el cartílago adyacente. A cada una de estas características se le da una puntuación.

Análisis bioquímico

Extracción de proteoglicanos: Para análisis bioquímicos, se recoge cartílago de control y tejido del defecto en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría. Se extraen los proteoglicanos de las secciones liofilizadas mediante tratamiento con HCl-guanidina 4 M, acetato de potasio 0,15 M a pH 5,8 en presencia de inhibidores de proteinasa (benzamidina 5 mM, ácido 6-amino-n-hexanoico 0,1 M, EDTA 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo y n-etilmaleimida 5 mM) a 4°C durante 60 horas. Se separan el extracto y el residuo. Se aclara concienzudamente el residuo con tampón de extracción, que se añade al extracto. Se analiza en los extractos el contenido de sulfato de condroitina y se utilizan para cromatografía de exclusión molecular.

Cromatografía de exclusión molecular: Se aplican alícuotas de extractos a columnas de Sepharose C 12 B (0,66 x 145 cm) (Pharmacia AB, Uppsala, Suecia) y se eluyen con un tampón disociativo a pH 6,1 que contiene guanidina-HCl 4 M, sulfato de sodio 0,1 M, acetato de sodio 0,05 M y Triton X-100 al 0,1%. El caudal es de 1,2 ml/h. Se analiza en las fracciones el contenido de sulfato de condroitina. Puede calcularse el contenido de moléculas grandes específicas de cartílago, probablemente agreganos.

MRI

Se realiza la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) con dos fines. En primer lugar, para monitorizar 1 mes después de la operación que el colgajo más implante haya permanecido en su sitio. En segundo lugar, se sigue el grupo 1C (2 años o más después de la operación) longitudinalmente con MRI a los 4 meses, 12 meses y en el sacrificio.

Sumario

Se prevé que los defectos tratados con dispositivo osteogénico mejorado demostrarán una regeneración de cartílago avanzada, fenotipo de condrocitos y cartílago comparados con controles ficticios o sin dispositivo. Se prevé también que dosis bajas de OP-1 conseguirán reparar de modo al menos cuantitativa y cualitativamente similar al de dosis mayores.

F. Reparación de defectos condrales utilizando proteína osteogénica

Este estudio investigó la formación de cartílago de mamífero en lesiones subcondrales tratadas con proteína osteogénica 1 humana recombinante (rhOP-1) (sola o en combinación con una matriz de colágeno) y/o pericondrio autólogo.

Materiales y métodos

Se hizo un defecto subcondral de 9 mm en el cóndilo femoral medial de la articulación de rodilla izquierda de 15 cabras. Se rellenó el defecto con un implante consistente en sangre coagulada reciente mezclada con: (a) partículas pequeñas de pericondrio de oreja autólogo; o (b) rhOP-1; o (c) rhOP-1 más pericondrio de oreja. La rhOP-1 se añadió en combinación con una matriz de colágeno (dispositivo de OP-1) o sin una matriz de colágeno (OP-1 sola). Se cerró el defecto con un colgajo periostial, que se cosió al cartílago. Después de tiempos de implantación de 1, 2 y 4 meses, se investigó la extensión de la reparación de cada defecto con técnicas histológicas estándar (metocromasia e hialinidad) y métodos bioquímicos bien conocidos (cromatografía en gel de proteoglicanos).

Resultados

Después 1 y 2 meses en este estudio particular, no había diferencias aparentes entre los defectos de control (implante (a) anterior) y los tratados con diversas OP-1. Sin embargo, después de 4 meses, sólo uno de los tres defectos de control mostraba formación de cartílago detectable, mientras que los cuatro defectos tratados con OP-1 estaban completa o parcialmente rellenados con cartílago, como indica el análisis histológico y bioquímico expuesto en la Tabla 19.

ES 2 273 412 T3

TABLA 19

Implante	% de defecto ¹	Puntuación bioquímica A	Puntuación histológica B	Puntuación de cartílago ²	
				Parcial	Total
Control	86%	0,7	0,0	0,60	
	14%	3,0	4,0	0,98	1,58
Dispositivo de OP-1	62%	2,0	4,0	3,72	
	38%	3,3	6,0	3,53	7,25
Dispositivo de OP-1 + pericondrio	79%	1,2	2,0	2,53	
	21%	5,7	6,0	2,46	7,99
Dispositivo de OP-1 solo	79%	2,0	5,0	5,53	
	21%	2,1	6,0	1,70	4,23
Dispositivo de OP-1 + pericondrio	78%	1,0	2,0	2,34	
	22%	4,2	5,0	2,02	4,36
1. Se dividió el defecto en partes homogéneas, se indica el % 2. Se calcula del modo siguiente: % x (A+B), por ejemplo, 0,86 x (0,7 + 0,0) = 0,60					

La Tabla 19 expone la puntuación de cartílago de defectos condilares tratados durante 4 meses sin OP-1 (control) o con OP-1 más o menos pericondrio en presencia o ausencia de una matriz de colágeno.

A la puntuación bioquímica (A) se le asignó un valor de 0-5 basado en la cromatografía en gel. La puntuación histológica (B) está basada en secciones de plástico no descalcificado en una escala de graduación de 0 a 6.

Conclusión

Los resultados de este estudio confirman que la OP-1 tiene utilidad promotora de cartílago en defectos subcondrales grandes en cabras. Esto indica que la OP-1 es de relevancia clínica en el tratamiento de lesiones grandes de cartílago articular y es particularmente útil para la reparación condral de defectos de esqueletos de soporte de peso causados por traumatismo o enfermedad en mamíferos.

En estudios relacionados, se prevé que otros dispositivos osteogénicos mejorados tales como dispositivos que contienen cola de fibrina darán como resultado la reparación de defectos subcondrales grandes. Además, dicha reparación estará acompañada de regeneración de cartílago articular más estable prístino. Se prevé adicionalmente que la reparación de defecto subcondral ocurrirá a una velocidad acelerada con cantidades reducidas de OP-1 cuando se mezcle con matriz de colágeno y un agente aglutinante tal como CMC, respecto a OP-1 mezclada con colágeno solo. Además, dicha reparación estará acompañada de regeneración de cartílago articular más estable prístino.

G. Reparación de defecto segmentario (tamaño crítico y no crítico) utilizando dispositivos osteogénicos mejorados que comprenden apatitos y/o fosfatos de tricalcio (TCP) y/o matrices de colágeno

Se utilizarán dispositivos mejorados que comprenden una variedad de matrices o mezclas de las mismas para reparar defectos de cúbito segmentarios (tamaño crítico y no crítico) a dosis variables de OP-1 en conejos y perros. Los dispositivos mejorados comprenderán: matriz Pyrost® (Osteo AG, Suiza), un bloque de HAp derivado de hueso bovino; gránulos de HAp al 100% (aproximadamente 300-400 ó 350-450 μm); TCP al 100% (aproximadamente 400 μm) y 50% de HAp/50% de TCP (aproximadamente 400 μm). Otras realizaciones comprenderán una o más de las matrices anteriormente descritas de porosidad apropiada. Una realización particularmente preferida de dispositivo osteogénico mejorado comprenderá matriz Collapat® (Osteo AG, Suiza), una esponja de HAp y colágeno. Otra realización particularmente preferida comprende aproximadamente 0,6 mg de CMC por g de gránulos de HAp o por g de gránulos de 75% de HAp/25% de TCP, especialmente cuando se desea un dispositivo con consistencia de masilla. Se describe anteriormente otra realización preferida que contiene β -TCP y cola de fibrina.

Se espera que los dispositivos mejorados tales como los descritos anteriormente inducirán la reparación de defectos segmentarios, y ciertas realizaciones preferidas harán esto a dosis bajas de OP-1.

