

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 629**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05753766 .4**
96 Fecha de presentación: **24.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1763362**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2007**

54 Título: **USO DE OP-1 PARA TRATAR DEFECTOS DEL CARTÍLAGO.**

30 Prioridad:
25.05.2004 US 574423 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

73 Titular/es:
STRYKER CORPORATION
2825 Airview Boulevard
Kalamazoo, MI 49002, US

72 Inventor/es:
RUEGER, David, C. y
KILDEY, Robyn

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 629 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de OP-1 para tratar defectos del cartilago

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la reparación de tejido ortopédico. Más particularmente, se refiere a la reparación o a la regeneración de cartilago.

Antecedentes de la invención

10 La reparación y regeneración de cartilago es uno de los mayores obstáculos en las técnicas ortopédicas actuales. La importancia es enorme ya que la lesión de cartilago y trastornos degenerativos tales como la osteoartritis, la degeneración de disco intervertebral y los desgarros de menisco son una causa importante de discapacidad entre la población adulta de los Estados Unidos.

15 El cartilago es un tejido conectivo compuesto de condrocitos embebidos en un matriz extracelular de fibras de colágeno, proteoglicanos y otras proteínas no colagenosas. Existen dos formas de cartilago, articular y no articular. El cartilago articular es una capa fina de tejido conectivo, que cubre los extremos de los huesos en las articulaciones. El cartilago no articular incluye fibrocartilago y cartilago elástico, e incluye los discos intervertebrales, los meniscos, la tráquea, la laringe, la nariz, las orejas y las costillas.

20 La función del cartilago es la de amortiguar el peso, resistir el desgaste y permitir un movimiento casi sin fricción en las articulaciones. Los defectos en el tejido de cartilago, a menudo provocados por un trauma, un desgaste anormal o una enfermedad, pueden conducir a dolor y rigidez, y si no se tratan pueden progresar y requerir finalmente una sustitución de toda la articulación. Por ejemplo, los defectos de cartilago articular a menudo conducen a una degradación prematura de la superficie articular y finalmente pueden dar como resultado defectos osteocondrales, osteoartritis o ambos.

La osteoartritis se considera un proceso de intento de reparación de la matriz extracelular de cartilago dañado, pero que falla gradualmente, ya que el equilibrio entre la síntesis y la eliminación de componentes de la matriz se ve afectado y desplazado hacia el catabolismo.

25 La capacidad del tejido cartilaginoso para regenerarse por sí mismo está muy limitada debido a su naturaleza avascular. La reparación de defectos osteocondrales, que implica tanto tejido cartilaginoso como el hueso subyacente, se produce en una extensión limitada promovida por la presencia de células madre y de factores de crecimiento y diferenciación llevados al defecto por la sangre y/o la médula. En estudios con animales, dichos defectos alcanzan cierto grado de reparación con la formación de una nueva capa de hueso y cartilago, pero la organización macromolecular y las características bioquímicas de la matriz de cartilago son imperfectas. El tejido reparado está constituido por colágeno de Tipo I, más que por colágeno de Tipo II, y proteoglicanos que no son específicos de cartilago, y dan como resultado fibrilaciones y cambios degenerativos con el tiempo. Y en los defectos de cartilago que no penetran en el hueso subcondral ni siquiera se produce reparación, ni en una extensión limitada.

30 Además, el tratamiento quirúrgico de defectos cartilaginosos es complejo y se ha demostrado que tiene un éxito limitado. Por ejemplo, los defectos de cartilago articular se tratan con un metodología artroscópica mediante la cual se eliminan los cuerpos sueltos y se suavizan las áreas de transición. Sin embargo, este método por sí solo frecuentemente no proporciona un alivio duradero de los síntomas. Las sustituciones de rodilla a menudo requieren la resección de cantidades significativas de hueso y a menudo requieren múltiples sesiones quirúrgicas.

40 El menisco es un pequeño tejido con forma de pezuña de caballo situado entre los extremos óseos del interior de la articulación de la rodilla, que actúa como amortiguador de impactos. Existen dos meniscos en cada rodilla, uno a cada lado de la rodilla. Normalmente son fuertes en gente joven y con la edad se vuelven más quebradizos y se desgarran con mayor facilidad. Los desgarros son extremadamente comunes en lesiones de ligamento cruzado anterior (LCA). El fibrocartilago meniscal, como el cartilago hialino articular, tiene una capacidad limitada para curarse, particularmente en las regiones media e interior avasculares. El tratamiento actual para los desgarros pequeños es dejarlo tal cual si no causa muchas molestias. Las opciones quirúrgicas para tratar desgarros meniscales dependen de una serie de factores que incluyen la naturaleza y la extensión de la lesión y, más importante, de su localización. Los desgarros en la región vascularizada, que está integrada con el sinovio altamente vascularizado, se han reparado con éxito mediante sutura. La meniscectomía parcial o total es el tratamiento quirúrgico normal para los desgarros sintomáticos en los dos tercios avasculares del menisco. Los desgarros en estas regiones del menisco son los tipos más comunes observados clínicamente. Independientemente de si se emplea una meniscectomía abierta, artroscópica, total o parcial, la osteoartritis es una secuela frecuente en estos pacientes a los pocos años de la cirugía. Por lo tanto, la forma habitual de reparación es eliminar sólo parcialmente los trozos desgarrados y reparar el cartilago mediante grapas. Desafortunadamente, el proceso de curación después de este procedimiento es lento. Además, si la reparación no ha tenido éxito entonces el menisco afectado debe ser retirado al completo posteriormente.

La principal causa de dolor persistente y a menudo debilitante es la degeneración del disco intervertebral (DIV). Al degenerarse los discos hacen que la unión de las vértebras se comprima, dando como resultado a menudo un dolor severo.

5 El DIV como sindesmosis proporciona articulación entre cuerpos vertebrales adyacentes y actúa como un amortiguador de la carga de peso que disipa las cargas espinales aplicadas axialmente. Estas funciones biomecánicas son posibles gracias a la estructura única del DIV que está compuesto de un anillo fibroso exterior rico en colágeno que rodea un núcleo pulposo central gelatinoso rico en proteoglicano hidratado. Unas capas cartilaginosas en la parte superior y en la inferior, capas delgadas de cartílago tipo hialino, cubren las interfaces de los cuerpos vertebrales dentro del disco.

10 La degeneración del disco lumbar representa una carga social y económica sustancial para la comunidad, que se manifiesta principalmente como un dolor lumbar (LBP, del inglés "low back pain"). Se estima que hasta el 80% de la población experimenta al menos un episodio significativo de LBP durante su vida, y aproximadamente el 2,5% de la población en edad de trabajar tomará algún tipo de baja médica al año como resultado del LBP. Los costes directos del LBP en los países occidentales modernos se han estimado en 9.000 millones de dólares de EE.UU., la mayor parte de los cuales se destinan a la consulta de medicina general, terapia física y otras medicinas conservadoras (Williams DA y col., (1998), Health care and indemnity costs across the natural history of disability in occupational low back pain, Spine 23: 2329-36). El gasto indirecto total, que incluye el tratamiento quirúrgico, puede ser diez veces superior (Maetzel y Li (2002), The economic burden of low back pain: a review of studies published between 1996 and 2001, Best Prac Res Clin Rheumatol 16: 23-30; Walker y col., (2003), The economic burden, Proceedings of the Spine Society of Australia Annual Scientific Meeting, Canberra, Australia).

La degeneración discal es un fenómeno natural que se produce, en la mayoría de los casos, a partir del momento de la madurez esquelética (Vernon-Roberts (1992), Age-related and degenerative pathology of intervertebral discs and apophyseal joints, en: The lumbar spine and back pain. Cuarta edición, Jayson MIV, Ed. Churchill, Livingstone, Edimburgo, Capítulo 2, 17-41). Es consistente con el avance de la edad, pero en muchos casos también está asociada a dolor, particularmente en la espina lumbar, y a una movilidad restringida. Los síntomas de LBP a menudo se solucionan espontáneamente con el tiempo cuando los pacientes modifican su estilo de vida para acomodarse a una movilidad restringida. Sin embargo, en muchos casos sigue siendo un factor significativo que requiere una intervención quirúrgica. El tratamiento quirúrgico tradicional "estándar dorado" para el LBP crónico ha sido la fusión espinal para inmovilizar el único nivel de dolor o el más doloroso. La fusión es cara debido a que requiere una hospitalización prolongada y atención médica quirúrgica especializada, y aunque la mayoría de los pacientes experimentarán un alivio del dolor a corto plazo, hoy día existen evidencias de que la fusión no proporciona los mejores resultados. Estudios a largo plazo sugieren que la fusión espinal en realidad promueve la degeneración a niveles adyacentes a la zona de fusión (Lee (1998), Accelerated degeneration of the segment adjacent to a lumbar fusion, Spine 13: 375-7). Del mismo modo que se desarrollaron las prótesis artificiales hace 50 años para restaurar la función de caderas y rodillas artríticas y fracturadas, ahora se están desarrollando prótesis con el objetivo de restaurar la función mecánica completa de los discos que se han convertido en dolorosos y artríticos debido a una degeneración crónica (Szpaalski y col. (2002), V Spine arthroplasty: a historical review, Eur Spine J 11: S65-S84). Sin embargo, es demasiado pronto para saber si cualquiera de los múltiples modelos que están siendo sometidos a ensayos proporcionará un beneficio a largo plazo.

40 Ahora se ha identificado una clase de proteínas que son competentes para actuar como auténticos morfógenos de tejido óseo y cartilaginoso, capaces por sí mismas de inducir la proliferación y la diferenciación de células progenitoras en tejido óseo, cartilaginoso, tendinoso y/o ligamentoso. Estas proteínas, denominadas en la presente memoria "proteínas osteogénicas" o "proteínas morfogénicas" o "morfógenos", incluyen miembros de la familia de proteínas morfogenéticas de hueso (BMP, del inglés "bone morphogenetic proteins") identificadas inicialmente por su capacidad para inducir la morfogénesis ósea ectópica, endocrinal. Las proteínas osteogénicas generalmente se clasifican en la técnica como un subgrupo de la superfamilia TGF- β de factores de crecimiento (Hogan (1996), Genes & Development 10: 1580-1594). Los miembros de la familia de proteínas morfógenas incluyen la proteína-1 osteogénica de mamífero (OP-1, también conocida como BMP-7, y el homólogo de *Drosophila* 60A), la proteína-2 osteogénica (OP-2, también conocida como BMP-8), la proteína-3 osteogénica (OP-3), la BMP-2 (también conocida como BMP-2A ó CBMP-2A, y el homólogo de *Drosophila* DPP), la BMP-3, la BMP-4 (también conocida como BMP-2B ó CBMP-2B), la BMP-5, la BMP-6 y su homólogo murino Vgr-1, la BMP-9, la BMP-10, la BMP-11, la BMP-12, la GDF3 (también conocida como Vgr2), la GDF8, la GDF9, la GDF10, la GDF11, la GDF12, la BMP-13, la BMP-14, la BMP-15, la BMP-16, la BMP-17, la BMP-18, la GDF-5 (también conocida como CDMP-1 ó MP52), la GDF-6 (también conocida como CDMP-2), la GDF-7 (también conocida como CDMP-3), el homólogo de *Xenopus* Vg1 y NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP y NEURAL. Los miembros de esta familia codifican cadenas de polipéptido secretadas que comparten características estructurales comunes, que incluyen el procesado a partir de una "proforma" precursora para producir una cadena de polipéptido madura competente para dimerizar, y que contiene un dominio activo carboxiterminal de aproximadamente 97-106 aminoácidos. Todos los miembros comparten un modelo conservado de cisteínas en este dominio y la forma activa de dichas proteínas puede ser tanto el homodímero enlazado por disulfuro de un único miembro de la familia como el heterodímero de dos miembros diferentes (véase, por ejemplo, Massague (1990) Annu. Rev. Cell Biol. 6: 597; Sampath y col. (1990) J. Biol. Chem. 265: 13198). Véase también las patentes de EE.UU. 5.011.691 y 5.266.683, Ozkaynak y col. (1990) EMBO J. 9: 2085-2093, Wharton y col. (1991) PNAS 88: 9214-9218; Ozkaynak (1992) J. Biol. Chem. 267: 25220-25227 y la patente de EE.UU.

5.266.683); (Celeste y col. (1991) PNAS 87: 9843-9847); (Lyons y col. (1989) PNAS 86: 4554-4558). Estas referencias describen las secuencias de aminoácidos y de ADN, así como las características químicas y físicas de estas proteínas osteogénicas. Véase también Wozney y col. (1988) Science 242: 1528-1534); BMP 9 (WO93/00432, publicada el 7 de enero de 1993); DPP (Padgett y col. (1987) Nature 325: 81-84; y Vg-1 (Weeks (1987) Cell 51: 861-867).

Los métodos preferidos actualmente para reparar defectos en cartílagos incluyen la limpieza de trozos, la microfractura, el trasplante celular autólogo, la mosaicoplastia y la sustitución articular. Sin embargo, ninguno de estos métodos de lugar a una reparación real o sustitución del tejido cartilaginoso. Estos métodos producen un tejido reparado imperfecto con características de cicatriz.

10 Por tanto, sigue existiendo una necesidad por composiciones y métodos para reparar y regenerar defectos en cartílagos que eviten los problemas asociados a los métodos y composiciones disponibles actualmente.

Resumen de la invención

15 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que consiste en OP-1 y un material de administración para una liberación sostenida o una eliminación retardada, para su uso en la reparación de un defecto de cartílago en un paciente, en el que el cartílago está rodeado de líquido sinovial; en donde la composición farmacéutica debe administrarse al líquido sinovial que rodea al cartílago; en donde la composición es una disolución líquida o una suspensión líquida y está formulada como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada.

20 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que consiste en OP-1 y un material de administración para una liberación sostenida o una eliminación retardada, para su uso en la regeneración o producción de cartílago en una zona de defecto de cartílago en un paciente, en donde el cartílago está rodeado por fluido sinovial; en donde la composición farmacéutica debe administrarse en el fluido sinovial que rodea al cartílago; en donde la composición es una disolución líquida o una suspensión líquida y está formulada como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada.

25 La presente invención además se refiere a una composición farmacéutica que consiste en OP-1 y un material de administración para una liberación sostenida o una eliminación retardada, para su uso para promover el crecimiento de cartílago o para acelerar la formación de cartílago en una zona de defecto de cartílago en un paciente, en donde el cartílago está rodeado de fluido sinovial; en donde la composición farmacéutica debe administrarse en el fluido sinovial que rodea al cartílago; en donde la composición es una disolución líquida o una suspensión líquida y está formulada como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada.

30 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que consiste en OP-1 y un material de administración para una liberación sostenida o una eliminación retardada, para su uso para prevenir la degradación de cartílago o para tratar una lesión de cartílago o una enfermedad o trastorno degenerativo del cartílago, en donde el cartílago está rodeado de fluido sinovial; en donde la composición farmacéutica debe administrarse en el fluido sinovial que rodea al cartílago; en donde la composición es una disolución líquida o una suspensión líquida y está formulada como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada.

