

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 555**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05020942 .8**

96 Fecha de presentación: **30.07.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1649865**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **GDF-5 para uso en la reparación de un defecto de cartílago no articular en un disco intervertebral**

30 Prioridad:
06.10.1998 US 103161 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
STRYKER CORPORATION (100.0%)
2825 Airview Boulevard
Kalamazoo, MI 49002 , US

72 Inventor/es:
VUKICEVIC, SLOBODAN;
KATIC, VLADIMIR y
SAMPATH, KUBER, T.

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

ES 2 389 555 T3

DESCRIPCIÓN

GDF-5 para uso en la reparación de un defecto de cartílago no articular en un disco intervertebral.

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de la reparación de tejido cartilaginoso no articular utilizando proteínas osteogénicas.

Antecedentes de la invención

Las proteínas osteogénicas y condrogénicas son capaces de inducir la proliferación y la diferenciación de células progenitoras en tejido óseo, cartilaginoso, de tendón y/o ligamentoso funcional. Estas proteínas, denominadas en la presente "proteínas osteogénicas", "proteínas morfogénicas" o "morfógenos", incluyen miembros de la familia de la proteína morfogenética ósea ("BMP") identificada por su capacidad para inducir la morfogénesis ósea endocondral. Las proteínas osteogénicas en general se clasifican en la técnica como un subgrupo de la superfamilia del TGF- β de factores del crecimiento (Hogan, *Genes & Development*, 10:1580-1594 (1996)). Las proteínas osteogénicas incluyen la proteína osteogénica-1 de mamífero (OP-1, también conocida como BMP-7) y su homólogo en *Drosophila* 60A, la proteína osteogénica-2 (OP-2, también conocida como BMP-8), la proteína osteogénica-3 (OP-3), BMP-2 (también conocida como BMP-2A o CBMP-2A) y su homólogo en *Drosophila* DPP, BMP-3, BMP-4 (también conocida como BMP-2B o CBMP-2B), BMP-5, BMP-6 y su homólogo murino Vgr-1, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, GDF-3 (también conocida como Vgr2), GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, GDF-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, GDF-5 (también conocida como CDMP-1 o MP52), GDF-6 (también conocida como CDMP-2), GDF-7 (también conocida como CDMP-3), el homólogo en *Xenopus* Vgl y NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP, y NEURAL.

Las proteínas osteogénicas generalmente incluyen péptidos secretores que comparten características estructurales comunes. Procesada a partir de una "proforma" precursora, la forma madura de una proteína osteogénica es un homo- o heterodímero con enlace disulfuro, teniendo cada subunidad un dominio activo carboxi-terminal. Este dominio tiene aproximadamente 97-106 restos aminoácidos y contiene un patrón conservado de restos cisteína (véase, por ejemplo, Massague, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6:597 (1990); Sampath *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:13198 (1990)).

Las proteínas osteogénicas puede estimular la proliferación y la diferenciación de células progenitoras cuando se administran con una matriz o un sustrato apropiados a un mamífero. Como resultado pueden inducir la formación de hueso, incluyendo la formación endocondral de hueso, bajo condiciones en las que el verdadero hueso de sustitución no podría producirse. Por ejemplo, cuando se combinan con un material de matriz, las proteínas osteogénicas inducen la formación de hueso nuevo en grandes defectos de hueso segmental, fusiones espinales, y fracturas.

La laringe se extiende desde la lengua hasta la tráquea. La tráquea es un tubo cartilaginoso y membranoso que se extiende desde el extremo inferior de la laringe hasta su división en dos bronquios principales. El tejido fibrocartilaginoso se encuentra en la laringe. El cartílago forma el marco esquelético de la laringe y está interconectado mediante ligamentos y membranas fibrosas. El hueso hioides está íntimamente asociado con la laringe, aunque normalmente se considera que es una estructura separada con una función diferenciada.

Las anomalías en el esqueleto laríngeo influyen en sus funciones respiratorias, defensivas y fonadoras, y pueden provocar asfixia o pérdida de la voz. Las anomalías pueden ser congénitas, tales como fisura de laringe, o adquiridas, tales como un edema de la glotis. Una osificación excesiva de uno o más tejidos cartilaginosos hialinos también puede limitar la función respiratoria o fonadora. Otras anomalías incluyen la ulceración de la laringe como resultado de una enfermedad, por ejemplo, sífilis, tuberculosis o malignidades. Las anomalías también pueden ser el resultado de un traumatismo mecánico en la laringe o en la tráquea, incluyendo las complicaciones de las traqueotomías. Varias enfermedades de la laringe humana, incluyendo el cáncer laríngeo, implican al esqueleto laríngeo. El tratamiento de estos y otros trastornos puede implicar la retirada parcial o completa del esqueleto laríngeo o de la tráquea (traqueotomía, laringotomía, o laringotraqueotomía). Los procedimientos reconstructores quirúrgicos de la laringe o de la tráquea son complejos. Hasta la fecha, la reconstrucción se ha basado en injertos de cartílago, injertos de intestino delgado, y adhesivos celulares, tales como fibrinógeno o cianoacrilato, para volver a unir el tejido desgarrado. Las complicaciones habituales incluyen el rechazo de injertos y/o la transformación fibrosa de autoinjertos o aloinjertos.

El tejido fibrocartilaginoso se encuentra no sólo en la laringe sino también en otras regiones, incluyendo el oído, la nariz, las costillas, los discos intervertebrales y el menisco interarticular. La reparación y la reconstrucción de defectos en estos tejidos requiere la regeneración de fibrocartílago de sustitución funcional apropiado.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición para su uso para reparar un defecto del cartílago no articular en un disco intervertebral, en la que la composición comprende GDF-5 y un vehículo seleccionado del grupo que consiste en un vehículo líquido y un vehículo en gel.

El vehículo utilizado en esta invención es biocompatible porque no es tóxico y no produce reacciones inflamatorias graves en el cuerpo. El vehículo también es biorreabsorbible porque puede ser reabsorbido al menos parcialmente, y preferiblemente por completo, en el sitio reparado dentro de un periodo de tiempo clínicamente aceptable, por ejemplo de 4 meses a un año. El vehículo puede incluir una matriz o estructura de "andamiaje", o puede estar sustancialmente exento de matriz. El vehículo puede estar en forma de gel o en forma líquida. Se describen vehículos que contienen materiales que incluyen tejido alogénico (por ejemplo, tejido cartilaginoso xenogénico, autólogo, o alogénico desvitalizado), colágeno (por ejemplo, colágeno de tipo I y II), celulosas (por ejemplo, alquilcelulosas, tales como carboximetilcelulosa), fosfatos de calcio (por ejemplo, hidroxapatita), poloxámeros (por ejemplo, PLURONIC F127), gelatinas, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG 3350), dextrinas, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de sésamo), y polímeros formados por ácido láctico, ácido butírico y/o ácido glicólico. En el vehículo también puede incluirse sangre autóloga o autogénica, porque se ha descubierto que dicha inclusión acelera el proceso de curación.

Tal como se emplean en la presente, los términos "morfógeno", "morfógeno óseo", "BMP", "proteína osteogénica" y "factor osteogénico" incluyen la clase de proteínas tipificadas por la proteína osteogénica-1 humana (hOP-1).

Se describe la OP-1. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de hOP-1 se proporcionan en SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente. Para facilitar la descripción, la hOP-1 se menciona como proteína osteogénica representativa. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que la OP-1 es representativa sólo de una familia de morfógenos.

Esta familia de morfógenos incluye los variantes biológicamente activos de cualquiera de las proteínas listadas anteriormente, incluyendo los variantes que contienen cambios conservativos en aminoácidos; y las proteínas osteogénicamente activas que tienen el dominio o esqueleto de siete cisteínas conservado según se define a continuación. Por ejemplo, las proteínas osteogénicas útiles también incluyen las que contienen secuencias que comparten una homología en la secuencia de aminoácidos de al menos 70% con el dominio de siete cisteínas C-terminal de hOP-1, correspondiendo dicho dominio a los 102-106 restos aminoácidos C-terminales de SEQ ID NO:2.

Para determinar el porcentaje de homología de una secuencia de aminoácidos candidata con dicho dominio de siete cisteínas, la secuencia candidata y la secuencia del dominio se alinean. El alineamiento puede realizarse, por ejemplo, con el algoritmo programador dinámico descrito en Needleman *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), y el programa informático Align, un paquete informático comercial producido por DNASTAR, Inc. El alineamiento inicial puede refinarse mediante una comparación con un alineamiento de múltiples secuencias de una familia de proteínas relacionadas. Tras haberse realizado y refinado el alineamiento entre la secuencia candidata y el dominio de siete cisteínas se calcula un porcentaje de puntuación de homología. Los restos aminoácidos alineados de las dos secuencias se comparan secuencialmente basándose en su similitud entre sí. Los factores de similitud incluyen tamaño, forma y carga eléctrica similares. Un método particularmente preferido para determinar las similitudes de aminoácidos es la matriz PAM250 descrita en Dayhoff *et al.*, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5:345-352 (1978 y supl.). En primer lugar se calcula una puntuación de similitud como la suma de las puntuaciones de similitud de aminoácidos alineados por bases. No se toman en cuenta las inserciones ni las delecciones para el porcentaje de similitud y coincidencia. Por consiguiente, no se utilizan las penalizaciones de hueco en este cálculo. Entonces la puntuación bruta se normaliza dividiéndola entre 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 bruta normalizada es el porcentaje de homología.

Las proteínas osteogénicas útiles pueden incluir las que contienen secuencias que comparten más del 60% de coincidencia con el dominio de siete cisteínas. Las proteínas osteogénicas útiles se definen como proteínas osteogénicamente activas que tienen una cualquiera de las secuencias genéricas definidas en la presente, incluyendo OPX (SEQ ID NO:3), y las secuencias genéricas 7 y 8 (SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, respectivamente) o las secuencias genéricas 9 y 10 (SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7, respectivamente).

Se describe un kit para la práctica del uso anteriormente descrito.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se basa en el descubrimiento de que las proteínas osteogénicas pueden generar tejidos y/o cartílago no articular de sustitución funcionales cuando se administran de modo local en el sitio de un defecto en un mamífero. Estos tejidos de cartílago no articular incluyen tejidos laríngeos, traqueales y otros tejidos fibrocartilaginosos, tales como los tejidos de los discos intervertebrales, las costillas, el menisco interarticular esquelético, el oído y la nariz. El uso de la invención es útil para restablecer las funciones perdidas o deterioradas como resultado de la pérdida o de lesiones de los discos intervertebrales en un mamífero, por ejemplo un ser humano.

Para que la invención pueda entenderse más a fondo, a continuación se describen diversos tipos de cartílago, tejidos y órganos cartilaginosos. El cartílago articular cubre las superficies articulares de las porciones de los huesos en las articulaciones. El cartílago permite el movimiento en las articulaciones sin un contacto directo entre los huesos, evitando con ello que se desgasten y se dañen las superficies óseas opuestas. El cartílago articular no tiene tendencia a la osificación. La superficie del cartílago tiene un aspecto macroscópico suave y de color perla, y bajo una magnificación de alta potencia es finamente granular. Este cartílago se denomina cartílago hialino, en oposición

al fibrocartílago y al cartílago elástico. Parece que el cartílago articular obtiene sus nutrientes en parte de los vasos de la membrana sinovial vecina, y en parte de los de los huesos que cubre. El cartílago articular está asociado con la presencia de colágeno de tipo II y de tipo IX y de diversos proteoglicanos bien caracterizados, y con la ausencia de colágeno del tipo X, que está asociado con la formación endocondral de hueso. Para una descripción detallada de la microestructura del cartílago articular, véase, por ejemplo, Aydelotte y Kuettner, *Conn. Tiss. Res.*, 18:205 (1988); Zanetti *et al.*, *J. Cell Biol.*, 101:53 (1985); y Poole *et al.*, *J. Anat.*, 138:13 (1984).