H. Formación de hueso utilizando cola de fibrina como agente aglutinante

Se completaron cuatro estudios subcutáneos en rata para evaluar el efecto de la formulación de OP-1 de cola de fibrina sobre la formación de hueso. La cantidad de formación de hueso a 10 μg de OP-1 utilizando las tres fuentes diferentes de cola de fibrina era similar, en el intervalo de 25% a 40% (véanse las tablas 19A-19F). No había una correlación clara entre inflamación y formación de hueso en estos estudios. Los resultados indicaron que la rata reaccionaba diferentemente a la cola de fibrina de diferentes especies. Por ejemplo, la cola de fibrina humana de Tissucol® desencadenaba una respuesta inflamatoria de 2 a 2,7 (véase la Tabla 19A), la cola de fibrina bovina causaba una respuesta inflamatoria de 2 a 3,5 (véanse las Tablas 19B y 19C) y la cola de fibrina de rata tenía la respuesta inflamatoria más baja de 1 a 1,3 (véase la Tabla 19D) en una escala de 0-4. Típicamente, se define una respuesta inflamatoria de 3-4 como grave, y 1-2 se define como leve a media.

TABLA 19A

Datos in vivo de Tissucol®/OP-1

Estudio	OP-1, μg	Peso de mitad extirpada, mg	Ca^{+2} , $\mu\text{g}/\text{mg}$	% de hueso/ histo- logía	Fibrosis (0-4)	Infla- mación (0-4)
	n= 4					
Tissucol®	0	n.d.	<1	0	2,3 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 1,2
Tissucol®	10	16 $\pm$ 6	15 $\pm$ 23	25 $\pm$ 25	3,3 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 0,6
Tissucol®	20	58 $\pm$ 42	39 $\pm$ 9	66 $\pm$ 32	1,8 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 0,8
OP-1	10	29 $\pm$ 21	49 $\pm$ 8	95 $\pm$ 6	0,8 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,6

Se mezclaron 20 μl de OP-1 (10 μg o 20 μg en lactosa al 5%) con 50 μl de fibrinógeno (70-110 mg/ml) y 50 μl de solución de trombina (500 U/ml) antes de implantación subcutánea.

ES 2 273 412 T3

TABLA 19B

Datos in vivo de cola de fibrina bovina

(Implante)	OP-1, µg	Peso de mitad extirpada, mg	Ca ⁺² , µg/mg	% de hueso/ histo- logía	Fibrosis (0-4)	Infla- mación (0-4)
	n= 4					
Cola de fibrina al 6%	0	n.d.				
Cola de fibrina al 6%	10	18 ± 8	25 ± 12	40 ± 43	2,3 ± 0,6	2 ± 1
OP-1	10	58 ± 8	65 ± 10	100 ± 0	0,75 ± 0,5	0 ± 0

Se mezclan 20 µl de OP-1 (10 µg en lactosa al 5%) con 50 µl de fibrinógeno bovino (60 mg/ml) y 50 µl de solución de trombina bovina (300 U/ml) antes de implantación subcutánea.

TABLA 19C

Datos in vivo de cola de fibrina bovina

(Formula- ción)	OP-1, µg	Peso de mitad extirpada, mg	Ca ⁺² , µg/mg	% de hueso/ histo- logía	Fibrosis (0-4)	Infla- mación (0-4)
	n= 4					
Cola de fibrina al 4%	0	n.d.	<3	0	2,25 ± 1	3 ± 1,4
Cola de fibrina al 4%	10	15 ± 7	10 ± 8	24 ± 25	2,5 ± 0,6	3,5 ± 1
OP-1	10	8 ± 5	42 ± 7	88 ± 10	1 ± 0	0 ± 0

ES 2 273 412 T3

Se mezclaron 20 μ l de OP-1 (10 μ g en lactosa al 5%) con 50 μ l de fibrinógeno bovino (40 mg/ml) y 50 μ l de solución de trombina bovina (200 U/ml) antes de implantación subcutánea.

TABLA 19D

Datos in vivo de cola de fibrina de rata

	OP-1, μ g	Mitad extir- pada, mg	Ca ⁺² , μ g/mg	% hueso/ histo- logía	Fibrosis (0-4)	Infla- mación (0-4)	% quistes
	n= 4						
Fibrina de rata	a	32 $\pm$ 13	2 $\pm$ 0,6	13 $\pm$ 19	1,3 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,8	9 $\pm$ 12
Dil. 2	10	38 $\pm$ 23	2 $\pm$ 0,8	23 $\pm$ 21	1,8 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,5	26 $\pm$ 18

Se mezclaron 20 μ l (10 μ g en lactosa al 5%) con 50 μ l de fibrinógeno bovino (40 mg/ml) y 50 μ l de solución de trombina bovina (200 U/ml) antes de implantación subcutánea.

Se completaron otros dos estudios *in vivo* en rata para evaluar el efecto de dispositivos que contienen cola de fibrina y OP-1 sobre la formación de hueso. En el primer estudio, se mezclaron fibrinógeno bovino (50 μ l, Sigma F8630, 10 mg/ml) y trombina bovina (50 μ l, 50 U/ml) con dispositivos de OP-1 justo antes de la implantación subcutánea. Los controles positivos son dispositivos de OP-1 humedecidos con 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato. Los dispositivos de OP-1 se prepararon mezclando 10 μ g de OP-1 en etanol al 47,5%/TFA al 0,01% con 25 mg de colágeno y se liofilizaron durante una noche. Los resultados se muestran en la Tabla 19E. No había diferencias significativas en la formación de hueso entre los dispositivos de OP-1 estándar y los dispositivos de OP-1 combinados con cola de fibrina bovina. También, se observó una respuesta inflamatoria menor a los dispositivos de OP-1/formulación de cola de fibrina comparados con la combinación de OP-1 líquido-cola de fibrina bovina (véanse las Tablas 19B y 19C).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 273 412 T3

TABLA 19E

Datos in vivo de cola de fibrina bovina con dispositivo de OP-1

	OP-1, μg	Mitad extir- pada, mg	Ca ⁺² , μg/mg	% hueso/ histo- logía	Fibrosis (0-4)	Infla- mación (0-4)
	n= 4					
Fibrina + dispositivo de OP-1	0	62 ± 15	20 ± 7	0 ± 0	2,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Fibrina + dispositivo de OP-1	10	123 ± 21	43 ± 11	66 ± 13	1,5 ± 0,6	1,3 ± 0,5
Dispositivo de OP-1	10	144 ± 33	54 ± 5	78 ± 13	1,0 ± 0,8	0,5 ±0,6

En un segundo estudio, se combinaron diferentes concentraciones de Tissucol® con el dispositivo de OP-1 estándar. Es decir, se combinó un dispositivo de OP-1 liofilizado (25 mg de peso total, 10 μg de OP-1) con solución de fibrinógeno humano (50 μl, fibrinógeno 70-110 mg/ml o diluido 2 ó 4 u 8 veces en solución salina tamponada con fosfato) y solución de trombina (50 μl, 500 U/ml o diluido 2 ó 4 u 8 veces en solución salina tamponada con fosfato) inmediatamente antes de la implantación. Los controles positivos son dispositivos de OP-1 humedecidos con 100 μl de solución salina tamponada con fosfato. Los resultados se muestran en la Tabla 19F. No hay diferencias significativas en la formación de hueso entre los dispositivos de OP-1 estándar y los dispositivos de OP-1 combinados con diferente concentración de Tissucol®. También, la concentración de fibrinógeno no tenía ningún efecto significativo sobre la formación de hueso.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 19F

