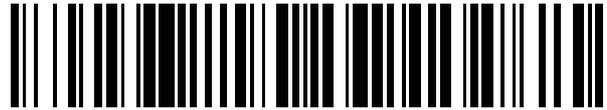


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 247 423**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 24/02 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2002 E 02803343 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **09.09.2015 EP 1448246**

54

Título: **Método de producción de un dispositivo recubierto homogéneamente que tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras**

30

Prioridad:

19.11.2001 EP 01127573

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:

30.12.2015

73

Titular/es:

**SCIL TECHNOLOGY GMBH (100.0%)
FRAUNHOFERSTRASSE 15
82152 MARTINSRIED, DE**

72

Inventor/es:

**KOHNERT, ULRICH;
PÖHLING, SYLKE;
HELLERBRAND, KLAUS y
HAPPERSBERGER, PETER**

74

Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

DESCRIPCIÓN

Método de producción de un dispositivo recubierto homogéneamente que tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras

5 La presente invención se refiere a un dispositivo de producción de un dispositivo que tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras *in vivo*.

10 Se ha demostrado que diversos fosfatos de calcio, tales como el fosfato tricálcico beta ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (FTC beta), fosfato tricálcico alfa (FTC alfa) e hidroxiapatita (HA) han demostrado ser eficaces como materiales de sustitución ósea. El FTC beta, por ejemplo, es adecuado como material granulado y en trozos (bloques) para el tratamiento de los defectos óseos. Los materiales de sustitución ósea que contienen fosfato de calcio se utilizan normalmente cuando la regeneración del hueso ya no es posible o solo es posible con dificultades. Además, los materiales de sustitución ósea se utilizan cuando la formación de hueso adicional es un requisito previo para la fijación posterior de un implante. Los fosfatos de calcio muestran un efecto osteoconductor, es decir, representan una estructura inerte que facilita la migración de las células desde el hueso circundante. Sin embargo, la presencia de huesos o de células mesenquimatosas diferentes es una condición previa para la nueva formación de los huesos. El efecto de los fosfatos de calcio puede aumentarse significativamente añadiendo esquirlas óseas. Los huesos no son solo osteoconductores, sino también osteogénicos (estimulación de las células óseas para la neosíntesis de material óseo) y osteoinductores, es decir, producen la transformación de células madre mesenquimatosas no diferenciadas en osteoblastos y condrocitos. Por motivos de seguridad, se prefieren las esquirlas óseas autógenas para las preparaciones alogénicas o xenogénicas. Sin embargo, la producción de huesos autogénicos siempre implica una segunda intervención quirúrgica que, en muchos casos, no es aceptada por el paciente.

15 Una alternativa al uso de huesos autogénicos es el uso de factores de crecimiento y diferenciación óseos específicos tales como GDF-5 o diferentes proteínas morfogenéticas óseas (PMO). Estos factores proteicos tienen un efecto osteoinductor que, sin embargo, solo pueden ejercer si se utilizan en forma inmovilizada. En la bibliografía se describen fosfatos de calcio, colágeno y colágeno mineralizado (fosfato de calcio que contiene colágeno) como soportes (hidroxiapatita y FTC beta) (Hotz, 1994), apatita hidroxílica procedente de extractos de algas (Gao, 1996), extractos óseos (Gombotz, 1996) y colágeno (Friess, 1999). Los análisis de la potencia de los soportes recubiertos, que están descritos en la bibliografía, no presentan un aspecto uniforme, sino que muestran variaciones significativas que son una consecuencia del tipo de soporte seleccionado o del método de recubrimiento (Terheyden et al. (1997)). Se describen varios métodos. En el documento WO 98/21972, se logra el recubrimiento mediante la precipitación rápida de GDF-5 sobre FTC beta, disolviendo primero el GDF-5 en un disolvente orgánico y precipitándolo después añadiendo agua. Sin embargo, debido a la toxicidad de muchos disolventes, no se prefiere un procedimiento de este tipo para la producción de composiciones farmacéuticas. Lind et al. (1996) llevan a cabo el recubrimiento de diversos materiales cerámicos de fosfato de calcio en presencia de gelatina (obtenida normalmente a partir de huesos de animales bovinos o cerdos) como proteína de protección. Sin embargo, debido al aumento del riesgo de infección, debe evitarse el uso de sustancias animales para la producción de composiciones farmacéuticas y especialidades farmacéuticas. Friess et al. (1999) y Gao et al. (1996) describen el recubrimiento de colágenos con PMO-2. Sin embargo, debido a la baja resistencia a la compresión de los colágenos, tales soportes no son adecuados para todas las indicaciones. Esto se aplica particularmente a las indicaciones en las que el hueso recién formado tiene que sostener una carga de presión posterior. Además, hasta ahora las calidades farmacéuticas del colágeno solo están disponibles a partir de fuentes animales. El documento DE 196 47 853 describe implantes óseos que comprenden una matriz de fosfato de calcio recubierta con proteína (por ejemplo, PMO, GDF). Dichos implantes se utilizan para el aumento óseo tras defectos artificiales, defectos óseos tras la extirpación de quistes o tumores, para tratar enfermedades del disco intervertebral y para la elevación del seno.

25 El documento US 5.385.887 describe formulaciones de proteínas morfogenéticas óseas que se dice que han mejorado la solubilidad y/o la estabilidad. Se describe que dicha mejora de la solubilidad y estabilidad se logra utilizando una composición de sacarosa, glicina y ácido glutámico.

El documento US 5.422.340 describe discos de fosfato tricálcico impregnados con FCT-beta 1 y Alam et al., Biomaterials 22 (2001), 1643-1651 describe materiales cerámicos de fosfato de calcio bifásico impregnados con proteína morfogenética ósea humana recombinante.

30 Por tanto, aunque diversos artículos describen el uso de soportes recubiertos con proteína para el aumento óseo, no se dispone de métodos eficaces y fiables para la fabricación y la utilización para el tratamiento de los defectos óseos, aunque no obstante son sumamente deseables.

Por tanto, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar métodos de producción de un dispositivo para tratar de manera eficaz y fiable defectos óseos que comprendan el aumento óseo.

35 El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método de producción de un dispositivo que tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras *in vivo* que comprende un soporte que contiene fosfato de calcio y una proteína osteoinductora, que bien es GDF-5 o PMO-2 y en el que dicho soporte está completamente recubierto

con dicha proteína osteoinductora y en el que cantidades esencialmente idénticas de dicha proteína osteoinductora están presentes en todas y cada una de las zonas de la superficie de dicho soporte, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 (a) proporcionar una disolución que comprende proteína osteoinductora disuelta y un tampón que contiene un ácido débil que tiene un valor de pK entre 3 y 7, preferiblemente entre 4 y 6, aunque dicha disolución carece de sustancias tóxicas, manteniendo dicho tampón dicha proteína disuelta durante un tiempo suficiente para permitir el recubrimiento homogéneo de un soporte que contiene fosfato de calcio cuando se pone en contacto con dicho soporte y pudiendo equilibrar dicho tampón el incremento de pH producido por el contacto de la disolución tampón con el soporte de fosfato de calcio de modo que la proteína no precipita inmediatamente debido a dicho incremento de pH;
- 10 (b) poner en contacto la disolución de la etapa (a) con un soporte que contiene fosfato de calcio;
- (c) permitir el recubrimiento homogéneo de la superficie de dicho soporte con dicha proteína disuelta; y
- (d) secar el soporte recubierto obtenido en la etapa (c).

15 En tanto que las realizaciones o características específicas de la presente descripción no están o ya no están cubiertas por la redacción o redacción de las reivindicaciones, esto no es una elección ni tampoco una exención con respecto a realizaciones que actúan de forma idéntica.

20 El término “dispositivo”, tal como se utiliza según la presente invención, se refiere a una entidad que comprende al menos dos componentes. Uno de dichos componentes es una matriz de soporte. Preferiblemente, dicha matriz de soporte consiste en materiales cerámicos inorgánicos. Dichos materiales cerámicos tienen una superficie particularmente elevada debido a la presencia de macroporos y microporos. Preferiblemente, dichos macroporos tienen un diámetro de aproximadamente 100 a 400 nm, mientras que los microporos tienen un diámetro inferior a 10 nm. Más preferiblemente, dicho soporte es un fosfato de calcio tal como se hace referencia más adelante.

25 Otro componente de dicho dispositivo es una proteína o polipéptido que tiene propiedades osteoinductoras (es decir, GDF-5 o PMO-2), tal como se explicará en detalle más adelante. La proteína o polipéptido se inmoviliza sobre la superficie del soporte. Las proteínas y los polipéptidos osteoinductores aplicados según la presente invención tienen una afinidad particularmente alta por las matrices de soporte inorgánicas, tales como el fosfato de calcio. Preferiblemente, la unión de dicha proteína o polipéptido al soporte es reversible. De este modo, se permite la disolución de dicha proteína una vez que el dispositivo se ha llevado a un entorno adecuado *in vivo*, tal como una cavidad ósea. Preferiblemente, dicha disolución de las proteínas es de liberación lenta, lo que permite la difusión de la proteína en el tejido que rodea al dispositivo. Por tanto, el dispositivo sirve como una fuente *in vivo* para proteínas osteoinductoras que se liberan lentamente y que pueden distribuirse eficazmente de esta manera en los tejidos circundantes o tener un efecto en la forma inmovilizada.