En algunas realizaciones, la lesión de tejido o la enfermedad degenerativa incluyen osteoartritis, desgarros de menisco y lesión en el LCA.

40 En algunas realizaciones, el cartílago es cartílago articular. En otras realizaciones, el cartílago es cartílago no articular. En algunas realizaciones, el cartílago no articular es un menisco.

En algunas realizaciones, la composición de OP-1 usada en la presente invención es una disolución acuosa. La composición de OP-1 se formula como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada (es decir, una formulación mediante la cual la eliminación de OP-1 se retrasa respecto a la eliminación normal). En algunas realizaciones, la composición de OP-1 se formula como una formulación inyectable.

45 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un esquema de una articulación que muestra la zona de lesiones de impacto bilateral.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el número de leucocitos en el fluido sinovial para animales tratados con OP-1 y para animales de control.

Las Figuras 3A y 3B son secciones histológicas de articulaciones de control y tratadas con OP-1.

50 La Figura 4 es un gráfico que muestra los niveles de sGAG en cartílago de cóndilo femoral medio para animales tratados con OP-1 y para animales de control.

La Figura 5 muestra resultados representativos de ovejas de control y tratadas con OP-1 en el modelo de osteoartritis. Las ovejas de control fueron tratadas sólo con colágeno. Las ovejas tratadas con OP-1 recibieron 350

µg de masilla de OP-1 en el momento de la cirugía y se inyectó una segunda dosis en el espacio articular 1 semana después.

La Figura 6 es una sección histológica de agujero 6 semanas después del tratamiento con masilla de OP-1.

La Figura 7 es una sección histológica de control de defecto de agujero de 6 semanas.

5 La Figura 8 es una sección histológica de control de defecto de agujero de 12 semanas.

La Figura 9 es una sección histológica de agujero 12 semanas después del tratamiento con masilla de OP-1.

La Figura 10 es una sección histológica de un defecto de desgarramiento meniscal 6 semanas después del tratamiento con masilla de OP-1.

10 La Figura 11 presenta el esquema de disección zonal para separar el disco en cuadrantes de anillo fibroso (AF) y el núcleo pulposo (NP) y la localización y extensión de la lesión anular anterolateral en el cuadrante 1 en secciones horizontal y vertical a través de discos intervertebrales ovinos lumbares. La localización de la lesión AF en las secciones horizontales 3 y 6 meses después de la cirugía queda bien ilustrada en la margen izquierda de esta figura. Las secciones histológicas verticales a lo largo del disco intervertebral y el cuerpo vertebral adyacente y los platos de crecimiento vertebral superior e inferior también demuestran la naturaleza focal de la lesión de AF (flecha) asociada a cambios en el colágeno del AF exterior (tricromo de Masson) y en la organización colagenosa (rojo de toluidina) en la zona de la lesión que penetra aproximadamente 4 mm en el disco (margen derecha de la figura).

15

La Figura 12 presenta puntos ROM de flexión-extensión correspondientes a unidad espinal funcional (FSU, del inglés "functional spinal unit") de oveja intacta y lesionada (lesión anular anterior).

La Figura 13 presenta la secuencia de aminoácidos correspondiente a la OP-1 humana.

20 **Descripción detallada de la invención**

Con el objetivo de que la invención descrita en la presente memoria pueda comprenderse en plenitud se presenta la siguiente descripción detallada.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que les daría comúnmente el especialista en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí para la práctica o los ensayos de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos, y no pretenden ser limitantes.

25

A lo largo de esta especificación, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", debe entenderse como que implica la inclusión de un integrante dado o grupo de integrantes, pero no la exclusión de cualquier otro integrante o grupo de integrantes.

30

A fin de definir adicionalmente la invención, se proporcionan aquí los siguientes términos y definiciones.

El término "cartílago" se refiere a un tipo de tejido conectivo que contiene condrocitos o células de tipo condrocito (que tienen muchas de las características de los condrocitos, aunque no todas) y material intracelular (por ejemplo, colágeno de Tipo I, II, IX y XI), proteoglicanos (por ejemplo, proteoglicanos de sulfato de condroitina, sulfato de queratano y sulfato de dermatano) y otras proteínas. Cartílago incluye cartílago articular y no articular.

35

El "cartílago articular", también denominado cartílago hialino, se refiere a un tejido conectivo avascular no mineralizado que recubre las superficies articulares de los huesos en las articulaciones y que actúa como interfaz reductora de la fricción entre dos superficies óseas opuestas. El cartílago articular permite el movimiento en las articulaciones sin que exista un contacto directo hueso a hueso. El cartílago articular no tiene tendencia a la osificación. La superficie cartilaginosa macroscópicamente tiene apariencia suave y perlada, y vista a gran aumento es finamente granular. El cartílago articular deriva nutrientes parcialmente de los vasos de la membrana sinovial circundante y parcialmente de los vasos del hueso que recubre. El cartílago articular está asociado a la presencia de colágeno de Tipo II y de Tipo IX y de varios proteoglicanos bien caracterizados, y a la ausencia de colágeno de Tipo X, que está asociado a la formación ósea endocranal. Para una descripción detallada de la microestructura de cartílago articular, véase, por ejemplo, Aydelotte y Kuettner, Conn. Tiss. Res., 18, página 205 (1988); Zanetti y col., J. Cell Biol., 101, página 53 (1985); y Poole y col., J. Anat., 138, página 13 (1984).

40

"Cartílago no articular" se refiere a cartílago que no recubre superficies articulares e incluye fibrocartílago (que incluye fibrocartílago interarticular, disco fibrocartilaginoso, fibrocartílago conector y fibrocartílago circunferencial) y cartílago elástico. En el fibrocartílago, la red de micropolisacáridos está entrelazada con lazos prominentes de colágeno y los condrocitos están dispersos más ampliamente que en el hialino o cartílago articular. El fibrocartílago interarticular se encuentra en articulaciones que están expuestas a contusiones y sometidas a movimiento frecuente, por ejemplo el menisco de la rodilla. Los ejemplos de dichas articulaciones incluyen, aunque sin limitación, las articulaciones temporo-mandibular, esterno-clavicular, acromio-clavicular, muñeca y rodilla. Mediante discos de

45

50

5 fibrocartilago se forma articulaciones cartilaginosas secundarias. Dichos discos fibrocartilaginosos, que se adhieren íntimamente a ambas superficies opuestas, están compuestos por anillos concéntricos de tejido fibroso, con láminas cartilaginosas interpuestas. Un ejemplo de dichos discos cartilaginosos es el disco intervertebral de la espina. El fibrocartilago conector se interpone entre las superficies óseas de las articulaciones que permiten una ligera
 5 movilidad, como entre los cuerpos de las vértebras y entre los huesos del pubis. El fibrocartilago circunferencial rodea el margen de algunas cavidades articulares tales como la cavidad cotiloidea de la cadera y la cavidad glenoidea del hombro.

10 El cartilago elástico contiene fibras de colágeno que son histológicamente similares a fibras de elastina. Este tipo de cartilago se encuentra en la aurícula del oído externo, en las trompas de Eustaquio, en la laringe cornícula y en la epiglotis. Como con todos los cartilagos, el cartilago elástico también contiene condrocitos y una matriz, estando esta última extendida por todas direcciones, mediante una red de fibras elásticas amarillas, que se ramifican y anastomosizan en todas las direcciones excepto inmediatamente alrededor de cada célula, en donde existe una cantidad variable de sustancia intercelular hialina no fibrilada.

15 La expresión “fluido sinovial” se refiere a una sustancia lubricante fina dentro de la cavidad sinovial que reduce la fricción dentro de la articulación.

20 El término “defecto” o “zona de defecto” se refiere a una disrupción del tejido condral u osteocondral. Un defecto puede asumir la configuración de un “vacío”, por el que se entiende un defecto tri-dimensional tal como, por ejemplo, un hueco, cavidad, agujero y otra disrupción sustancial de la integridad estructural del tejido condral u osteocondral. Un defecto también puede ser una separación del cartilago de su punto de unión con el hueso o con ligamentos. En determinadas realizaciones, el defecto es tal que es incapaz de una reparación endógena o espontánea. Un defecto puede ser el resultado de un accidente, una enfermedad y/o una manipulación quirúrgica. Por ejemplo, los defectos de cartilago pueden ser el resultado de un trauma en una articulación, tal como el desplazamiento de tejido de menisco rasgado dentro de la articulación. Los defectos de cartilago también pueden ser el resultado de enfermedades degenerativas de la articulación, tales como la osteoartritis.

25 El término “reparar” se refiere a la formación de nuevo cartilago que es suficiente para rellenar al menos parcialmente el vacío o la discontinuidad estructural en la zona del defecto. La reparación no significa, sin embargo, un proceso de curación completa o tratamiento que es 100% efectivo para restaurar un defecto a su estado fisiológico/estructural/mecánico pre-defecto.

30 La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva para reparar, regenerar, promover, acelerar, prevenir la degradación, o para formar tejido cartilaginoso.

El término “paciente” se refiere a un animal que incluye un mamífero (por ejemplo, un humano).

35 La expresión “proteína morfogénica” se refiere a una proteína que tiene actividad morfogénica. Preferiblemente, una proteína morfogénica de esta invención comprende al menos un polipéptido que pertenece a la familia de proteínas BMP. Las proteínas morfogénicas incluyen proteínas osteogénicas. Las proteínas morfogénicas pueden ser capaces de inducir a células progenitoras a proliferar y/o a iniciar mecanismos de diferenciación que conduzcan a la formación de tejido cartilaginoso, óseo, tendinoso, ligamentoso o de otro tipo, dependiendo del entorno local, y de por tanto las proteínas morfogénicas pueden comportarse de forma diferente en diferentes entornos. Por ejemplo, una proteína morfogénica puede inducir tejido óseo en una zona de tratamiento y tejido cartilaginoso en una zona de tratamiento diferente.

40 La expresión “proteína morfogénica ósea (BMP)” se refiere a una proteína que pertenece a la familia BMP de la superfamilia de proteínas TGF- β (familia BMP) en base a homología de secuencia de ADN y de aminoácidos. Una proteína pertenece a la familia BMP de acuerdo con esta invención cuanto tiene al menos un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con al menos un miembro conocido de la familia de BMP dentro del dominio conservado C-terminal rico en cisteína, que es característico de la familia de proteínas BMP. Preferiblemente, la proteína tiene al
 45 menos un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con al menos un miembro conocido de la familia BMP en el dominio conservado C-terminal rico en cisteína. Los miembros de la familia BMP pueden tener menos del 50% de identidad global de secuencia de ADN o de aminoácidos. La proteína osteogénica tal como se define también en la presente memoria es competente para inducir la formación de cartilago articular en una localización avascular apropiada in vivo.

50 La expresión “homología de secuencia de aminoácidos” se entiende que incluye tanto identidad como similitud de secuencia de aminoácidos. Las secuencias homólogas comparten residuos de aminoácidos idénticos y/o similares, en donde los residuos similares son sustituciones conservadoras, o “mutaciones puntuales permitidas”, correspondientes a residuos de aminoácido en una secuencia de referencia alineada. Por tanto, una secuencia de polipéptido candidata que comparte un 70% de homología de aminoácido con una secuencia de referencia es
 55 aquella en la que el 70% de los residuos alineados son idénticos o sustituciones conservadoras de los correspondientes residuos en una secuencia de referencia. Algunos polipéptidos morfogénicos particularmente preferidos comparten al menos un 60%, y preferiblemente un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos C-terminales 102-106, que definen el dominio conservado de siete cisteínas de la OP-1 humana y

proteínas relacionadas.

Se puede determinar la homología de secuencia de aminoácidos mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar el porcentaje de homología de una secuencia de aminoácidos candidata con respecto a la secuencia del dominio de siete cisteínas, primero se alinean las dos secuencias. El alineamiento se puede hacer con, por ejemplo, el algoritmo de programación dinámica descrito en Needleman y col., J. Mol. Biol., 48, página 443 (1970), y el programa Align, un paquete de software comercial producido por DNASTar, Inc. Un alineamiento inicial puede refinarse mediante la comparación con un alineamiento multi-secuencia de una familia de proteínas relacionadas. Una vez que el alineamiento ha sido ejecutado y refinado, se calcula una puntuación de porcentaje de homología. Los residuos de aminoácido alineados de las dos secuencias se comparan secuencialmente para determinar la similitud entre otros. Los factores de similitud incluyen un tamaño, forma y carga eléctrica similares. Un método particularmente preferido para determinar similitudes de aminoácidos es la matriz PAM250 descrita en Dayhoff y col., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5, páginas 345-352 (1978 y Sup.). Primero se calcula una puntuación de similitud como la suma de las puntuaciones de similitudes de aminoácidos alineadas par a par. Para los propósitos de porcentaje de homología e identidad, se ignoran las inserciones y las eliminaciones. Por consiguiente, en este cálculo no se emplean penalizaciones por huecos. La puntuación obtenida es normalizada a continuación dividiéndola por la media geométrica de las puntuaciones de la secuencia candidata y el dominio de siete cisteínas. La media geométrica es la raíz cuadrada del producto de estas puntuaciones. La puntuación normalizada sin refinar es el porcentaje de homología.

La expresión "sustituciones conservadoras" se refiere a residuos que son física o funcionalmente similares a los correspondientes residuos de referencia. Es decir, una sustitución conservadora y su residuo de referencia tienen similar tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas que incluyen la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservadoras preferidas son aquellas que cumplen los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff y col., ver más arriba. Los ejemplos de sustituciones conservadoras son sustituciones que entran en los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparagina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina. La expresión "variante conservadora" o "variación conservadora" también incluye el uso de un residuo de aminoácido sustituyente en lugar de un residuo de aminoácido presente en una secuencia de aminoácidos original dada, en donde los anticuerpos específicos para la secuencia original también son específicos, es decir dan lugar a "reacción cruzada" o "reacción inmune", para la secuencia de polipéptido sustituida resultante.

La expresión "proteína osteogénica (PO)" se refiere a una proteína morfogénica que es capaz de inducir que una célula progenitora forme cartílago y/o hueso. El hueso puede ser hueso intramembranoso o hueso endocranal. La mayoría de las proteínas osteogénicas son miembros de la familia de proteínas BMP y por tanto también son BMPs. Tal como se ha descrito en otro punto de la presente memoria, la clase de proteínas está tipificada por la proteína osteogénica humana (hOP-1). La proteína osteogénica útil para la práctica de la invención es una forma osteogénicamente activa de la OP-1 y las variantes de secuencia de aminoácidos de la misma. La OP-1 adecuada para su utilización en la invención de los solicitantes puede ser identificada por medio de experimentación rutinaria usando el bioensayo reconocido en la técnica descrito por Reddi y Sampath (Sampath y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 84, páginas 7109-13).