Otros tipos de cartílago permanente en mamíferos adultos incluyen el fibrocartílago y el cartílago elástico. En el fibrocartílago, la red de mucopolisacáridos está entrelazada con destacados haces de colágeno y los condrocitos están más ampliamente dispersos que en el cartílago hialino. El fibrocartílago blanco consiste en una mezcla de tejido fibroso blanco y tejido cartilaginoso en diversas proporciones. Las articulaciones cartilaginosas secundarias están formadas por discos de fibrocartílago que unen a las vértebras en la columna vertebral. Los fibrocartílagos interarticulares se encuentran en las articulaciones que están más expuestas a conmociones violentas y están sometidas a un movimiento frecuente, por ejemplo el menisco de la rodilla. Los ejemplos de dichas articulaciones incluyen la articulación temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, de muñeca y de rodilla. Estos discos fibrocartilaginosos, que se adhieren con fuerza a ambas superficies opuestas, están compuestas de anillos concéntricos de tejido fibroso, con láminas cartilaginosas interpuestas. Un ejemplo de dichos discos fibrocartilaginosos son los discos intervertebrales de la columna. Los fibrocartílagos conectores están interpuestos entre las superficies óseas de las articulaciones que admiten sólo una ligera movilidad, por ejemplo entre el cuerpo de las vértebras y entre los huesos púbicos. Los fibrocartílagos circunferentes rodean el margen de algunas de las cavidades articulares, tales como la cavidad cotiloidea de la cadera y la cavidad glenoidea del hombro, y actúan para profundizar la superficie articular y para proteger sus bordes. Los fibrocartílagos estratiformes se refieren al revestimiento delgado que cubre los surcos óseos a través de los cuales se deslizan los tendones de ciertos músculos. El fibrocartílago interarticular se considera en la presente cartílago no articular, para distinguirlo del cartílago articular que está formado principalmente por hialino. Cuando está presente en cantidades pequeñas, tal como en los discos articulares, el labrum glenoideo y acetabular, el revestimiento cartilaginoso de los surcos óseos para los tendones y algunos cartílagos articulares, el fibrocartílago se diferencia de otros tipos de cartílago porque tiene mucho colágeno de tipo I (tejido conectivo general) en su matriz; entonces quizás sería mejor considerarlo como una mezcla de dos tipos de tejido, por ejemplo cuando un ligamento o tejido tendinoso se inserta en el cartílago hialino, en lugar de ser un tipo específico de cartílago (véase, por ejemplo, *Gray's Anatomy*).

El cartílago elástico contiene fibras de colágeno que son histológicamente similares a las fibras de elastina. Este cartílago se encuentra en el cuerpo humano en la aurícula del oído externo, los tubos de Eustaquio, el cartílago corniculado de la laringe y la epiglotis. Al igual que en todos los tipos de cartílago, el cartílago elástico también contiene condrocitos y una matriz, extendiéndose esta última en todas direcciones, mediante una red de fibras elásticas amarillas, ramificándose y anastomosándose en todas direcciones excepto inmediatamente alrededor de cada célula, en donde se encuentra una cantidad variable de sustancia intercelular hialina no fibrilada.

Tal como se emplea en la presente, "cartílago" se diferencia de los tejidos cartilaginosos fibróticos, que se producen en tejido de escara, por ejemplo, y son queloides y típicos de tejido de tipo escara, es decir, están compuestos de capilares y haces abundantes, irregulares y desorganizados de colágeno de tipo I y de tipo II.

Los cartílagos laríngeos principales son cartílago hialino o fibrocartílago, en particular fibrocartílago elástico. De manera específica, los cartílagos corniculado, cuneiforme, tritado y epiglótico son fibrocartílago elástico con poca tendencia a osificar o calcificar a lo largo del tiempo. El cartílago tiroideo, cricoides y la mayor parte del cartílago aritenoides son cartílago hialino y pueden sufrir una calcificación u osificación moteada con el envejecimiento y pueden deteriorar la aceptabilidad mecánica del tejido. Los ligamentos laríngeos principales incluyen los ligamentos extrínsecos (por ejemplo, la membrana tirohioidea y sus ligamentos componentes), los ligamentos intrínsecos (por ejemplo, la membrana cricotiroidea y sus ligamentos componentes), los pliegues vestibulares y los ligamentos asociados, los pliegues vocales y los ligamentos asociados.

La tráquea es un tubo cilíndrico cartilaginoso y membranoso aplanado en la parte posterior. Se extiende desde la parte inferior de la laringe, al nivel de la sexta vértebra cervical, hasta la parte opuesta de la cuarta (o a veces la quinta) vértebra dorsal, en donde se divide en dos bronquios, uno por cada pulmón. La tráquea está compuesta de anillos cartilaginosos hialinos imperfectos que se completan con membranas fibrosas. Son muy elásticos pero a veces se calcifican con el envejecimiento avanzado. Los cartílagos están encerrados en una membrana fibrosa elástica.

I. Consideraciones sobre las proteínas

En su forma nativa madura, una proteína osteogénica natural es un dímero glicosilado, que generalmente tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 30-36 kD, según se determina mediante SDS-PAGE. Cuando se reduce, la proteína de 30 kD produce dos subunidades polipeptídicas glicosiladas que tienen unos pesos moleculares aparentes de aproximadamente 16 kD y 18 kD. En el estado reducido, la proteína no tiene actividad osteogénica detectable. La proteína no glicosilada, que también tiene actividad osteogénica, tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 27 kD. Cuando se reduce, la proteína de 27 kD produce dos polipéptidos no glicosilados que tienen cada uno un peso molecular de aproximadamente 14 kD a aproximadamente 16 kD.

Generalmente, las proteínas osteogénicas naturales se traducen como un precursor que tiene un péptido señal N-terminal con una longitud habitualmente menor que aproximadamente 30 aminoácidos. Al péptido señal le sigue un dominio "pro" que se escinde para producir el dominio C-terminal maduro. El péptido señal se escinde con rapidez tras la traducción, en un sitio de ruptura que puede predecirse en una secuencia concreta utilizando el método de Von Heijne, *Nucleic Acids Research*, 14:4683-4691 (1986). El dominio pro habitualmente es aproximadamente tres veces más grande que el dominio C-terminal maduro totalmente procesado.

La proteína GDF-5 útil en la presente incluye cualquier proteína nativa natural conocida, incluyendo sus homólogos alélicos, filogenéticos y otros variantes. Esto también incluye los producidos de forma biosintética (que incluyen, por ejemplo, las "muteínas" o "proteínas mutantes") y los que son miembros osteogénicamente activos nuevos de la familia morfogénica general de proteínas. Las secuencias particularmente útiles incluyen las que comprenden los 96 a 102 restos aminoácidos C-terminales de GDF-5 y sus variantes de secuencia de aminoácidos.

Las proteínas osteogénicas útiles descritas incluyen las que tienen una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 70% (por ejemplo, al menos 80%) de homología de secuencia o "similitud" con toda o parte de una proteína morfogénica de referencia natural. Una proteína de referencia es la OP-1 humana, y su secuencia de referencia es el dominio de siete cisteínas C-terminal presente en las formas osteogénicamente activas de la OP-1 humana. Este dominio se corresponde con los restos 330-431 de SEQ ID NO:2. Otras proteínas osteogénicas conocidas también pueden utilizarse como secuencia de referencia. En una realización, una secuencia de aminoácidos candidata puede alinearse con una secuencia de aminoácidos de referencia utilizando el método de Needleman *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 48:443-453 (1970), aplicado de modo conveniente por programas informáticos, tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). No se toman en cuenta los huecos internos ni las inserciones de aminoácidos en la secuencia candidata para calcular el nivel de homología o coincidencia entre las secuencias candidata y de referencia.

En la presente, se entiende que una "homología de secuencia de aminoácidos" incluye la coincidencia y la similitud de secuencia de aminoácidos. Las secuencias homólogas comparten restos aminoácidos idénticos y/o similares, en las que los restos similares son sustituciones conservativas, o "mutaciones puntuales permitidas", de los correspondientes restos aminoácidos en una secuencia de referencia alineada. Por tanto, una secuencia polipeptídica candidata que comparte una homología de aminoácidos del 70% con una secuencia de referencia es aquella en que cualquiera de 70% de los restos alineados son idénticos a los correspondientes restos en una secuencia de referencia, o son sustituciones conservativas de éstos. Los polipéptidos morfogénicos pueden compartir al menos 60% (por ejemplo, al menos 65%) de coincidencia de secuencia de aminoácidos con el dominio de siete cisteínas C-terminal de la OP-1 humana.

Tal como se emplea en la presente, las "sustituciones conservativas" son restos que son física o funcionalmente similares a los correspondientes restos de referencia. Es decir, una sustitución conservativa y su resto de referencia tienen un tamaño, una forma, una carga eléctrica y unas propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad para formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas cumplen los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff *et al.* (1978), 5, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, supl. 3, cap. 2, pp. 354-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., 2007. Los ejemplos de sustituciones conservativas son las sustituciones dentro de 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 conservativo" o "variación conservativa" también incluye el uso de un resto aminoácido sustitutivo en lugar un resto aminoácido en una secuencia de aminoácidos de origen concentra, en el que los anticuerpos específicos para la secuencia de origen también son específicos (es decir, tienen "reactividad cruzada" o "inmunorreaccionar") con la secuencia polipeptídica sustituida resultante.

La familia de proteínas osteogénicas se define mediante una secuencia de aminoácidos genérica.

Las secuencias genéricas 9 (SEQ ID NO:6) y 10 (SEQ ID NO:7) son secuencias de aminoácidos compuestas de las siguientes proteínas: OP-1 humana, OP-2 humana, OP-3 humana, BMP-2 humana, BMP-3 humana, BMP-4 humana, BMP-5 humana, BMP-6 humana, BMP-9 humana, BMP-10 humana, BMP-11 humana, 60A de *Drosophila*, Vg-1 de *Xenopus*, UNIVIN de erizo de mar, CDMP-1 humana (GDF-5 de ratón), CDMP-2 humana (GDF-6 de ratón, BMP-13 humana), CDMP-3 humana (GDF-7 de ratón, BMP-12 humana), GDF-3 de ratón, GDF-1 humana, GDF-1 de ratón, DORSALIN de pollo, DPP, SCREW de *Drosophila*, NODAL de ratón, GDF-8 de ratón, GDF-8 humana, GDF-9 de ratón, GDF-10 de ratón, GDF-11 humana, GDF-11 de ratón, BMP-15 humana, y BMP3b de rata. Al igual que la secuencia genérica 7, la secuencia genérica 9 incluye el esqueleto de seis cisteínas C-terminal y, al igual que la secuencia genérica 8, la secuencia genérica 10 incluye el esqueleto de siete cisteínas C-terminal.