30

35 Además, el dispositivo puede comprender excipientes adicionales. Estos excipientes sirven para la estabilización de la proteína, por ejemplo, sacáridos, aminoácidos, polioles o detergentes, o para el mantenimiento del pH, por ejemplo, sustancias tampón. Los excipientes preferidos englobados por esta invención se tratan en detalle más adelante.

40 El término “osteoinductor” se refiere a la capacidad de transformación de las células madre mesenquimatosas en osteoblastos y condrocitos. Un requisito previo para la osteoinducción es una señal que se distribuye por el dispositivo hacia los tejidos circundantes en los que los precursores de osteoblastos mencionados anteriormente llegan a activarse. Osteoinducción, tal como se utiliza en el presente documento, engloba la diferenciación de las células mesenquimatosas en las células precursoras óseas, los osteoblastos. Además, la osteoinducción también comprende la diferenciación de dichos osteoblastos en osteocitos, las células maduras del hueso. Además, también se engloba en la osteoinducción, la diferenciación de las células mesenquimatosas en condrocitos. En particular, en los huesos largos, los condroblastos y los condrocitos que se alojan en el pericondrio del hueso también pueden diferenciarse en osteocitos. Por tanto, la osteoinducción requiere la diferenciación de células no diferenciadas o menos diferenciadas en osteocitos que pueden formar el hueso. Por tanto, un requisito previo para la osteoinducción es una señal que se distribuye por el dispositivo hacia los tejidos circundantes, en los que residen normalmente los precursores de los osteocitos mencionados anteriormente. Tal como se ha descrito anteriormente, las proteínas osteoinductoras utilizadas según la presente invención se liberan lentamente desde el dispositivo tras el implante y se distribuyen eficazmente en los tejidos circundantes. Además, las proteínas y los polipéptidos englobados por la presente invención tienen propiedades osteoinductoras *in vivo*. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica que la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (FCT- β) engloba miembros que tienen propiedades osteoinductoras. Los miembros individuales de dicha superfamilia de FCT- β que tienen propiedades osteoinductoras particularmente buenas se enumeran más adelante. En conclusión, las proteínas osteoinductoras del dispositivo de la presente invención tras haberse liberado del soporte sirven como señal osteoinductora para los precursores de los osteocitos del tejido que rodea el sitio de implantación del dispositivo.

55

El término “osteogénico” describe la síntesis de hueso nuevo por los osteoblastos. Según la presente invención, el hueso preexistente en los alrededores del sitio de implantación del dispositivo crece en el dispositivo utilizando la estructura del dispositivo como una matriz sobre la que pueden adherirse los osteocitos.

5 El término “soporte” engloba matrices tridimensionales, tales como los materiales cerámicos a los que se hizo referencia anteriormente. Además, tal como se describió anteriormente, dicho soporte tiene preferiblemente una superficie ampliada debido a la formación de macro y microporos. El material de soporte tiene una alta afinidad por las proteínas osteoinductoras, aunque no obstante permite la liberación de dichas proteínas *in vivo*. Según la presente invención, dicho soporte es, preferiblemente, un fosfato de calcio. El soporte comprendido en el dispositivo de la invención puede llevarse a una forma adecuada para la administración del dispositivo *in vivo*, tal como 10 materiales cerámicos en forma de gránulos, bloques, cubos, cementos y pastas amorfas. Además, el soporte puede recubrirse sobre una superficie metálica.

El término “fosfato de calcio” engloba composiciones que comprenden iones calcio, iones fosfato y, opcionalmente, otros iones o átomos que son adecuados para el soporte de la presente invención. Los fosfatos de calcio, tal como se utilizan según la presente invención, son cristales que tienen una estructura tridimensional adecuada para el dispositivo de la presente invención, tal como se explicó anteriormente. Más adelante se facilita una lista de fosfatos de calcio preferidos y bien conocidos. 15

El término “proteína osteoinductora”, tal como se explicó anteriormente, se refiere a miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (FCT- β) que tienen propiedades osteoinductoras, tal como el factor de crecimiento y diferenciación 5; véase más adelante. Estas proteínas osteoinductoras muestran una alta afinidad por los fosfatos de calcio. El fosfato de calcio puede estar presente, por ejemplo, en la forma de FTC beta, FTC ALFA o hidroxiapatita. Dependiendo de los macroporos (100 – 400 nm) y los microporos (< 10 nm), estos minerales inorgánicos absorben disoluciones acuosas. Durante este proceso, proteínas tales como GDF-5 o PMO-2 se adsorben fuertemente sobre la superficie del soporte. Una condición previa importante para este proceso es una solubilidad suficiente de las proteínas en la disolución de recubrimiento. 20

El término “recubierto homogéneamente” significa que la superficie del soporte está totalmente recubierta con dicha proteína osteoinductora, por lo que están presentes cantidades esencialmente idénticas de proteína en todas y cada una de las zonas de la superficie de dicho soporte. Un soporte recubierto homogéneamente según esta invención muestra, preferiblemente, una cobertura máxima con la proteína osteoinductora sobre su superficie. El recubrimiento homogéneo es un requisito previo para la liberación eficaz y la distribución homogénea y para la actividad de la proteína osteoinductora en el tejido que rodea al sitio de implantación. Además, ha de entenderse que las proteínas osteoinductoras no están agregadas y están parcial o totalmente inactivadas debido a precipitación o a microprecipitación, en su lugar, el recubrimiento homogéneo debe lograr la unión de proteínas no agregadas y biológicamente activas. Dicho recubrimiento homogéneo puede lograrse mediante el método de la presente invención y se describe en los ejemplos adjuntos. Además, se describen medios y métodos para controlar el recubrimiento homogéneo, la cuantificación y la caracterización de la proteína inmovilizada en los ejemplos adjuntos. 25 30 35

Ventajosamente, se ha encontrado según la presente invención que el dispositivo descrito anteriormente de la presente invención tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras mejoradas y fiables *in vivo* tras la implantación en un sujeto, preferiblemente un ser humano. Un requisito previo para un dispositivo de este tipo es un recubrimiento homogéneo del soporte con una proteína osteoinductora, no agregada y biológicamente activa. Se ha encontrado que incluso la agregación producida por microprecipitación conduce a un recubrimiento no homogéneo, dando como resultado al menos la disminución significativa de las propiedades osteoinductoras, tal como se describe para otros dispositivos en la técnica anterior, por ejemplo, en el documento WO98/21972. Además, se ha encontrado que pueden evitarse efectos secundarios no deseados, tales como reacciones tóxicas y de inflamación del sujeto tras la implantación mediante el dispositivo de la presente invención que carece de impurezas tóxicas o contaminantes infecciosos. En particular, el uso de proteínas de protección (tales como por ejemplo, gelatina) como mediadores de solubilidad es totalmente innecesario para el dispositivo de la presente invención. 40 45

La presente invención se refiere a un método para la producción de un dispositivo de la presente invención que tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras *in vivo*, que comprende las etapas de:

50 (a) proporcionar una disolución que comprende proteína osteoinductora disuelta y un tampón que contiene un ácido débil que tiene un valor de pK entre 3 y 7, preferiblemente entre 4 y 6, aunque dicha disolución carece de sustancias tóxicas, manteniendo dicho tampón dicha proteína disuelta durante un tiempo suficiente para permitir el recubrimiento homogéneo de un soporte que contiene fosfato de calcio cuando se pone en contacto con dicho soporte y pudiendo equilibrar dicho tampón el incremento de pH producido por el contacto de la disolución tampón con el soporte de fosfato de calcio de modo que la proteína no precipita inmediatamente debido a dicho incremento de pH; 55

(b) poner en contacto la disolución de la etapa (a) con un soporte que contiene fosfato de calcio;

(c) permitir el recubrimiento homogéneo de la superficie de dicho soporte con dicha proteína disuelta; y

(d) secar el soporte recubierto obtenido en la etapa (c).

Las definiciones de los términos utilizados para describir el dispositivo de la invención se aplican, cambiando lo que se deba cambiar, al método anteriormente mencionado y a los métodos a los que se hace referencia más adelante.

El término “secar” engloba los medios para eliminar líquidos, tal como una disolución tampón en exceso, que todavía están presentes tras recubrir el soporte con la proteína osteoinductora. Preferiblemente, el secado se logra mediante secado a vacío o liofilización.

El término “tampón que mantiene dicha proteína disuelta durante un tiempo para permitir el recubrimiento homogéneo” se refiere a un tampón en el que las proteínas osteoinductoras pueden disolverse eficazmente y que puede equilibrar el aumento de pH producido al poner en contacto la disolución tampón con el soporte de fosfato de calcio, de manera que la proteína no precipite inmediatamente, por ejemplo, debido a un aumento de pH. La persona experta en la técnica puede componer dicho tampón basándose en la solubilidad de la proteína osteoinductora que depende del pH, la fuerza iónica y la influencia del soporte sobre dichos parámetros tras poner en contacto el soporte con dicha disolución tampón. Según la presente invención, se ha encontrado que un tampón adecuado para el método de la presente invención comprende una sustancia tampón en una baja concentración, un ácido débil, un alcohol o un sacárido.