Composiciones para el crecimiento y la reparación de cartílago y sus usos

Las composiciones pueden usarse para la reparación de cartílago (por ejemplo, en una articulación o un menisco). Las composiciones que comprenden OP-1 descritas en la presente memoria permitirán al médico correspondiente tratar una serie de lesiones de tejido, afecciones y trastornos degenerativos o de enfermedad de tejido que pueden aliviarse o remediarse mediante una regeneración o reparación de tejido localizada estimulada.

La invención proporciona composiciones para su uso en el tratamiento de lesiones de tejido cartilaginoso y de enfermedades o trastornos degenerativos de cartílagos que incluyen, aunque sin limitación, osteoartritis, desgarros de menisco y lesiones de LCA.

En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones para su uso para reparar o regenerar cartílago en una zona de defecto de cartílago en un paciente. La invención también proporciona composiciones para uso para producir cartílago, promover el crecimiento de cartílago acelerando la formación de cartílago en una zona de defecto de cartílago, y para uso en la prevención de la degradación de cartílago en un paciente.

La composición para uso en la presente invención está destinada a ser administrada en el fluido sinovial que rodea al cartílago. En algunas realizaciones, el cartílago es cartílago articular. En otras realizaciones, el cartílago es cartílago no articular. En algunas realizaciones, el cartílago no articular incluye, aunque sin limitación, menisco interarticular.

Familia de proteínas morfogénicas de hueso

La familia BMP, llamada así por los miembros representativos de familia de proteínas morfogénicas/osteogénicas, pertenece a la superfamilia de proteínas TGF- β . De las "BMPs" conocidas (BMP-1 a BMP-18), aisladas

principalmente en base a homología de secuencia, todas excepto la BMP-1 están clasificadas como miembros de la familia BMP de proteínas morfogénicas (Ozkaynak y col., EMBO J., 9, páginas 2085-93 (1990)).

La familia BMP incluye otros miembros estructuralmente relacionados que son proteínas morfogénicas, que incluyen los productos de complejo génico decapentapléptico (DPP) de *Drosophila*, el producto Vg1 de *Xenopus laevis* y su homólogo murino, Vgr-1 (véase, por ejemplo, Massagué, Annu. Rev. Cell Biol., 6, páginas 597-641 (1990)).

Los dominios C-terminales de BMP-3, BMP-5, BMP-6 y OP-1 (BMP-7) son idénticos en aproximadamente un 60% al de la BMP-2, y los dominios C-terminales de BMP-6 y OP-1 son idénticos en un 87%. LABMP-6 es probablemente el homólogo humano de la Vgr-1 murina (Lyons y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, páginas 4554-59 (1989)); las dos proteínas son idénticas en un 92% en general a nivel de secuencia de aminoácidos (Patente de EE.UU. N° 5.459.047). La BMP-6 es idéntica en un 58% al producto Vg-1 de *Xenopus*.

Propiedades bioquímicas estructurales y funcionales de las proteínas morfogénicas de hueso

Los morfógenos óseos naturales comparten una homología de secuencia de aminoácidos sustancial en sus regiones (dominios) C-terminales. Habitualmente, las proteínas osteogénicas naturales mencionadas anteriormente son traducidas como un precursor, que tiene una secuencia de péptido señal N-terminal típicamente de menos de aproximadamente 30 residuos, seguida de un dominio "pro" que es separado para producir el dominio C-terminal maduro de aproximadamente 97-106 aminoácidos. El péptido señal es separado rápidamente en la traducción, en una zona de ruptura que puede predecirse para una secuencia dada usando el método de Von Heijne, Nucleic Acids Research, 14, páginas 4683-4691 (1986). El dominio pro típicamente es aproximadamente tres veces más grande que el dominio C-terminal maduro completamente procesado.

Otra característica de los miembros de la familia de proteínas BMP es su aparente capacidad para dimerizar. Se han encontrado varias proteínas osteogénicas (OPs) derivadas de hueso y BMPs en forma de homo y heterodímeros en sus formas activas. La capacidad de las OPs y de las BMPs para formar heterodímeros puede conferir capacidades inductivas morfogénicas adicionales o alteradas en las proteínas morfogénicas. Los heterodímeros pueden exhibir afinidades de unión cualitativa o cuantitativamente diferentes a los homodímeros para las moléculas receptoras de OP y BMP. Unas afinidades de unión alteradas pueden conducir a su vez a una activación diferencial de los receptores que median en diferentes mecanismos de señalización, lo que en definitiva conduce a diferentes actividades o productos biológicos. Las afinidades de unión alteradas también pueden manifestarse de un modo específico del tipo de tejido o célula, induciendo de este modo que sólo unos tipos concretos de células progenitoras se vean sometidas a proliferación y/o diferenciación.

El polipéptido de OP-1, tal como se usa en la presente memoria, comparte una relación definida con una secuencia presente en la OP-1 humana osteogénicamente activa, la SEC ID N°: 1 (Véase la Figura 1). La OP-1, tal como se usa en la presente memoria, comparte una relación definida con al menos el dominio C-terminal de seis cisteínas de la OP-1 humana, los residuos 335-431 de la SEC ID N°: 1, en particular con al menos el dominio C-terminal de siete cisteínas de la OP-1 humana, los residuos 330-431 de la SEC ID N°: 1.

Se ha descrito la proteína osteogénica OP-1 (véase, por ejemplo, Oppermann y col., Patente de EE.UU. N° 5.354.557). La proteína de origen natural en su forma nativa madura es un dímero glicosilado que típicamente presenta un peso molecular aparente de aproximadamente 30-36 kDa, según se determina mediante SDS-PAGE. 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 el estado reducido, la proteína no presenta actividad osteogénica detectable. La proteína no glicosilada, que también presenta 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. La OP-1, tal como se usa en la presente memoria, puede incluir formas que tienen estructuras de glicosilación que varían, extremos N que varían y formas truncadas o mutadas de la proteína nativa.

Las publicaciones que describen secuencias de OP-1, así como sus propiedades químicas y físicas, incluyen: Patente de EE.UU. N° 5.011.691; Patente de EE.UU. N° 5.266.683; Ozkaynak y col., EMBO J., 9, páginas 2085-2093 (1990).

En otra realización de esta invención, la proteína OP-1 puede prepararse sintéticamente para inducir la formación de tejido. La OP-1 preparada sintéticamente puede ser una proteína nativa o puede ser una proteína no nativa, es decir, una que no se encuentra en la naturaleza.

En una realización preferida de esta invención, la proteína OP-1 comprende un par de subunidades de OP-1 unidas por puentes de disulfuro para producir una especie dimérica. En otra realización preferida de esta invención, la proteína OP-1 comprende un par de subunidades de OP-1 que producen una especie dimérica formada mediante interacciones no covalentes. Las interacciones no covalentes incluyen interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas.

Como se ha indicado anteriormente, la OP-1 útil en la presente invención generalmente es una proteína dimérica que comprende un par plegado de polipéptidos. Dicha OP-1 es inactiva cuando está reducida, pero es activa en forma de homodímero oxidado. En algunas realizaciones, la OP-1 es un monómero.

5 La OP-1 útil en la presente invención incluye cualquier OP-1, tanto aislada a partir de fuentes naturales como producida mediante técnicas recombinantes de ADN u otras técnicas sintéticas, e incluye las variantes de contrapartida filogenética y alélica de dicha proteína, así como las muteínas de las misma y diversas construcciones truncadas y de fusión. También se contempla que los mutantes de eliminación o adición son activos, incluyendo aquellos que pueden alterar el dominio conservado C-terminal de seis o siete cisteínas, siempre que la alteración no afecte funcionalmente a la relación entre dichas cisteínas en la estructura plegada. Por consiguiente, dichas formas
10 activas son consideradas equivalentes a la OP-1 descrita específicamente en la presente memoria. La OP-1 puede incluir formas que tienen estructuras de glicosilación variables, extremos N variables, una familia de proteínas relacionadas que presentan regiones de homología de secuencia de aminoácidos y formas activas truncadas o mutadas de proteínas nativas o biosintéticas, producidas mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedantes.

15 La OP-1 contemplada en la presente memoria puede ser expresada a partir de ADNc intacto o truncado o a partir de ADNs sintéticos en células hospedantes procariontes o eucariotas, y puede purificarse, dividirse, replegarse y dimerizarse para formar composiciones morfogénicamente activas. Las células hospedantes preferidas actualmente incluyen, sin limitación, procariontes que incluyen *E. coli* o eucariontes que incluyen células de levadura o de mamífero, tales como células CHO, COS ó BSC. El especialista en la técnica apreciará que se pueden usar otras
20 células hospedantes para obtener ventaja. Las descripciones detalladas de la OP-1 útil en la práctica de esta invención, incluyendo cómo prepararla, usarla y probarla para determinar su actividad osteogénica, se describen en numerosas publicaciones, que incluyen las Patentes de EE.UU. N° 5.266.683 y 5.011.691, así como en cualquiera de las publicaciones citadas en la presente memoria.

25 Por tanto, a la vista de esta descripción y del conocimiento disponible en la técnica, los ingenieros genéticos especialistas pueden aislar genes procedentes de ADNc o de bibliotecas genómicas de diferentes especies biológicas, que codifican secuencias de aminoácido apropiadas, o pueden construir ADNs a partir de oligonucleótidos, y a continuación pueden expresarlos en varios tipos de células hospedantes, que incluyen tanto procariontes como eucariontes, para producir grandes cantidades de proteínas activas capaces de estimular la morfogénesis de hueso y cartílago en un mamífero.

30 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas que comprenden OP-1 pueden ser una disolución líquida o una suspensión líquida. Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con esta invención son para ser administradas al fluido sinovial.

35 Las composiciones farmacéuticas que comprenden OP-1 pueden, por ejemplo, incluirse en formulaciones esterilizadas isotónicas. La formulación es líquida.

Las composiciones para su uso de acuerdo con esta invención son formulaciones de liberación sostenida, formulaciones de administración lenta, formulaciones mediante las cuales se retarda la eliminación de la proteína morfogénica. Existen numerosos materiales de administración disponibles para preparar estas composiciones. Incluyen, aunque sin limitación, microesferas de polímeros de ácido poliláctico/poliglicólico, liposomas, colágeno, polietilén glicol (PEG), matrices de ácido hialurónico/fibrina, ácido hialurónico, fibrina, quitosán, gelatina, Sistema SABER™ (isobutirato de acetato de sacarosa (SAIB)), DURIN™ (polímero biodegradable para implantes cargados de fármaco), MICRODUR™ (polímeros biodegradables/microencapsulación) y DUROS™ (bomba mini-osmótica). En algunas realizaciones, la proteína morfogénica está ligada covalentemente al material de administración.

45 Las composiciones para su uso de acuerdo con esta invención contienen OP-1 dispersa en un material portador biocompatible que actúan como un sistema de administración adecuado para los compuestos. Los ejemplos adecuados de vehículos de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen poliláctidos (Patente de EE.UU. N° 3.773.319; EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman y col., Biopolymers, 22, páginas 547-56 (1985)); poli(2-hidroxietil-metacrilato), etilén vinil acetato (Langer y col., J. Biomed. Mater. Res., 15, páginas 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech. 12, páginas 98-105 (1982)) o ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico (EP 133.988), ácido poliláctico, ácido poliglicólico o los polímeros de los mismos.

55 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con esta invención también pueden administrarse usando, por ejemplo, microesferas, liposomas, otros sistemas de administración microparticulados o formulaciones de liberación sostenida colocadas dentro, cerca o en comunicación con los tejidos afectados, los fluidos que bañan dichos tejidos (por ejemplo, fluido sinovial) o el torrente sanguíneo que baña dichos tejidos.

Se pueden preparar liposomas que contengan OP-1 mediante métodos bien conocidos (véase, por ejemplo, DE 3.218.121; Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, páginas 3688-92 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, páginas 4030-34 (1980); Patentes de EE.UU. N° 4.485.045 y 4.544.545). De forma ordinaria, los liposomas son de tipo unilamelar pequeños (aproximadamente 200-800 Angstroms), en donde el contenido lipídico es superior al aproximadamente el 30% molar de colesterol. La proporción de colesterol se selecciona para controlar la velocidad óptima de liberación de la proteína morfogénica.

La OP-1 usa en esta invención también puede ligarse a liposomas. La unión de OP-1 a liposomas puede llevarse a cabo mediante cualquier agente reticulante conocido tal como agentes reticulantes heterobifuncionales que han sido utilizados ampliamente para acoplar toxinas o agentes quimioterapéuticos a anticuerpos para una administración dirigida. La conjugación a liposomas también puede llevarse a cabo usando el reactivo reticulante dirigido a carbohidratos hidrazide de ácido 4-(4-maleimidofenil)-butírico (MPBH) (Duzgunes y col., J. Cell. Biochem. Abst. Suppl. 16E 77 (1992)).

El especialista en la técnica puede crear una formulación biocompatible y/o biodegradable seleccionada para promover la inducción de tejido.

Un vehículo válido para OP-1 debería llevar a cabo varias funciones importantes. Debería actuar como un sistema de administración lenta de OP-1 o de eliminación retardada de la proteína morfogénica, y proteger la proteína morfogénica frente a proteólisis no específica.

Adicionalmente, los materiales seleccionados deben ser compatibles *in vivo* y preferiblemente deben ser biodegradables. El ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y las diversas combinaciones presentan diferentes velocidades de disolución *in vivo*.

El vehículo también puede adoptar la forma de un hidrogel. Cuando el material vehículo comprende un hidrogel, se refiere a una red tridimensional de polímeros hidrofílicos reticulados en la forma de un gel compuesto sustancialmente por agua, preferiblemente, aunque sin limitación, geles que tengan más de un 90% de agua. El hidrogel puede tener carga neta positiva o carga neta negativa, o puede ser neutro. Un hidrogel típico con carga neta negativa puede caracterizarse por componentes de la matriz extracelular tales como colágeno y laminina. Los ejemplos de componentes de matriz extracelular disponibles comercialmente incluyen Matrigel™ y Vitrogen™. Un ejemplo de un hidrogel de carga neutra es el óxido de polietileno altamente reticulado o el polivinilalcohol.

Niveles de dosificación de entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 1000 µg al día, preferiblemente de entre 3 µg y 50 µg al día, de OP-1 son útiles para la reparación y regeneración de cartílago. Como apreciará el especialista en la técnica, pueden requerirse niveles de dosis inferiores o superiores a los indicados. La dosificación y los regímenes de tratamiento específicos para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen la actividad de la proteína morfogénica específica empleada, de la edad, del peso corporal, del estado general de salud, del sexo, de la dieta, del tiempo de administración, de la velocidad de excreción, de la combinación de fármacos, de la gravedad del daño del tejido y del juicio del médico responsable.