SECUENCIA GENÉRICA 9

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45 50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
 55 60 65
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 70 75 80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa (SEQ ID NO: 6)
 85 90 95

- en la que cada Xaa se define independientemente como sigue: Xaa en el resto 1 = (Phe, Leu o Glu); Xaa en el resto 2 = (Tyr, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val o Glu); Xaa en el resto 3 = (Val, Ile, Leu o Asp); Xaa en el resto 4 = (Ser, Asp, Glu, Asn o Phe); Xaa en el resto 5 = (Phe o Glu); Xaa en el resto 6 = (Arg, Gln, Lys, Ser, Glu, Ala o Asn); Xaa en el resto 7 = (Asp, Glu, Leu, Ala o Gln); Xaa en el resto 8 = (Leu, Val, Met, Ile o Phe); Xaa en el resto 9 = (Gly, His o Lys); Xaa en el resto 10 = (Trp o Met); Xaa en el resto 11 = (Gln, Leu, His, Glu, Asn, Asp, Ser o Gly); Xaa en el resto 12 = (Asp, Asn, Ser, Lys, Arg, Glu o His); Xaa en el resto 13 = (Trp o Ser); Xaa en el resto 14 = (Ile o Val); Xaa en el resto 15 = (Ile o Val); Xaa en el resto 16 = (Ala, Ser, Tyr o Trp); Xaa en el resto 18 = (Glu, Lys, Gln, Met, Pro, Leu, Arg, His o Lys); Xaa en el resto 19 = (Gly, Glu, Asp, Lys, Ser, Gln, Arg o Phe); Xaa en el resto 20 = (Tyr o Phe); Xaa en el resto 21 = (Ala, Ser, Gly, Met, Gln, His, Glu, Asp, Leu, Asn, Lys o Thr); Xaa en el resto 22 = (Ala o Pro); Xaa en el resto 23 = (Tyr, Phe, Asn, Ala o Arg); Xaa en el resto 24 = (Tyr, His, Glu, Phe o Arg); Xaa en el resto 26 = (Glu, Asp, Ala, Ser, Tyr, His, Lys, Arg, Gln o Gly); Xaa en el resto 28 = (Glu, Asp, Leu, Val, Lys, Gly, Thr, Ala o Gln); Xaa en el resto 30 = (Ala, Ser, Ile, Asn, Pro, Glu, Asp, Phe, Gln o Leu); Xaa en el resto 31 = (Phe, Tyr, Leu, Asn, Gly o Arg); Xaa en el resto 32 = (Pro, Ser, Ala o Val); Xaa en el resto 33 = (Leu, Met, Glu, Phe o Val); Xaa en el resto 34 = (Asn, Asp, Thr, Gly, Ala, Arg, Leu o Pro); Xaa en el resto 35 = (Ser, Ala, Glu, Asp, Thr, Leu, Lys, Gln o His); Xaa en el resto 36 = (Tyr, His, Cys, Ile, Arg, Asp, Asn, Lys, Ser, Glu o Gly); Xaa en el resto 37 = (Met, Leu, Phe, Val, Gly o Tyr); Xaa en el resto 38 = (Asn, Glu, Thr, Pro, Lys, His, Gly, Met, Val o Arg); Xaa en el resto 39 = (Ala, Ser, Gly, Pro o Phe); Xaa en el resto 40 = (Thr, Ser, Leu, Pro, His o Met); Xaa en el resto 41 = (Asn, Lys, Val, Thr o Gln); Xaa en el resto 42 = (His, Tyr o Lys); Xaa en el resto 43 = (Ala, Thr, Leu o Tyr); Xaa en el resto 44 = (Ile, Thr, Val, Phe, Tyr, Met o Pro); Xaa en el resto 45 = (Val, Leu, Met, Ile o His); Xaa en el resto 46 = (Leu, Asn o Val); Xaa en el resto 47 = (Thr, Ser, Ala, Asn o His); Xaa en el resto 48 = (Leu, Asn o Ile); Xaa en el resto 49 = (Val, Met, Leu, Pro o Ile); Xaa en el resto 50 = (His, Asn, Arg, Lys, Tyr o Gln); Xaa en el resto 51 = (Phe, Leu, Ser, Asn, Met, Ala, Arg, Glu, Gly o Gln); Xaa en el resto 52 = (Ile, Met, Leu, Val, Lys, Gln, Ala o Tyr); Xaa en el resto 53 = (Asn, Phe, Lys, Glu, Asp, Ala, Gln, Gly, Leu o Val); Xaa en el resto 54 = (Pro, Asn, Ser, Val o Asp); Xaa en el resto 55 = (Glu, Asp, Asn, Lys, Arg, Ser, Gly, Thr, Gln, Pro o His); Xaa en el resto 56 = (Thr, His, Tyr, Ala, Ile, Lys, Asp, Ser, Gly o Arg); Xaa en el resto 57 = (Val, Ile, Thr, Ala, Leu o Ser); Xaa en el resto 58 = (Pro, Gly, Ser, Asp o Ala); Xaa en el resto 59 = (Lys, Leu, Pro, Ala, Ser, Glu, Arg o Gly); Xaa en el resto 60 = (Pro, Ala, Val, Thr o Ser); Xaa en el resto 61 = (Cys, Val o Ser); Xaa en el resto 63 = (Ala, Val o Thr); Xaa en el resto 64 = (Thr, Ala, Glu, Val, Gly, Asp o Tyr); Xaa en el resto 66 = (Gln, Lys, Glu, Arg o Val); Xaa en el resto 67 = (Leu, Met, Thr o Tyr); Xaa en el resto 68 = (Asn, Ser, Gly, Thr, Asp, Glu, Lys o Val); Xaa en el resto 69 = (Ala, Pro, Gly o Ser); Xaa en el resto 70 = (Ile, Thr, Leu o Val); Xaa en el resto 71 = (Ser, Pro, Ala, Thr, Asn o Gly); Xaa en el resto 72 = (Val, Ile, Leu o Met); Xaa en el resto 74 = (Tyr, Phe, Arg, Thr, Tyr o Met); Xaa en el resto 75 = (Phe, Tyr, His, Leu, Ile, Lys, Gln o Val); Xaa en el resto 76 = (Asp, Leu, Asn o Glu); Xaa en el resto 77 = (Asp, Ser, Arg, Asn, Glu, Ala, Lys, Gly o Pro); Xaa en el resto 78 = (Ser, Asn, Asp, Tyr, Ala, Gly, Gln, Met, Glu, Asn o Lys); Xaa en el resto 79 = (Ser, Asn, Glu, Asp, Val, Lys, Gly, Gln o Arg); Xaa en el resto 80 = (Asn, Lys, Thr, Pro, Val, Ile, Arg, Ser o Gln); Xaa en el resto 81 = (Val, Ile, Thr o Ala); Xaa en el resto 82 = (Ile, Asn, Val, Leu, Tyr, Asp o Ala); Xaa en el resto 83 = (Leu, Tyr, Lys o Ile); Xaa en el resto 84 = (Lys, Arg, Asn, Tyr, Phe, Thr, Glu o Gly); Xaa en el resto 85 = (Lys, Arg, His, Gln, Asn, Glu o Val); Xaa en el resto 86 = (Tyr, His, Glu o Ile); Xaa en el resto 87 = (Arg, Glu, Gln, Pro o Lys); Xaa en el resto 88 = (Asn, Asp, Ala, Glu, Gly o Lys); Xaa en el

resto 89 = (Met o Ala); Xaa en el resto 90 = (Val, Ile, Ala, Thr, Ser o Lys); Xaa en el resto 91 = (Val o Ala); Xaa en el resto 92 = (Arg, Lys, Gln, Asp, Glu, Val, Ala, Ser o Thr); Xaa en el resto 93 = (Ala, Ser, Glu, Gly, Arg o Thr); Xaa en el resto 95 = (Gly, Ala o Thr); y Xaa en el resto 97 = (His, Arg, Gly, Leu o Ser). Además, después del resto 53 en BMP3b de rata y GDF-10 de ratón hay una Ile; después del resto 54 en GDF-1 hay una Thr; después del resto 54 en BMP3 hay una Val; después del resto 78 en BMP-8 y DORSALIN hay una Gly; y después del resto 37 en GDF-1 humana hay Pro, Gly, Gly, y Pro.

La secuencia genérica 10 (SEQ ID NO:7) incluye toda la secuencia genérica 9 y además incluye los siguientes cinco restos aminoácidos en su N-terminal: Cys Xaa Xaa Xaa Xaa (SEQ ID NO:9), en la que Xaa en el resto 2 = (Lys, Arg, Gln, Ser, His, Glu, Ala o Cys); Xaa en el resto 3 = (Lys, Arg, Met, Lys, Thr, Leu, Tyr o Ala); Xaa en el resto 4 = (His, Gln, Arg, Lys, Thr, Leu, Val, Pro o Tyr); y Xaa en el resto 5 = (Gln, Thr, His, Arg, Pro, Ser, Ala, Gln, Asn, Tyr, Lys, Asp o Leu). Por consiguiente, comenzando en el resto 6, cada "Xaa" en la secuencia genérica 10 es un aminoácido especificado definido en la secuencia genérica 9, con la distinción de que cada número de resto descrito para la secuencia genérica 9 se desplaza en cinco en la secuencia genérica 10. Por ejemplo, "Xaa en el resto 1 = (Phe, Leu o Glu)" en la secuencia genérica 9 se corresponde con Xaa en el resto 6 en la secuencia genérica 10.

Las proteínas osteogénicamente activas útiles pueden comprender una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se hibrida, bajo condiciones de hibridación de baja, media o alta rigurosidad, con el ADN o ARN que codifica las secuencias osteogénicas de referencia. Los ejemplos de secuencias de referencia incluyen las secuencias C-terminales que definen los dominios de siete cisteínas conservadas de OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, 60A, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, y similares. En la presente, se definen las condiciones de hibridación muy rigurosas como una hibridación en formamida al 40%, 5x SSPE, 5x disolución de Denhardt, y SDS al 0,1% a 37 °C durante la noche, y lavado en 0,1x SSPE, SDS al 0,1% a 50 °C. Las condiciones rigurosas convencionales están bien caracterizadas en los textos de clonación molecular convencionales, disponibles en el mercado. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., ed. por Sambrook et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); *DNA Cloning*, volúmenes I y II (D.N. Glover, ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds., 1984); y B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984).

Las proteínas osteogénicas contempladas en la presente pueden expresarse a partir de ADNc o ADN genómico intacto o truncado, o a partir de ADN sintéticos, en células hospedantes procariotas o eucariotas. Las proteínas díméricas pueden aislarse a partir del medio de cultivo y/o plegarse y dimerizarse *in vitro* para formar composiciones biológicamente activas. Los heterodímeros pueden formarse *in vitro* combinando cadenas polipeptídicas separadas y diferenciadas. Como alternativa, los heterodímeros pueden formarse en una única célula coexpresando ácidos nucleicos que codifiquen cadenas polipeptídicas separadas y diferenciadas. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/09229 y la patente de EEUU nº 5.411.941, para obtener ejemplos de protocolos para la producción de proteínas heterodiméricas recombinantes. Las células hospedantes preferidas en la actualidad incluyen procariotas, que incluyen *E. coli*, y eucariotas, que incluyen levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*) o células de mamífero (por ejemplo, células CHO, COS o BSC). También pueden utilizarse de manera favorable otras células hospedantes. Unas descripciones detalladas de las proteínas útiles en la práctica de esta invención, incluyendo la forma de fabricarlas, utilizarlas y ensayarlas para la actividad osteogénica, se describen en numerosas publicaciones, incluyendo las patentes de EEUU nº 5.266.683 y 5.011.691.

II. Consideraciones sobre la formulación y la administración

A. Consideraciones generales

Las composiciones para su uso según la invención pueden formularse utilizando métodos habituales. Las metodologías de formulación útiles incluyen la liofilización de la proteína solubilizada sobre materiales de matriz o vehículo. Las disoluciones de solubilización de proteínas útiles incluyen etanol, urea, tampones fisiológicos (por ejemplo, disolución salina), tampones ácidos, y disoluciones de acetonitrilo/ácido trifluoroacético, y similares. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.266.683. La concentración final deseada de proteína dependerá de la actividad específica de la proteína, así como del tipo, volumen y localización anatómica del defecto. En una realización preferida, las proteínas útiles tienen una actividad específica de formación de hueso semimáxima de 0,5-1,0 ng de proteína/25 mg de matriz. También pueden utilizarse proteínas con una actividad específica menor. La concentración final deseada de proteína puede depender de la edad, del sexo y de la salud general del receptor. Por ejemplo, una dosis eficaz en general es de 10-1000 µg de proteína osteogénica por 4 cm² de defecto. Unas cantidades más pequeñas pueden ser suficientes para defectos o desgarros más pequeños. La optimización de las dosificaciones no requiere más que la experimentación habitual y está dentro de la técnica.