Datos in vivo de Tissucol® con dispositivos de OP-1

	OP-1, µg	Mitad extir- pada, mg	Ca ⁺² , µg/mg	% hueso/ histo- logía	Fibrosis (0-4)	Infla- ción (0-4)
97-0137 (n° 1111)	n= 4					
OP-1 + Tissucol®	10	163 ± 50	37 ± 7	55 ± 30	2,0 ± 0,8	1,8 ± 1,0
OP-1 + Tissucol® diluido 2 veces	10	162 ± 32	34 ± 8	54 ± 13	1,8 ± 1,0	1,8 ± 1,0
OP-1 + Tissucol® diluido 4 veces	10	170 ± 19	41 ± 6,6	69 ± 26	1,5 ± 1,0	1,5 ± 1,0
OP-1 + Tissucol® diluido 8 veces	10	177 ± 23	40 ± 8	55 ± 25	1,8 ± 1,0	1,8 ± 1,0
Dispositivo de OP-1	10	137 ± 43	58 ± 10	84 ± 8	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

En resumen, la propiedad de manejo de dispositivos de OP-1 estándar mejora utilizando cola de fibrina, por ejemplo, y las partículas de colágeno permanecen integradas en la cola. Los datos *in vivo* indicaban que los dispositivos de OP-1 con cola de fibrina promueven la formación de hueso.

I. Reparación de defectos utilizando dispositivos osteogénicos mejorados que contienen cola de fibrina como agente aglutinante

Se utilizarán dispositivos mejorados que contienen cola de fibrina que comprenden una variedad de matrices o mezclas de las mismas para reparar defectos óseos, osteocondrales o condrales a dosis variables de OP-1 en modelos animales reconocidos en la técnica. Ciertas realizaciones de dispositivos preferidos comprenderán: cola de fibrina, colágeno y OP-1. Otras realizaciones de dispositivos preferidos comprenderán: cola de fibrina, β -TCP y OP-1. Finalmente, el ensayo adicional incluirá cualquiera de los materiales de matriz citados anteriormente adecuados para uso con la presente invención.

Se espera que los dispositivos mejorados que contienen cola de fibrina tales como los descritos anteriormente promoverán y acelerarán la formación de hueso en defectos de tamaño crítico y no crítico, fracturas sin unión y fracturas, así como promoverán y acelerarán la reparación de defectos osteocondrales y condrales.

5 J. Reparación de defecto segmentario (tamaño crítico y no crítico) utilizando dispositivo mejorado que contiene cola de fibrina

El siguiente es un estudio experimental comparativo de la eficacia de dispositivos mejorados que contienen cola de fibrina para curar defectos segmentarios (de tamaño crítico y no crítico).

10 Sistema de ensayo

Como se describe anteriormente, se utilizan en este estudio perros mestizos macho adultos criados a propósito. Se presta especial atención a seleccionar animales de tamaño y peso uniformes para limitar la variabilidad de la geometría y carga óseas.

Como se describe anteriormente también, se realiza la cirugía utilizando técnicas asépticas estándar bajo anestesia con gas isoflurano. Se preparan ambos miembros anteriores y se cubren de modo estéril. Se hace una incisión lateral de aproximadamente 2 cm de longitud y se obtiene la exposición del cúbito utilizando disección roma y aguda. Se crea un defecto de tamaño crítico o no crítico en el cúbito medio utilizando una sierra oscilante. Se mantiene el radio para estabilidad mecánica y no se utiliza fijación interna ni externa. Se irriga el sitio con solución salina y se cierran meticulosamente los tejidos blandos en capas alrededor del defecto. Se implanta o inyecta el dispositivo de implante apropiado en el sitio de defecto. Se repite después el procedimiento en el lado contralateral con el implante apropiado.

Se administran a los animales antibióticos intramusculares durante cuatro días después de la cirugía y se toman radiografías anteroposteriores rutinarias inmediatamente después de la cirugía para asegurar una colocación quirúrgica apropiada. Se mantienen los animales en jaulas de recuperación de 91,44 x 121,92 cm hasta que se demostró que soportaban su peso, después de lo cual se transfirieron a carreras y movimiento no restringido permitidos.

Se obtienen semanalmente radiografías de los miembros anteriores hasta las 4 semanas, y después cada dos semanas hasta las 16 semanas en los animales supervivientes utilizando tiempos e intensidades de exposición estandarizados. Se evalúan las radiografías y se comparan con radiografías anteriores para apreciar la calidad y velocidad de curación del defecto. Se evalúan los cambios en la apariencia radiográfica basándose en la presencia y densidad de formación de hueso nuevo, la extensión de la formación de puente en el defecto y la incorporación de las cortezas de hueso del hospedador.

35 Descripción del material de ensayo

Los materiales de implante contienen proteína osteogénica 1 humana recombinante (rhOP-1) en una formulación de tampón acetato, y rhOP-1 en cola de fibrina más colágeno o cola de fibrina más β -TCP. Se comparan las formulaciones de rhOP-1 con controles de sólo vehículo. La formulación de rhOP-1 en tampón acetato consiste en 3,5 mg/ml de OP-1 en un tampón lactosa/acetato suministrado en un volumen de 100 μ l. El control de vehículo consiste en 100 μ l de volumen de tampón lactosa/acetato. Las formulaciones de ensayo contienen rhOP-1/cola de fibrina-colágeno o rhOP-1/cola de fibrina- β -TCP.

45 Diseño experimental

Se crean defectos segmentarios bilaterales de cúbito de tamaño crítico o no crítico en todos los animales. Un grupo de animales recibe una inyección de 0,35 mg de formulación de rhOP-1/acetato en un defecto y el tampón acetato sin rhOP-1 en el defecto contralateral. Otro grupo de animales recibe una inyección de rhOP-1/cola de fibrina-colágeno o rhOP-1/cola de fibrina- β -TCP en un defecto y cola de fibrina- β -TCP o colágeno solo en el defecto contralateral. Se sacrifican los animales en periodos de 4, 8 y 12 semanas después de la operación. Ciertos perros reciben defectos bilaterales sin implante (sólo defecto) y se evalúan en los periodos de 4, 8, 12 y 16 semanas después de la operación.

55 Procedimientos de ensayo

Al final del periodo de ensayo, se sacrifican los animales utilizando una sobredosis de barbiturato intravenoso. Se recogen inmediatamente el cúbito y el radio en bloque y se disponen en gases empapadas con solución salina. Se macrofotografían ambos cúbitos y se toman radiografías de contacto antes de retirar cuidadosamente por disección los tejidos blandos del sitio de defecto. Se utiliza después una sierra enfriada con agua para cortar el cúbito a una longitud uniforme de 9 cm con el defecto centrado en la mitad de la muestra de ensayo para evaluación del ensayo biomecánico.

Si la curación de defecto es suficiente basándose en la manipulación manual, se ensaya la torsión hasta rotura de las muestras en una máquina de ensayo hidráulica de bucle cerrado MTS (Minneapolis, MN) operada por control de impactos a una velocidad de desplazamiento constante de 50 mm/min. Se monta cada extremo del segmento óseo en un manguito de aluminio cilíndrico y se cementa con metacrilato de metilo. Se fija rígidamente un extremo y se gira el otro en sentido contrario a las agujas del reloj. Puesto que el cúbito de perro tiene una ligera curvatura, se montan las muestras excéntricamente para mantener la rotación de la muestra coaxial con la del dispositivo de ensayo. Se aplica

la fuerza de torsión con un brazo de palanca de 6 cm. Se generan curvas de fuerza-desplazamiento angular, a partir de las cuales se obtienen el momento y la deformación angular de rotura, y se calcula la absorción de energía hasta rotura como el área bajo la curva de carga-desplazamiento.