Una ventaja de la presente invención es el recubrimiento homogéneo que se logra mediante la limitación del aumento del pH de la disolución de recubrimiento durante el proceso de recubrimiento. El proceso descrito permite la distribución homogénea y la inmovilización de la proteína osteoinductora en dicho soporte. Además, la eficacia del proceso de recubrimiento se mantiene mediante el soporte debido a las fuerzas capilares que resultan de la presencia de numerosos macro y microporos que debido a su tamaño pueden absorber la disolución en los poros. Además, a diferencia de otros métodos descritos en la técnica, por ejemplo, en el documento WO98/21972, la proteína o polipéptido osteoinductor se aplica, según el método de la presente invención, mediante la unión a los soportes, en lugar de mediante precipitación o microprecipitación. Estos hallazgos en que se basa la presente invención, demuestran que la agregación de las proteínas puede evitarse mediante el uso de aditivos adecuados, tal como se describe en el presente documento. Una condición previa importante es el conocimiento de la solubilidad de la proteína osteoinductora dependiente del valor de pH, la fuerza iónica y las superficies presentes. La ralentización del aumento del pH producido por el contacto de la disolución de recubrimiento con los fosfatos de calcio que reaccionan de una manera alcalina, en particular, desempeña un importante papel durante el recubrimiento. Ventajosamente, mediante el método de la presente invención tiene lugar la distribución uniforme a través de la superficie interna del material de soporte y la capacidad de unirse a las superficies antes de una precipitación inducida por el pH de dicha proteína. Podría demostrarse que el aumento de pH que se produce durante el recubrimiento de los fosfatos de calcio se decelera suficientemente mediante el uso de un ácido débil, tal como el ácido acético. Además, la adición de combinaciones orgánicas tales como sacarosa demuestra ser adicionalmente ventajosa. Además, una fuerza iónica baja es una condición previa importante para el recubrimiento satisfactorio. Además, las pruebas demuestran que también el volumen de la disolución de recubrimiento tiene un efecto considerable sobre la calidad del recubrimiento. Finalmente, el método de la presente invención se dirige a evitar disolventes orgánicos perjudiciales, tales como el acetonitrilo, que se utilizan habitualmente en los métodos descritos en la técnica. Al evitar dichos disolventes orgánicos perjudiciales, pueden mejorarse el perfil de seguridad y la tolerancia local del dispositivo de la presente invención.

En una realización preferida del método de la invención, dicho tampón tiene una concentración de tampón inferior a 100 mmol/l, inferior a 50 mmol/l o inferior a 20 mmol/l.

El tampón contiene un ácido débil. El término “ácido débil” se refiere a compuestos orgánicos o inorgánicos que contienen al menos un átomo de hidrógeno unido de manera ionogénica. Los ácidos débiles son bien conocidos en la técnica y se describen en los libros de texto habituales, tales como Römpp, léxico de química. Dichos ácidos débiles que tienen bajos grados de disociación y se describen por valores de pKa de entre 3 y 7, preferiblemente de entre 4 y 6.

Más preferiblemente, dicho ácido débil es ácido acético o ácido succínico.

En una realización preferida del método de la invención, dicho tampón comprende sacáridos. El término “sacáridos” engloba mono, di y polisacáridos. La estructura y la composición de los mono, di y polisacáridos son bien conocidas en la técnica y se describen en libros de texto habituales, tales como Römpp, léxico de química.

Más preferiblemente, dicho sacárido es un disacárido. Más preferiblemente, dicho disacárido es sacarosa o trehalosa.

En una realización preferida de la invención, dicho fosfato de calcio es fosfato tricálcico beta, fosfato tricálcico alfa, apatita o un cemento que contiene fosfato de calcio. Dichos fosfatos de calcio son particularmente muy adecuados como soportes para el dispositivo de la presente invención. Sus propiedades *in vivo* se han descrito en Hotz, 1994, Gao, 1996, y en el documento WO98/21972.

Según la invención, dicha proteína osteoinductora es GDF-5 o PMO-2. Ambas proteínas son miembros de la familia FCT- β . Se ha demostrado que la familia FCT- β de factores de crecimiento y diferenciación participa en numerosos procesos biológicos que comprenden la formación de hueso. Todos los miembros de dicha familia son polipéptidos

secretados que comprenden una estructura de dominio característico. En el propio extremo N-terminal, los miembros de la familia de FCT- β comprenden un péptido señal o secuencia líder de secreción. Esta secuencia va seguida, en el extremo C-terminal, por el prodominio y por la secuencia del polipéptido maduro. La secuencia del polipéptido maduro comprende siete cisteínas conservadas, seis de las cuales son necesarias para la formación de enlaces disulfuro intramoleculares, mientras que otra es necesaria para la dimerización de dos polipéptidos. El miembro de la familia FCT- β biológicamente activo es un dímero, compuesto preferiblemente por dos polipéptidos maduros. Los miembros de la familia FCT- β se secretan normalmente como proproteínas que comprenden, además de la secuencia madura, el prodominio. Los prodominios se escinden extracelularmente y no forman parte de la molécula de señalización. Sin embargo, se ha informado de que el (los) prodominio(s) pueden necesitarse para la estabilización extracelular de los polipéptidos maduros.

En el contexto de la presente invención, el término "miembro de la familia FCT- β " o las proteínas de dicha familia a las que se hace referencia más adelante, abarcan todas las variantes biológicamente activas de dichas proteínas o miembros de todas las variantes, así como sus precursores inactivos. Por tanto, las proteínas que comprenden simplemente la secuencia madura, así como las proteínas que comprenden la proteína madura y el prodominio o la proteína madura, el prodominio y la secuencia líder, están dentro del alcance de la invención, así como fragmentos biológicamente activos de las mismas. Si un fragmento de un miembro de FCT- β tiene actividad biológica puede determinarse fácilmente mediante ensayos biológicos descritos, por ejemplo, en: Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanka H, Omura S, Suda T, (1990): The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 295-299 o Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K (1996): Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J. Biol. Chem.* 271: 21345-21352.

Preferiblemente, la actividad biológica según la invención puede determinarse mediante modelos *in vivo*, tal como se describe en los ejemplos adjuntos. Además, en la presente invención se engloban variantes de los miembros de FCT- β que tienen secuencias de aminoácidos que son idénticas en al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% a las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia FCT- β .

Un resumen de los miembros de la superfamilia FCT- β se facilita en: Wozney JM, Rosen V (1998): Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346: 26-37. Las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia FCT- β pueden obtenerse a partir de bases de datos bien conocidas, tales como Swiss-Prot a través de Internet (<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>). Las secuencias de aminoácidos para PMO-2 y GDF-5, miembros de la familia FCT- β con un potencial osteoinductor particularmente alto, también se muestran en SEQ ID N°: 1 a 3, respectivamente.

La PMO-2 es un miembro de la subfamilia de PMO. Se ha demostrado que los miembros de la subfamilia de la proteína morfogenética ósea (PMO) participan, entre otros, en la inducción y la remodelación del tejido óseo. Las PMO se aislaron originalmente de la matriz ósea. Estas proteínas se caracterizan por su capacidad para inducir nueva formación ósea en sitios ectópicos. Varios estudios *in vivo* demostraron la potenciación de la osteogénesis y la condrogénesis de las células precursoras por las PMO y el aumento de la posibilidad de que cada molécula de PMO desempeñe un papel distinto durante el desarrollo del esqueleto. Más detalles acerca de las propiedades moleculares y biológicas de las PMO se describen en: Wozney JM, Rosen V (1998): Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346: 26-27, Schmitt J, Hwang K, Winn, SR, Hollinger J (1999): Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 17: 269-278 y Lind M (1996): Growth factors: possible new clinical tools. *Acta Orthop Scand* 67: 407-17.

La secuencia de aminoácidos para la preproforma de PMO-2 se deposita con el número de registro P12643 de Swiss-Prot y se muestra más adelante. Los aminoácidos 1 a 23 corresponden a la secuencia señal, los aminoácidos 24 a 282 corresponden al propéptido y los aminoácidos 283 a 396 corresponden a la proteína madura. Preferiblemente, PMO-2 se refiere a la preproforma, a la proforma o al péptido PMO-2 maduro, respectivamente. Además, también se engloban fragmentos de dichas proteínas que tienen esencialmente la misma actividad biológica, preferiblemente propiedades osteoinductoras. Más adelante se facilita más información sobre las secuencias para PMO-2.

También se ha demostrado que el factor de crecimiento y diferenciación (GDF) participa, entre otros, en la inducción y la remodelación del tejido óseo. El factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5), también conocido como proteína morfogenética derivada del cartílago 1 (CDMP-1) es un miembro del subgrupo de la familia PMO, que también incluye otras proteínas relacionadas, preferiblemente, GDF-6 y GDF-7. La forma madura de la proteína es un homodímero de 27 kDa. Varios estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran el papel de GDF-5 durante la formación de diferentes características morfológicas en el esqueleto de los mamíferos. Las mutaciones de GDF-5 son responsables de anomalías en el esqueleto, incluyendo la disminución de la longitud de los huesos largos de las extremidades, el desarrollo anómalo de las articulaciones en las extremidades y el esternón (Storm y Kingsley

(1999), *Development Biology*, 209, 11-27). La secuencia de aminoácidos entre el ratón y el ser humano está altamente conservada.

