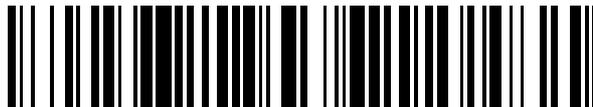


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 756**

51 Int. Cl.:

A61K 35/32 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

C07K 14/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06839667 .0**

96 Fecha de presentación: **01.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1942960**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **Métodos para producir composiciones de matriz ósea**

30 Prioridad:

01.11.2005 US 732675 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73 Titular/es:

**WARSAW ORTHOPEDIC, INC. (100.0%)
2500 Silveus Crossing
Warsaw, IN 46581, US**

72 Inventor/es:

BEHNAM, KEYVAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 756 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para producir composiciones de matriz ósea.

Antecedentes

Introducción

5 Se sabe que el tejido óseo de mamíferos contiene una o más sustancias proteinazas, presumiblemente activas durante el crecimiento y la curación natural del hueso, que pueden inducir una cascada de desarrollo de eventos celulares que dan como resultado la formación de hueso endocondral. Los factores activos son referidos de diferente manera en la bibliografía como proteínas morfogenéticas o morfogénicas del hueso (BMP), proteínas inductoras de hueso, factores de crecimiento de hueso o de crecimiento, proteínas osteogénicas, o proteínas osteoinductivas. Estos factores activos son referidos colectivamente en la presente memoria como factores osteoinductivos.

10 Es bien sabido que el hueso contiene estos factores osteoinductivos. Estos factores osteoinductivos están presentes en la estructura de compuestos del hueso cortical y están presentes a concentraciones muy bajas, p. ej., 0,003%. Los factores osteoinductivos dirigen la diferenciación de las células mesenquimáticas pluripotenciales en células osteoprogenitoras que forman osteoblastos. Basándose en el trabajo de Marshall Urist que se muestra en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.294.753, presentada el 13 de Octubre de 1981, la desmineralización apropiada del hueso cortical expone los factores osteoinductivos, haciéndola osteoinductiva, como se comenta con más detalle más abajo.

Información general de los Injertos de hueso

20 La reparación rápida y eficaz de los defectos de los huesos causados por lesión, enfermedad, heridas, o cirugía ha sido durante mucho tiempo un objetivo de la cirugía ortopédica. Para este fin, se han utilizado o se ha propuesto el uso de numerosas composiciones y materiales para su uso en la reparación de los defectos de los huesos. Las propiedades biológicas, físicas, y mecánicas de las composiciones y materiales se encuentran entre los factores principales que influyen en su idoneidad y funcionamiento en las diferentes aplicaciones ortopédicas.

25 Durante mucho tiempo se ha considerado el hueso esponjoso autólogo (HEA) el tratamiento de referencia para los injertos de hueso. El HEA es osteoinductivo y no inmunogénico, y, por definición, tiene todas las características estructurales y funcionales apropiadas para el receptor concreto. Desafortunadamente, el HEA solamente se encuentra disponible en un número limitado de circunstancias. Algunos individuos carecen de HEA de dimensiones y calidad apropiadas para el trasplante, y el dolor en el lugar y la morbilidad del donante pueden suponer graves problemas para los pacientes y sus médicos.

30 Se ha dedicado mucho esfuerzo a la identificación y el desarrollo de materiales de injerto de hueso alternativos. Urist ha publicado artículos fundamentales sobre la teoría de la inducción de hueso y un método para descalcificar hueso, esto es, elaborar matriz ósea desmineralizada (MOD). Urist M.R., Bone Formation by Autoinduction, Science 1965; 150(698):893-9; Urist M.R. et al., The Bone Induction Principle, Clin. Orthop. Rel. Res. 53:243-283, 1967. Como se mencionó anteriormente, la MOD es un material osteoinductivo, ya que induce el crecimiento del hueso cuando se implanta en un sitio ectópico de un roedor, debido a los factores osteoinductivos contenidos en la MOD. Honsawek et al. (2000). Ahora se sabe que existen numerosos factores osteoinductivos, p. ej., las BMP 1-15, que son parte de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF beta) (Kawabata et al., 2000). La BMP-2 se ha convertido en la más importante y la más ampliamente estudiada de la familia de proteínas BMP. También existen otras proteínas presentes en la MOD que no son osteoinductivas solas pero contribuyen al crecimiento del hueso, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), el factor de crecimiento de tipo insulínico I y II (IGF-I e IGF-II), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1) (Hauschka, et al. 1986; Canalis, et al., 1988; Mohan et al. 1996).