- 5 Se preparan para evaluación histológica tanto las muestras tratadas como no tratadas. Se fijan las muestras individuales mediante inmersión en solución de formalina tamponada al 10% inmediatamente después del ensayo mecánico o después de seccionar en muestras no tratadas. Con una sierra de diamante enfriada con agua, se dividen las muestras biseccionando las muestras a lo largo de su eje largo. Este procedimiento da como resultado dos porciones de cada muestra para preparaciones histológicas, incluyendo seccionamiento rectificado no descalcificado y seccionamiento de microtomo no descalcificado. Se evalúan en las secciones histológicas la calidad de unión, la apariencia y calidad del hueso cortical y reticular, y la remodelación ósea.

Resultados

- 15 Se espera que los dispositivos mejorados que contienen cola de fibrina con alguna de las matrices preferidas anteriormente citadas, tales como colágeno o β -TCP, promoverán la reparación de defectos segmentarios tanto de tamaño crítico como no crítico.

VII. Estudios clínicos humanos: Métodos de uso de dispositivos osteogénicos mejorados

20 A. Reparación de defectos óseos

1. Ensayo 1. Fractura tibial abierta reciente

- 25 Este estudio es un estudio multicéntrico prospectivo aleatorizado de pacientes con fracturas recientes de tibia que requieren intervención quirúrgica en el sitio de fractura.

Introducción

- 30 Actualmente, hay aproximadamente 26 millones de fracturas anualmente en todo el mundo. La mayoría de las fracturas se curan sin complicación y no se consideran “un problema”. Existe sin embargo un “impacto sobre la calidad de vida”, con pacientes que están sin trabajar o impedidos de ocuparse en una actividad normal, que no son capaces de volver a la actividad o, cuando lo hacen, que sufren de dolor persistente. Los pacientes, particularmente en el mundo occidental, esperan cada vez más soluciones a estos problemas.

- 35 El coste del tratamiento de fracturas es sorprendente. En 1988, las fracturas costaron una estimación de 20.000 millones de dólares en los Estados Unidos. El segmento mayor, aproximadamente un 44% o 7.200 millones de dólares, estaba relacionado con el tratamiento hospitalario. En ese año, casi 900.000 personas fueron hospitalizadas por fracturas, con una duración media de estancia de 8,8 días para un total de 7,9 millones de días. Los costes de enfermería domiciliaria fueron los segundos con 2.800 millones de dólares, y la atención hospitalaria ambulatoria el tercero con 1.800 millones de dólares.

- 45 Cuando las ramificaciones económicas de las fracturas se consideran en conjunto con el impacto sobre la calidad de vida, existe verdaderamente la necesidad de mejorar las metodologías de tratamiento, especialmente de fracturas que son consideradas potencialmente problemáticas. Estas son fracturas que, debido a la naturaleza de la lesión o a temas de mitigación del hospedador, pueden requerir intervenciones quirúrgicas adicionales, llevan un tiempo extendido para curar y/o pueden prevenir una recuperación funcional total.

- 50 Por tanto, el estudio descrito a continuación se diseña para investigar dispositivos osteogénicos mejorados como aceleradores de la curación de fracturas recientes en seres humanos y como medio para reducir el potencial de problemas de curación después de la lesión que requieran intervención para potenciar el proceso de curación. Adicionalmente, ciertos pacientes en este estudio se tratarán con dispositivos osteogénicos mejorados como sustitutos de injerto de hueso en pacientes que requieran injerto de hueso después de lesión o en casos de curación retardada.

- 55 Como se contempla en la presente memoria y se describe anteriormente, las realizaciones actualmente preferidas de dispositivos osteogénicos mejorados tienen una consistencia que puede inyectarse a través de una aguja de gran calibre, o pueden disponerse a través de una incisión abierta de tal modo que permanecerán generalmente en el sitio en un entorno con sangre. Además del envasado más convencional, los dispositivos osteogénicos mejorados inyectables pueden envasarse en un aplicador/jeringuilla listo para uso. Pueden añadirse una variedad de boquillas y agujas para personalizar la aplicación. Otras realizaciones se volverán también radioopacas mediante la adición de componentes radioopacos tales como se describen anteriormente.

- 65 Se espera que los dispositivos osteogénicos mejorados de la presente invención (inyectables e implantables) reducirán la incidencia de intervenciones adicionales, acelerarán la velocidad de curación, mejorarán la calidad de vida y acelerarán la vuelta a la actividad normal. Además, se espera que los dispositivos osteogénicos mejorados dados a conocer en la presente memoria se utilizarán en fracturas de todos los huesos largos, clavícula y escápula, para promover la curación, conducir a una incidencia reducida de intervención (incluyendo reoperación), una velocidad de curación aumentada, una tasa de vuelta a la actividad normal aumentada y una morbilidad reducida. En contraposición con

las modalidades de reparación de fractura actualmente disponibles, no hay requisitos mecánicos con los dispositivos mejorados y métodos dados a conocer en la presente memoria.

Diseño del estudio

Los pacientes requerirán tratamiento quirúrgico de fracturas abiertas de tibia adquiridas como consecuencia de un traumatismo. La fractura debe tener el potencial de ser adecuadamente estabilizada en el sitio de fractura para permitir la curación. Los pacientes mostrarán evidencia radiográfica de madurez esquelética.

Tipo de tratamiento

Tipo nº 1: lesión inicial ≤ 7 días del cierre definitivo.

Tipo nº 2: hasta 6 semanas después de la lesión inicial en pacientes que requieren injerto óseo.

Las fracturas de tipo nº 1 son aquellas que no requieren injerto óseo. Los pacientes se asignarán aleatoriamente a una relación 1:1 de tratamiento estándar (desbridamiento del sitio de fractura, reducción y estabilización), que será el grupo de control, frente a tratamiento estándar más dispositivo de OP-1 con y sin un agente aglutinante tal como carboximetilcelulosa (CMC). En ciertos pacientes, variarán las dosificaciones de proteína osteogénica OP-1. Como se describe anteriormente, una formulación actualmente preferida del dispositivo osteogénico mejorado contiene 2,5 mg de OP-1/1.000 g de colágeno/200 mg de CMC. Las dosificaciones de OP-1 variarán desde la mitad del máximo a 4 veces; el contenido de CMC variará de 100 a 300 mg. Como se describe anteriormente también, las variaciones de volúmenes de agente humectante se investigarán por el cirujano/médico a cargo para conseguir la consistencia/configuración deseada del dispositivo. Los pacientes del primer grupo que no están curados 6 meses después del tratamiento se asignarán aleatoriamente de nuevo a una relación 1:1 de injerto óseo (control) frente a OP-1.

Las fracturas de tipo nº 2 son aquellas que requieren injerto óseo. Los pacientes se asignarán aleatoriamente en una relación 1:1 de injerto óseo (control) frente a OP-1. Los pacientes del primer grupo que no están curados a los 6 meses después del tratamiento se cruzarán de injerto de hueso a OP-1 y de OP-1 a injerto de hueso.

Plan de estudio

Se seguirán los pacientes durante un mínimo de 1 año después del tratamiento para valorar la curación, con un seguimiento de 24 meses para valorar el estado.

Las valoraciones de seguimiento se realizarán a las 2 semanas, 4 semanas y cada 4 semanas hasta los 6 meses, y a los 8, 10 y 12 meses después del tratamiento. Todos los pacientes tendrán una valoración de seguimiento adicional a los 24 meses para determinar el estado de salud general y del sitio de fractura. Se realizarán las siguientes valoraciones: cambios en el examen físico; radiografías; valoraciones de dolor clínico; valoraciones clínicas de soporte del peso; valoraciones clínicas de funcionamiento; valoración de la calidad de vida (antes del alta, 6 y 12 meses); y documentación de cualquier intervención para potenciar/promover la curación (quirúrgica y no quirúrgica) y fallos/reemplazos de material.