5 La secuencia de aminoácidos para la preproforma de GDF-5 está depositada con el número de registro P 43026 en Swiss-Prot o se muestra en la SEQ ID N°: 3. Los aminoácidos 1 a 27 corresponden a la secuencia líder, los aminoácidos 28 a 381 corresponden a la proforma y los aminoácidos 382 a 501 corresponden a la proteína madura. Preferiblemente, GDF-5 se refiere a la preproforma, a la proforma o al péptido GDF-5 maduro. Además, también se engloban los fragmentos de GDF-5 que tienen esencialmente la misma actividad biológica, preferiblemente propiedades osteoinductoras. Más preferiblemente, dicho fragmento comprende los aminoácidos 383 a 501 de la secuencia mostrada en SEQ ID N°: 3.

10 Según la invención, el tampón carece de sustancias tóxicas.

15 El término “sustancias tóxicas”, preferiblemente, engloba aquellos aditivos y disolventes orgánicos tóxicos que se utilizan en los métodos descritos en la técnica, por ejemplo, el acetonitrilo. Dichas sustancias pueden producir inflamación y otras reacciones tras la implantación de los dispositivos que contienen dichas sustancias. Dichos dispositivos son terapéuticamente menos aceptables debido a dichos efectos secundarios no deseados que no pueden evitarse mediante los métodos de recubrimiento descritos en la técnica. Además, la directriz internacional para el desarrollo de proteínas terapéuticas exige que deben evitarse sustancias tóxicas y perjudiciales en el proceso de fabricación (para más detalles véase: Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), Tema Q3C; www.emea.eu.int/). Sin embargo, el dispositivo que es obtenible mediante el método de la presente invención carece ventajosamente de dichas sustancias tóxicas y, por tanto, es terapéuticamente muy aceptable y cumple los requisitos de las autoridades normativas.

20

Además, en otra realización preferida del método de la invención, dicho dispositivo carece de material infeccioso.

25 Además de las sustancias tóxicas, el material infeccioso comprendido en el dispositivo puede producir infecciones graves en un sujeto en el que se ha trasplantado el dispositivo. Sin embargo, se utiliza gelatina potencialmente infecciosa derivada de huesos bovinos o porcinos como una proteína de protección en muchos métodos del estado de la técnica (Und, 1996).

30 El producto que es obtenible mediante el método de la invención puede formularse como una composición farmacéutica o un dispositivo médico. La composición de dicho producto puede comprender compuestos adicionales, como estabilizantes, sustancias tampón y otros excipientes. La cantidad del producto obtenible mediante la presente invención aplicado al paciente se determinará por el médico que le atiende y otros factores clínicos; preferiblemente según cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, la cantidad aplicada a un paciente depende de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se le estén administrando simultáneamente. El progreso puede monitorizarse mediante la evaluación periódica.

35 Gracias a la presente invención, es posible tratar varios defectos óseos que incluyen cavidades grandes. En particular, las cavidades grandes no podían tratarse eficazmente o solo con la utilización de material de hueso autógeno. Sin embargo, debido a las propiedades osteoinductoras y osteoconductoras fiables y eficientes del dispositivo que se puede obtener mediante el método de la invención, el tratamiento de los defectos óseos que requiere la reparación o un aumento óseo importante es ahora posible sin una segunda cirugía.

40 El dispositivo que es obtenible mediante el método de la invención se puede usar para la preparación de una composición farmacéutica que va a utilizarse para el aumento óseo.

Las definiciones de los términos a los que se hizo referencia anteriormente se aplican, cambiando lo que se deba cambiar, al uso mencionado anteriormente de la presente invención y los descritos más adelante.

45 El término “aumento óseo” se refiere a la formación terapéutica de hueso, que está indicada con el fin de tratar defectos óseos, cavidades en huesos, o enfermedades y trastornos acompañados por pérdida de tejido óseo o para preparar el entorno posterior de un implante. Las enfermedades y trastornos descritos a continuación son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle en libros de texto médicos habituales, tales como *Pschyrembel* o *Stedman*.

Preferiblemente, dicho aumento óseo sigue a defectos por traumatismo, cáncer o artificiales.

50 El dispositivo que es obtenible mediante el método de la invención también se puede usar para la preparación de una composición farmacéutica para tratar defectos óseos.

Más preferiblemente, dichos defectos óseos son defectos en los huesos largos o defectos óseos tras apicoectomía, extirpación de quistes o tumores, extracción de dientes o extracción quirúrgica de dientes retenidos.

La invención también se refiere al uso del dispositivo de la invención o de un dispositivo que es obtenible mediante el método de la invención para llenar cavidades y para la regeneración de tejido guiada por soporte en periodontología.

5 El dispositivo que es obtenible mediante el método de la invención para la preparación de una composición farmacéutica que va a utilizarse para la elevación del piso sinusal, el aumento de la cresta maxilar y mandibular atrofiada y la estabilización de los implantes inmediatos.

También dentro del alcance de la presente invención está un método de preparación del dispositivo según la reivindicación 1 para tratar una o más de las enfermedades a las que se hace referencia según los usos de la presente invención, en el que dicho método comprende al menos la etapa de administrar el dispositivo de la invención o un dispositivo que se puede obtener mediante el método de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable a un sujeto. Preferiblemente, dicho sujeto es un ser humano.

Las tablas siguientes muestran las secuencias de aminoácidos para PMO-2 y GDF-5:

PMO-2 humana (número de registro prim. de Swiss-Prot: P12643); SEQ ID N° 1:

Clave	Desde	Hasta	Longitud
SEÑAL	1	23	23
PROPEP	24	282	259
hPMO-2	283	396	114

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
MVAGTRCLLA LLLPQVLLGG AAGLVPELGR RKFAAASSGR PSSQPSDEVL SEFELRLLSM
      |      |      |      |      |      |
      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
FGLKQRPTPS RDAVPPYML DLYRRHSGQP GSPAPDHRLE RAASRANTVR SFPHEESLEE
      |      |      |      |      |      |
     130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
LPETSGKTTR RFFFNLSIP TEEFITSDEL QVFREQMQDA LGNNSPFHHR INIYEIIPKA
      |      |      |      |      |      |
     190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
TANSKFPVTR LLDTRLVNQN ASRWESFDVT PAVMRWTAQG HANHGFVVEV AHLEEKQGVV
      |      |      |      |      |      |
     250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
KRHVRIISRL HQDEHSWSQI RPLLVTFGHD GKGHPLHKRE KRQAKHKQRK RLKSSCKRHP
      |      |      |      |      |      |
     310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
LYVDFSDVGV NDWIVAPPGY HAFYCHGECF FPLADHLNST NHATVQTLVN SVNSKIPKAC
      |      |      |
     370     380     390
      |      |      |
CVPTLSAIS MLYLDENEKV VLKNYQDMVV ECGGCR
    
```

15

Bibliografía

[1] SECUENCIA DEL ÁCIDO NUCLEICO.

MEDLINE = 89072730; PubMed = 3201241;

20 Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitscock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A.; "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities."; Science 242:1528-1534(1988).

[2] CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X (2,7 ANGSTROMS) DE 292-396.

MEDLINE = 99175323; PubMed = 10074410; Scheufler C., Sebald W., Huelsmeyer M.; "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 A resolution."; J. Mol. Biol. 287:103-115(1999).

GDF-5 humano (número de registro prim. de Swiss-Prot: P 43026); SEQ ID Nº 3:

Clave	Desde	Hasta	Longitud
SEÑAL	1	27	27
PROPEP	28	381	354
hGDF-5	382	501	120

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
MRLPKLLTFL LWYLAWLDE FICTVLGAPD LGQR PQGSRP GLAKAEAKER PPLARNVFRP
      |      |      |      |      |      |
      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
GGHSYGGGAT NANARAKGGT GQTGGLTQPK KDEPKKLPPR PGGPEPKPGH PPQTRQATAR
      |      |      |      |      |      |
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
TVTTPKGQLPG GKAPPKAGSV PSSFLLKKAR EPGPPREPKE PFRPPPITPH EYMLSLYRTL
      |      |      |      |      |      |
      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
SDADRKGGNS SVKLEAGLAN TITSFIDKQD DDRGPVVRKQ RYVFDISALE KDGLLGAEELR
      |      |      |      |      |      |
      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
ILRKKPSDTA KPAVPRRRA AQLKLSSCPS GRQPAALLDV RSVPGLDGSG WEVFDIWKLF
      |      |      |      |      |      |
      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
RNFKNSAQLC LELEAWERGR TVDLRGLGPD RAARQVHEKA LFLVFGRTTK RDLFFNEIKA
      |      |      |      |      |      |
      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |
RSGQDDKTVY EYLFQRRKR RAPLATRQGK RPSKNLKARC SRKALHVNFK DMGWDDWIIA
      |      |      |      |      |      |
      430     440     450     460     470     480
      |      |      |      |      |      |
PLEYEAFHCE GLCEPFLRSH LEPTNHAVIQ TLMNSMDPES TPPTCCVPTR LSPISILFID
      |      |
      490     500
      |      |
SANNVVKQY EDMVVEGCGC R
    
```

5

Bibliografía

[1] SECUENCIA DEL ÁCIDO NUCLEICO.

TEJIDO = Placenta;

MEDLINE = 95071375; PubMed = 7980526;

10 Hoetten G., Neidhardt H., Jacobowsky B., Pohl J.; "Cloning and expression of recombinant human growth/differentiation factor 5."; Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:646-652(1994).