35 Se ha informado de que los implantes de MOD son particularmente útiles (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.394.370, 4.440.750, 4.485.097, 4.678.470, y 4.743.259; Mulliken et al., Calcif Tissue Int. 33:71, 1981; Neigel et al., Ophthal. Plast Reconstr. Surg. 12:108, 1996; Whiteman et al., J. Hand. Surg. 18B:487, 1993; Xiaobo et al., Clin. Orthop. 293:360, 1993). La MOD se obtiene típicamente de cadáveres. El hueso se retira asépticamente y se trata para eliminar cualquier agente infeccioso. El hueso se desmenuza moliéndolo o triturándolo, y después se extrae el componente mineral por medio de diferentes métodos, por ejemplo empapando el hueso en una solución ácida. La matriz restante es maleable y se puede procesar y/o formar o conformar adicionalmente para su implantación en un sitio concreto en el receptor. El hueso desmineralizado preparado de este modo contiene una variedad de componentes incluyendo proteínas, glicoproteínas, factores de crecimiento, y proteoglicanos. Después de la implantación, la presencia de MOD induce el reclutamiento celular hacia el lugar de la lesión. Las células reclutadas se pueden diferenciar finalmente en células formadoras de hueso. Dicho reclutamiento de células conduce a un incremento en la velocidad de curación de heridas y, por lo tanto, a una recuperación más rápida para el paciente.

55 Algunos estudios indican que las capacidades osteoinductivas de hueso desmineralizado de especies de orden superior en especies de orden superior son relativamente bajas. Un estudio comparó la osteoinductividad de matriz

ósea de rata y canina, y de hueso cortical y esponjoso. La matriz ósea de rata indujo de modo sistemático hueso nuevo y elevados niveles de fosfatasa cuando se implantó ectópicamente en rata. La matriz canina indujo pequeñas cantidades de hueso y niveles de fosfatasa más bajos cuando se implantó en perro y en rata, siendo la matriz cortical algo más inductiva que la matriz esponjosa. La matriz ósea desmineralizada de perro fue el único material sometido a ensayo que no mostró osteoinductividad alguna. Schwarz et al., Acta. Orthop. Scan. 60(6):693-695, 1989.

De un modo similar, otro estudio determinó que la matriz ósea de mono induce la formación de hueso ectópico en rata atímica pero no en monos adultos. Se concluyó que la matriz ósea de mono adulto contiene propiedades inductivas de hueso pero que estas propiedades no son suficientes para inducir la formación de hueso en sitios del músculo de monos adultos. Aspenberg et al., J. of Orthop. Res. 9:20-25, 1991.

Otro estudio más evaluó la regeneración de hueso y cementum después de la regeneración guiada de tejido (RGT) en defectos de fenestración periodontal. Específicamente, se evaluó el efecto adyuvante del implante de MOD liofilizado, alogénico y se encontró que no mostraba un efecto adyuvante discernible para la RGT en el modelo de defecto. Los descubrimientos críticos fueron 1) las partículas de MOD permanecieron embebidas en el tejido conectivo denso sin evidencia de actividad metabólica del hueso; y 2) se observaron cantidades limitadas y similares de regeneración de hueso y cementum para los defectos tanto con RGT más MOD como con RGT. Caplanis et al., J Periodontal 851-856, Agosto, 1998.

Las formulaciones de MOD actuales tienen varias desventajas. Primero, si bien la matriz de MOD basada en colágeno es relativamente estable, los factores osteoinductivos dentro de la matriz de MOD se degradan rápidamente. La actividad osteogénica de la MOD se puede degradar significativamente en las 24 horas siguientes a la implantación, y en algunos casos la actividad osteogénica se puede inactivar en 6 horas. Por lo tanto, los factores osteoinductivos asociados con la MOD solamente se encuentran disponibles para reclutar las células hacia el sitio de la lesión durante un tiempo corto después del trasplante. Para la mayor parte del procedimiento de curación, que puede tomar de semanas a meses, el material implantado puede proporcionar poca o ninguna ayuda en el reclutamiento de las células. Además de los factores osteoinductivos presentes en la MOD, también se cree que la estructura global del implante de MOD contribuye a las capacidades de curación de hueso del implante.