Un dispositivo descrito en la presente puede adoptar una diversidad de configuraciones. Puede comprender una matriz sintética o natural configurada con un tamaño y una forma para que se ajuste al sitio del defecto que se va a reparar. Como alternativa, el dispositivo puede comprender un vehículo para formular un gel, una pasta, una masilla, un cemento, una lámina o un líquido. Por ejemplo, puede formularse un dispositivo osteogénico en disolución exento de matriz solubilizando ciertas formas de OP-1 en tampones acetato (20 mM; pH 4,5) o citrato, o en disolución salina tamponada con fosfato (pH 7,5). En algunos casos, la proteína osteogénica puede no solubilizarse por completo y puede precipitar tras su administración al sitio del defecto. Las suspensiones, la formación de agregados o la

precipitación *in vivo* no deteriora la operatividad del dispositivo osteogénico exento de matriz cuando se realiza la práctica según la invención descrita en la presente. Los dispositivos exentos de matriz en forma líquida o semilíquida son particularmente adecuados para la inyección, para suministrar el dispositivo al sitio del defecto mediante inyección, en lugar de medios quirúrgicos. Una serie de dispositivos exentos de matriz se describen a continuación.

5 También pueden añadirse materiales de matriz, incluyendo materiales en partículas, a estos dispositivos de forma favorable.

El dispositivo osteogénico puede prepararse inmediatamente antes de su administración al sitio del defecto. Por ejemplo, pueden prepararse *in situ* dispositivos que contienen carboximetilcelulosa (CMC), adecuados para mezclar inmediatamente antes de la cirugía. Una CMC de baja viscosidad (AQUALON) puede envasarse e irradiarse por separado de la proteína osteogénica OP-1. La proteína OP-1 entonces se mezcla con el vehículo de CMC y se ensaya para la actividad osteogénica. Los dispositivos preparados de esta manera son tan biológicamente activos como el dispositivo convencional sin CMC. Los dispositivos reparan sitios de defectos induciendo la formación de cartílago o tejido. La cantidad de proteína osteogénica eficaz para este objetivo puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica.

10

15 B. Preparación de proteínas morfogénicas óseas

A continuación se ilustran métodos para preparar OP-1 liofilizada. Otras proteínas osteogénicas liofilizadas pueden prepararse de una manera similar.

La OP-1 se liofiliza en tampón acetato 20 mM (pH 4,5) con manitol, lactosa, glicina al 5% u otro aditivo o agente de relleno, utilizando protocolos de liofilización convencionales. La OP-1 preparada de esta manera puede permanecer biológicamente activa durante al menos seis meses cuando se conserva de 4 °C a 30 °C.

20

La OP-1 también puede liofilizarse en tampón succinato o citrato (u otro tampón no volátil) para su reconstitución en agua, o en agua para su reconstitución en tampón acetato 20 mM (pH 4,5). En general, los aditivos tales como lactosa, sacarosa, glicina y manitol son adecuados para su uso en dispositivos osteogénicos exentos de matriz liofilizados. En ciertas realizaciones, estos dispositivos (OP-1 0,5 mg/ml y aditivo al 5%) pueden prepararse en una configuración en húmedo o en seco antes de la liofilización.

25

Por ejemplo, las formulaciones líquidas de OP-1 en tampón acetato 10 y 20 mM (pH 4, 4,5 y 5) con y sin manitol (al 0%, 1% y 5%) son estables y osteogénicamente activas durante al menos seis meses.

III. Bioensayos

Un bioensayo reconocido en la técnica para la inducción de hueso se describe en Sampath *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:6591-6595 (1983), y en la patente de EEUU nº 4.968.590. El ensayo implica depositar muestras de ensayo en sitios subcutáneos en ratas receptoras bajo anestesia con éter. Se realiza una incisión vertical de 1 cm bajo condiciones estériles en la piel sobre la región torácica, y se prepara un bolsillo mediante disección roma. En ciertas circunstancias, aproximadamente 25 mg de la muestra de ensayo se implantan profundamente en el bolsillo, y la incisión se cierra con una grapa metálica para la piel. El sitio heterotrópico permite el estudio de la inducción de hueso sin las posibles ambigüedades que resultan del uso de sitios ortotrópicos.

30

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

Los implantes realizados con éxito muestran un avance controlado a través de diversas etapas de desarrollo endocondral del hueso inducido, que incluyen: (1) infiltración transitoria por leucocitos polimorfonucleares en el día uno; (2) migración y proliferación de células mesenquimáticas en los días dos y tres; (3) aparición de condrocitos en los días cinco y seis; (4) formación de la matriz del cartílago en el día siete; (5) calcificación del cartílago en el día ocho; (6) invasión vascular, aparición de osteoblastos, y formación de hueso nuevo en los días nueve y diez; (7) aparición de remodelación osteoblástica y remodelación ósea en los días doce a dieciocho; y (8) diferenciación de la médula ósea hematopoyética en los osículos en el día veintiuno.

40

Se prefieren realizar cortes y tinción de secciones histológicas para determinar el grado de osteogénesis en los implantes. La tinción con azul de toluidina o hematoxilina/eosina demuestra con claridad el desarrollo final endocondral del hueso. Un bioensayo de doce días es suficiente para determinar si existe actividad inductora de hueso asociada a la muestra de ensayo.

50

Además, puede utilizarse la actividad fosfatasa alcalina como marcador para la osteogénesis. La actividad enzimática puede determinarse de forma espectrofotométrica después de la homogeneización del material de ensayo extirpado. La actividad tiene su pico en los días 9-10 *in vivo* y después disminuye lentamente. Las muestras que no demuestran desarrollo de hueso en una histología no deberían mostrar actividad fosfatasa alcalina bajo estas condiciones de ensayo. El ensayo es útil para cuantificar la formación de hueso poco tiempo después de que las muestras de ensayo se retiren de la rata. Por ejemplo, las muestras que contienen proteína osteogénica a varios

55

niveles de pureza se han ensayado para determinar el nivel de dosis/pureza más eficaz, para buscar una formulación que pueda producirse a escala industrial. Los resultados medidos mediante el nivel de actividad fosfatasa alcalina y evaluación histológica pueden representarse como “unidades formadoras de hueso”. Una unidad formadora de hueso representa la cantidad de proteína requerida para una actividad formadora de hueso semimáxima en el día 12. Además pueden construirse curvas de dosis para la actividad inductora de hueso *in vivo* en cada etapa de un esquema de purificación ensayando la concentración de proteína obtenida en la etapa. La construcción de dichas curvas requiere sólo experimentación habitual.

IV. Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

Este ejemplo demuestra la eficacia de la proteína osteogénica para regenerar tejido laríngeo de sustitución funcional en un modelo canino (raza sabueso).

Para preparar un dispositivo osteogénico, la lámina tiroidea canina donante, que se va a utilizar como matriz del aloinjerto, se congeló y se descongeló varias veces para liberar y retirar las células. La lámina tiroidea entonces se desmineralizó en HCl 0,5 N (por ejemplo, cuatro intercambios de 10 volúmenes de disolución; 2 horas por intercambio). Se revistió un trozo de 4,5 cm² de matriz de aloinjerto de tiroidea tratada con aproximadamente 250 µg de OP-1 madura para formar un dispositivo osteogénico implantable.

Se realizó la cirugía utilizando procedimientos convencionales. Se creó un defecto de 2 cm² en la lámina izquierda del cartílago tiroidea del animal hospedante después de una preparación cuidadosa del pericondrio. El implante se ajustó para que encajase en el defecto y se incorporó con varios puntos. El pericondrio y los músculos adyacentes entonces se sustituyeron. Tras la recuperación, se dejó que el animal se moviese sin restricciones. El animal se sacrificó a las 18 semanas postoperatorias.

Antes del sacrificio se controló el avance de la curación de modo visual y mediante palpación. La cirugía y la recuperación no produjeron pérdida de voz. La manipulación manual no identificó grandes anomalías y sugiere la formación de un tejido mecánicamente aceptable y flexible. Tras el sacrificio, la laringe entera se diseccionó y se fijó en paraformaldehído al 4% y se postfijó en etanol al 70%. La disección cuidadosa de todos los tejidos blandos no identificó osificación ni estructuras patológicas, tales como mineralización patológica, vascularización aberrante y similares. El cartílago tiroidea tenía la forma adecuada en los laterales operado y no operado, y fue difícil indicar el lateral operado. El cartílago tiroidea tenía un color de tipo cartílago sin que hubiese una mayor vascularización. Mediante palpación sólo se descubrió una pequeña protuberancia de aproximadamente 2 mm en el lateral reconstruido. Una presión máxima con el dedo no indicó inestabilidad en el cartílago de sustitución. El nuevo tejido tenía una resistencia, una flexibilidad y una ductilidad similares al tejido original. No se edujeron interferencias con los rayos de movilidad laríngeos.

El análisis histológico indicó una buena incorporación del cartílago y del hueso recién formados al área del defecto. El nuevo tejido de cartílago parece ser permanente, es decir, estable, y no estar sometido a reabsorción, según evidencia su existencia continuada a los 4 meses después de la operación. El cartílago temporal generalmente se reabsorbe o se convierte en tejido fibrótico en 3 meses. Se identificaron osteoblastos y nueva formación de hueso en porciones del tejido, lo cual indica la aparición de osteogénesis.

Estos datos demuestran que el aloinjerto de cartílago tiroidea prerrevestido con OP-1 induce la formación de una reconstrucción mecánicamente aceptable de un defecto en el cartílago tiroidea creado de modo quirúrgico. Se demostró que un vehículo cartilaginoso era aceptable, sin liberación rápida hacia las estructuras adyacentes. Por tanto, la OP-1 puede utilizarse para estimular el crecimiento y la reparación del cartílago.

Ejemplo de referencia 2

Este ejemplo proporciona un protocolo para determinar la eficacia de la proteína osteogénica para reparar grandes defectos del tejido laríngeo y para la medición comparativa de vehículos alternativos y concentraciones de proteínas osteogénicas.

En este caso se ensayó un intervalo de concentraciones de proteínas, es decir, 100 µg-500 µg, y dos protocolos quirúrgicos diferentes, es decir, dispositivos implantados bajo el pericondrio y dispositivos implantados bajo la fascia. Se contempla que la fascia proporciona menos células progenitoras que el pericondrio. Los animales se sacrifican a las 16 semanas. La tabla 1 a continuación resume el protocolo.

Tabla 1: Protocolo del experimento

Grupo	Perros	Defecto	Implante	Duración
I	3	Parcial (2/3 del lateral derecho del cartílago tiroidea)	Cartílago control bajo el pericondrio	4 meses

II	3	Parcial (2/3 del lateral derecho del cartílago tiroides)	100 µg de OP-1 + cartílago bajo el pericondrio	4 meses
III	3	Parcial (2/3 del lateral derecho del cartílago tiroides)	500 µg de OP-1 + cartílago bajo el pericondrio	4 meses
IV	3	Parcial (2/3 del lateral derecho del cartílago tiroides)	500 µg de OP-1 + cartílago bajo la fascia	4 meses
V	3	Parcial (2/3 del lateral derecho del cartílago tiroides)	500 µg de OP-1 + cartílago extraído con GuHCl bajo el pericondrio	4 meses

Ejemplo de referencia 3

Este ejemplo proporciona un protocolo para determinar la eficacia de una matriz sintética para reparar tejido laríngeo en un mamífero.