[2] SECUENCIA DEL ÁCIDO NUCLEICO.

TEJIDO = Cartílago articular;

MEDLINE = 95050604; PubMed = 7961761;

Chang S., Hoang B., Thomas J.T., Vukicevic S., Luyten F.P., Ryba N.J.P., Kozak C.A., Reddi A.H., Moos M.; "Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development."; J. Biol. Chem. 269:28227-28234(1994).

5 Las figuras muestran:

Figura 1: Solubilidad de GDF-5 en ácido acético 5 mM, H₃PO₄ 5 mM /NaOH, NaCl 150 mM a diferentes valores de pH.

Figura 2: Solubilidad de GDF-5 en arginina 20 mM / ácido acético a diferentes valores de pH.

10 Figura 3: Solubilidad de GDF-5 en dos tampones que tienen diferentes fuerzas iónicas y valores de pH (HAc = ácido acético).

Figura 4: Aumento del pH durante el recubrimiento en presencia de HCl 10 mmol/l.

Figura 5: Aumento del pH en presencia de acetonitrilo al 75%.

Figura 6: Dependencia del pH de las disoluciones de recubrimiento que tienen diferentes concentraciones de ácido acético durante el recubrimiento.

15 Figura 7: Homogeneidad de la distribución de GDF-5 sobre FTC beta (100 µg de GDF-5 sobre 100 mg de FTC beta) lograda por el recubrimiento en presencia de ácido acético 10 mmol/l con (derecha) y sin sacarosa (izquierda).

Figura 8: Homogeneidad de la distribución de GDF-5 sobre FTC beta (100 µg de GDF-5 sobre 100 mg de FTC beta) lograda por el recubrimiento en presencia de glicina 20 mmol/l / NaOH, pH 10.

Figura 9: Análisis histomorfométrico de un implante recubierto en presencia de glicina 20 mmol/l / NaOH, pH 10.

20 Figura 10: Homogeneidad de la distribución de rhPMO-2 sobre FTC beta.

Figura 11: Homogeneidad de la distribución de GDF-5 sobre FTC beta lograda por el recubrimiento en presencia de sacarosa (izquierda) y trehalosa (derecha).

La invención se describirá ahora mediante la referencia a los siguientes ejemplos biológicos que son meramente ilustrativos y no se interpretan como una limitación del alcance de la presente invención.

25 **Ejemplo 1: Cuantificación de GDF-5 en disolución por RP-HPLC**

El contenido de GDF-5 se determinó mediante análisis de HPLC en fase inversa (RP). Se analizaron alícuotas de la muestra utilizando una columna Poros C8-18 (R2/10, 2,1* 30 mm, Applied Biosystems). Se utilizó ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo al 21% (disolvente A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo al 84% (disolvente B) como disolventes a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. El perfil de elución se registró midiendo la absorbancia a 220 nm.

30 Las cantidades de GDF-5 se calcularon a partir del área de pico a 220 nm utilizando una curva patrón.

Ejemplo 2: Extracción y cuantificación de la proteína inmovilizada

Método A:

35 Se suspendió FTC beta recubierto (40 mg) en 700 µl de matriz de disolución (ácido cítrico 1,22 mol/l, HCl 1,22 mol/l, urea 8 mol/l) y se incubó durante 60 min. a 4°C. Tras la centrifugación (13200*g, 2 min) se analizaron 50 µl del sobrenadante mediante RP-HPLC (véase el ejemplo 1). La curva patrón se tomó con diversas cantidades de GDF-5 en la disolución de matriz respectiva.

Método B:

40 Se suspendió FTC beta recubierto (40 mg) en 700 µl de matriz de disolución (Tris 10 mmol/l / HCl, pH 7,4, urea 8 mol/l, EDTA 100 mmol/l) y se incubó durante 60 min. a 4°C y se centrifugó (5 min. a 13.500*g). Posteriormente, el sobrenadante se cuantificó tal como se describe en el método A o se analizó adicionalmente.

Ejemplo 3: Solubilidad de rhGDF-5 a diferentes valores de pH

45 GDF-5 se ajusta a una concentración de 4 mg/ml en HCl 10 mmol/l. Se diluyen 1:100 alícuotas (50 µl) de la disolución madre con ácido acético 5 mmol/l, H₃PO₄ 5 mmol/l / NaOH, NaCl 150 mmol/l con diferentes valores de pH cada uno. Las muestras se incubaron durante 15 min. y se centrifugaron (2 min. a 13.200*g). Se determinaron el valor del pH y el contenido de proteína en el sobrenadante. En una segunda prueba, la disolución madre se diluyó con arginina 20 mmol/l / HOAc con diferentes valores de pH cada uno. Los datos en las figuras 1 y 2 muestran que

GDF-5 en tampones con fuerza iónica baja (≤ 20 mmol/l) solo es soluble en una disolución ácida ($\text{pH} \leq 5$) o alcalina ($> \text{pH} 10$). Sin embargo, en el intervalo de pH de entre 6,0 y 9,5, la solubilidad es < 5 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 4: Solubilidad de GDF-5 en dos tampones que tienen diferente fuerza iónica a diferentes valores de pH

- 5 Se ajusta GDF-5 a una concentración de 4 mg/ml en HCl 10 mmol/l. Se diluyen 1:100 alícuotas (50 μl) de la disolución madre con ácido acético 10 mmol/l /NaOH y con ácido acético 5 mmol/l, H_3PO_4 5 mmol/l / NaOH, NaCl 150 mmol/l con diferentes valores de pH cada uno. Las muestras se incubaron durante 15 min. y se centrifugaron (2 min. a 13.200*g). Se determinaron el valor del pH y el contenido de proteína en el sobrenadante. Los datos en la figura 3 muestran que con todos los valores de pH medidos, la solubilidad de GDF-5 en un tampón con fuerza iónica superior, que corresponde al estado fisiológico, es significativamente inferior que en el tampón con fuerza iónica baja (aproximadamente 10 mmol/l).
- 10

Ejemplo 5: Solubilidad de GDF-5 en diferentes disolventes

Se disolvió GDF-5 liofilizado en acetonitrilo puro, se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente y se centrifugó (13.200*g, 2 min). No pudo detectarse GDF-5 en el sobrenadante.

- 15 Se disolvió GDF-5 liofilizado (50 μg) con 50 μl de acetonitrilo al 75%, se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente y se centrifugó (13.200*g, 2 min). En el sobrenadante, se midió el pH y se determinó el contenido de GDF-5. Se detectó el 100% del GDF-5 utilizado y el valor del pH de la disolución era de 3,0. Posteriormente, se ajustó el valor del pH a 7,4 añadiendo NaOH, se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente de nuevo y se centrifugó. Solo se detectaron 3 $\mu\text{g/ml}$ correspondientes a una solubilidad de 60 $\mu\text{g/ml}$.
- 20 Los datos muestran que GDF-5 no es soluble en acetonitrilo puro, pero que es soluble en disoluciones acuosas ácidas que contienen acetonitrilo. Según los resultados encontrados en los sistemas acuosos, la solubilidad disminuye en mezclas de acetonitrilo – agua con el aumento del pH.

Ejemplo 6: Cambio del valor del pH de la disolución de GDF-5 durante el recubrimiento de FTC beta

- 25 En un recipiente de reacción, se mezclan 200 mg de FTC beta con 200 μl de una disolución de recubrimiento que contiene GDF-5 (1 mg/ml; producida a partir de un liofilizado producido a partir de una disolución en HCl). El valor del pH de la suspensión se observa durante 30 min. Los resultados ilustrados en las figuras 4-5 muestran que tras aproximadamente 2 min, el pH de la suspensión alcanza el intervalo de $\text{pH} > 6,5$, que es crítico para la solubilidad de GDF-5, cuando se utilizan disoluciones de recubrimiento no tamponadas tales como por ejemplo HCl 10 mmol/l o acetonitrilo al 75% (el pH ácido inicial en el acetonitrilo al 75% resulta de las cantidades restantes de HCl presente).
- 30 Debido a la solubilidad insuficiente, tiene lugar la precipitación de la proteína y la formación de agregación, que puede detectarse mediante tinción de Coomassie (véase el ejemplo 7).

- El uso de una disolución de recubrimiento tamponada con acetato (figura 6) produce una reducción del aumento del pH durante el recubrimiento. Mientras el pH aumenta hasta 8 en las disoluciones no tamponadas, el pH de la disolución de recubrimiento tamponada con acetato (40-80 mmol/l) alcanza su máximo a pH 5,4. De esta forma, se garantiza una solubilidad suficiente durante el proceso de recubrimiento. El GDF-5 utilizado puede extenderse uniformemente y unirse al soporte sin que tenga lugar precipitación (véase el ejemplo 7).
- 35

También se logra un retraso del aumento del pH utilizando etanol al 60%. El retraso es suficiente para lograr una distribución uniforme de GDF-5 a través del soporte (véase el ejemplo 7).

Ejemplo 7: Detección de la homogeneidad del recubrimiento

- 40 La proteína adsorbida se hace visible tiñendo con azul brillante de Coomassie sobre el soporte. La distribución del color azul se correlaciona con la distribución de la proteína respectiva sobre el soporte de FTC beta.