Extracción de proteínas

La utilidad potencial de los factores osteoinductivos ha sido ampliamente reconocida. Se ha contemplado que la disponibilidad de los factores osteoinductivos podría revolucionar la medicina ortopédica y ciertos tipos de cirugía plástica, dental, y diferentes procedimientos reconstructivos periodontales y craneofaciales.

La Patente de los Estados Unidos de Urist Núm. 4.294.753 fue la primera de sus muchas patentes sobre un procedimiento para extraer BMP a partir de MOD. En el momento de la patente '753 de Urist, se hacía referencia a la BMP en general. No obstante, como se mencionó más arriba, ahora se sabe que existen múltiples formas de BMP. El procedimiento de Urist fue ampliamente adoptado, y aunque los diferentes usuarios pueden utilizar agentes químicos diferentes a los descritos en el procedimiento básico de Urist, el diseño básico de las etapas del procedimiento sigue siendo ampliamente utilizado hoy como uno de los principales métodos de extracción de BMP a partir de MOD. Véanse, p. ej., la Publicación de los Estados Unidos 2003/0065392 (2003); la Publicación de los Estados Unidos 2002/0197297 (2002). Urist informó de que su procedimiento básico realmente da como resultado generalmente bajos rendimientos de BMP por peso unitario de MOD. Urist et al. (1982).

Las propiedades observadas de los factores osteoinductivos han inducido un intenso esfuerzo de búsqueda en diversos laboratorios dirigidos al aislamiento e identificación del factor puro o de los factores responsables de la actividad osteogénica. Sampath et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7109-7113 describen un procedimiento modificado para la purificación de proteína osteogénica a partir de hueso de mamífero. Urist et al. (1983), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 173:194-199, describen una fracción de proteína osteogénica humana que se había extraído de hueso cortical desmineralizado por medio de una mezcla disolvente inorgánica-orgánica de cloruro de calcio-urea, y recuperado mediante precipitación diferencial en guanidina-hidrocloruro y electroforesis en gel preparativa. Los autores informan de que la fracción de proteína tiene una composición de aminoácidos de un polipéptido ácido y un peso molecular en el intervalo de 17-18 kDa. Se dijo que este material era distinto de una proteína denominada "factor de crecimiento derivado de hueso" descrita por Canalis et al. (1980 Science 210:1021-1023) y por Farley et al. (1982) Biochem 21:3508-3513.

Urist et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:371-375, describen un extracto de BMP bovina que tiene las propiedades de un polipéptido ácido y un peso molecular de aproximadamente 18 kDa. Los autores informan de que la proteína estaba presente en una fracción separada mediante cromatografía con hidroxapatita, y de que inducía la formación de hueso en el músculo del cuarto trasero de ratón y la regeneración de hueso en defectos por trefina en cráneos de rata y perro. Su método de obtención del extracto a partir de hueso da como resultado preparaciones mal definidas e impuras.

La Solicitud de Patente Europea Núm. de Serie 148.155, publicada el 7 de Octubre de 1985 tiene la intención de describir proteínas osteogénicas derivadas de individuos del género bovino, porcino y humano. Se dice que una de

las proteínas, designadas por los autores de la invención como una proteína P3 que tiene un peso molecular de 22-24 kDa, ha sido purificada en un estado esencialmente homogéneo. Se informa de que este material induce la formación de hueso cuando se implanta en animales.

5 La Solicitud Internacional Núm. PCT 1087/01537 (Pub. Int. Núm. WO 88/00205) describe una fracción impura de hueso bovino con cualidades de inducción de hueso. Los solicitantes mencionados también describen supuestos "factores inductivos de hueso" producidos mediante técnicas de ADN recombinante. Se recuperaron cuatro secuencias de ADN de genotecas genómicas o de ADNc humano o bovino y se expresaron en células anfitrionas recombinantes. Si bien los solicitantes establecieron que las proteínas expresadas podían ser proteínas morfogénicas del hueso, no demostraron inducción de hueso. Este mismo grupo refirió con posterioridad ((1988) Science 242:1528-1534) que tres de los cuatro factores inducen formación de cartílago, y postulan que la actividad de formación de hueso "es debida a una mezcla de moléculas reguladoras" y que la "formación de hueso está controlada muy probablemente... por la interacción de estas moléculas". De nuevo, no se atribuyó formación de hueso a los productos de expresión de los ADNc. Véase también Urist et al., documento EPO 0.212.474, titulado "Bone Morphogenic Agents".