- 5 Se crean defectos de fisuras de modo quirúrgico en 2/3 de un lateral del cartílago tiroides en el animal de ensayo. El tamaño de los defectos varía de 2,0-4,5 cm². Para preparar un dispositivo osteogénico se empleó uno de los siguientes tres tipos de matrices/vehículos: (i) matriz de colágeno de hueso que se ha desmineralizado, extraído con Gaudier, y combinado con CMC, por ejemplo, 0,15-0,25 g de CMC/g de polímero, para maximizar la concisión, la integridad y las propiedades de manipulación; (ii) matriz de colágeno-GAG sintética; y (iii) vehículos exentos de
- 10 matriz. La cantidad de proteína osteogénica es (i) 50 µg/defecto; (ii) 100 µg/defecto; (iii) 500 µg/defecto; o (iv) 750 µg/defecto. El protocolo de cirugía para implantar el dispositivo osteogénico implica la sustitución del pericondrio, o la eliminación del pericondrio y la sustitución sólo de la fascia y los músculos.

Los animales se tratan como se describió en el ejemplo 1. Los animales se sacrifican a las 12 semanas, 18 semanas, 24 semanas y 36 semanas.

- 15 La integridad mecánica del tejido diano puede evaluarse utilizando protocolos convencionales para medir la capacidad de carga de peso, el radio de movilidad, la fuerza compresora y similares.

Se anticipa que todos los componentes de la matriz producirán una formación de tejido de sustitución mecánicamente aceptable, y que a las 24 semanas o 36 semanas, la histología revelará la formación estable de cartílago.

20 Ejemplo de referencia 4

Este ejemplo proporciona un protocolo para determinar la eficacia de la proteína osteogénica para regenerar una laringe de sustitución funcional y mecánicamente aceptable tras una laringectomía parcial o completa.

- En este caso se crea un defecto suficiente como para eliminar al menos 2/3 de la laringe y que implica a múltiples cartílagos y ligamentos laríngeos. Se crea una matriz de aloinjerto de sustitución utilizando, por ejemplo, el protocolo descrito en el ejemplo 1 ó 2, o el protocolo descrito en la publicación PCT WO 95/33502.
- 25

- La matriz de sustitución se reviste con proteína osteogénica como se describió anteriormente (por ejemplo, 10-1000 µg de OP-1) y se implanta de modo quirúrgico. Los animales se controlan de modo visual y mediante manipulación manual, y se sacrifican a las 12 semanas, 18 semanas, 24 semanas y 36 semanas después de la operación. Se anticipa que la incorporación total del injerto dará como resultado la formación de tejido de ligamento y cartílago de sustitución funcional y mecánicamente aceptable, y que el tejido de sustitución dará lugar a una estructura abierta flexible sin una pérdida sustancial de la voz o de la actividad de esfínter.
- 30

Ejemplo de referencia 5

- Se estudió la eficacia de la OP-1 para la regeneración de la laringe de perro tratando defectos del cartílago tiroides con aloinjertos de tiroides cubiertos con pericondrio del hospedante. Antes de la implantación, los aloinjertos se congelaron, se descongelaron y se desmineralizaron. Los animales se sacrificaron 4 meses después de la cirugía. El examen macroscópico de todos los especímenes fue realizado por un cirujano laríngeo y no se observaron cambios patológicos en ninguna de las áreas del cuello del animal sacrificado. No se descubrió osificación patológica en los músculos circundantes ni en otras estructuras conectivas. Además no se observaron cambios en la parte interna de la propia laringe, incluyendo los tres compartimentos laríngeos, a saber, vestíbulo, luz laríngea y cavidad infraglotica.
- 35

- Se analizaron 11 especímenes de 11 animales, incluyendo: (i) 3 especímenes de perros control implantados sólo con aloinjertos (grupo I); (ii) 4 especímenes de perros cuyos implantes estaban revestidos con 500 µg de OP-1 y colocados bajo el pericondrio del cartílago tiroides del hospedante (grupo II); (iii) 2 especímenes de perros cuyos implantes estaban revestidos con 500 µg de OP-1 y colocados bajo la fascia del cuello del cartílago tiroides del
- 40

hospedante (grupo III); y (iv) 2 especímenes de perros cuyos implantes de aloinjerto habían sido extraídos con sal y clorhidrato de guanidinio, revestidos con 500 µg de OP-1 y colocados bajo el pericondrio de la lámina tiroides del hospedante (grupo IV).

- 5 Tras la terminación, se retiraron la laringe y las estructuras circundantes, se estudiaron y se fijaron en formaldehído al 10% durante 48 horas. Después la lámina tiroides izquierda que contenía el defecto reparado se diseccionó y se postfijó en paraformaldehído al 4%. Cada lámina tiroides se dividió en 4 bloques que cubren el espécimen completo y cada bloque se introdujo de modo individual en plástico. Entonces se realizó una análisis histológico utilizando secciones en serie a lo largo del defecto que estaban separadas por aproximadamente 1-2 mm.

Grupo I: Implantes de aloinjerto control

- 10 En este grupo control, los implantes secado no fueron expuestos a ninguna disolución antes de la implantación. Todos los implantes se suturaron de tal forma que el borde se solapa con el sitio del defecto del hospedante en aproximadamente 2 mm.

- 15 En ninguno de los tres especímenes control se observó la formación de hueso o de cartílago nuevos. Además, los aloinjertos completos permanecieron completamente intactos sin una reducción aparente del tamaño. No se observó reabsorción, nueva vascularización ni inflamación. En un perro, el aloinjerto implantado se deslizo lateralmente debido a unas suturas defectuosas, y el defecto fue cerrado por tejido conectivo fibroso irregular.

Grupo II: Implantes revestidos con OP-1 y cubiertos con el pericondrio del hospedante

- 20 En estos perros, los defectos cerrados se mostraron duros y estables tras una compresión mecánica (dedo). No fue posible desplazar el área del defecto mediante palpación intensa, lo cual indica que los implantes resisten tensiones mecánicas normales en el sitio de la implantación. Estas tensiones incluyen la compresión de los tejidos blandos (músculos, fascias, etc.) durante el tragado, la respiración y el ladrado. Un análisis histológico indicó que la OP-1 induce la reparación de hueso, de cartílago y de tipo ligamentoso de los defectos del cartílago tiroides. El aloinjerto implantado no fue completamente reabsorbido en los 4 meses de tiempo de observación.

- 25 La curación en el diámetro mayor del defecto se estudió con más detenimiento. En ambos extremos de la longitud mayor del sitio del defecto fue evidente la presencia de cartílago recién formado. El nuevo cartílago abarca aproximadamente 40-50% del área del defecto y estaba completamente fusionado con el cartílago tiroides del hospedante. El nuevo cartílago era cartílago hialino con fibras de cartílago elástico cruzadas.

- 30 Se observó cartílago joven, acompañado por una graduación definida desde células mesenquimáticas a condroblastos a condrocitos. A medida que las células mesenquimáticas se diferencian en condroblastos, estos últimos depositan componentes de la matriz alrededor de sí mismo, rodeándose de sus propios productos secretados. Como resultado se formó una pequeña laguna. Los condroblastos residen en estos espacios sin ningún contacto con otras células. La matriz es acidófila. La maduración de los condroblastos en condrocitos está acompañada de hipertrofia celular y un cambio desde la forma lagunar a una configuración ovoide o angular.

- 35 La matriz del aloinjerto se encontraba distanciada de las nuevas capas de cartílago, estando físicamente separada por una capa de tejido fibroso. No se observó remodelación del cartílago en el lateral izquierdo del sitio del defecto en los 4 meses de periodo de observación, lo cual indica que el cartílago recién formado era estable al menos durante este periodo. La cantidad, mucho menor, de cartílago en el lateral derecho del defecto estaba en contacto con una capa de hueso. La parte central y derecha del defecto estaban formadas por el resto del aloinjerto, hueso recién formado, y estructuras de tipo ligamentoso. El hueso nuevo ocupaba aproximadamente 20-25% del área del defecto. Las superficies de las trabéculas recién formadas estaban cubiertas de modo irregular con osteoblastos activos que depositan espesas juntas osteoides. El sitio completo del defecto estaba introducido de manera compacta en tejido fibroso conectivo. Las superficies del cartílago y del hueso estaban directamente cubiertas por pericondrio y tejido de tipo periosteó que tenían una gran cantidad de células y de vascularización y que contenían las células precursoras.

- 45 El sitio del defecto estaba rodeado desde el exterior por una capa de tipo ligamentoso de tejido conectivo fibroso normal. La característica significativa de este tejido conectivo es la orientación ordenada paralela de las fibras de colágeno. Los fibrocitos delimitan la extensión de los haces individuales, haciendo que este tejido sea un material con bajo contenido en células. Los núcleos de las células y las fibras tenían un aspecto ondulado dependiente del sitio. Este tejido conectivo es el tipo predominante que forma tendones y ligamentos. Puesto que la laringe contiene ligamentos, se espera que tendrá células precursoras en este microentorno concreto. Los haces individuales de estas fibras muy organizadas se mantienen juntos mediante tejido conectivo laxo, que también es una característica de los ligamentos y de los tendones. Además, la reducida vascularización de este tejido también es una marca de los ligamentos que es responsable de la capacidad regenerativa variable en procedimientos ortopédicos convencionales.

- 55 En un perro, el implante se deslizó ligeramente hacia la parte media, pero permaneció en su lugar en gran parte. El hueso que cubre ambas superficies del aloinjerto estaba en contacto directo con el aloinjerto en la parte anterior (externa) del sitio del defecto y a una distancia del aloinjerto en la parte posterior (interna) del sitio del defecto. Se

observó formación endocondral de hueso, evidenciado por la sustitución del anlage del cartílago por hueso. El aloinjerto se dividió en dos trozos separados por una capa de tejido conectivo fibroso. Una capa fibrosa espesa también separaba el hueso recién formado de la parte posterior del sitio del aloinjerto. El hueso recién formado estaba compuesto de trabéculas cubiertas por juntas osteoides y osteoblastos cuboides activos. Esto indica que la inducción de hueso no depende de la velocidad de eliminación del aloinjerto y que el aloinjerto formado por colágeno de tipo II no dirige el tipo de tejido formado en el sitio de regeneración.

Grupo III: Implantes revestidos con OP-1 y cubiertos por la fascia del cuello

Los resultados en este grupo de perros indican que la utilización de la fascia del cuello, en lugar del pericondrio, para cubrir el implante produce un retraso significativo en la inducción de tejido nuevo y en la eliminación del aloinjerto.

Grupo IV: Implantes químicamente extraídos, revestidos con OP-1 y cubiertos con pericondrio

En este grupo de perros, los defectos cerrados se mostraron duros y estables tras una compresión mecánica (dedo), y no fue posible diferenciarlos de los de los animales del grupo II. Un análisis histológico indicó que la OP-1 induce la reparación de hueso, de cartílago y de tipo ligamentoso de los defectos del cartílago tiroides. Al igual que en los animales del grupo II, el proceso no se completó durante un periodo de observación de 4 meses. Sin embargo, se observó una curación eficaz de los defectos del tejido laríngeo.

La curación en el diámetro mayor del defecto se estudió con más detenimiento. En ambos extremos de la longitud mayor del sitio del defecto mayor fue evidente la presencia de cartílago y hueso recién formados. El hueso y el cartílago ocupan aproximadamente 30-35% y 25-30%, respectivamente, del espesor completo del área del defecto. El límite entre el cartílago tiroides del hospedante y el hueso nuevo se curó mediante la formación de un continuo de hueso, mientras que el límite entre el cartílago tiroides del hospedante y el cartílago nuevo se curó mediante un continuo de cartílago. El continuo de hueso muestra una fusión completa con el cartílago tiroides del hospedante mediante un mecanismo de formación de microcallos. Concretamente, la lámina del cartílago tiroides del hospedante adolescente puede contener una capa de hueso cubierta por dos capas de cartílago hialino; creando un defecto durante el procedimiento quirúrgico, el hueso del hospedante finalmente se daña (se fractura). La instalación del implante revestido con OP-1 en el sitio del defecto induce la curación del hueso mediante la formación de microcallos.