- Se incuban 3-4 gránulos recubiertos con 200 μl de disolución de tinción (60% de PBS, 40% de metanol, 0,4% de azul brillante de Coomassie R250) en una cavidad de una placa de 96 pocillos y se incuban durante 30 min. a temperatura ambiente. Un soporte no recubierto se trata de la misma forma como control. El exceso de agente de tinción se elimina mediante lavado con 60% de PBS, 40% de metanol, hasta que el soporte no recubierto utilizado como control se decolora completamente. El soporte teñido se seca a 40°C y se documenta fotográficamente.
- 45

Ejemplo 8: Recubrimiento de gránulos (I)

- Se colocan 200 mg de FTC- β (tamaño del gránulo de 0,5 – 1,0 mm) en forma seca en un recipiente de vidrio 2R. La disolución madre de rhGDF-5 (4 mg/ml en HCl 10 mM) se diluye hasta 1 $\mu\text{g/ml}$ por medio del tampón de recubrimiento correspondiente. Se pipetea 200 μl de disolución GDF-5 obtenida de esta manera sobre el FTC beta y se absorben. El material granuloso húmedo se incuba durante 1 hora a 25°C y después se seca a vacío.
- 50

Ejemplo 9: Recubrimiento de gránulos (II)

Se colocan 200 mg de FTC- β (tamaño del gránulo de 0,5 – 1,0 mm) en forma seca en un recipiente de vidrio 2R. La disolución madre de rhGDF-5 (4 mg/ml en HCl 10 mM) se diluye hasta 1 μ g/ml por medio del tampón de recubrimiento correspondiente. Se pipetea 200 μ l de disolución GDF-5 obtenida de esta manera sobre el FTC beta y se absorben. El material granuloso húmedo se incuba durante 1 hora a 25°C y después se liofiliza.

Ejemplo 10: Recubrimiento de bloques

Un bloque de FTC beta que tiene una masa de 360 mg se coloca en un recipiente de reacción adecuado (Eppendorf), se mezcla con 500 μ l de la disolución de recubrimiento, se incuba durante una hora y se seca a vacío o se liofiliza.

10 Ejemplo 11: Comparación de los diferentes métodos de recubrimiento

Debido al uso de disoluciones de recubrimiento tamponadas con acetato, la formación de precipitación pudo reducirse significativamente. Otra mejora se logró añadiendo sacarosa. La calidad del recubrimiento con y sin sacarosa se ilustra en la figura 7. Mientras que todavía pueden reconocerse precipitados individuales como manchas de color azul oscuro sin sacarosa, el recubrimiento en presencia de sacarosa da como resultado un recubrimiento sin manchas.

La importancia de la homogeneidad del recubrimiento se aclara al comparar dos preparaciones que se produjeron durante la investigación utilizando disoluciones de recubrimiento en etanol al 60% y glicina 20 mmol / NaOH, pH 10, respectivamente. Mientras que se logró una distribución homogénea en presencia de etanol al 60%, tiene lugar una formación de precipitación significativa sobre la superficie del soporte en presencia de glicina (figura 8). Ambos soportes se compararon en un modelo de defectos en la bóveda craneal de la rata (véase más adelante).

Ejemplo 12: Modelo de defectos de espesor total en la bóveda craneal en ratas

Se obtuvo FTC beta recubierto con rhGDF-5 (50 μ g/25 mg de FTC beta) utilizando diferentes tampones de recubrimiento (glicina 20 mmol/l / NaOH, pH 10 (C1) y etanol al 60% (C2)). Las ratas se anestesiaron mediante inyección intramuscular de tiletamina - zolazepam (ZOLETIL® VIRBAC, CARROS, Francia, 50 mg/kg, i.m.). Se cortó el pelo de la parte dorsal del cráneo. A continuación la piel se lavó con un jabón germicida (VETEDINE®, VETOQUINOL, LURE, Francia). El sitio quirúrgico se lavó con un antiséptico, tal como povidona yodada (disolución VETEDINE®, VETOQUINOL, LURE, Francia). Se realizó una incisión de 20 mm de longitud en el cuero cabelludo a lo largo de la sutura sagital, y la piel, la musculatura y el periostio, se reflejaron dejando al descubierto los huesos parietales. Se utilizó un trépano de 6 mm (COVELY, GENAY, Francia) para crear el defecto en la parte dorsal del hueso parietal, lateral a la sutura sagital bajo irrigación constante con solución fisiológica estéril (AGUETTANT, LYON, Francia). Se crearon dos defectos idénticos por animal. Se tuvo cuidado para evitar la lesión de la duramadre y para evitar la punción del seno sagital superior. Una vez aplicados los implantes, el periostio y los músculos se suturaron en su sitio y se suturó el cuero cabelludo (hilo de polipropileno, ProlOne®, ETHNOR, ISSY LES MOULINEAUX, Francia).

Tras un seguimiento de 6 semanas, los animales se anestesiaron mediante inyección intramuscular de ZOLETIL® (50 mg/kg), después se sacrificaron mediante la inyección de una dosis letal de DOLETHALND (pentobarbital sódico, VETOQUINOL, LURE, Francia).

Se tomaron muestras de los explantes y se fijaron en disolución de formalina tamponada al 10%. A continuación, las muestras se deshidrataron en disoluciones de alcohol de concentraciones crecientes y se incluyeron en PMMA (poli(metacrilato de metilo), Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se obtuvo una sección de 20 μ m de espesor mediante una técnica de microcorte y molienda adaptada de Donath (Donath K. Breuner G., A method for the study of undecalcified bone and teeth with attached soft tissues. J. Oral. Pathol. 11, 318-326, 1982). Se tiñó una sección con Paragon modificado para análisis cualitativo y semi-cuantitativo mediante microscopía óptica.

Las secciones histológicas se observaron utilizando un microscopio Polyvar (REICHERT) equipado con un objetivo x4, x10, x25 y x40.

Se observaron grandes cantidades de médula ósea y células osteoblásticas en el sitio tratado con C2. Por el contrario, la formación ósea fue escasa con C1. La degradación del material del implante también aumentó con C2 en comparación con C1. Para los resultados de los análisis histomorfométricos de los materiales de implante, véase la tabla 1 y la figura 9.

50

Tabla 1

Muestra	% de tejido óseo	% de implante	% de tejido lagunar	% de tejido fibroso
C1	8,9	39,2	2,1	49,8
C2	43,4	18,5	21,4	16,7

Ejemplo 13: Recubrimiento de FTC beta con PMO-2

- 5 Se colocan 200 mg de FTC beta (tamaño de gránulo de 0,5 – 1,0 mm) en un recipiente de vidrio 2R. La disolución madre de PMO-2 se diluye hasta 1 mg/ml con el tampón de recubrimiento correspondiente (ácido acético 10 mmol/l, sacarosa al 10%). Se incuban 200 µl de la disolución de recubrimiento con FTC beta (1 h, 4°C) y se liofilizan. La distribución de PMO-2 sobre el soporte recubierto se mostró mediante tinción de Commassie (figura 10).

Ejemplo 14: Comparación del proceso de recubrimiento en presencia de sacarosa y trehalosa

- 10 Se colocan 200 mg de FTC beta (tamaño de gránulo de 0,5 – 1,0 mm) en un recipiente de vidrio 2R. La disolución madre de GDF-5 (4 mg/ml en HCl 10 mmol/l) se diluye hasta 1 mg/ml con el tampón de recubrimiento correspondiente. Las dos variantes del tampón de recubrimiento contienen sacarosa al 10% y trehalosa al 10%, respectivamente. Se incuban 200 µl de la disolución de recubrimiento con FTC beta (1 h, 4°C) y se liofilizan. La distribución de GDF-5 sobre el soporte recubierto se mostró mediante tinción de Commassie (figura 11).

Bibliografía:

- 15 Celeste A.J., et al. (1990) "Identification of transforming growth factor ..."; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 9843-9847.
- Chang, S. et al. (1994); "Cartilage-derived morphogenetic proteins..."; J. Biol. Chem. 269: 28227-28234.
- EMA, ICH Topic Q 3C, Impurities: Residual Solvents
- Friess, W. et al. (1998); Pharm. Dev. Technol. 4, 387-396.
- 20 Gao, T et al. (1996); Int. Orthopaedics 20, 321-325.
- Gombotz, W et al. (1996) en Formulation, characterization and stability of protein drugs, Plenum Press, Nueva York, EE.UU., págs. 219-245.
- Griffith, D.L. et al. (1996); "Three-dimensional structure of recombinant human..."; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 878-883.
- 25 Hoetten, G. et al. (1994); "Cloning and expression of recombinant human growth/differentiation factor 5."; Biochem. Biophys. Res. Commun. 204: 646-652.
- Hotz, G et al. (1994); Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 23, 413-417.
- Katagiri, T. et al. (1990); Biochem. Biophys. Res. Commun. 172: 295-299.
- Lind, M et al. (1996); J. Orthopaedic Res. 14, 343 – 350.
- 30 Lind, M. (1996); Acta. Orthop. Scand. 67: 407-17.
- Nishitoh, H. et al (1996); J Biol. Chem. 271: 21345-21352.
- Oezkaynak, E. et al. (1990); "OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family"; EMBO J. 9: 2085-2093.
- Scheufler, C. et al. (1990); "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution".
- 35 Schmitt, J. et al. (1999); J. Orthop. Res. 17: 269-278.
- Shore, E.M. et al. (1997); "Human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) genomic DNA sequence".
- Storm & Kingsley (1999); Development Biology, 209, 11-27.
- Terheyden, H et al. (1997); Mund Kiefer Gesichtschir. 1, 272-275.