EJEMPLO 1: Reparación de defectos osteocondrales en el modelo de perro

Se someterá a cirugía a 12 perros macho adultos criados expresamente para este propósito. Ambas extremidades traseras se prepararán y se cubrirán de un modo estéril. Se hará una incisión pararotular media de aproximadamente cuatro centímetros de longitud. Se retraerá lateralmente la rótula para exponer el cóndilo femoral. En el cóndilo medio derecho se creará un defecto de 5,0 mm de diámetro que se extienda a través de la capa de cartílago y que penetre en el hueso subcondral hasta una profundidad de 6 mm en la región central de carga del cóndilo femoral con una broca de perforación especialmente diseñada o modificada de 5,0 mm. Los animales se dividirán en dos grupos de 6 animales cada uno. En el primer grupo, tras una irrigación copiosa con disolución salina para eliminar los trozos y las células de médula liberadas, se aplicará la OP-1 de tiempo de liberación apropiado al fluido sinovial que rodea al defecto. En el primer grupo de 6 animales, los defectos de la derecha recibirán la OP-1 de liberación con el tiempo. La extremidad izquierda de todos los animales servirá como control que recibe partículas de control (0% de OP-1).

El segundo grupo de 6 animales no recibirá tratamiento con OP-1 en el momento de la cirugía. A los 3 días de la cirugía, se inyectará la formulación apropiada de OP-1 de liberación con el tiempo en el fluido sinovial que rodea a la articulación con el defecto. En los 6 animales se inyectará la OP-1 de liberación con el tiempo en el fluido sinovial alrededor del defecto derecho. La extremidad izquierda de todos los animales servirá como control que recibe partículas de control (0% de OP-1).

Los animales serán sacrificados a las 16 semanas de la cirugía. En el sacrificio se extraerán los fémures distales como una unidad y las zonas de defecto se evaluarán histológicamente y en conjunto en base al esquema de Moran y col. (J. Bone Joint Surg. 74B: 659-667, 1992) que se ha usado en investigaciones previas.

Se tomarán radiografías de las extremidades traseras antes de operar, inmediatamente después de operar y en la semana 16 del postoperatorio. Las radiografías preoperatorias se usarán para asegurar que no había anomalías preexistentes y para verificar la madurez esquelética. Las radiografías postoperatorias se usarán para determinar el

lugar del defecto. Las radiografías de sacrificio se usarán para determinar la velocidad de curación y restauración del hueso subcondral y de la superficie articular. Las radiografías se tomarán en una misma semana desde la fecha de evaluación.

5 El examen patológico general de los cadáveres se llevará a cabo inmediatamente después del sacrificio. Se extraerán inmediatamente los fémures distales como una unidad y se almacenarán en toallas empapadas en disolución salina y se colocarán en bolsas de plástico etiquetadas. Se tomarán fotografías de alta resolución de las zonas de defecto y etiquetarán cuidadosamente.

10 Los tejidos blandos serán extirpados de la zona de defecto mediante disección meticulosa y se extraerá el extremo proximal del fémur. Con una sierra de diamante refrigerada con agua se aislará cada zona de defecto para la evaluación histológica.

15 Los especímenes se fijarán mediante inmersión en una disolución de paraformaldehído al 4% y se prepararán para el procesamiento histológico descalcificado. Se cortarán tres secciones de tres niveles de cada bloque. Los niveles 1 y 3 serán los más próximos al perímetro del defecto. El nivel 2 estará localizado en el centro del defecto. Se teñirán tres secciones de cada nivel con azul de toluidina y Safranin O y verde rápido. Las secciones se graduarán en base al esquema de Moran y col. (J. Bone Joint Surg. 74B: 659-667, 1992).

Es de esperar que los animales tratados con OP-1 exhiban una reparación mejorada de los defectos osteocondrales en comparación con los animales de control.

EJEMPLO 2: Modelo de oveja de regeneración de defectos condrales mediante administración intraarticular de OP-1 en microesferas de liberación con el tiempo

20 Se someterá a cirugía a 18 ovejas adultas criadas expresamente para este fin. Con un instrumento especialmente diseñado, se creará un defecto condral de 10 mm en la rodilla de la extremidad trasera izquierda de las 18 ovejas en la superficie del cóndilo que soporta la carga de peso, de 2 mm de profundidad sobre la capa calcificada (la exposición de sangre se considerará un fallo). Las rodillas derechas de todos los animales se mantendrán intactas para actuar como control.

25 Grupo 1 (6 animales): en el día 3 del postoperatorio, la rodilla izquierda de cada animal recibirá una inyección intra-articular de una suspensión de 250 µL que contiene 57 mg de microesferas al 0,3% de control sin OP-1.

Grupo 2 (6 animales): en el día 3 del postoperatorio, la rodilla izquierda de cada animal recibirá una inyección intra-articular de una suspensión de 250 µL que contienen 57 mg de microesferas al 0,3% que contienen 170 µg de OP-1.

30 Grupo 3 (6 animales): en el día 3 del postoperatorio y en la semana 6 del postoperatorio, la rodilla izquierda de cada animal recibirá una inyección intraarticular de una suspensión de 250 µL que contiene 57 mg de microesferas al 0,3% que contienen 170 µg de OP-1.

La evaluación artroscópica de las rodillas se llevará a cabo en las semanas 3 y 6 del postoperatorio para todos los animales. Se realizarán escáneres de RMN/IRM en las semanas 3 y 6 del postoperatorio. También se llevará a cabo periódicamente una evaluación mecánica de las rodillas.

35 Todos los animales serán sacrificados en el mes 3 del postoperatorio. Tras el sacrificio se realizará una histología, una histomorfometría, una inmunotinción y una hibridación in situ para determinar marcadores específicos de condrocitos articulares. Es de esperar que las rodillas tratadas con OP-1 exhiban una regeneración mejorada respecto a las rodillas de control.

EJEMPLO 3: Modelo de oveja para la prevención de osteoartritis

40 Se usan ovejas como modelo para la osteoartritis porque se ha demostrado que en estos animales se produce una osteoartritis progresiva después de un impacto de lesión sencilla. En este estudio se utilizaron doce ovejas hembra adultas cruzadas que fueron aclimatadas durante 14 días. Todas las ovejas recibieron anestesia general y, usando técnicas asépticas, se practicó una artrotomía de 3 cm para permitir el acceso a ambas articulaciones femorotibiales. Se usó un mecanismo mecánico de muelle cargado para crear lesiones de impacto bilateral en la región de carga de peso del cóndilo femoral medio (30 MPa, diámetro de 6 mm x 2) (véase la figura 1). Tras una sutura rutinaria de las incisiones, las ovejas recibieron una inyección intra-articular en cada rodilla de OP-1 en un vehículo de colágeno y carboximetilcelulosa (Implante de OP-1, 340 µg) o vehículo solo. Se usaron dos grupos experimentales (N=6). El grupo A recibió 0,3 mL de OP-1 + colágeno + carboximetilcelulosa intra-articularmente en una rodilla en el momento de la cirugía (día 0) y una semana después (día 7). Las inyecciones del día 0 se administraron inmediatamente después del cierre de la incisión quirúrgica. El grupo B recibió OP-1 en una rodilla en los días 0, 7, 14, 21 y 35. Se aspiró el fluido sinovial antes de la inyección de la OP-1 y vehículo para permitir la medida de los valores de leucocitos y de proteína total como indicadores de inflamación. El tratamiento con OP-1 redujo significativamente los leucocitos en el fluido sinovial 1 semana después de la operación (p<0.003, ensayo T emparejado) pero no la concentración total de proteínas (véase la figura 2).

5 Las ovejas fueron sacrificadas 12 semanas después de la operación para una evaluación detallada (tinción paravital, tinción TUNEL, histopatología, cartílago, análisis GAG sulfatado, ensayo de indentación biomecánica) de los tejidos articulares. El cartílago anormal (captación de tinta de India) fue significativamente diferente entre los grupos ($p < 0.03$) debido a que las lesiones en las rodillas de OP-1 a menudo se limitaban a un brillo/reflectividad reducido, mientras que las articulaciones de control presentaban áreas de fibrilación o erosión (véase la tabla 1).

Tabla 1

Animal	Cartílago anormal % ¹	
	Vehículo	OP-1
28	20	5
29	40	20
30	60	0
31	50	20
32	70	10
33	25	10

¹ A partir de captación de tinta de India sobre la superficie de la articulación, fotografía digital, medidas de área escaladas usando el software de morfometría Northern Eclipse™.

10 Las secciones histológicas mostraron agrupaciones de condrocitos, matriz acelular y pérdida de cartílago en las articulaciones tratadas con vehículo (figura 3A), mientras que las lesiones en articulaciones tratadas con OP-1 (figura 3B) consistieron en una pérdida de condrocitos en la zona superficial y/o pequeñas fisuras. La puntuación de histología Mankin no fue significativamente diferente ($p < 0,06$, Wilcoxon Signed Rank Test), pero el sistema de puntuación OARSI, que es sensible al tamaño de la lesión, demostró ser valioso ($p < 0,03$) (ver tabla 2) (van der Sluijs J. y col., The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. Ortho Res 1992, 10: 58-61).

15 Tabla 2

Animal	Puntuación Mankin modificada ¹		Puntuación OARSI ²	
	Vehículo	OP-1	Vehículo	OP-1
28	4	2	6	2
29	4	2	8	1,5
30	4	2	8	1
31	5	1	12	5
32	4	3	13,5	4
33	6	3	10	4

¹ La puntuación Mankin modificada está entre 0 y 13, siendo 0 cartílago normal.

² Cálculo de la puntuación internacional de la Osteoarthritis Research Society = gravedad de la lesión x área con un máximo de 24 para una única lesión.

20 Las concentraciones de glicosaminoglicano sulfatado fueron superiores en el grupo tratado con OP-1 con una fuerte tendencia hacia la significación estadística ($p < 0,06$) (ver figura 4).

El grupo de colágeno/CMC solo dio como resultado fibrilaciones y erosión de la superficie, mientras que el grupo de OP-1 muestra poco o ningún daño (véase la figura 5). Las articulaciones tratadas con OP-1 parecen más sanas y brillantes que las de los controles.

25 Estos experimentos demuestran una clara mejora, si no la protección completa con dos inyecciones de OP-1. Pequeñas lesiones pueden persistir tras la terapia debido a que se pueden producir defectos de grosor parcial de lesiones por impactos de 30 MPa que es improbable que se reparen completamente. La OP-1 fue capaz de suprimir la extensión centrífuga de los cambios degenerativos sobre el cóndilo femoral, mientras que las articulaciones tratadas con vehículo desarrollaron una osteoartritis unicompartimental. El mecanismo mediante el cual la OP-1 ejerce este efecto puede ser a través de sus propiedades anabólicas, que afectan a la reparación. Sin embargo, había poco tejido reparado en las zonas de impacto, por lo que puede que otro mecanismo que promueve la supervivencia de condrocitos lesionados sea operativo. Estas observaciones indican que la OP-1 puede ser útil para otras aplicaciones tales como la ingeniería de tejidos y las terapias basadas en células, en donde la lesión puede producirse cuando las células son recolectadas o manejadas.

EJEMPLO 4: Modelo de oveja para el efecto terapéutico de OP-1 tras inyección intra-articular

5 Este estudio usará N=12 ovejas hembra adultas cruzadas de 1,5-2,5 años de edad que son aclimatadas durante 14 días y que pasan un reconocimiento de salud antes de pasar a formar parte del estudio. Con anestesia general y usando una técnica aséptica, todas las ovejas recibirán lesiones de impacto de 30 MPa estandarizadas en ambos (izquierdo y derecho) cóndilos femorales medios mediante una artrotomía de 3 cm mínimamente invasiva. Tres semanas después de la operación, las ovejas serán sedadas con diazepam (10 mg/kg) y quetamina (3-5 mg/kg) para permitir una preparación aséptica de la rodilla para sinoviocentesis e inyección del artículo en evaluación, placebo o disolución salina fisiológica en la articulación femorotibial media de acuerdo con la Tabla 3.

Tabla 3

		Semana		0	3	4	8	12	16
Dosis	Grupo	Nº de animales	Nº de rodillas	Cirugía	Inyección intra-articular				
Dos dosis 3 y 4 semanas después de lesión	Ensayo-L	9	9	Cirugía de impacto	OP-1/P	OP-1/P			Sacrificio
	Placebo-R		9		Placebo	Placebo			
Controles salinos	Control salino-R	3	6	Lesión de impacto	Salino	Salino			Sacrificio
	Control salino-L				Ninguno	Ninguno			
Animales totales en estudio		12							
Aspiración de fluido sinovial				x	x	x	x	x	x

10 R: extremidad derecha; L: extremidad izquierda.

Todas las ovejas recibirán lesiones en el cóndilo femoral medio bilateral. En el primer grupo de nueve ovejas, una rodilla recibirá el artículo de ensayo y la rodilla contralateral recibirá un placebo que consiste en el vehículo solo. Los tratamientos de rodilla recibirán disolución salina fisiológica USP como control para determinar el efecto del placebo.

15 El estudio seguirá el siguiente procedimiento establecido en la Tabla 4:

Tabla 4

Día -14 a día -1	Pre-acondicionamiento, programa de mantenimiento de salud, recorte de pezuñas, ensayo de fiebre-Q
Semana 0 a semanas 3, 4	Cirugía y lesión de impacto en ambas rodillas de las ovejas. Recolección de fluido sinovial. El fluido sinovial recogido y OP-1 y placebo se inyectan en las respectivas articulaciones.
Semana 8, 12	Recolección de fluido sinovial usando técnicas asépticas y sedación. Congelación de 2 alícuotas de fluido sinovial (de 200 µL cada una) y procesado de una alícuota fresca de EDTA para el recuento de leucocitos totales, recuentos diferenciales y determinación de proteínas totales.
Semana 16	Sacrificar todas las ovejas. Recoger fluido sinovial y tejidos para inspección detallada.

EJEMPLO 5: Modelos de cobaya y conejo para osteoartritis

Se utilizaron los modelos de osteoartritis de resección de LCA (inducida) de cobaya Hartley y de conejo. Catorce cobayas de 3, 6 ó 9 meses de edad fueron inyectadas en la rodilla derecha con una disolución salina tamponada de fosfato (PBS) que contenía 50 µg de rhOP-1 a intervalos de 3 semanas durante un periodo de 12 semanas. La rodilla izquierda sirvió como control sin tratamiento.

- 5 A diez conejos Blancos de Nueva Zelanda se les reseccionó el LCA izquierdo y recibieron una inyección en la articulación de 100 µg de rhOP-1 en una disolución de PBS o de una disolución de control a intervalos de 3 semanas durante un periodo de evaluación de 12 semanas. La rodilla derecha sirvió como control no tratado con LCA reseccionado para todos los animales.