En todos los especímenes y bloques de tejido ensayados, cuando había hueso residiendo en la lámina tiroides, también se formaba hueso en los límites del defecto adyacentes. Esta observación sugiere que la OP-1 atrae a células precursoras desde la médula ósea del hospedante. Por contraste, si no existía hueso residiendo en la lámina tiroides del hospedante se desarrolla un continuo de cartílago, que conecta el tiroides del hospedante con el resto del aloinjerto y/o con el tejido de tipo ligamentoso circundante. De esta manera, los tejidos recién formados y el aloinjerto no reabsorbido componen un sitio del defecto en regeneración muy compacto. El hueso recién formado se extiende hasta la mitad del defecto y se localiza entre los trozos del aloinjerto no reabsorbidos. Está relleno de médula hematopoyética y totalmente mineralizado. Al igual que en los animales del grupo II, también se observaron estructuras de tipo ligamentoso recién formadas, con haces de ligamentos unidos al cartílago y hueso recién formados.

Estos resultados indican que 500 µg de OP-1 administrados mediante un vehículo de aloinjerto de tiroides inducen la regeneración y la reparación de defectos del cartílago de la lámina tiroides, y que el nuevo tejido satisface las necesidades mecánicas del animal para tragar, ladrar y respirar. El tejido nuevo, que incluye hueso, cartílago y estructuras de tipo ligamentoso, forma más del 80% del área del defecto.

Los resultados también indican que la curación depende, en gran parte, de la OP-1 y los tejidos circundantes que proporcionan las diversas células precursoras. La diferenciación del tejido en el proceso de curación no parece depender del vehículo, porque un vehículo de colágeno de tipo II no fue el único en estimular la formación de cartílago nuevo.

Estos resultados también sugieren que los tres tipos de tejidos recién formados y sus apéndices, por ejemplo, médula ósea, vasos sanguíneos, etc. están estrechamente conectados como un "continuo de hueso-cartílago-ligamento" de tejidos. Por tanto, parece que la OP-1 actúa como un morfógeno de múltiples tejidos en este microentorno específico.

Por último, estos resultados indican que la OP-1 no es simplemente un morfógeno osteogénico: también puede inducir la formación de tejidos de cartílago y de tipo ligamentoso permanentes.

Ejemplo de referencia 6

Este ejemplo describe otro estudio sobre la eficacia de la proteína osteogénica para regenerar tejido nuevo en el sitio de un defecto. Este estudio contiene cinco grupos experimentales que se dividieron en dos subestudios. En los grupos I-III se comparan los efectos de diferentes vehículos de OP-1 sobre la reparación de defectos del cartílago tiroides idénticos. Los vehículos ensayados fueron CMC, CMC/pasta de sangre, y la esponja HELISTAT® (una composición de colágeno de tipo I). Los grupos IV y V abordan diferentes modelos animales y métodos quirúrgicos,

en los que se crearon defectos más grandes, tal como aparecen en la práctica clínica humana, y se repararon mediante combinaciones de dispositivo de OP-1/CMC, malla quirúrgica VICRYL, y soportes rígidos PYROST (una composición mineral ósea). Estos dos últimos grupos son aproximaciones del producto y procedimiento combinados previstos para un escenario clínico. Las cirugías en los grupos I-III se realizaron uno o dos meses antes de las cirugías en los grupos IV y V. El protocolo experimental se resume a continuación en la tabla II.

Tabla II: Reconstrucción de la laringe de perro utilizando OP-1

Grupo	Perros	Defecto	OP-1	Duración
I	3	I	A	4 meses
II	3	I	B	4 meses
III	3	I	C	4 meses
IV	3	II	A	6 meses
V	3	III	A x 2	6 meses

Defecto:

I: Eliminación parcial de la lámina tiroides derecha. La OP-1 se aplicó al defecto y estaba contenida entre las capas pericóndricas adyacentes al cartílago tiroides.

II: Laringotomía vertical parcial. Se implantó un dispositivo de OP-1/CMC entre las capas de una malla VICRYL. El implante se fijó a varillas PYROST, que colocaron y conformaron el implante. El implante estaba contenido entre una aleta de mucosa faríngea (interior) y el pericondrio (exterior).

III: Laringotomía vertical parcial extendida. Se implantaron dispositivos de OP-1/CMC (2 por animal) y se fijaron como se describió para la laringotomía vertical parcial.

OP-1: A. dispositivo de OP-1/CMC; B. OP-1 en CMC/pasta de sangre; C. OP-1 aplicada a HELISTAT®

El análisis del tejido laríngeo tratado indicó que las tres formulaciones (dispositivo de OP-1/CMC, OP-1/CMC y pasta de sangre, OP-1/HELISTAT®) inducían la formación de hueso y de cartílago en el sitio del defecto. Algunos implantes se integraron parcialmente y otros se integraron totalmente con el cartílago existente que rodea los sitios de los defectos.

Ejemplo de referencia 7

Utilizando los protocolos descritos en los ejemplos 1-3 se demostró la eficacia de la proteína osteogénica para generar una sustitución mecánicamente aceptable de los anillos de cartílago hialino traqueales y del ligamento anular. Se creó un defecto suficiente como para eliminar al menos 2/3 de uno de los varios anillos de cartílago hialino repartidos. Se prepara una matriz de aloinjerto traqueal donante como se describió anteriormente en el ejemplo 1. También puede utilizarse una matriz de polímeros sintéticos. Preferiblemente, se emplean 10-750 µg de OP-1. La matriz de sustitución se reviste con la proteína osteogénica y se implanta de modo quirúrgico entre dos anillos que aún están presentes utilizando miniplacas metálicas.

Los animales se controlan mediante endoscopia traqueal y mediante palpación manual. Se sacrifican a las 24 semanas después de la cirugía. Se anticipa que se producirá la incorporación completa del injerto y que se formará una membrana de tipo ligamentoso recién inducida y que conectará el nuevo anillo con los anillo traqueales vecinos, produciendo una estructura de tipo tubular abierta flexible con respiración interrumpida.

Ejemplo 8

El siguiente protocolo puede utilizarse para determinar si un morfógeno, tal como OP-1, es eficaz *in vivo* para estimular la regeneración de tejido para reparar defectos en los discos intervertebrales.

Los discos intervertebrales se retiran de forma aséptica de perros maduros, se recortan todos los tejidos adherentes, y se desvitalizan como se describió en el ejemplo 1. Cada disco se bisecciona en el plano coronal y se realizan defectos circulares en el espesor completo de 3 mm en cada una de las mitades. Los discos se revisten con el morfógeno y se reimplantan de modo quirúrgico. Los discos se examinan para determinar el grado de reparación en los sitios de los defectos en diversos momentos después de la reimplantación.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra la eficacia de la proteína osteogénica para estimular la reparación de la matriz del cartílago por células, de forma específica células del núcleo pulposo ("NP") y células del anillo fibroso ("AF"), aisladas a partir de discos intervertebrales ("DIV").

5 En este ejemplo se aislaron discos lumbares de conejos New Zealand blancos y se separó el tejido del NP del tejido del AP mediante disección. Las células NP y AF se aislaron por separado a partir de los dos tejidos mediante digestión enzimática secuencial y se resuspendieron en alginato estéril de baja viscosidad al 1,2%, que entonces se formó en esferas mediante expulsión a través de una aguja de calibre 22 hacia una disolución de CaCl_2 102 mM. Las esferas se cultivaron por separado en medio DMEM/F-12 que contenía suero bovino fetal al 10% ("FBS"), ascorbato 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y gentamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El medio se cambió a diario.

10 Después de 14 días cada cultivo se subdividió en tres grupos. El primer grupo era un grupo control cultivado durante 12 días más. El segundo y el tercer grupo se sometieron a quimionucleólisis durante 2 horas con condroitinasa ABC 0,1 U/ml ("C-ABC"), que se emplea habitualmente para degradar las cadenas de sulfato de condroitina y de sulfato de dermatano de los proteoglicanos ("PG"). Los proteoglicanos son un componente necesario de la matriz extracelular de los DIV. Unos niveles bajos de PG están asociados con la enfermedad de los discos degenerativa.

15 Se cree que una menor síntesis de PG desempeña un papel contribuyente en la degeneración de los discos. El segundo y el tercer grupo posteriormente se cultivaron durante 12 días, el segundo grupo en presencia de 200 ng/ml de OP-1 y el tercer grupo en ausencia de OP-1.

Los ensayos se realizaron en los tres grupos inmediatamente después del tratamiento con C-ABC, y en los días 3, 6, 9 y 12 posteriores. Se determinó la velocidad de mitosis midiendo la cantidad de ADN utilizando el tinte Hoechst 33258 y fluorometría. Se midió la cantidad de síntesis de PG sulfatado utilizando el ensayo de tinte DMMB descrito en Hauselmann *et al.*, *J. Cell Sci.*, 107:17-27 (1994).

20

Las células del segundo grupo cultivadas en presencia de OP-1 restablecen una matriz significativamente más rica en PG que las del tercer grupo cultivadas en ausencia de OP-1, así como del primer grupo control. Estos resultados demuestran que la proteína osteogénica puede estimular el crecimiento de la matriz extracelular.

Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra la eficacia de la proteína osteogénica para estimular la reparación de la matriz del cartílago por células, de modo específico células NP y AF, aisladas a partir de DIV.

En este ejemplo se aislaron discos lumbares de conejos New Zealand blancos y se separó el tejido del NP del tejido del AP mediante disección. Las células NP y AF se aislaron por separado a partir de los dos tejidos mediante digestión enzimática secuencial y se resuspendieron en alginato estéril de baja viscosidad al 1,2%, que entonces se formó en esferas. Las células se cultivaron por separado en medio DMEM/F-12 que contenía FBS al 10%, cambiándose el medio a diario. Después de 7 días, cada cultivo se subdividió en tres grupos. El primer grupo era un grupo control que no se trató con OP-1. El segundo y el tercer grupo se cultivaron en presencia de OP-1 durante 72 horas, tratándose el segundo grupo con 100 ng/ml de OP-1 y el tercer grupo con 200 ng/ml de OP-1. Se añadió ^3H -prolina radiomarcada a los cultivos durante las últimas 4 horas de incubación con OP-1. Después de la incubación se extrajo el colágeno de los cultivos y se determinó la velocidad de producción del colágeno midiendo la incorporación de ^3H -prolina en los extractos. La producción de colágeno está asociada con el crecimiento y la reparación de la matriz de cartílago. Para determinar la velocidad de proliferación celular se midió el contenido en ADN de cada grupo utilizando el tinte Hoechst 33258.

30

35

40 La proteína osteogénica aumentó la producción de colágeno en los cultivos celulares de NP y AF de una manera dependiente de la concentración. El tercer grupo incorpora más radiomarcador que el segundo grupo, que a su vez incorpora más radiomarcador que el primer grupo control. La proteína osteogénica tiene un efecto mitógeno significativo a concentraciones altas, que es responsable de una parte del aumento en la producción de colágeno. No obstante, la velocidad de síntesis de colágeno aumentó significativamente incluso cuando se observa un aumento en la proliferación celular. Estos resultados sugieren que la proteína osteogénica estimula el crecimiento y la reparación de la matriz extracelular.

45

Ejemplo 11

Este ejemplo ilustra la eficacia de la proteína osteogénica para estimular la síntesis de los componentes de la matriz del cartílago (por ejemplo, colágeno y PG) por células, de modo específico células NP y AF, aisladas a partir de DIV.