Wang, E.A. et al. (1990); "Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone."; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 9843-9847.

Wozney, J.M. et al. (1998); Clin. Orthop. 346: 26-37.

Wozney, J.M. et al. (1988); Science 242: 1528-1534.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un dispositivo que tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras *in vivo*, que comprende un soporte que contiene fosfato de calcio y una proteína osteoinductora, en el que dicha proteína osteoinductora bien es GDF-5 o PMO-2 y en el que dicho soporte está completamente recubierto con dicha proteína osteoinductora y en el que cantidades esencialmente idénticas de dicha proteína osteoinductora están presentes en todas y cada una de las zonas de la superficie de dicho soporte, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) proporcionar una disolución que comprende proteína osteoinductora disuelta y un tampón que contiene un ácido débil que tiene un valor de pK entre 3 y 7, preferiblemente entre 4 y 6, aunque dicha disolución carece de sustancias tóxicas, manteniendo dicho tampón dicha proteína disuelta durante un tiempo suficiente para permitir el recubrimiento homogéneo de un soporte que contiene fosfato de calcio cuando se pone en contacto con dicho soporte y pudiendo equilibrar dicho tampón el incremento de pH producido por el contacto de la disolución tampón con el soporte de fosfato de calcio de modo que la proteína no precipita inmediatamente debido a dicho incremento de pH;
 - (b) poner en contacto la disolución de la etapa (a) con un soporte que contiene fosfato de calcio;
 - (c) permitir el recubrimiento homogéneo de la superficie de dicho soporte con dicha proteína disuelta; y
 - (d) secar el soporte recubierto obtenido en la etapa (c).
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho tampón tiene una concentración de tampón inferior a 100 mmol/l, inferior a 50 mmol/l o inferior a 20 mmol/l.
3. El método según la reivindicación 2, en el que dicho ácido débil es el ácido acético o el ácido succínico.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho tampón además comprende sacáridos.
5. El método según la reivindicación 5, en el que dicho sacárido es un disacárido.
6. El método según la reivindicación 5, en el que dicho disacárido es sacarosa o trehalosa.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho dispositivo carece de material infeccioso.