Se espera que las fracturas tratadas con dispositivos osteogénicos mejorados evidenciarán una velocidad de curación acelerada.

Adicionalmente, se espera que los pacientes tratados con dispositivos osteogénicos mejorados experimentarán al menos los siguientes beneficios adicionales:

- 1) potencial de un tiempo de curación reducido con restauración más rápida del funcionamiento, soporte del peso y ambulación;
- 2) potencial de prevención de unión retardada/mala/nula;
- 3) vuelta a las actividades normales más pronto/menos tiempo de trabajo/escuela perdido;
- 4) ahorro potencial de intervenciones/procedimientos quirúrgicos adicionales para la promoción de la curación;
- 5) menos complicaciones de material; y
- 6) en aquellos pacientes que requieren injerto de hueso, el beneficio de no tener cirugía de sitio secundario para la recogida de hueso con la morbilidad asociada.

2. Ensayo 2: Fractura diafisaria cerrada reciente

Se evaluará la reparación de fracturas diafisarias cerradas recientes en sujetos humanos utilizando dispositivos osteogénicos mejorados. Específicamente, los pacientes se tratarán con dispositivos osteogénicos mejorados inyectables

mediante inyección del dispositivo en el sitio de defecto cerrado. Se prevé que se observará una reparación acelerada del defecto respecto a pacientes no tratados con dispositivos osteogénicos mejorados.

3. Otros ensayos humanos

Se anticipa que los ensayos 1 y 2 como se exponen anteriormente se repetirán utilizando diversas configuraciones de dispositivos osteogénicos mejorados que contienen cola de fibrina. Se prevé adicionalmente que dichos dispositivos promoverán la formación de hueso y, en ciertas realizaciones, acelerarán la reparación de defecto respecto a sujetos no tratados.

B. Reparación de defectos osteocondrales

1. Experimento 1: Osteocondritis disecante

Los modelos de defecto osteocondral apoyan el uso clínico de rhOP-1 para tratar osteocondritis disecante (OD) y defectos por traumatismo. La OD es una enfermedad que da como resultado zonas localizadas de defectos osteocondrales. Una causa de la enfermedad puede ser daño isquémico en la zona localizada, pero su etiología exacta es desconocida. En pacientes con OD, la zona afectada se vuelve avasculares, con cambios posteriores en el cartílago articular superpuesto. Los pacientes que padecen OD en la rodilla experimentan síntomas que incluyen bloqueo de la articulación, dolor localizado, hinchamiento y crepitus retrorrotuliano. Se realiza un experimento que implica pacientes con OD en la rodilla para comparar la capacidad del dispositivo osteogénico mejorado frente a la del dispositivo osteogénico estándar de reparar defectos de OD.

Los métodos actuales conocidos en la técnica para el tratamiento de OD implican el uso de técnicas quirúrgicas altamente invasivas. En la mayoría de los pacientes esqueléticamente maduros con OD, es necesaria cirugía. Las técnicas quirúrgicas requieren taladrado artroscópico de la lesión intacta. Como resultado, los pacientes deben experimentar la administración de anestesia general durante la cirugía. Los pacientes deben tener limitado el movimiento de sus rodillas después de la operación por una abrazadera de inmovilización, y no pueden caminar sin el uso de muletas hasta que se evidencia la curación.

En este estudio, se realizan técnicas menos invasivas para el tratamiento de OD. Las técnicas implican el uso de dispositivo osteogénico mejorado, que se suministra al sitio de defecto mediante inyección. Se compara la actividad del dispositivo osteogénico mejorado en la reparación de OD con la del dispositivo osteogénico estándar.

Se prevé que los pacientes tratados con el dispositivo osteogénico mejorado que contiene cualquiera de las matrices y agentes aglutinantes anteriormente citados mostrarán mayor alivio de síntomas de OD que los tratados con dispositivo osteogénico estándar. Los pacientes tratados con dispositivo osteogénico mejorado experimentarán al menos una mayor reducción del dolor, hinchamiento y bloqueo de la rodilla que los tratados con dispositivo osteogénico estándar, todos los cuales son indicios de mejora y/o reparación del defecto.

Equivalentes

La invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse de las características esenciales de la misma. Por lo tanto, las anteriores realizaciones han de considerarse en todos los aspectos ilustrativas en lugar de limitantes de la invención descrita en la presente memoria. El alcance de la invención está por tanto indicado por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por la descripción anterior y, por lo tanto, todos los cambios que entren dentro del significado de las reivindicaciones se pretenden abarcados en las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para inducir la formación de hueso o cartílago local, que comprende:

(a) una proteína osteogénica;

(b) matriz derivada de un material que no es un polímero sintético; y

(c) un agente aglutinante seleccionado del grupo consistente en carboximetilcelulosa y la sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90.

2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha proteína osteogénica se selecciona del grupo consistente en: OP-1, OP-2, OP-3, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9, BMP10, BMP11, BMP12, BMP15, BMP16, DPP, Vgl, Vgr, proteína 60A, GDF1, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDF10, GDF11 y variantes de secuencia aminoacídica de cada una de las anteriores.

3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha proteína osteogénica se selecciona del grupo consistente en: OP-1, OP-2, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6 y variantes de secuencia aminoacídica de cada una de las anteriores.

4. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha proteína osteogénica comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 70% de homología con los 102-106 aminoácidos C-terminales, incluyendo el dominio de siete cisteínas conservado, de OP-1 humana.

5. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha proteína osteogénica es OP-1.

6. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo comprende al menos dos proteínas osteogénicas diferentes.

7. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha matriz se selecciona del grupo consistente en colágeno, hueso desmineralizado, apatitos, hidroxiapatitos, fosfatos de tricalcio y mezclas de los mismos.

8. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha matriz es colágeno.

9. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha matriz es β -fosfato de tricalcio.

10. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo comprende al menos dos materiales de matriz diferentes.

11. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un agente humectante.

12. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que dicho agente humectante es solución salina.

13. Un dispositivo para inducir la formación de hueso o cartílago local que comprende: aproximadamente 1,25 mg de OP-1 y al menos aproximadamente 180 mg de carboximetilcelulosa por 1.000 mg de matriz de colágeno, en el que dicha carboximetilcelulosa tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90.

14. El dispositivo de la reivindicación 13, que comprende al menos aproximadamente 2,5 mg de OP-1 por 1.000 mg de matriz de colágeno.

15. El dispositivo de la reivindicación 13 ó 14, que comprende al menos aproximadamente 200 mg de carboximetilcelulosa por 1.000 mg de matriz de colágeno.

16. Un dispositivo para inducir la formación de cartílago o hueso local, que comprende una proteína osteogénica y un vehículo, en el que dicho vehículo comprende

(a) una parte (p/p) de agente aglutinante seleccionado del grupo consistente en carboximetilcelulosa y la sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90; y

(b) 50 o menos partes (p/p) de matriz seleccionada del grupo consistente en colágeno, hueso desmineralizado, apatitos, hidroxiapatitos, fosfatos de tricalcio y mezclas de los mismos.

17. El dispositivo de la reivindicación 16, en el que dicho vehículo comprende una parte (p/p) de agente aglutinante y 25 partes (p/p) de matriz.

ES 2 273 412 T3

18. El dispositivo de la reivindicación 16, en el que dicho vehículo comprende una parte (p/p) de agente aglutinante y 10 partes (p/p) de matriz.

5 19. El dispositivo de la reivindicación 16, en el que dicho vehículo comprende una parte (p/p) de agente aglutinante y 5 partes (p/p) de matriz.