10 Todos los animales de ambos modelos fueron evaluados en términos de apariencia general y de evidencias histológicas de cambios artríticos usando una escala Mankin modificada para graduar la gravedad de la degeneración. Las rodillas de cobayas sin tratar desarrollaron una progresión de cambios artríticos de 3 a 6, de 6 a 9 y de 9 a 12 meses de edad con una degeneración severa aparente global e histológicamente a los 12 meses de edad. El tratamiento con OP-1 presentó el efecto más profundo en la prevención de la degeneración en la cobaya en los periodos tempranos. La degeneración global e histológica en la rodilla a los 9 meses de edad en los animales tratados con rhOP-1 fue similar a los animales no tratados a los 6 meses de edad. A los 12 meses de edad, la gravedad de los cambios degenerativos era comparable. En el modelo de conejo con LCA reseccionado, el tratamiento con OP-1 mostró una ligera mejoría en la gravedad de la degeneración en las zonas tratadas en el periodo de evaluación de 12 semanas. Estos resultados demuestran que la OP-1 tiene algunos efectos beneficiosos para prevenir o frenar los cambios artríticos de la etapa inicial.

EJEMPLO 6: Modelo de oveja para curación de menisco

25 En cada menisco de ambas rodillas de las ovejas se creó un agujero (6 mm de diámetro) y un desgarro longitudinal (2 cm de largo) suturado mediante hilo no reabsorbible. Hubo dos grupos de tratamiento: de masilla de OP-1 (3,5 mg de OP-1/gramo de colágeno de tipo 1 bovino con carboximetilcelulosa) y un grupo de control sin ningún tratamiento más que el defecto creado quirúrgicamente. Los animales tratados con OP-1 recibieron 0,3 mL (350 µg) inyectados en el espacio articular antes de cerrar la incisión, y después fueron inyectados en el espacio articular 7 días después de la cirugía.

30 6, 12 y 26 semanas después del tratamiento, los animales serán sometidos a eutanasia. Tras la eutanasia, se extraerá el menisco y se cortará en dos partes, la anterior, con el desgarro longitudinal suturado, y la posterior, con el agujero. Las secciones serán teñidas con Tricromo de Masson y safranina O. También se puede llevar a cabo la inmunohistoquímica del menisco usando anticuerpos específicos para detectar colágeno I, II, VI, S100, proteasas MMP1.

35 Se separará una sección de menisco, se embeberá en OCT y se congelará en nitrógeno líquido. Las secciones obtenidas con un criostato se recolectarán, se homogeneizarán y se preparará el ARN usando reactivo Trizol. Se llevará a cabo RT-PCR para estudiar la expresión génica de varios marcadores que incluyen colágeno de tipo I, tipo II y agregano con marcadores para matriz extracelular, TGF-β e IGF-2 como factores de crecimiento, MMP-1, MMP-3 y TIMP-1 como enzimas degradadoras de matriz, y finalmente ciclina A, Bcl-2, BAX y caspasa 3 como marcadores para células proliferantes y en estado apoptótico. También se inspeccionará otro tejido de articulación y se comparará con controles para determinar cualquier diferencia global que pueda deberse a la OP-1.

40 Los resultados preliminares del efecto de masilla de OP-1 en los agujeros del área avascular del menisco indican que en todos los meniscos con defectos de agujero se observó un efecto positivo tras el tratamiento con masilla de OP-1. La masilla se mantuvo durante las primeras seis semanas, para después ser reabsorbida y desaparecer. Cabe destacar que se produjo una penetración notable de células desde la superficie del menisco hacia el interior de los agujeros, que se rellenaron principalmente con tejido fibroso desde la octava semana en adelante.

45 A las 6 semanas, la mayoría de los animales de control tenían poca materia rellenando los defectos, y la materia presente era fibrosa y tenue. En los defectos tratados con OP-1, había más tejido presente junto con colágeno particulado. La respuesta celular resultó ser mayor en el grupo de OP-1 (véase las figuras 6 y 7). A las 12 semanas, la mayoría de los defectos de control seguían vacíos. Se observó poca actividad celular en la periferia del defecto. Los defectos tratados con OP-1 todavía contenían partículas de colágeno, pero parecía haber un aumento de celularidad rodeando al defecto, y algo de progresión hacia la formación de nuevo tejido (véase la figura 8). Tras 25 semanas se observó la formación de puentes fibrosos en algunos de los animales de control, pero la mayoría eran de naturaleza tenue. Las partículas de colágeno desaparecieron de los defectos en el grupo de OP-1 y fueron reemplazadas predominantemente con tejido fibroso. La remodelación resultó seguir siendo activa (véase la figura 9).

55 Los resultados preliminares sobre el efecto de masilla de OP-1 en la reparación de meniscos con lesiones longitudinales no fueron concluyentes. Sólo se observaron diferencias pequeñas entre las lesiones tratadas con OP-1 en comparación con el grupo de control. Esto podría deberse al hecho de que la sutura no proporciona una fijación adecuada, y que la proteína no se integra bien debido a la sutura. En unos pocos animales tratados con OP-1 se

pudo observar la formación de puentes en el defecto (véase la figura 10).

EJEMPLO DE REFERENCIA 7: Modelo de oveja de reparación y regeneración de disco

La inducción experimental de defectos anulares exteriores controlados en ovejas inicia una secuencia de eventos que reproduce fielmente, patológica y bioquímicamente, la evolución de la degeneración de disco en el hombre. Los cambios de composición incluyen una alteración en la cantidad y en los tipos de colágenos sintetizados por las células en la zona de la lesión (Kaapa y col., 1994a, b, 1995, Kaapa E. y col. (1995) Collagen synthesis and types I, III, IV and VI collagens in an animal model of disc degeneration, Spine 20, 59-67; Kaapa E. y col., (1994) Collagens in the injured porcine intervertebral disc, J. Orthop. Res. 12, 93-102; y Kaapa E. y col., (1994) Proteoglycan chemistry in experimentally injured porcine intervertebral disk, J. Spin. Dis. 7, 296-306) pérdida de proteoglicanos de tipo agregano de alta densidad boyante y una elevación de los niveles de los proteoglicanos pequeños sustituidos con DS, decorina y biglicano, en el disco lesionado (Melrose J. y col., (1992) A longitudinal study of the matrix changes induced in the intervertebral disc by surgical damage to the annulus fibrosus, J Orthop Res 10: 665-676; Melrose J. y col., (1997) Topographical variation in the catabolism of aggrecan in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration, J Spinal Disord 10: 55-67; y Melrose J. y col., (1997) Elevated synthesis of biglycan and decorin in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration, Eur Spine J 6: 376-84). Como consecuencia de la degeneración del disco, también se han anotado cambios en el suministro vascular a la placa final cartilaginosa (CEP, del inglés "cartilaginous end plate") (Moore RJ y col., (1992) Changes in endplate vascularity after an outer annulus tear in the sheep, Spine 17: 874-878) y remodelación del hueso vertebral adyacente a los defectos anulares experimentales (Moore RJ y col., (1996) Remodeling of vertebral bone after outer annular injury in sheep, Spine 21: 936-940), cambios en la competencia biomecánica de discos afectados por lesión "reparados" (Latham JM y col., (1994) Mechanical consequences of annular tears and subsequent intervertebral disc degeneration, J Clin Biomech 9: 211-9), y cambios osteoartrotróficos en articulaciones de faceta espinal (Moore RJ y col., (1999) Osteoarthritis of the facet joints resulting from annular rim lesions in sheep lumbar discs, Spine, 24: 519-525).

A. El modelo ovino de lesión anular

Se someterá a ayuno a las ovejas desde 24 h antes de la cirugía y se inducirá anestesia con una inyección intravenosa de 1 g de tiopentona. Se tomará una placa de rayos-X plana lateral para verificar que la anatomía de espina lumbar es normal. Se mantendrá la anestesia general tras una intubación endotraqueal mediante halotano al 2,5% monitorizado mediante oximetría de pulso y medida de CO₂ de marea final. Se preparará el flanco izquierdo desde las costillas hasta la cresta ilíaca para cirugía estéril. Las ovejas recibirán una inyección intramuscular de 1200 mg de penicilina. Se practicará una incisión cutánea sobre el lateral izquierdo inmediatamente anterior a los procesos inversos de la espina y se expondrá la espina lumbar mediante disección seca usando una técnica de separación del músculo anterior. Se respetará la anatomía vascular y neural y se controlarán las hemorragias mediante presión directa o electrocauterización, si fuera necesario.

Un total de doce ovejas de dos años de edad recibirán lesiones anulares controladas en sus discos L1-L2, L3-L4 y L5-L6 mediante incisión a través del anillo fibroso anterolateral izquierdo paralela y adyacente a la placa final craneal usando un escalpelo del número 11 para crear una lesión que mide 4 mm de largo x 5 mm de profundidad. Los discos lumbares intervinientes (L2-L3, L4-L5) no se verán afectados por la incisión.

Los discos con incisión recibirán una de las siguientes 3 terapias, (I) sin tratamiento, (II) disolución de lactosa, o (III) lactosa que contiene OP-1. En todas las ovejas el disco L3-L4 se tratará con disolución de lactosa solamente y el disco L5-L6 se tratará con lactosa más OP-1. En las 4 ovejas restantes los tratamientos en los discos L1-L2 y L5-L6 se invertirán para evitar cualquier problema potencial asociado a nivel espinal. Debe quedar un disco sin operar entre los discos tratados para permitir un anclaje adecuado de FSUs en la evaluación mecánica posterior (ver más adelante). Se usará una sutura con cable para identificar el nivel craneal operado con fines de posterior identificación tanto en rayos X como en la identificación morfológica. También se usarán otros tres animales no operados como controles para el estudio biomecánico.

La degeneración producida por una incisión anular es bien conocida en ovejas (Osti OL y col., (1990) Volvo Award for Basic Science, Annulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model, Spine 15: 762-7) y es de esperar que muestra la primera evidencia radiográfica e histoquímica tras 12 semanas. Tres meses después de la inducción de las lesiones anulares, las ovejas serán sacrificadas mediante inyección intravenosa de 6,5 g de pentobarbitona sódica y las espinas lumbares serán radiografiadas para evaluar la calcificación de los discos, se extraerán mediante escisión y se procesarán para los análisis biomecánicos (n=8) e histoquímicos (n=4), y, después de la evaluación biomecánica los mismos discos serán diseccionados zonalmente para realizar análisis de composición.

B. Análisis de composición de los tejidos de los discos

Se diseccionarán zonalmente los tejidos de los discos intervertebrales en cuadrantes anulares y núcleos pulposos, tal como se indica en la Figura 11.

C. Determinación de los contenidos de proteoglicano y colágeno en los tejidos de disco

Se trocearán finamente muestras de anillo fibroso y de núcleo pulposo sobre hielo y se secarán por congelación porciones representativas de cada zona de tejido de peso húmedo conocido hasta obtener un peso constante. La diferencia entre el peso inicial y el final de los tejidos proporcionará el contenido en agua. Se hidrolizarán por triplicado porciones (de 1-2 mg) de los tejidos secados en HCl 6M a 110°C durante 16 h y se analizarán alícuotas de
 5 digestos neutralizados para determinar hidroxiprolina como medida del contenido en colágeno del tejido (Melrose J y col., (1992) A longitudinal study of the matrix changes induced in the intervertebral disc by surgical damage to the annulus fibrosus, *J Orthop Res* 10: 665-676; Melrose J y col., (1994a) Proteoglycan heterogeneity in the normal adulto vine intervertebral disc, *Matrix* 14: 61-75; Melrose J y col., (1994b) Variation in the composition of the ovine intervertebral disc with spinal level and in its constituent proteoglycans, *Vet Comp Orthop Traum* 7: 70-76; Melrose J y col., (1991) The influence of scoliosis and ageing on proteoglycan heterogeneity in the human intervertebral disc *J Orthop Res* 9: 68-77; y Melrose J y col., (1996) Intervertebral disc reconstitution after chemonucleolysis with chymopapain is dependent on dosage: an experimental study in beagle dogs *Spine* 21: 9-17). También se someterán a digestión, por triplicado, porciones de tejidos secados (~2 mg) con papaína, y se analizarán alícuotas del tejido solubilizado para determinar glicosaminoglicano sulfatado usando el colorante metacromático azul de 1,9-dimetilmetileno como medida del proteoglicano en el tejido (véase Melrose y col., 1991, 1992, 1994, 1996, indicadas anteriormente).

D. Análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos

Se aislarán segmentos de movimiento espinal que son designados para análisis histoquímico mediante el corte de los cuerpos craneal y caudal vertebral próximos a las placas finales cartilaginosas usando una sierra para hueso. Se fijarán en bloque los especímenes de disco enteros, que incluyen los segmentos de cuerpo vertebral adyacente, en formalina tamponada neutra al 10% o en Histochoice® durante 56 h, y se descalcificarán con varios cambios de ácido fórmico al 10% en NBF al 5% durante 2 semanas con agitación constante hasta lograr la descalcificación completa, confirmada usando una cabina de rayos X Faxitron HP43855A (Hewlett Packard, McMinnville, EE.UU.).

Se deshidratarán láminas sagitales (de 5 mm de espesor) de especímenes de cuerpo de disco vertebral descalcificado mediante disoluciones graduales de etanol empleando métodos histológicos estándares y embebidos en cera de parafina. Se prepararán secciones de parafina de 4 µm de espesor para la tinción histoquímica y se montarán sobre portas de vidrio para microscopio Superfrost Plus (Menzel-Glaser) y se secarán a 85°C durante 30 minutos y después a 55°C durante una noche. Las secciones serán desparafinadas en xileno (4 cambios x 2 minutos) y se rehidratarán a través de lavados con etanol graduado en agua (de 100% a 70% v/v).

Se teñirán tres secciones de todos los bloques con hematoxilina y eosina. Estas secciones se codificarán y serán examinadas por un histopatólogo independiente, que comparará las características histológicas de los niveles que recibieron la incisión anular solamente con los que recibieron la incisión y rhOP-1. Se usará un sistema de graduación semi-cuantitativo de cuatro puntos para determinar las características microscópicas. También se examinará la arquitectura de colágeno en las secciones teñidas con tricromo de Masson y rojo picro-sirius usando un microscopio de luz polarizada.