Figura 1

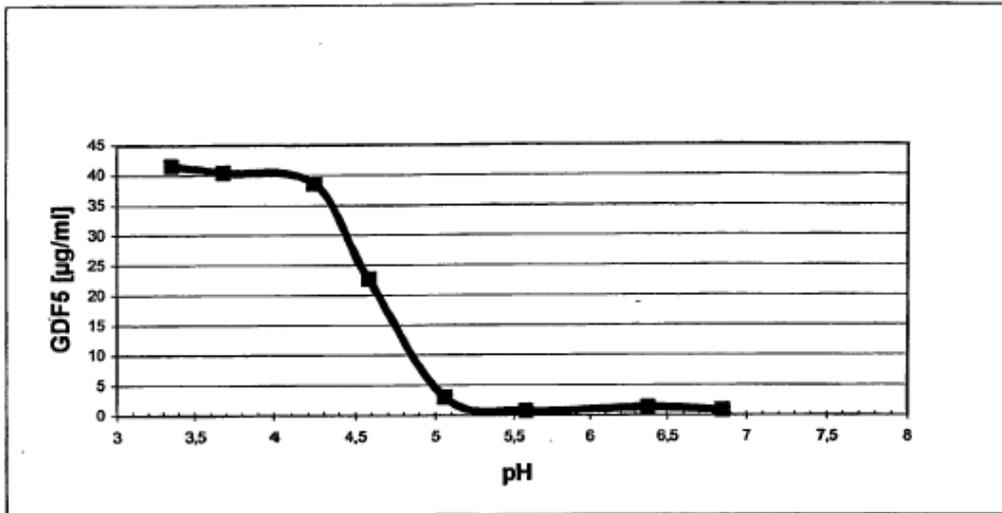


Figura 2

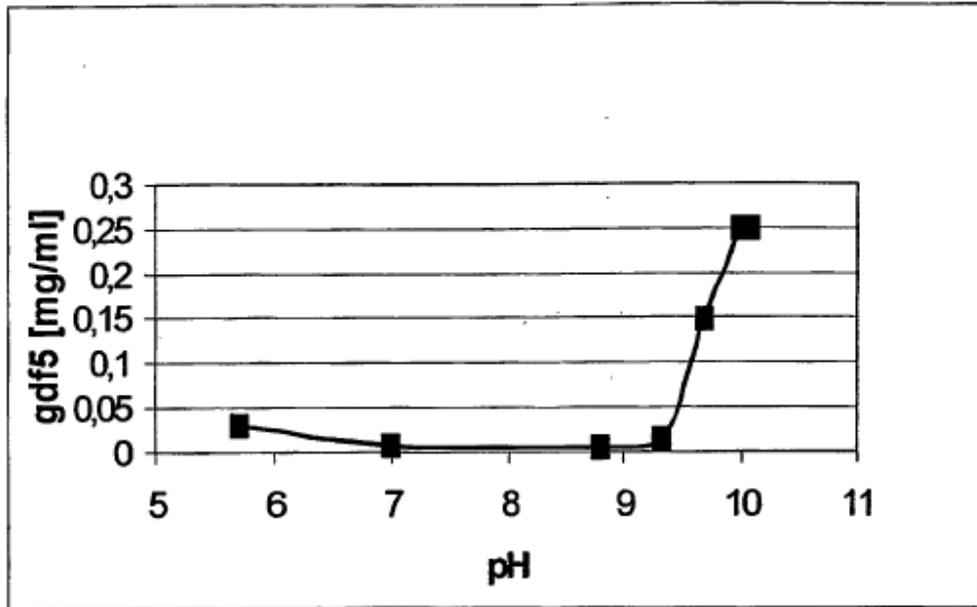


Figura 3

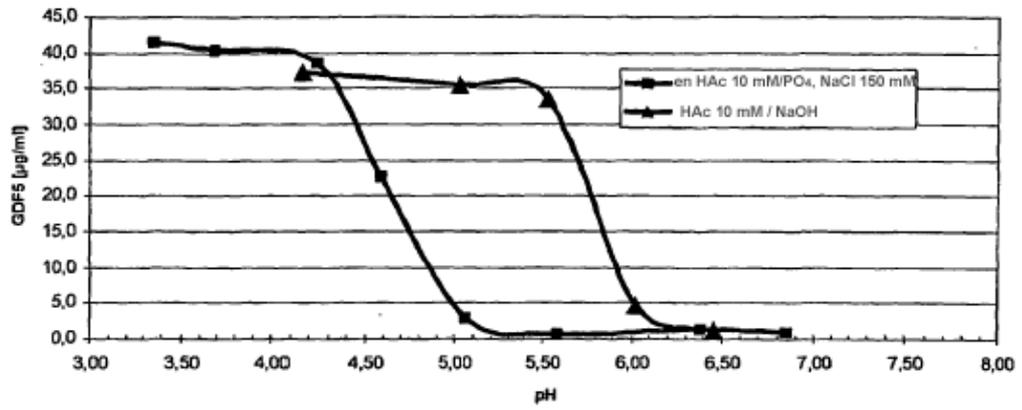


Figura 4

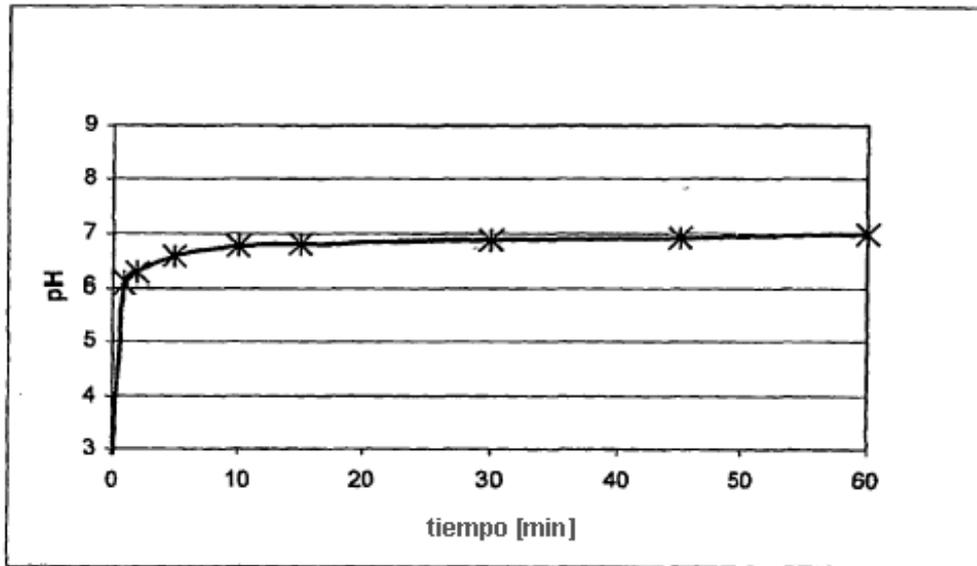


Figura 5

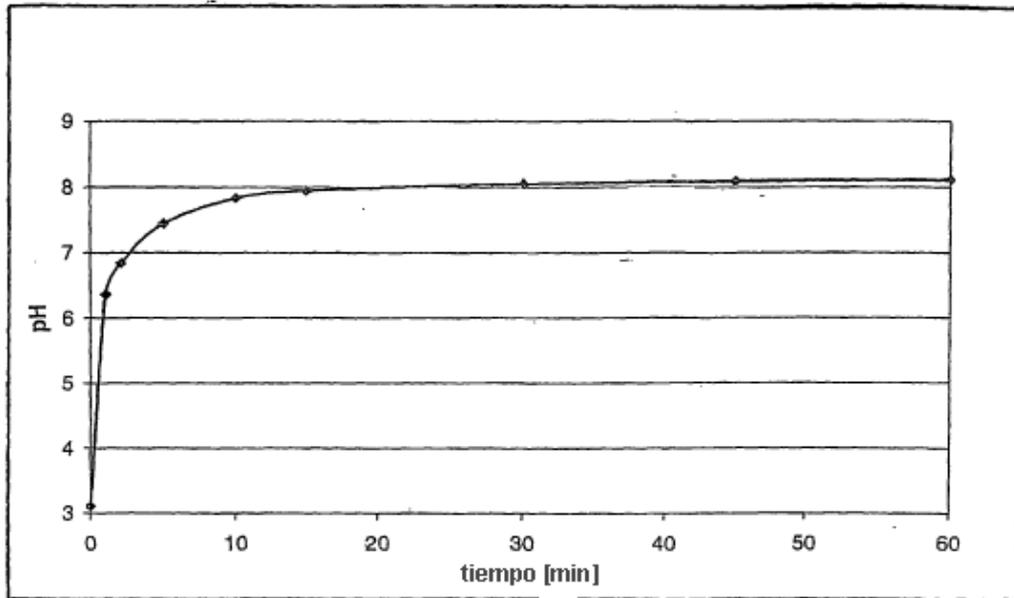


Figura 6

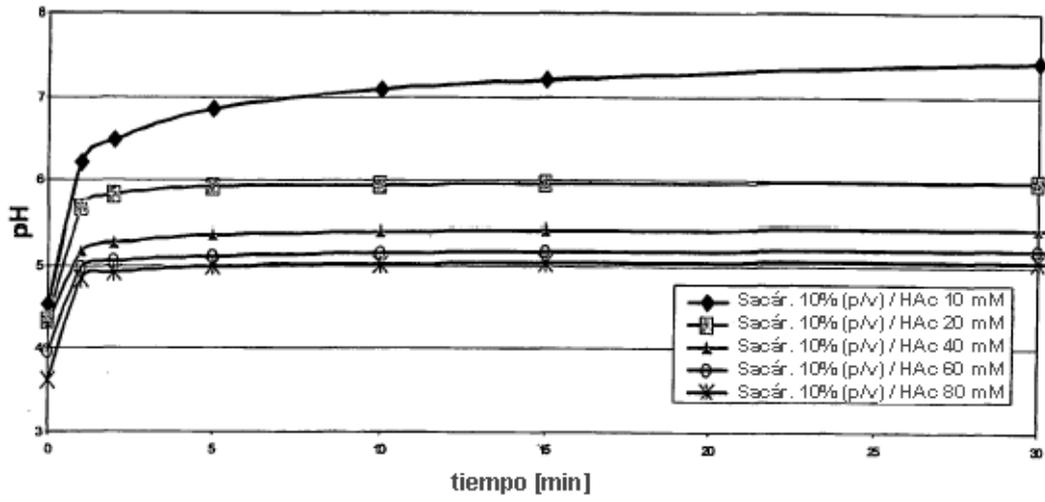


Figura 7



Figura 8

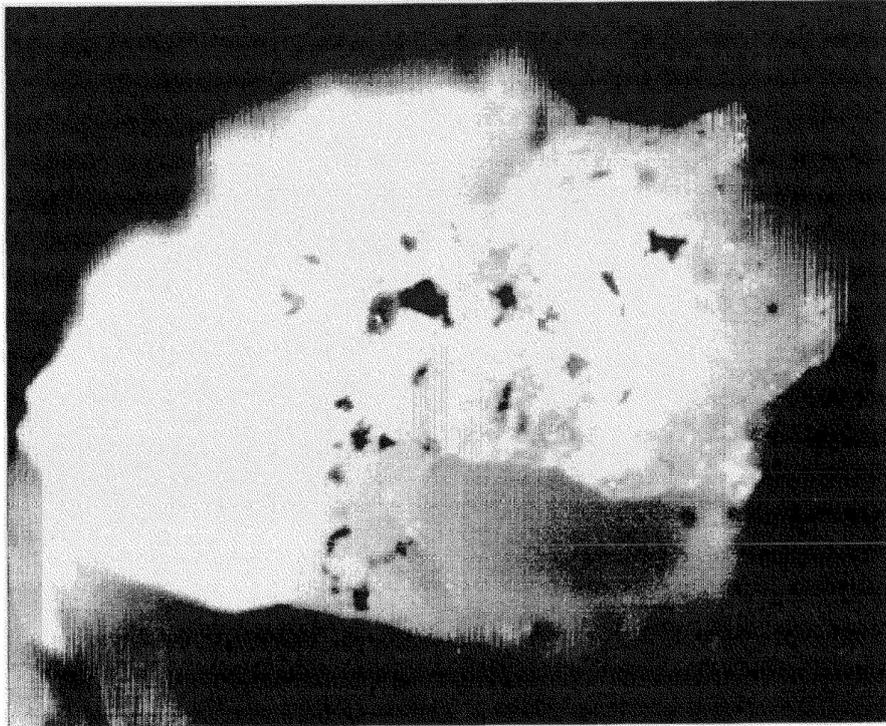


Figura 9



Figura 10

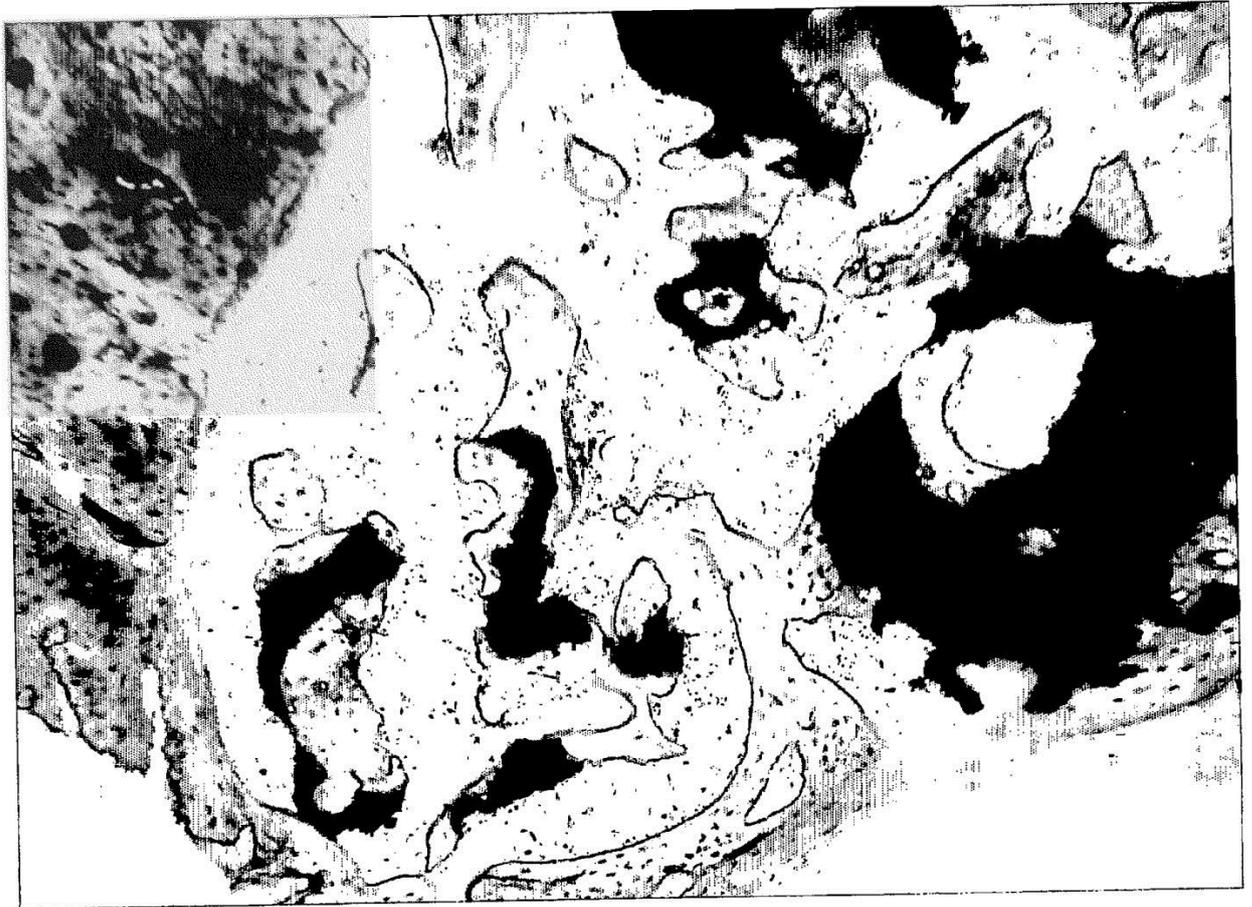


Figura 11