20. El dispositivo de la reivindicación 16, en el que dicho vehículo comprende menos de cinco partes (p/p) de matriz.

10 21. Un dispositivo para inducir la formación de hueso o cartílago local, que comprende una proteína osteogénica y un vehículo, en el que dicho vehículo comprende:

15 (a) 10 o menos partes (p/p) de agente aglutinante seleccionado del grupo consistente en carboximetilcelulosa y la sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90; y

(b) una parte (p/p) de matriz seleccionada del grupo consistente en colágeno, hueso desmineralizado, apatitos, hidroxiapatitos, fosfatos de tricalcio y mezclas de los mismos.

20 22. El dispositivo de la reivindicación 21, en el que dicho vehículo comprende menos de 10 partes (p/p) de agente aglutinante.

23. El dispositivo de la reivindicación 14, 17 ó 22, que comprende adicionalmente solución salina.

25 24. Uso de una proteína osteogénica, matriz derivada de un material que no es un polímero sintético y un agente aglutinante seleccionado del grupo consistente en carboximetilcelulosa y la sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90, para la preparación de un dispositivo farmacéutico para inducir la formación de hueso o cartílago local para reparación de sitio de defecto de hueso, cartílago u osteocondral.

30 25. El uso de la reivindicación 24, en el que la formación de hueso local es formación de hueso endocondral.

26. El uso de la reivindicación 24, en el que la formación de hueso local es formación de cartílago articular.

35 27. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que dicho sitio de defecto se selecciona del grupo consistente en: defecto de tamaño crítico, defecto de tamaño no crítico, defecto segmentario sin unión, fractura sin unión, fractura, defecto osteocondral y defecto subcondral.

40 28. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en el que el volumen de la composición farmacéutica proporcionada al sitio de defecto es suficiente para rellenar el sitio de defecto.

29. Un dispositivo para inducir la formación de hueso o cartílago local, que comprende:

45 (a) OP-1;

(b) matriz de colágeno; y

50 (c) carboximetilcelulosa que tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90.

30. Un kit para inducir la formación de hueso o cartílago local utilizando el dispositivo de la reivindicación 1, comprendiendo el kit:

55 (a) un primer recipiente adaptado para albergar una proteína osteogénica y un material de matriz; y

(b) un segundo recipiente adaptado para albergar un agente aglutinante;

60 en el que la proteína osteogénica y el material de matriz se proporcionan en el primer recipiente, y el agente aglutinante se selecciona del grupo consistente en carboximetilcelulosa y la sal de sodio de la misma, en el que el agente aglutinante tiene una viscosidad de aproximadamente 0,01-0,2 Pa.s y un grado de sustitución de 0,65-0,90, y se proporciona en un segundo recipiente.

31. El kit de la reivindicación 30, que comprende adicionalmente un tercer recipiente adaptado para albergar un agente humectante.

65 32. El kit de la reivindicación 30, en el que dicho primer recipiente y segundo recipiente son iguales.