Los procedimientos de inmunohistoquímica se llevarán a cabo usando una casete Sequenza y un sistema de inmunotinción desechable Coverplate, tal como se ha descrito previamente (Melrose J y col., (2002) Perlecan, the Multi-domain Proteoglycan of Basement Membrane is also a Prominent Pericellular Component of Hypertrophic Chondrocytes of Ovine Vertebral Growth Plate and Cartilaginous End Plate Cartilage, *Histochem. Cell Biol.* 118, 269-280; Melrose J y col., (2002) Increased nerve and blood-vessel in-growth associated with proteoglycan depletion in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration, *Spine* 27, 1278-85; Melrose J y col., (2002) Comparison of the morphology and growth characteristics of intervertebral disc cells, synovial fibroblasts and articular chondrocytes in monolayer and alginate bead cultures, *Eur. Spine J.* 12, 57-65; Melrose J y col., (2001) Differential expression of proteoglycan epitopes and growth characteristics of ovine intervertebral disc cells grown in alginate beads, *Cells Tissues Organs* 168: 137-146; Melrose J y col., (2003) Perlecan, the multi domain HS-proteoglycan of basement membranes is a prominent extracellular and pericellular component of the cartilaginous vertebral body rudiments, vertebral growth plates and intervertebral discs of the developing human spinal column, *J Histochem Cytochem* 51: 1331-1341; Melrose J y col., (2000) Differential Expression of Proteoglycan epitopes by ovine intervertebral disc cells grown in alginate bead culture, *J. Anat.* 197: 189-198; Melrose J y col., (2002) Spatial and Temporal Localisation of Transforming Growth Factor-β, Fibroblast Growth Factor-2, Osteonectin and Identification of Cells Expressing α-Smooth Muscle Actin in the Injured Annulus Fibrosus: Implications for Extracellular Matrix Repair, *Spine* 27: 1756-1764; y Knox S y col., (2002) Not all perlecan are created equal: interactions with fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and FGF receptors, *J. Biol. Chem.* 277: 14657-14665). La actividad de peroxidasa endógena será bloqueada inicialmente mediante la incubación de secciones de tejido con H₂O₂ al 3%. Después se realizará una pre-digestión de las secciones de tejido con combinaciones de condroitinasa ABC (0,25 U/mL) en tampón Tris-acetato 20 mM de pH 8,0 durante 1 h a 37°C, hialuronidasa testicular bovina 1000 U/mL durante 1 h a 37°C en tampón de fosfato a pH 5,0, seguido de tres lavados en Tris-HCl 20 mM a pH 7,2 con NaCl 0,5 M (TBS) o proteinasa-K (DAKO S3020) durante 6 minutos a temperatura ambiente para exponer epitopos antigénicos. A continuación los tejidos serán bloqueados durante 1 h en suero porción normal al 20% y serán probados con una serie de anticuerpos primarios de proteoglicanos y colágenos grandes y pequeños (Tabla 5). También se procesarán

- secciones de control negativo omitiendo el anticuerpo primario o sustituyendo un anticuerpo primario de isótopo irrelevante del anticuerpo primario auténtico de interés. Se usarán peroxidasa de rábano o anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina para la detección usando dihidrocloruro de 3,3'-diaminobencideno al 0,05% y H₂O₂ al 0,03% en TBS o sustratos Nova RED. Los portas teñidos se examinarán mediante microscopía de campo brillante y se fotografiarán usando un sistema de cámara digital de fotomicroscopio Leica MPS 60.

Tabla 5

Anticuerpos primarios de epítomos de proteína nuclear de proteoglicano y colágeno

Epítomo de anticuerpo primario	Clon (isótopo)
Proteoglicanos grandes	
Agrecano	AD 11-2A9 (IgG)
Perlecano	A76 (IgG ₁)
Versicano	A1S1D1D1 (IgG)
Proteoglicanos pequeños	
Decorina	6-B-6 (IgG)
Biglicano	LF-96 (IgG de conejo)
Fibromodulina	Policlonal de conejo
Colágeno	
Tipo I	I8H5 (IgG ₁)
Tipo II	II-4CII (IgG ₁)
Tipo IV	CIV-22 (IgG ₁)
Tipo VI	Policlonal de conejo
Tipo X	Policlonal de ratón

E. Determinación bioquímica de los segmentos de movimiento espinal

- 10 Se llevará a cabo un análisis de rango de movimiento (ROM) biomecánico no destructivo para cada unidad espinal funcional (FSU) en varios planos de movimiento (flexión-extensión, contracción lateral, compresión y torsión). Cada FSU comprende dos vértebras adyacentes, el disco tratado y los ligamentos asociados.

Una plantilla especialmente diseñada, basada en la desarrollada por Callaghan y McGill, permite aplicar momentos puros de torsión y contracción a cada FSU, a la vez que mantiene una carga axial constante. Esta carga combinada es una simulación próxima a las cargas fisiológicas experimentadas por la espina in vivo.

- 15 Se evaluarán cuatro FSUs: niveles de control no operados; niveles que se vieron sometidos a incisión; niveles que se vieron sometidos a incisión y se trataron con OP-1 y vehículo, y niveles que se vieron sometidos a incisión y se trataron solamente con vehículo. Cada FSU se montará en dos copas de aleación de aluminio y se asegurará con cemento dental de cura fría. Se tendrá cuidado para asegurar que el disco intervertebral está alineado con las copas. Antes del inicio del ensayo, cada FSU se pre-cargará hasta una tensión de 0,5 MPa hasta alcanzar un estado de hidratación reproducible. Este se usa como línea base antes de cada ensayo. La tensión precargada de 0,5 MPa simula la posición de pie en relajación y está basada en la medida in vivo de las presión intradiscal (Wilke H-J y col., (1999) New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life, Spine 24: 755-62). Se aplicará una carga de torsión de ± 5 Nm y una carga de flexión-extensión de ± 1 Nm, la carga de contracción lateral se aplicará durante 10 ciclos con una carga axial constante de 0,5 MPa. Se aplicará una carga axial cíclica (0-1000 N en 10 ciclos) para investigar la respuesta a la compresión axial del DIV.

F. Estudios piloto

- 30 Se han completado estudios piloto con espinas de ovejas y de canguros para verificar las técnicas experimentales. La Figura 12 muestra curvas típicas de "Par de torsión frente a rotación" de una FSU de oveja en 10 ciclos de carga de flexión-extensión. Las dos curvas representan la FSU antes y después de una lesión de borde anular anterior circunferencial. Se puede observar que el corte anular dio como resultado un aumento del rango de movimiento (ROM) durante la extensión, mientras que el ROM de flexión no se vio afectado. Este ROM incrementado representa de forma general un aumento en la inestabilidad espinal. Otra observación es la elevada repetibilidad de los ciclos de carga, lo que verifica la reproducibilidad de la instalación de ensayo.

El análisis de los datos incluirá la rigidez en la región lineal durante el quinto ciclo de carga, la histéresis y la energía de tensión y la extensión de la zona neutra. Los datos procedentes de los niveles no operativos se compararán con los niveles sometidos a incisión, con y sin OP-1, y se llevará a cabo un análisis de varianza de medidas repetidas en una dirección para cada uno de los parámetros biomecánicos.

5 EJEMPLO 8: El efecto de OP-1 en defectos condrales y de microfractura tratada en cartílagos en un modelo de cabra

Este estudio evaluará los efectos de la OP-1 en la cantidad y composición del tejido reparativo inducido por un procedimiento de microfractura en un modelo de cabra. Se usará un total de 24 cabras macho adultas (de edades entre 1,5 y 3 años) que pesan aproximadamente 25 kg. Antes de la cirugía, se examinará las articulaciones de rodilla roentgenográficamente para excluir aquellos animales con enfermedades articulares degenerativas y otros problemas ortopédicos detectados. Se producirá un defecto condral cuadrado (extracción del cartílago hasta la capa de cartílago calcificado) de 8 mm (en un lateral) en la ranura troclear de las rodillas derechas (articulaciones reprimidas) de todos los animales. En 12 de las cabras dicho defecto condral servirá como zona de tratamiento (Grupos IA y IB, ver la Tabla 4 más adelante). Las articulaciones de rodilla derechas de 12 de los animales serán sometidas entonces a un tratamiento de microfractura (Grupos IIA y IIB). Se producirán 16 agujeros de microfractura usando un pico de aproximadamente 1 mm de diámetro.

Inmediatamente después de la operación, se inyectarán aproximadamente 0,3 mL de masilla de OP-1 (colágeno + CMC) hidratada con salino en el fluido sinovial de la articulación. A los siete días, se administrará una segunda inyección. En 6 de los animales del grupo de defecto condral (IB) y en 6 de los animales del grupo de microfractura (IIB) sólo se administrará el vehículo.

Tabla 6

Grupo	Tipo de lesión	Tratamiento (+ ó - OP-1)	Tamaño de muestra
IA	Condral	+	6
IB	Condral	-	6
IIA	Microfractura	+	6
IIB	Microfractura	-	6

Todos los animales serán sacrificados 16 semanas después de la cirugía. Todas las zonas se prepararán para la evaluación histomorfométrica. Se evaluará una sección histológica procedente de la porción central de cada defecto. Se determinará el área total y los porcentajes de tipos de tejido específicos (cartílago articular, cartílago hialino, fibrocartílago y tejido fibroso) que rellenan la región del defecto condral original usando una rejilla en la parte ocular del microscopio. Se emplearán criterios histológicos bien aceptados para los tipos de tejidos (véase, por ejemplo, Wang Q., y col. Healing of defects in canine articular cartilage: distribution of nonvascular alpha smooth muscle actin-containing cells, Wound Repair Regen. 8, páginas 145-158 (2000); Breinan HA, y col., Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes, J. Orthop. Res. 18, páginas 781-789 (2000); y Breinan, HA, y col., Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model, J. Bone Joint Surg. 79A, páginas 1439-1451 (1997)).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> STRYKER CORPORATION
- <120> MÉTODOS PARA TRATAR DEFECTOS DEL CARTÍLAGO
- <130> STK-13 PCT
- <140> Pendiente de asignar
- <141> 24-05-2005
- <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 431
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

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 Glu 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
 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

- <210> 2
- <211> 96
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética de aminoácidos COP-5
- <400> 2

Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asp Asp Trp Ile Val Ala
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Pro
 20 25 30

Leu Ala Asp His Phe Asn Ser Thr Asn His Ala Val Val Gln Thr Leu
 35 40 45

Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr
 50 55 60

Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Tyr Asn Gln Glu Met Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg
 85 90 95

- <210> 3
- <211> 96
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética de aminoácidos COP-7
- <400> 3

Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Pro
 20 25 30

Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Val Val Gln Thr Leu
35 40 45

Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr
50 55 60

Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Tyr Asn Gln Glu Met Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg
85 90 95

- <210> 4
- <211> 102
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> OP-X

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(102)
- <223> Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos específicos según se define en la descripción

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (2)..(3)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (9)..(9)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (11)..(11)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (16)..(16)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (19)..(19)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (23)..(23)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (26)..(26)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (39).. (39)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (56)..(58)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (60)..(61)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (65)..(65)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (71)..(71)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (75).. (75)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (82).. (82)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (84)..(84)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (87)..(87)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (89)..(89)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (91)..(91)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (97)..(97)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 4

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

<210> 5

<211> 97

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia genérica 7

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(97)

<223> Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos específicos según se define en la descripción

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (2)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (6)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (11)..(16)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (18)..(21)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (23)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (26)..(26)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (28)..(28)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (30)..(31)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (33)..(40)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (44)..(60)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (63)..(63)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (65)..(72)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (74)..(80)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (82)..(82)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (84)..(88)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (90)..(90)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (92)..(93)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (97)..(97)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 5

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 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

<210> 6
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Secuencia genérica 8

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(102)
- <223> Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos específicos según se define en la descripción

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (2)..(5)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (7)..(9)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (11)..(13)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (16)..(21)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (23)..(26)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (28)..(28)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (31)..(31)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (33)..(33)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (35)..(36)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (38)..(45)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (49)..(65)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (68)..(68)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (70)..(77)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (79)..(85)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (87)..(87)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (89)..(93)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (97)..(98)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (102)..(102)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 6

ES 2 369 629 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 Xaa Asn His Ala
35 40 45

Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Cys Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val
85 90 95

Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
100

- <210> 7
- <211> 97
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Secuencia genérica 9

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(97)
- <223> Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos específicos según se define en la descripción

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (1)..(16)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (18)..(24)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (26)..(26)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
- <221> característica_miscelánea
- <222> (28)..(28)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>

<221> característica_misclánea
 <222> (30)..(61)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (63)..(63)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (65)..(72)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (74)..(93)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (97)..(97)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 7

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
35 40 45

Xaa Xaa 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

Xaa Xaa Cys Xaa Cys
85 90 95

Xaa

<210> 8
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Secuencia genérica 10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(102)

<223> Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos específicos según se define en la descripción

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (2)..(21)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (23)..(29)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (31)..(31)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (33)..(33)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (35)..(66)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (68)..(68)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (70)..(77)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (79)..(98)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (100)..(100)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (102)..(102)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 8

Cys Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly
20 25 30

Xaa Cys Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa

- <210> 9
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Secuencia consenso
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(5)
- <223> Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos específicos según se define en la descripción
- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (2)..(5)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 9

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

- <210> 10
- <211> 1822
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (49)..(1341)
- <400> 10

ES 2 369 629 T3

ggcgcgggcc	cggagcccgg	agcccgggta	gcgcgtagag	ccggcgcg	atg	cac	gtg										57
							Met	His	Val								
							1										
cgc	tca	ctg	cga	gct	gcg	gcg	ccg	cac	agc	ttc	gtg	geg	etc	tgg	gca		105
Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro	His	Ser	Phe	Val	Ala	Leu	Trp	Ala		
	5					10					15						
ccc	ctg	ttc	ctg	ctg	cgc	tcc	gcc	ctg	gcc	gac	ttc	agc	ctg	gac	aac		153
Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Asn		
20					25					30					35		
gag	gtg	cac	tcg	agc	ttc	atc	cac	cgg	cgc	ctc	cgc	agc	cag	gag	cgg		201
Glu	Val	His	Ser	Ser	Phe	Ile	His	Arg	Arg	Leu	Arg	Ser	Gln	Glu	Arg		
				40					45					50			
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				
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	
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			
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					
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		
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					
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		
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		

ES 2 369 629 T3

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

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

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

aac gcc acc aac cac gcc atc gtg cag acg ctg gtc cac ttc atc aac 1209
 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 gcccaagtttt 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 ggtaattatg agcgcctacc agccaggcca cccagccgtg ggaggaaggg 1711

ggcgtggcaa ggggtgggca cattggtgtc tgtgcgaaag gaaaattgac ccggaagttc 1771

ctgtaataaa tgtcacaata aaacgaatga atgaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1822

<210> 11
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

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
 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

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición farmacéutica que consiste en OP-1 y un material de administración para liberación sostenida o eliminación retardada para su uso en la reparación de un defecto de cartílago en un paciente, en donde el cartílago está rodeado por fluido sinovial; en donde la composición farmacéutica debe administrarse en el fluido sinovial que rodea al cartílago; en donde la composición es una disolución líquida o una suspensión líquida y se formula como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada.
- 10 2.- Una composición farmacéutica que consiste en OP-1 y un material de administración para liberación sostenida o eliminación retardada para su uso en la regeneración o la producción de cartílago en una zona de defecto de cartílago en un paciente, en donde el cartílago está rodeado por fluido sinovial; en donde la composición farmacéutica debe administrarse en el fluido sinovial que rodea al cartílago; en donde la composición es una disolución líquida o una suspensión líquida y se formula como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada.
- 15 3.- Una composición farmacéutica que consiste en OP-1 y un material de administración para liberación sostenida o eliminación retardada para su uso en la promoción o la aceleración de la formación de cartílago en una zona de defecto de cartílago en un paciente, en donde el cartílago está rodeado por fluido sinovial; en donde la composición farmacéutica debe administrarse en el fluido sinovial que rodea al cartílago; en donde la composición es una disolución líquida o una suspensión líquida y se formula como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada.
- 20 4.- Una composición farmacéutica que consiste en OP-1 y un material de administración para liberación sostenida o eliminación retardada para su uso en la prevención de la degradación de cartílago o en el tratamiento de una lesión de cartílago o una enfermedad o trastorno degenerativo de cartílago en un paciente, en donde el cartílago está rodeado por fluido sinovial; en donde la composición farmacéutica debe administrarse en el fluido sinovial que rodea al cartílago; en donde la composición es una disolución líquida o una suspensión líquida y se formula como una formulación de liberación sostenida o como una formulación de eliminación retardada.
- 25 5.- La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición es una formulación inyectable.
- 6.- La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición es una disolución acuosa.
- 30 7.- La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la composición comprende polietilenglicol.
- 8.- La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la OP-1 está glicosilada.
- 35 9.- La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la lesión de tejido o la enfermedad degenerativa se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, desgarros de menisco y lesión de ligamento cruzado anterior (LCA).