50 En este ejemplo se aislaron discos lumbares de conejos New Zealand blancos y se separó el tejido del NP del tejido del AP mediante disección. Las células NP y AF se aislaron por separado a partir de los dos tejidos mediante digestión enzimática secuencial y se encapsularon en esferas de alginato estéril de baja viscosidad al 1,2%, según se describe en Chiba *et al.*, *Spine*, 22:2885 (1997). Las esferas se cultivaron por separado en medio DMEM/F-12 que contenía FBS al 10%, cambiándose el medio a diario. Después de 7 días, cada cultivo se subdividió en tres grupos. El primer grupo era un grupo control que no se trató con OP-1. El segundo y el tercer grupo se cultivaron en

55

presencia de OP-1 durante 72 horas, tratándose el segundo grupo con 100 ng/ml de OP-1 y el tercer grupo con 200 ng/ml de OP-1.

Para proporcionar un marcador para la síntesis de colágeno se añadió ^3H -prolina radiomarcada a los cultivos durante las últimas 16 horas de incubación con OP-1. Para proporcionar un marcador para la síntesis de PG se añadió ^{35}S -sulfato radiomarcado a los cultivos durante las últimas 4 horas de incubación con OP-1. Para proporcionar un marcador para la proliferación celular se añadió MTT a los cultivos durante los últimos 60 minutos de incubación con OP-1. Entonces se realizaron ensayos sobre los cultivos celulares para medir la proliferación celular, la síntesis de PG y la síntesis de colágeno. La proliferación celular se ensayó lisando y centrifugando las células y midiendo la absorbancia del sobrenadante a 550 nm, tal como se describe en Mossman, *J. Immunol. Methods*, 65:55 (1984). La síntesis de PG se determinó midiendo la incorporación de ^{35}S a la matriz, según se describe en Mok *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:33021 (1994), y Masuda *et al.*, *Anal. Biochem.*, 217:167 (1994), cuyas indicaciones se incorporan en la presente como referencia. La síntesis de colágeno se ensayó midiendo la incorporación de ^3H -prolina a la matriz, según se describe en Hauselmann *et al.*, *supra*.

Los datos demuestran que la OP-1 aumenta la síntesis de PG y colágeno en los cultivos de NP y AF de una manera dependiente de la concentración. El tercer grupo incorpora más de ambos tipos de radiomarcador que el segundo grupo, que a su vez incorpora más de ambos tipos de radiomarcador que el primer grupo control. La proteína osteogénica tiene un efecto mitógeno significativo a concentraciones altas, que es responsable de una parte del aumento en la producción de colágeno y PG. No obstante, la velocidad de síntesis de colágeno y PG aumentó significativamente incluso cuando se observa un aumento en la proliferación celular. Estos resultados sugieren que la proteína osteogénica estimula el crecimiento y la reparación de la matriz extracelular.

Ejemplo 12

Se estudian los efectos *in vivo* de la OP-1 sobre la reparación de discos intervertebrales en dos modelos de conejo: un modelo implica el apuñalamiento del anillo fibroso, según se describe en Lipson *et al.*, *Spine*, 6:194 (1981), y el otro modelo implica una inyección con C-ABC intradiscal, según se describe en Kato *et al.*, *Clin. Orthop.*, 253:301 (1990).

Brevemente, para el método del apuñalamiento, se realiza una incisión en el anillo fibroso de conejos New Zealand blancos. En cada conejo se tratan dos discos: un disco se trata con OP-1 y el otro se trata con disolución salina. Para el modelo de inyección intradiscal se exponen los discos lumbares de conejos New Zealand blancos y se inyecta C-ABC en presencia y en ausencia de OP-1 en los discos intervertebrales. En momentos variables después del tratamiento los conejos se eutanizan y se evalúan los efectos de la OP-1 sobre la reparación del espacio de los discos intervertebrales mediante métodos muy conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen la formación de imágenes de resonancia magnética, ensayos mecánicos, análisis histológicos, y estudios bioquímicos de los diversos componentes de la matriz extracelular en los discos reparados.

Ejemplo de referencia 13

Este ejemplos describe otro estudio sobre la regeneración de la laringe de perro con OP-1 y diferentes vehículos.

En este estudio, se utilizaron tres dispositivos osteogénicos diferentes para administrar la OP-1. Fueron el dispositivo de OP-1/CMC, OP-1/CMC/pasta de sangre, y OP-1/esponja HELISTAT®. El dispositivo de pasta de sangre se preparó mezclando 160 μl de OP-1 a 5 mg/ml con 400 μl de CMC al 20% mediante una conexión de jeringa, seguido de la adición de 240 μl de sangre autóloga recién extraída y mezclado continuo. El volumen final aplicado al defecto fue de 0,8 ml. El dispositivo HELISTAT se preparó aplicando 225 μl de OP-1 sobre 6 mg de esponja HELISTAT por cada 2 cm^2 de área del defecto.

Se estudiaron tres métodos de tratamiento diferentes. En el primer método de tratamiento se crearon defectos en la lámina del cartilago tiroides izquierda como se describió anteriormente; los dispositivos de OP-1 se aplicaron a las áreas de los defectos y se mantuvieron entre las capas pericóndricas adyacentes al defecto. En el segundo método de tratamiento se realizó en primer lugar una laringotomía vertical parcial y se implantó el dispositivo de OP-1/HELISTAT; la inmovilización del área reconstruida se logró con PYROST tal como se describió en el ejemplo 6, y el implante se colocó entre una aleta de mucosa faríngea (interior) y el pericondrio (exterior). El tercer método de tratamiento implica una fisura en el cricoides anterior y el aumento luminal; en este método, el dispositivo de OP-1/HELISTAT se implantó y se inmovilizó con PYROST.

Durante el transcurso del experimento no se registraron problemas en la respiración, el tragado y el ladrido de los animales de ensayo. Los perros se sacrificaron cuatro meses después de la cirugía y todos los especímenes, que incluyen grandes áreas reconstruidas, se mostraron duros tras una palpación. Se realizó la disección de la laringe, teniendo cuidado de no afectar a las áreas curadas de modo incompleto, si es que había. Los especímenes se cortaron y se introdujeron en plástico tal como se describió previamente.

Grupo I: OP-1/CMC

Este grupo de animales se trató con el primer método de tratamiento, *supra*, utilizando el dispositivo de OP-1/CMC.

Los defectos del tiroides se curaron casi completamente en los tres perros. De modo sorprendente, aunque la CMC estaba demasiado líquida, el tejido recién inducido se colocó bien dentro de los márgenes del defecto. Esta observación sugiere que el cierre con tejido blando se realizó con éxito. Esta fue también la primera prueba de que la CMC puede actuar como vehículo para la OP-1. Además, aunque no hubo pruebas de que la OP-1 se mantuviese dentro de la CMC durante un periodo de tiempo mayor, estando protegida frente a la degradación proteolítica, el hueso recién inducido se incorporó bien en el defecto. A diferencia del anterior estudio con perros, en el que la OP-1 aplicada con una matriz de aloinjerto pudo inducir hueso, cartílago y ligamento, este estudio demuestra que sólo se formaron hueso y ligamento. El hueso nuevo estaba bien conectado con ambos extremos del cartílago y estaba rodeado por un tejido blando de tipo ligamentoso. Una tinción de Von Kossa indicó la completa mineralización del hueso nuevo. Una abundante médula ósea rellena los osículos casi completamente. Se encontraron restos del anclaje del cartílago. Las superficies óseas estaban cubiertas de osteoblastos muy activos, que acumulaban una capa espesa de osteoides a lo largo de las superficies óseas. El hueso cortical en el exterior de los osículos recién formados estaba sufriendo una intensa remodelación, según lo indican las unidades de remodelación óseas intracorticales rellenas de osteoclastos, osteoblastos y capilares sanguíneos. En varias fronteras entre cartílago y hueso, el proceso de formación endocondral de hueso aún estaba activo, aunque el límite entre los dos tejidos no estaba claramente demarcado. Este resultado indica que una nueva capa de cartílago, que se ha formado entre el cartílago antiguo y el hueso nuevo, se ira osificando con el tiempo, y que el cartílago recién formado sólo estaba presente de forma transitoria y, por tanto, carece de las características de un tejido permanente.

En el estudio con perros descrito en el ejemplo 5, se emplearon aloinjertos de cartílago como vehículo para la OP-1; el cartílago recién formado estaba separado del hueso y parecía permanente. Sin embargo, en este estudio, en el que se utilizó un vehículo diferente (CMC) y la formación de tejido no fue controlada por la liberación lenta de morfógeno ni guiada por un vehículo de la matriz extracelular, la osteogénesis predominó frente a la condrogénesis. Este resultado sugiere que las células precursoras reclutadas para la formación de tejido en el presente estudio y en el estudio previo procedían de la misma agrupación celular, y que el umbral de morfógeno en presencia de CMC estimula la osteogénesis. En otras palabras, el material vehículo y el morfógeno contenido en él influyen de modo coordinado en el resultado de la diferenciación tisular. Además, en el ejemplo 5, los vehículos del aloinjerto no fueron completamente eliminados por la reabsorción en los 4 meses de periodo de observación. En este caso, en el que se utilizaron vehículos de CMC, la velocidad de curación fue significativamente más rápida, puesto que el área completa del defecto se cerró y se remodeló casi completamente en el mismo periodo de tiempo.

Grupo II: OP-1/CMC/sangre

Este grupo de animales se trató con el primer método de tratamiento, *supra*, utilizando el dispositivo de OP-1/CMC/sangre. Los defectos en todos los perros se curaron completamente. Al igual que en los perros del grupo I, se indujo tejido de hueso y ligamento, mientras que no se observó cartílago nuevo. Los tejidos recién formados se colocaron bien dentro de los márgenes del defecto. La adición de sangre a la CMC parece haber creado más hueso nuevo que estaba sometido a una remodelación ósea intracortical. La remodelación produjo islas de médula ósea nueva con juntas osteoides anchas. El hueso nuevo estaba bien conectado con ambos extremos del cartílago y estaba rodeado por un tejido blando de tipo ligamentoso. Una tinción de Von Kossa indicó la completa mineralización del hueso nuevo. Las superficies óseas estaban cubiertas de osteoblastos muy activos, que acumulaban una capa espesa de osteoides a lo largo de las superficies. Los márgenes en los que se funden el cartílago antiguo y el hueso nuevo estaban netamente separados por una capa fina de tejido conectivo bien organizado. No se detectaron señales de formación endocondral de hueso dentro del cartílago antiguo, lo cual sugiere que el proceso de osificación es más rápido en los defectos tratados con el dispositivo de OP-1/CMC/sangre que en los defectos tratados con el dispositivo de OP-1/CMC. La presencia de precursores osteogénicos en la sangre puede ser la responsable de esta diferencia.

Grupo III: OP-1/HELISTAT

Este grupo de animales se trató con el primer método de tratamiento, *supra*, utilizando el dispositivo de OP-1/esponja HELISTAT. Los defectos en todos los perros se curaron completamente por la formación de hueso nuevo. A diferencia de los perros del grupo I y II, los perros del grupo III contenían menos tejido de tipo ligamentoso en los sitios de los defectos curados. En un animal, el nuevo tejido estaba bien colocado dentro de los márgenes y sólo una pequeña cantidad sobresalía por el lateral. En otros animales, el tejido nuevo formaba múltiples capas; en un perro, el tejido nuevo estaba completamente fuera del marco del defecto, induciendo la formación de hueso en el área adyacente.