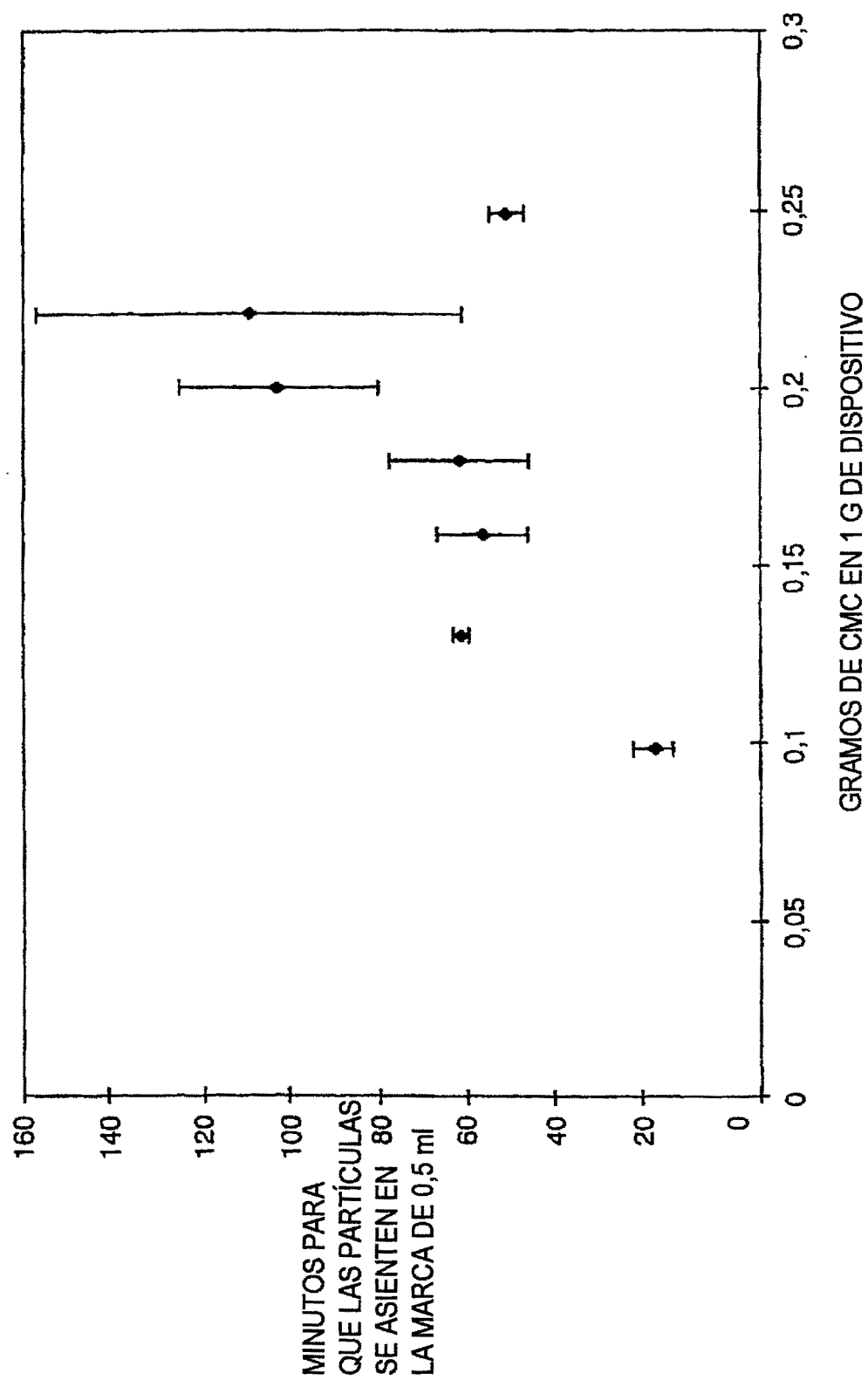


FIG. 1

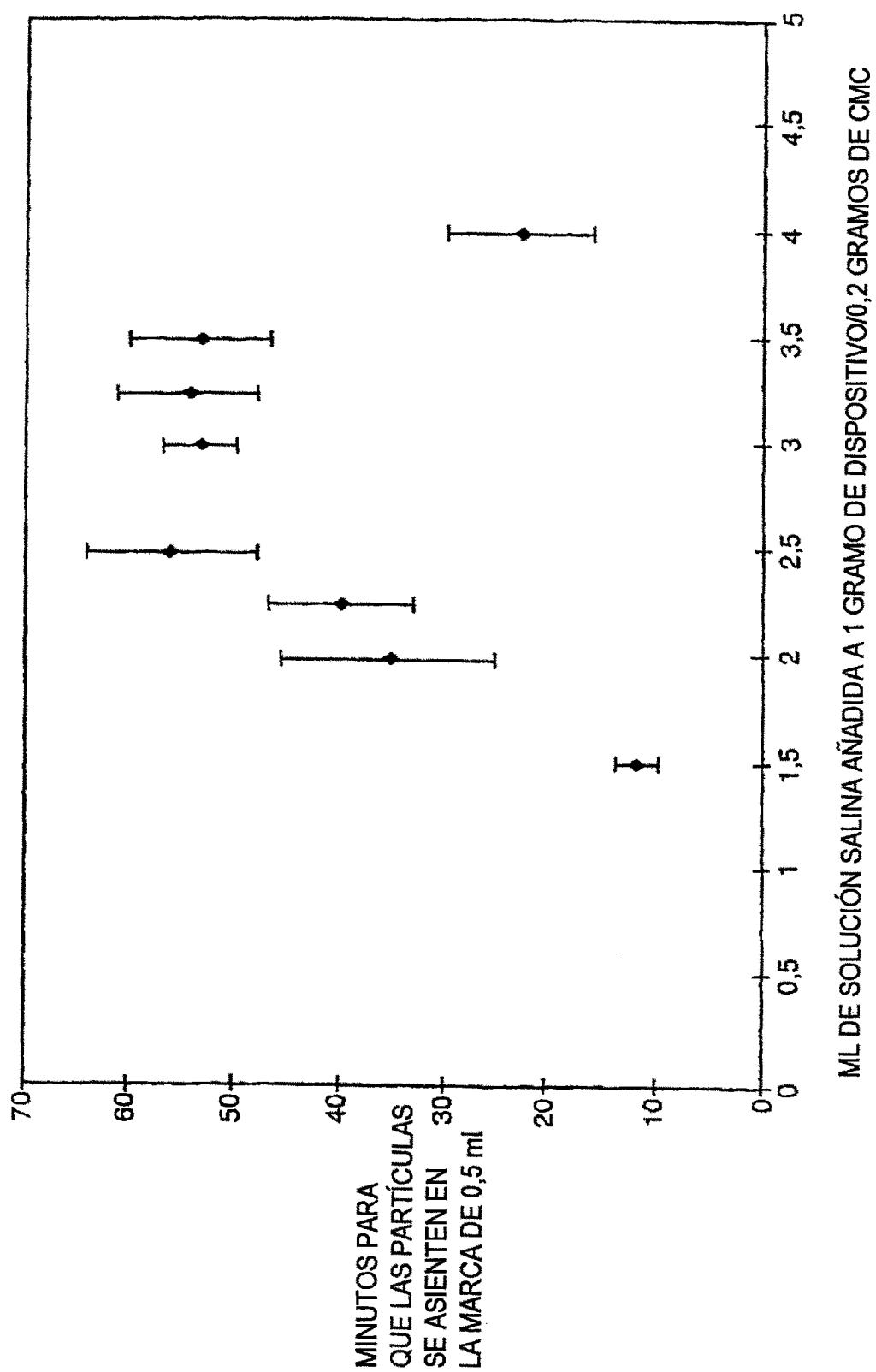


FIG. 2

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: RUEGER, David C.
TUCKER, Marjorie, M.
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: DISPOSITIVOS OSTEOGÉNICOS MEJORADOS Y MÉTODOS DE
USO DE LOS MISMOS PARA LA REPARACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS ENDOCONDRALES Y
OSTEOCONDRALES
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: CREATIVE BIOMOLECULES, INC.
(B) CALLE: 45 SOUTH STREET
(C) CIUDAD: HOPKINTON
(D) ESTADO: MA
20 (E) PAÍS: EE.UU.
(F) CÓDIGO POSTAL: 01748
- (v) FORMA DE LECTURA INFORMÁTICA:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: disquete
(B) ORDENADOR: compatible con PC de IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1.30
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) INFORMACIÓN DE REPRESENTANTE/AGENTE:
- 40 (A) NOMBRE: VITO, CHRISTINE C.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 39.061
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: CRP-137
- 45 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
(A) TELÉFONO: (617) 248-7000
(B) TELEFAX: (617) 248-7100

50 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 1.822 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: HOMO SAPIENS
(B) TIPO DE TEJIDO: hipocampo
- 65 (ix) RASGO:
(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

ES 2 273 412 T3

(B) LOCALIZACIÓN: 49...1341

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: experimental

(D) OTRA INFORMACIÓN: /función= "PROTEÍNA OSTEOGÉNICA", /producto= "OP1", /evidencia= EXPERIMENTAL, /nombre_estándar= "OP1"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 1:

10	GGTGGGGGCC CGGAGCCCGG AGCCCGGGTA GCGCGTAGAG CCGGCGCG ATG CAC GTG Met His Val 1	57
	CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCA Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala 5 10 15	105
15	CCC CTG TTC CTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAC TTC AGC CTG GAC AAC Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn 20 25 30 35	153
20	GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg	201
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 273 412 T3

	40										45										50												
5	CGG	GAG	ATG	CAG	CGC	GAG	ATC	CTC	TCC	ATT	TTG	GGC	TTG	CCC	CAC	CGC															249		
	Arg	Glu	Met	Gln	Arg	Glu	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Pro	His	Arg																	
				55					60					65																			
	CCG	CGC	CCG	CAC	CTC	CAG	GGC	AAG	CAC	AAC	TCG	GCA	CCC	ATG	TTC	ATG															297		
	Pro	Arg	Pro	His	Leu	Gln	Gly	Lys	His	Asn	Ser	Ala	Pro	Met	Phe	Met																	
			70					75					80																				
10	CTG	GAC	CTG	TAC	AAC	GCC	ATG	GCG	GTG	GAG	GAG	GGC	GGC	GGG	CCC	GGC															345		
	Leu	Asp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly																	
		85					90					95																					
	GGC	CAG	GGC	TTC	TCC	TAC	CCC	TAC	AAG	GCC	GTC	TTC	AGT	ACC	CAG	GGC															393		
	Gly	Gln	Gly	Phe	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Gln	Gly																	
		100				105					110					115																	
15	CCC	CCT	CTG	GCC	AGC	CTG	CAA	GAT	AGC	CAT	TTC	CTC	ACC	GAC	GCC	GAC															441		
	Pro	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	His	Phe	Leu	Thr	Asp	Ala	Asp																	
					120					125					130																		
	ATG	GTC	ATG	AGC	TTC	GTC	AAC	CTC	GTG	GAA	CAT	GAC	AAG	GAA	TTC	TTC															489		
	Met	Val	Met	Ser	Phe	Val	Asn	Leu	Val	Glu	His	Asp	Lys	Glu	Phe	Phe																	
				135					140					145																			
20	CAC	CCA	CGC	TAC	CAC	CAT	CGA	GAG	TTC	CGG	TTT	GAT	CTT	TCC	AAG	ATC															537		
	His	Pro	Arg	Tyr	His	His	Arg	Glu	Phe	Arg	Phe	Asp	Leu	Ser	Lys	Ile																	
			150					155					160																				
	CCA	GAA	GGG	GAA	GCT	GTC	ACG	GCA	GCC	GAA	TTC	CGG	ATC	TAC	AAG	GAC																585	
	Pro	Glu	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg	Ile	Tyr	Lys	Asp																	
			165				170					175																					
25	TAC	ATC	CGG	GAA	CGC	TTC	GAC	AAT	GAG	ACG	TTC	CGG	ATC	AGC	GTT	TAT															633		
	Tyr	Ile	Arg	Glu	Arg	Phe	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Ile	Ser	Val	Tyr																	
			180			185					190				195																		
	CAG	GTG	CTC	CAG	GAG	CAC	TTG	GGC	AGG	GAA	TCG	GAT	CTC	TTC	CTG	CTC															681		
	Gln	Val	Leu	Gln	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	Phe	Leu	Leu																	
					200				205					210																			
30	GAC	AGC	CGT	ACC	CTC	TGG	GCC	TCG	GAG	GAG	GGC	TGG	CTG	GTG	TTT	GAC															729		
	Asp	Ser	Arg	Thr	Leu	Trp	Ala	Ser	Glu	Glu	Gly	Trp	Leu	Val	Phe	Asp																	
				215					220					225																			
	ATC	ACA	GCC	ACC	AGC	AAC	CAC	TGG	GTG	GTC	AAT	CCG	CGG	CAC	AAC	CTG															777		
	Ile	Thr	Ala	Thr	Ser	Asn	His	Trp	Val	Val	Asn	Pro	Arg	His	Asn	Leu																	
			230					235					240																				
	GGC	CTG	CAG	CTC	TCG	GTG	GAG	ACG	CTG	GAT	GGG	CAG	AGC	ATC	AAC	CCC															825		
	Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Gly	Gln	Ser	Ile	Asn	Pro																	
			245			250					255																						
40	AAG	TTG	GCG	GGC	CTG	ATT	GGG	CGG	CAC	GGG	CCC	CAG	AAC	AAG	CAG	CCC															873		
	Lys	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Arg	His	Gly	Pro	Gln	Asn	Lys	Gln	Pro																	
			260			265					270				275																		
	TTC	ATG	GTG	GCT	TTC	TTC	AAG	GCC	ACG	GAG	GTC	CAC	TTC	CGC	AGC	ATC															921		
	Phe	Met	Val	Ala	Phe	Phe	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	His	Phe	Arg	Ser	Ile																	
					280					285				290																			
45	CGG	TCC	ACG	GGG	AGC	AAA	CAG	CGC	AGC	CAG	AAC	CGC	TCC	AAG	ACG	CCC															969		
	Arg	Ser	Thr	Gly	Ser	Lys	Gln	Arg	Ser	Gln	Asn	Arg	Ser	Lys	Thr	Pro																	
				295					300					305																			
	AAG	AAC	CAG	GAA	GCC	CTG	CGG	ATG	GCC	AAC	GTG	GCA	GAG	AAC	AGC	AGC															1017		
	Lys	Asn	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Asn	Val	Ala	Glu	Asn	Ser	Ser																	
				310				315					320																				
50	AGC	GAC	CAG	AGG	CAG	GCC	TGT	AAG	AAG	CAC	GAG	CTG	TAT	GTC	AGC	TTC															1065		
	Ser	Asp	Gln	Arg	Gln	Ala	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe																	
				325			330					335																					
	CGA	GAC	CTG	GGC	TGG	CAG	GAC	TGG	ATC	ATC	GCG	CCT	GAA	GGC	TAC	GCC															1113		
	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala																	
				340		345					350				355																		
55	GCC	TAC	TAC	TGT	GAG	GGG	GAG	TGT	GCC	TTC	CCT	CTG	AAC	TCC	TAC	ATG															1161		
	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met																	
					360				365						370																		
60	AAC	GCC	ACC	AAC	CAC	GCC	ATC	GTG	CAG	ACG	CTG	GTC	CAC	TTC	ATC	AAC															1209		