Figura 1

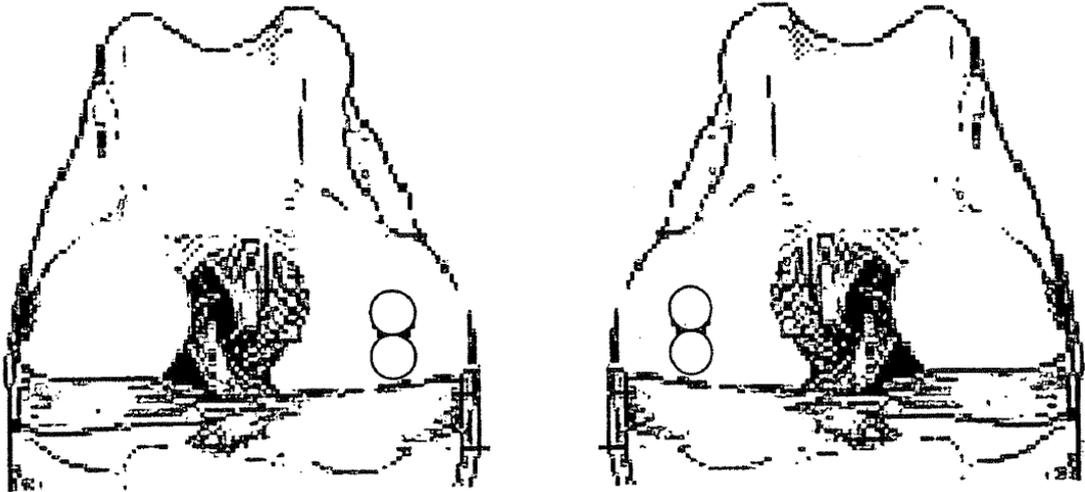
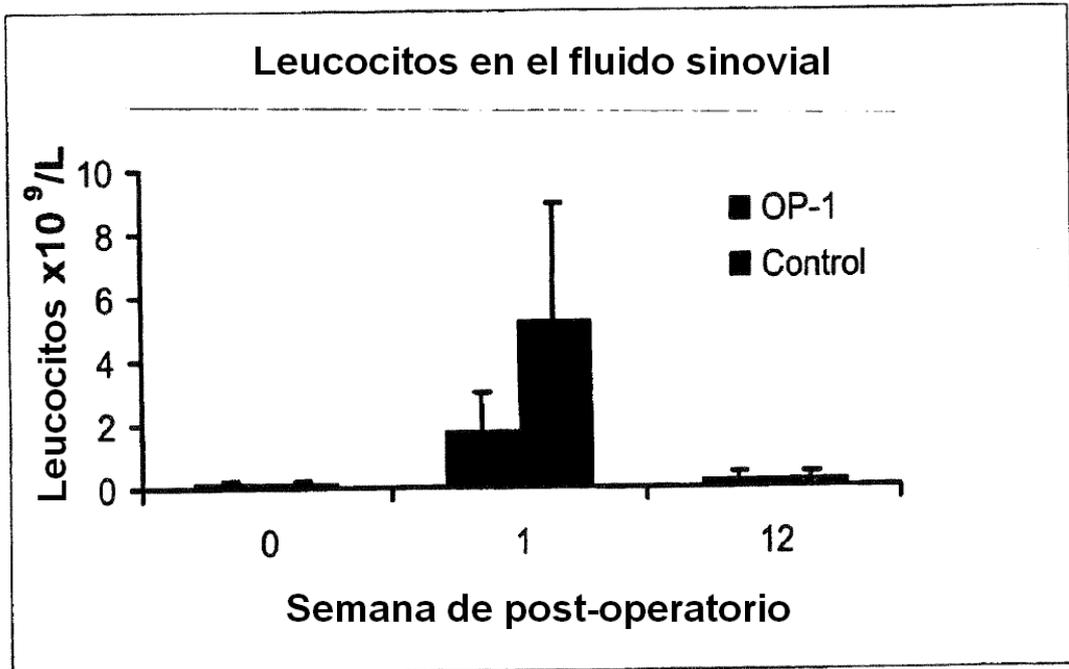


Figura 2



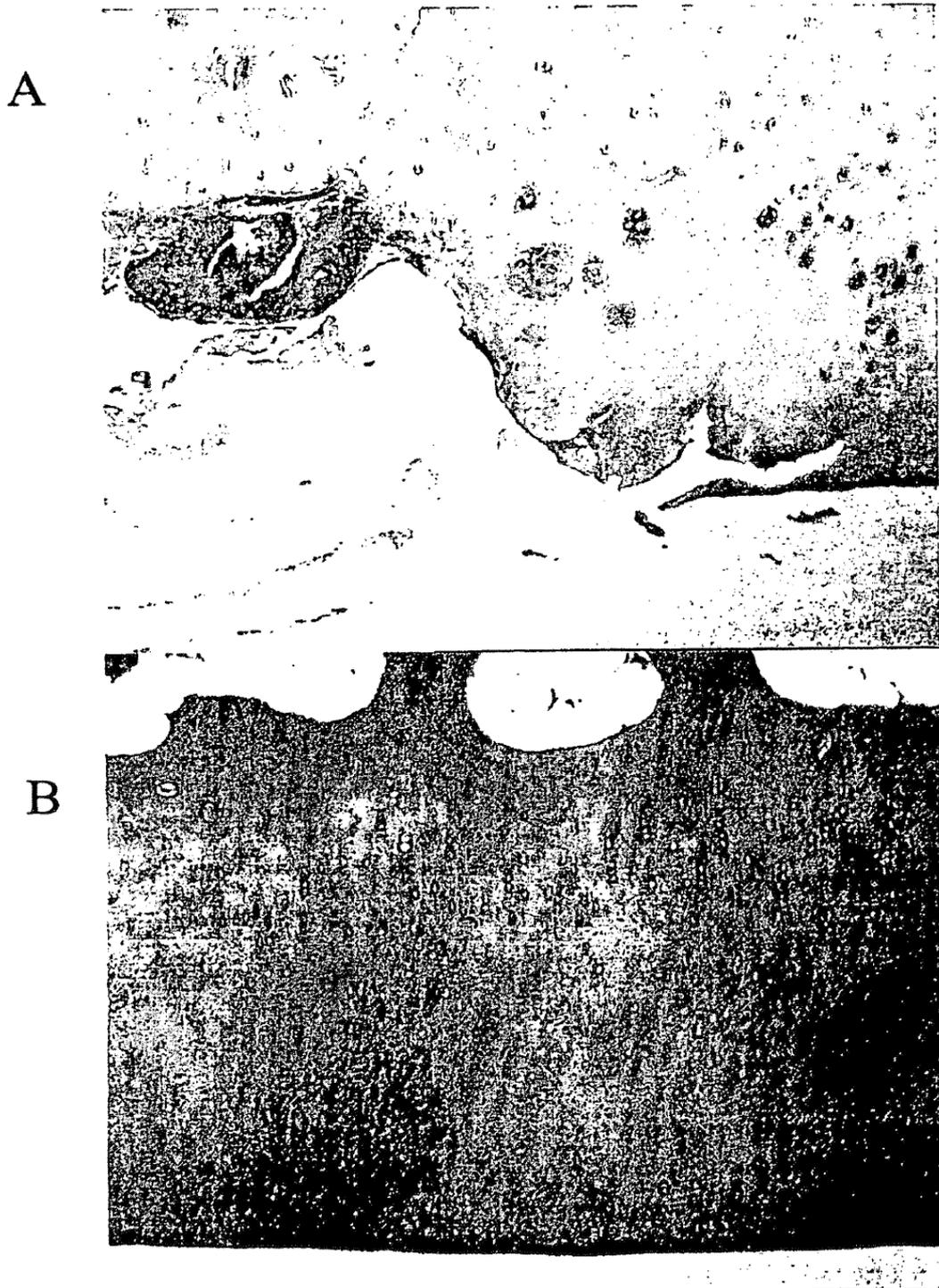
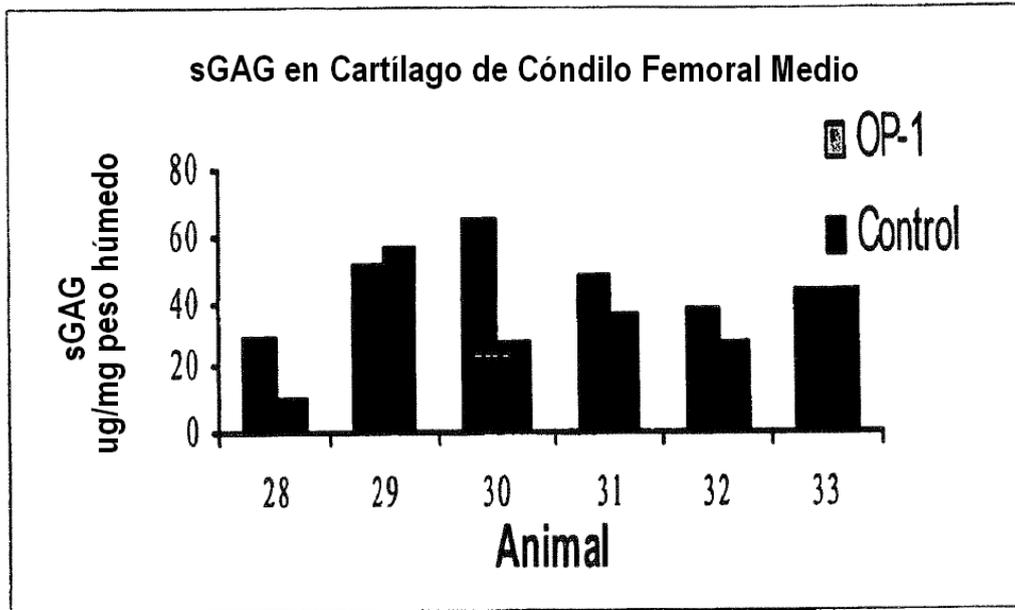