La abundancia de osificación se determinó mediante el tamaño y la colocación de la esponja HELISTAT. Los márgenes del hueso nuevo y el cartílago antiguo estaban separados por una fina capa fibrosa. Pequeñas cantidades de colágeno procedentes de la esponja HELISTAT no fueron reabsorbidas. El desplazamiento de la esponja en un animal condujo a una abundante formación de hueso fuera del sitio del defecto. La orientación de las trabéculas del hueso seguía la dirección de las fibras de colágeno dentro de la esponja, lo cual sugiere que la osificación fue guiada por la matriz del vehículo a la que se había unido el morfógeno. La disminución en la cantidad de tejido de tipo ligamentoso observada en este grupo de animales es probable que fuese debida a la menor capacidad del colágeno de tipo I para atraer a células precursoras de ligamento.

Grupo IV: Laringectomía vertical parcial

Este grupo de animales se trató con el segundo método de tratamiento, *supra*, utilizando el dispositivo de OP-1/esponja HELISTAT. La mitad anterior de la lámina tiroidea izquierda y los tejidos blandos circundantes (pliegues ventricular y vocal) se retiraron de modo quirúrgico. La inmovilización del área reconstruida se realizó con PYROST. El implante se colocó entre una aleta de mucosa faríngea (interior) y el pericondrio (exterior). La regeneración del esqueleto de la laringe aún estaba en marcha, con relleno óseo en el cartílago tiroidea retirado, como en 4 meses después de la operación. El hueso nuevo aún estaba sufriendo remodelación y proporciona un buen andamiaje para la integridad del esqueleto de la laringe. El hueco entre los cartílagos vocal y tiroidea estaba relleno de tejido conectivo desorganizado, lo cual permite el flujo de aire normal.

Grupo V: Fisura en el cricoides anterior con aumento luminal

Este grupo de animales se trató con el tercer método de tratamiento, *supra*, utilizando el dispositivo de OP-1/esponja HELISTAT. La parte anterior del arco cricoides se transeccionó y se creó una extensión del lumen mediante la implantación externa de PYROST. El espacio entre los extremos del cricoides se relleno con el dispositivo de OP-1/HELISTAT. El lumen permaneció extendido mientras el PYROST fue parcialmente eliminado o pulverizado y se integró con el hueso nuevo. El área central fue ocupada por hueso nuevo que estaba sufriendo una remodelación activa. De modo sorprendente, se formó un tejido óseo mínimo adyacente al PYROST, que puede haber actuado como una matriz de afinidad para la proteína OP-1 liberada desde la esponja HELISTAT adyacente. En un espécimen, el hueso nuevo y el hueso rodeado de PYROST formaban un área de hueso extendida que no comprometía al diámetro del lumen. No se formó tejido de tipo ligamentoso, lo cual indica la inexistencia de células precursoras en la vecindad del cartílago cricoides.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> STRYKER CORPORATION

<120> Reparación de laringe, tráquea y otros tejidos fibrocartilaginosos

<130> E1645 EP/1 S3

<140> EP 05 02 0942.8

<141> 1999-07-30

<150> US 60/103,161

<151> 1998-10-06

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1822

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(1341)

<223> /función= "proteína osteogénica"

/producto= "OP1"

/evidencia= experimental

/nombre_estándar= "OP1"

<400> 1

ggcgcgggcc	cggagcccgg	agcccgggta	gcgcgtagag	ccggcgcg	atg	cac	gtg	57
					Met	His	Val	
					1			
cgc	tca	ctg	cga	gct	gcg	gcg	ccg	57
Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro	
5					10			
								105
cgc	tca	ctg	cga	gct	gcg	gcg	ccg	
Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro	
5					10			
								105
ccc	ctg	ttc	ctg	ctg	cgc	tcc	gcc	153
Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	
20					25			
								153
gag	gtg	cac	tcg	agc	ttc	atc	cac	201
Glu	Val	His	Ser	Ser	Phe	Ile	His	
				40				
								201
cgg	gag	atg	cag	cgc	gag	atc	ctc	249
Arg	Glu	Met	Gln	Arg	Glu	Ile	Leu	
			55					
								249
ccg	cgc	ccg	cac	ctc	cag	ggc	aag	297
Pro	Arg	Pro	His	Leu	Gln	Gly	Lys	
		70						
								297
ctg	gac	ctg	tac	aac	gcc	atg	gcg	345
Leu	Asp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Met	Ala	
85					90			
								345
ggc	cag	ggc	ttc	tcc	tac	ccc	tac	393
Gly	Gln	Gly	Phe	Ser	Tyr	Pro	Tyr	
100					105			
								393

ES 2 389 555 T3

ccc Pro	cct Pro	ctg Leu	gcc Ala 120	agc Ser 120	ctg Leu	caa Gln	gat Asp	agc Ser 125	cat His 125	ttc Phe	ctc Leu	acc Thr	gac Asp 130	gcc Ala 130	gac Asp	441
atg Met	gtc Val	atg Met	agc Ser 135	ttc Phe	gtc Val	aac Asn	ctc Leu	gtg Val 140	gaa Glu	cat His	gac Asp	aag Lys	gaa Glu 145	ttc Phe	ttc Phe	489
cac His	cca Pro	cgc Arg 150	tac Tyr	cac His	cat His	cga Arg	gag Glu 155	ttc Phe	cgg Arg	ttt Phe	gat Asp	ctt Leu 160	tcc Ser	aag Lys	atc Ile	537
cca Pro	gaa Glu 165	ggg Gly	gaa Glu	gct Ala	gtc Val	acg Thr 170	gca Ala	gcc Ala	gaa Glu	ttc Phe	cgg Arg 175	atc Ile	tac Tyr	aag Lys	gac Asp	585
tac Tyr 180	atc Ile	cgg Arg	gaa Glu	cgc Arg	ttc Phe 185	gac Asp	aat Asn	gag Glu	acg Thr	ttc Phe 190	cgg Arg	atc Ile	agc Ser	gtt Val	tat Tyr 195	633
cag Gln	gtg Val	ctc Leu	cag Gln 200	gag Glu	cac His	ttg Leu	ggc Gly	agg Arg	gaa Glu 205	tcg Ser	gat Asp	ctc Leu	ttc Phe	ctg Leu 210	ctc Leu	681
gac Asp	agc Ser	cgt Arg 215	acc Thr	ctc Leu	tgg Trp	gcc Ala	tcg Ser	gag Glu 220	gag Glu	ggc Gly	tgg Trp	ctg Leu	gtg Val 225	ttt Phe	gac Asp	729
atc Ile	aca Thr 230	gcc Ala	acc Thr	agc Ser	aac Asn	cac His	tgg Trp 235	gtg Val	gtc Val	aat Asn	ccg Pro	cgg Arg 240	cac His	aac Asn	ctg Leu	777
ggc Gly 245	ctg Leu	cag Gln	ctc Leu	tcg Ser	gtg Val	gag Glu 250	acg Thr	ctg Leu	gat Asp	ggg Gly	cag Gln 255	agc Ser	atc Ile	aac Asn	ccc Pro	825
aag Lys 260	ttg Leu	gcg Ala	ggc Gly	ctg Leu	att Ile 265	ggg Gly	cgg Arg	cac His	ggg Gly	ccc Pro 270	cag Gln	aac Asn	aag Lys	cag Gln	ccc Pro 275	873
ttc Phe	atg Met	gtg Val	gct Ala 280	ttc Phe	ttc Phe	aag Lys	gcc Ala	acg Thr	gag Glu 285	gtc Val	cac His	ttc Phe	cgc Arg	agc Ser 290	atc Ile	921
cgg Arg	tcc Ser	acg Thr 295	ggg Gly	agc Ser	aaa Lys	cag Gln	cgc Arg	agc Ser 300	cag Gln	aac Asn	cgc Arg	tcc Ser	aag Lys 305	acg Thr	ccc Pro	969
aag Lys	aac Asn	cag Gln 310	gaa Glu	gcc Ala	ctg Leu	cgg Arg	atg Met 315	gcc Ala	aac Asn	gtg Val	gca Ala	gag Glu 320	aac Asn	agc Ser	agc Ser	1017
agc Ser	gac Asp 325	cag Gln	agg Arg	cag Gln	gcc Ala	tgt Cys 330	aag Lys	aag Lys	cac His	gag Glu	ctg Leu 335	tat Tyr	gtc Val	agc Ser	ttc Phe	1065
cga Arg 340	gac Asp	ctg Leu	ggc Gly	tgg Trp	cag Gln 345	gac Asp	tgg Trp	atc Ile	atc Ile	gcg Ala 350	cct Pro	gaa Glu	ggc Gly	tac Tyr	gcc Ala 355	1113
gcc Ala	tac Tyr	tac Tyr	tgt Cys	gag Glu 360	ggg Gly	gag Glu	tgt Cys	gcc Ala	ttc Phe 365	cct Pro	ctg Leu	aac Asn	tcc Ser	tac Tyr 370	atg Met	1161
aac Asn	gcc Ala	acc Thr	aac Asn 375	cac His	gcc Ala	atc Ile	gtg Val	cag Gln 380	acg Thr	ctg Leu	gtc Val	cac His	ttc Phe 385	atc Ile	aac Asn	1209

```

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 gccaaagtttt tctggatcct ccattgctcg ccttggccag 1411

gaaccagcag accaactgcc ttttgtgaga ccttcccctc cctatcccca actttaaggg 1471

tgtgagagta ttaggaaaca tgagcagcat atggctttttg atcagttttt cagtggcagc 1531

atccaatgaa caagatccta caagctgtgc aggcaaaacc tagcaggaaa aaaaaacaac 1591

gcataaagaa aaatggccgg gccaggtcat tggctgggaa gtctcagcca tgcacggact 1651

cgtttccaga ggtaattatg agcgcctacc agccaggcca cccagccgtg ggaggaaggg 1711

ggcgtggcaa ggggtgggca cattggtgtc tgtgcgaaag gaaaattgac ccggaagtgc 1771

ctgtaataaaa tgtcacaata aaacgaatga atgaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1822

```

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
1 5 10 15

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
20 25 30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
35 40 45

Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
50 55 60

Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
65 70 75 80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
85 90 95

Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
100 105 110

Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
115 120 125

```

ES 2 389 555 T3

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

<210> 3

5 <211> 102

<212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido"
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(102)
 10 <223> /nota= Cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados que se definen en la memoria descriptiva.
 /label = OPX
 <400> 3
 Cys Xaa Xaa His Glu Leu Tyr Val Ser 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 Ile Leu Xaa Lys Xaa Arg Asn Met Val val
 85 90 95
 Xaa Ala Cys Gly Cys His
 100
 <210> 4
 15 <211> 97
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido"
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(97)
 25 <223> /nota= Cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados que se definen en la memoria descriptiva. /etiqueta= secuencia-genérica-7
 <400> 4

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

<210> 5

<211> 102

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido"

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(102)

<223> /nota= Cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados que se definen en la memoria descriptiva.

/etiqueta= secuencia-genérica-8

15 <400> 5

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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Cys Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val
 85 90 95
 Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 100

<210> 6

20 <211> 97

<212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido"

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(97)
 10 <223> /nota= Cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados
 que se definen en la memoria descriptiva.
 /etiqueta= secuencia-genérica-9

 <400> 6

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

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

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Pro
 50 55 60

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys
 85 90 95

 Xaa

 <210> 7
 15 <211> 102
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido"

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(102)
 25 <223> /nota= Cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados
 que se definen en la memoria descriptiva.
 /etiqueta= secuencia-genérica-10

 <400> 7

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

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido"

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(5)

<223> /nota= Cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados que se definen en la memoria descriptiva.

<400> 8

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

15

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido"

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(5)

<223> /nota=Cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados que se definen en la memoria descriptiva.

<400> 9

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

30

REIVINDICACIONES

1.- Una composición para su uso para la reparación de un defecto del cartílago no articular en un disco intervertebral, en la que la composición comprende GDF-5 y un vehículo seleccionado del grupo que consiste en un vehículo líquido y un vehículo en gel.

5 2.- La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el vehículo es un vehículo líquido.

3.- La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el vehículo es un vehículo en gel.