ES 2 273 412 T3

Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn
 375 380 385
 CCG GAA ACG GTG CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACG CAG CTC AAT GCC 1257
 Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala
 390 395 400
 ATC TCC GTC CTC TAC TTC GAT GAC AGC TCC AAC GTC ATC CTG AAG AAA 1305
 Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys
 405 410 415
 TAC AGA AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCCTCC 1351
 Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430
 GAGAATTCAG ACCCTTTGGG GCCAAGTTTT TCTGGATCCT CCATTGCTCG CCTTGGCCAG 1411
 GAACCAGCAG ACCAACTGCC TTTTGTGAGA CCTTCCCCTC CCTATCCCCA ACTTTAAAGG 1471
 TGTGAGAGTA TTAGGAAACA TGAGCAGCAT ATGGCTTTTG ATCAGTTTTT CAGTGGCAGC 1531
 ATCCAATGAA CAAGATCCTA CAAGCTGTGC AGGCAAAACC TAGCAGGAAA AAAAAACAAC 1591
 GCATAAAGAA AATGGCCGG GCCAGGTCAT TGGCTGGGAA GTCTCAGCCA TGCACGGACT 1651
 CGTTTCCAGA GGTAAATTATG AGCGCCTACC AGCCAGGCCA CCCAGCCGTG GGAGGAAGGG 1711
 GGGCTGGCAA GGGGTGGGCA CATTGGTGTG TGTGCGAAAG GAAAATTGAC CCGGAAGTTC 1771
 CTGTAATAAA TGTCACAATA AAACGAATGA ATGAAAAAAA AAAAAAAAAA A 1822

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 431 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 2

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30
 Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45
 Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60
 Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
 85 90 95
 Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110
 Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125
 Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140
 Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160
 Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175
 Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190
 Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
 195 200 205
 Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu

ES 2 273 412 T3

210 215 220
 Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
 225 230 235 240
 His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
 245 250 255
 Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
 260 265 270
 Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
 275 280 285
 Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser
 290 295 300
 Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu
 305 310 315 320
 Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr
 325 330 335
 Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu
 340 345 350
 Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn
 355 360 365
 Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His
 370 375 380
 Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln
 385 390 395 400
 Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile
 405 410 415
 Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 102 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: proteína

(B) LOCALIZACIÓN: 1...102

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca= OPX, /nota= “en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se definen en la memoria descriptiva.”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 3:

Cys Xaa Xaa His Glu Leu Tyr Val Xaa Phe Xaa Asp Leu Gly Trp Xaa
 1 5 10 15
 Asp Trp Xaa Ile Ala Pro Xaa Gly Tyr Xaa Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Cys Xaa Phe Pro Leu Xaa Ser Xaa Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Xaa Gln Xaa Leu Val His Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Val Pro Lys
 50 55 60
 Xaa Cys Cys Ala Pro Thr Xaa Leu Xaa Ala Xaa Ser Val Leu Tyr Xaa
 65 70 75 80
 Asp Xaa Ser Xaa Asn Val Xaa Leu Xaa Lys Xaa Arg Asn Met Val Val
 85 90 95
 Xaa Ala Cys Gly Cys His
 100

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 97 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: proteína

(B) LOCALIZACIÓN: 1...97

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca= sec.-genérica 7, /nota= "en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se definen en la memoria descriptiva".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 4:

```

Leu Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1      5      10      15
Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Pro
 20      25      30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35      40      45
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Cys Xaa Pro
 50      55      60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65      70      75      80
Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa Xaa Cys Xaa Cys
 85      90      95
Xaa
    
```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 102 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: proteína

(B) LOCALIZACIÓN: 1...102

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca= sec.-genérica-8, /nota= "en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se definen en la memoria descriptiva."

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 5:

ES 2 273 412 T3

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly
 20 25 30
 Xaa Cys Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Ala
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Cys Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val
 85 90 95
 Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 100

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 97 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: proteína
- (B) LOCALIZACIÓN: 1...97
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /marca= sec.-genérica-9, /nota= “en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se definen en la memoria descriptiva.”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 6:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Pro
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys
 85 90 95
 Xaa

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 102 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: proteína

ES 2 273 412 T3

(B) LOCALIZACIÓN: 1...102

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca= sec.-genérica-10, /nota= “en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se definen en la memoria descriptiva.”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 7:

```

10      Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        1      5      10      15
        Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly
        20      25      30
        Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        35      40      45
15      Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        50      55      60
        Xaa Xaa Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        65      70      75      80
20
        Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        85      90      95
25      Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
        100

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: proteína

(B) LOCALIZACIÓN: 1...5

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se definen en la memoria descriptiva.”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 8:

```

50      Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
        1      5

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: proteína

(B) LOCALIZACIÓN: 1...5

ES 2 273 412 T3

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “en la que cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se definen en la memoria descriptiva.”

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 9:

5

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65