Figura 3

Figura 4



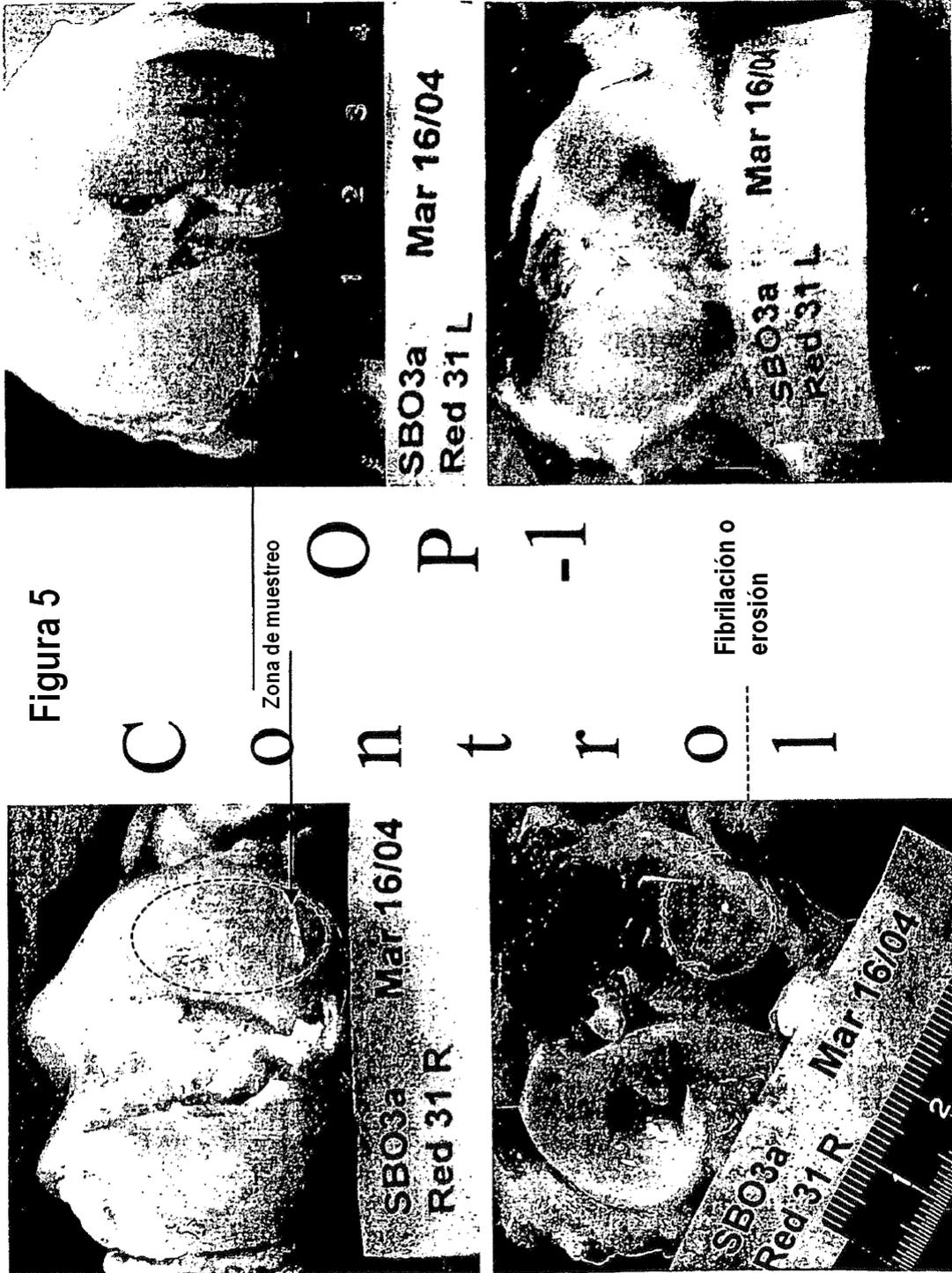


Figura 6

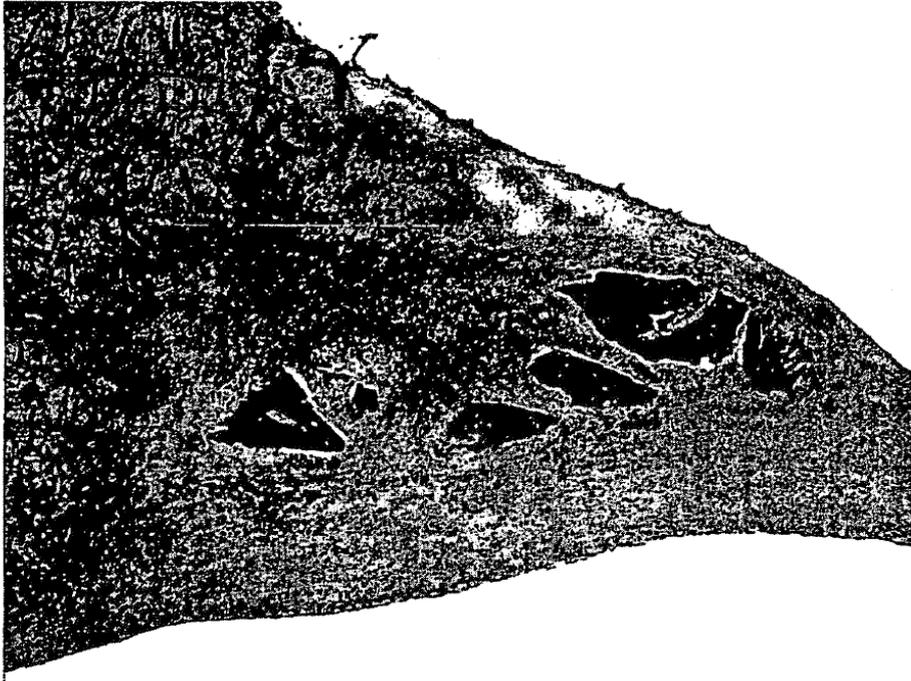


Figura 7

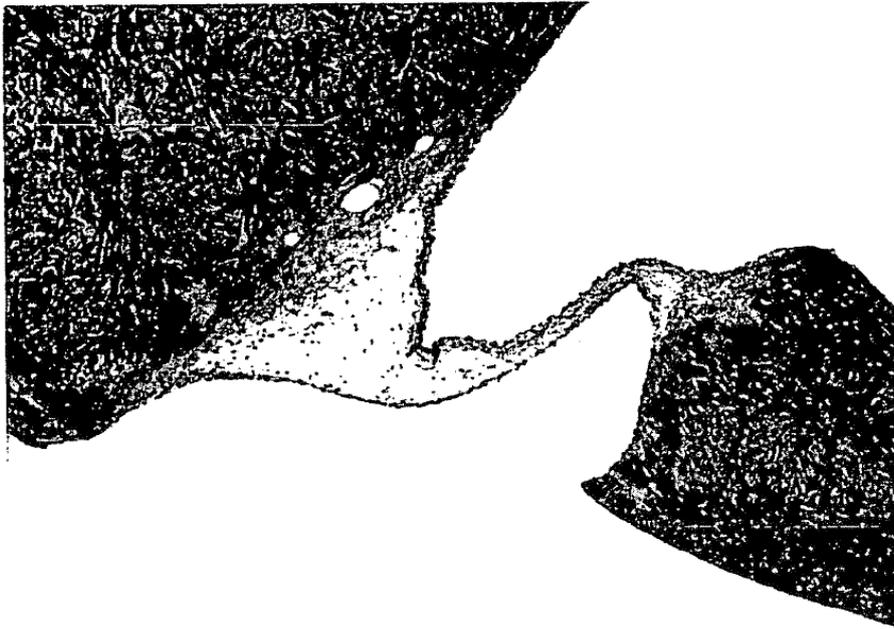


Figura 8



Figura 9

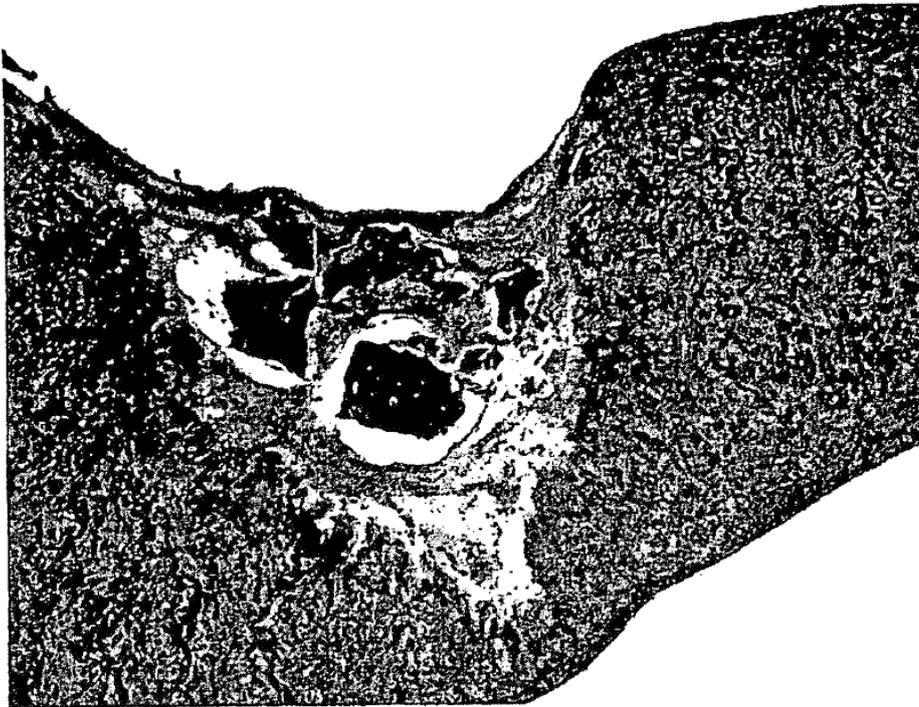


Figura 10



Figura 11

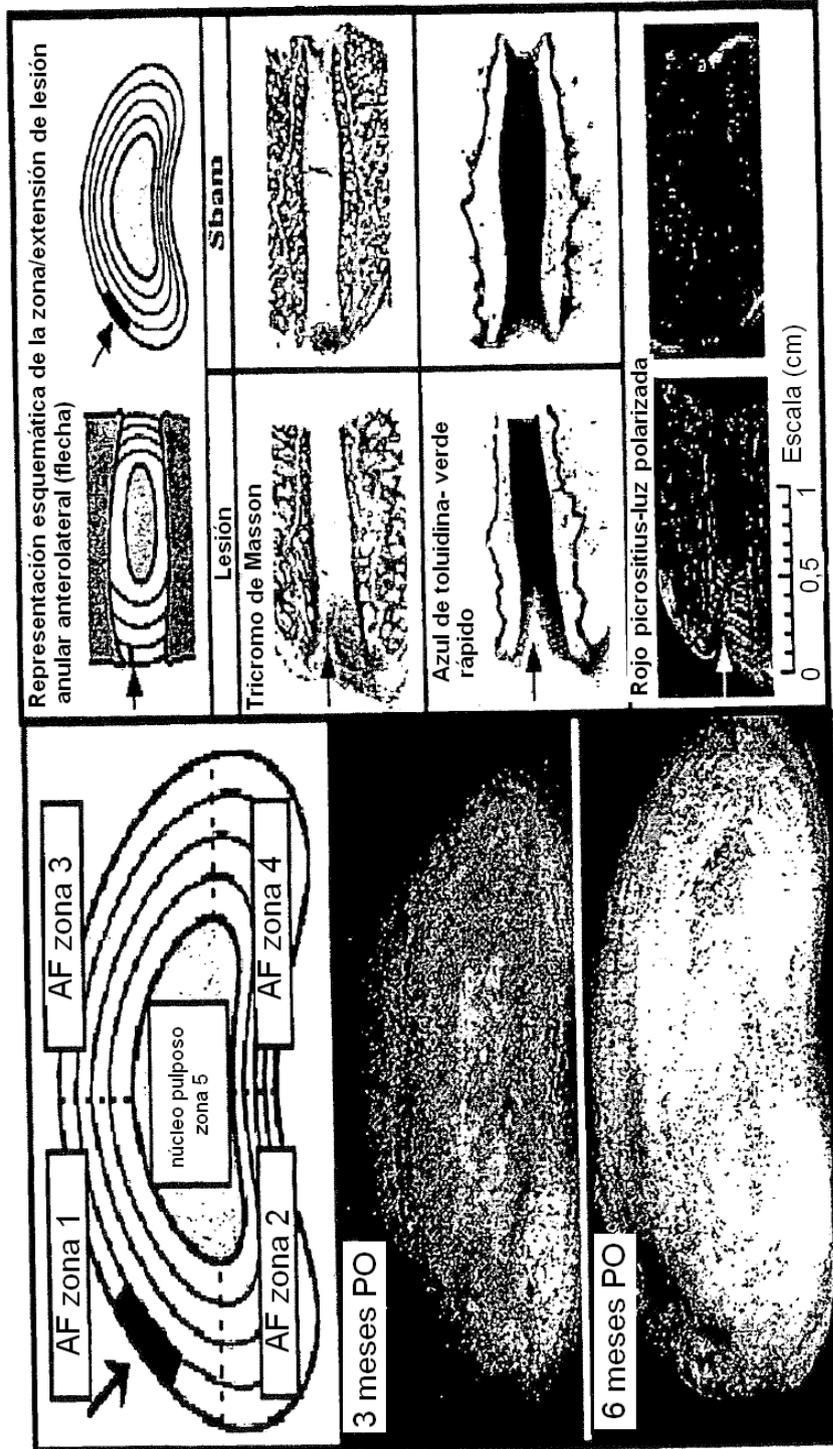


Figura 12

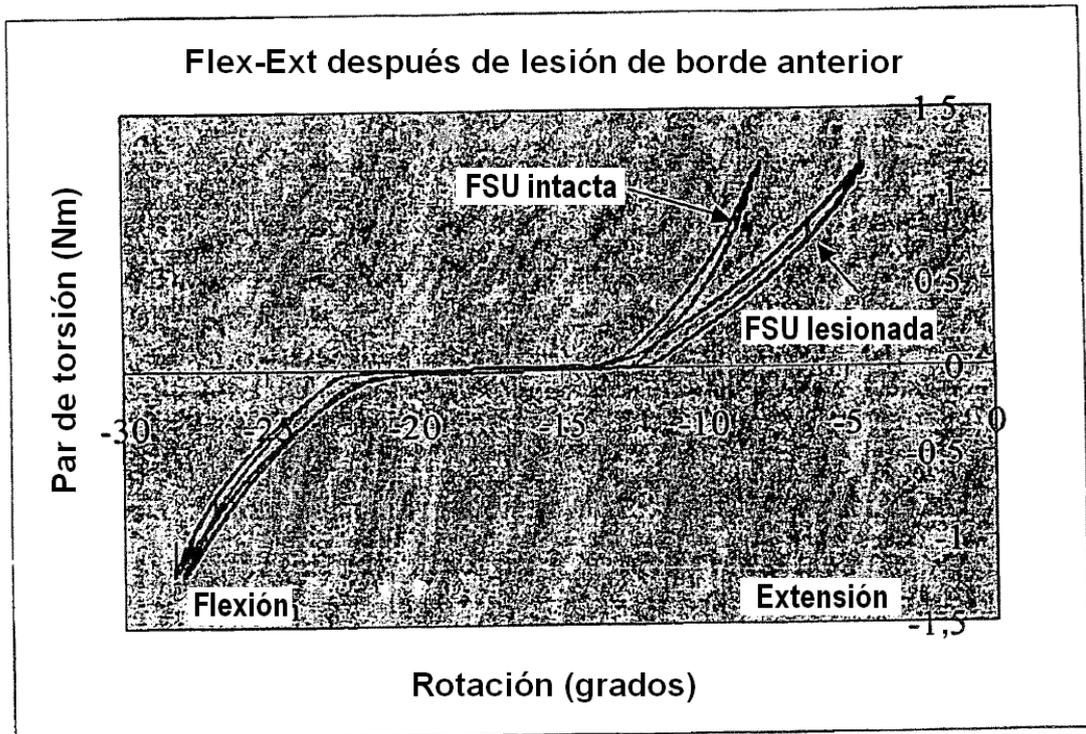


Figura 13

Met	His	Val	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	His	Ser	Phe	Val	Ala	Leu	Trp	Ala	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Arg	
1				5			10		15				15				20					25		
Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Asn	Glu	Val	His	Ser	Ser	Phe	Ile	His	Arg	Arg	Leu	Arg	Ser	Gln	Glu
				30			35		40				40				45					50		
Arg	Arg	Glu	Met	Gln	Arg	Glu	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Pro	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Leu	Gln	Gly	Lys
				55			60		65				65				70					75		
His	Asn	Ser	Ala	Pro	Met	Phe	Met	Leu	Asp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly
				80			85		90				90				95					100		
Gln	Gly	Phe	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	His
				105			110		115				115				120					125		
Phe	Leu	Thr	Asp	Ala	Asp	Met	Val	Met	Ser	Phe	Val	Asn	Leu	Val	Glu	His	Asp	Lys	Glu	Phe	Phe	His	Pro	Arg
				130			135		140				140				145					150		
Tyr	His	His	Arg	Glu	Phe	Arg	Phe	Asp	Leu	Ser	Lys	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg
				155			160		165				165				170					175		
Ile	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Glu	Arg	Phe	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Ile	Ser	Val	Tyr	Gln	Val	Leu	Gln	Glu
				180			185		190				190				195					200		
His	Leu	Gly	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	Phe	Leu	Leu	Asp	Ser	Arg	Thr	Leu	Trp	Ala	Ser	Glu	Glu	Gly	Trp	Leu	Val
				205			210		215				215				220					225		
Phe	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Ser	Asn	His	Trp	Val	Val	Asn	Pro	Arg	His	Asn	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Glu
				230			235		240				240				245					250		
Thr	Leu	Asp	Gly	Gln	Ser	Ile	Asn	Pro	Lys	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Arg	His	Gly	Pro	Gln	Asn	Lys	Gln	Pro
				255			260		265				265				270					275		
Phe	Met	Val	Ala	Phe	Phe	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	His	Phe	Arg	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Gly	Ser	Lys	Gln	Arg	Ser
				280			285		290				290				295					300		
Gln	Asn	Arg	Ser	Lys	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Asn	Val	Ala	Glu	Asn	Ser	Ser	Ser	Asp
				305			310		315				315				320					325		
Gln	Arg	Gln	Ala	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Tip	Gln	Asp	Tip	Ile	Ile	Ala
				330			335		340				340				345					350		
Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn	Ala	Thr	Asn
				355			360		365				365				370					375		
His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	Val	His	Phe	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	Val	Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln
				380			385		390				390				395					400		
Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys	Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val
				405			410		415				415				420					425		
Arg	Ala	Cys	Gly	Cys	His																			