15 Wang et al., (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 9484-9488, describen la purificación parcial de una proteína morfogénica de hueso bovina a partir de extractos de guanidina de hueso desmineralizado que tiene actividad de formación de cartílago y hueso como una proteína básica correspondiente a un peso molecular de 30 kDa determinado mediante elución en gel. La separación de la fracción de 30 kDa dio proteínas de 30, 18, y 16 kDa, que, tras la separación, fueron inactivas. A la vista de este resultado, los autores reconocen que la identidad exacta del material activo no ha sido determinada.

Wang et al., (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 2220-2224, describen la expresión y la purificación parcial de una de las secuencias de ADNc descritas en el documento PCT 87/01537. La formación consistente de cartílago y/o hueso con su proteína requiere un mínimo de 600 ng de material puro en 50%.

25 La Solicitud Internacional Núm. PCT/89104458 (Pub. Int. Núm. WO 90/003733) describe la purificación y el análisis de una familia de factores osteogénicos denominada "P3 OF 31-34". La familia de proteínas contiene al menos cuatro proteínas, que se caracterizan por secuencias de fragmentos peptídicos. La mezcla impura P3 OF 31-34 se analizó para determinar su actividad osteogénica. La actividad de las proteínas individuales no se evalúa ni se comenta.

Implantación de las Proteínas Extraídas

30 La implantación satisfactoria de los factores osteoinductivos para la formación de hueso endocondral requiere la asociación de las proteínas con un material portador adecuado capaz de mantener las proteínas en un lugar de aplicación *in vivo*. El portador debe ser biocompatible, biodegradable *in vivo*, y suficientemente poroso como para permitir la infiltración celular. Se ha encontrado que las partículas de colágeno insoluble que quedan después de la extracción con guanidina y la deslipidación de hueso pulverizado generalmente son eficaces en los implantes alogénicos en algunas especies. Sin embargo, los estudios han demostrado que si bien las proteínas osteoinductivas son útiles entre distintas especies, la matriz ósea colagenosa utilizada generalmente para inducir la formación de hueso endocondral es específica de la especie. Sampath y Reddi, (1983) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 6591-6594. Los portadores de matriz ósea xenogénica extraída, deslipidada, desmineralizada implantados *in vivo* invariablemente fracasan al inducir la osteogénesis, presumiblemente debido a componentes inhibidores o inmunogénicos en la matriz ósea. Incluso el uso de matriz alogénica en dispositivos osteogénicos puede no ser suficiente para la formación osteoinductiva de hueso en muchas especies, como se comenta anteriormente.

45 La Patente de los Estados Unidos Núm. 4.563.350 describe el uso de matriz ósea bovina tripsinizada como matriz xenogénica para realizar la actividad osteogénica cuando se implanta con preparaciones de proteínas inductoras de hueso parcialmente purificadas, extraídas. Se dice que la formación de hueso requiere la presencia de al menos 5%, y preferiblemente al menos 10%, de colágeno no fibrilar. Los autores de la invención mencionada reivindican que la eliminación de telopéptidos que son responsables en parte de la inmunogenicidad de las preparaciones de colágeno es más adecuada para implantes xenogénicos.

50 La Solicitud de Patente Europea Núm. de Serie 309.241, publicada el 29 de Marzo de 1989 describe un dispositivo para inducir la formación de hueso endocondral que comprende una preparación de proteína osteogénica, y una matriz portadora que comprende 60-98% o bien de componente mineral o bien de polvo de colágeno óseo y 2-40% de colágeno hipoinmunogénico ateloapéptido.

55 Deatherage et al., (1987) Collagen Rel. Res. 7: 2225-2231, tienen la intención de describir un dispositivo implantable aparentemente xenogénico que comprende un extracto de matriz ósea bovina que ha sido mínimamente purificado por medio de una columna de intercambio iónico de una etapa y reconstituido con colágeno placentario de Tipo I humano altamente purificado.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 3.394.370, describe una matriz de colágeno reconstituido supuestamente útil en implantes xenogénicos. Las fibras de colágeno se tratan enzimáticamente para eliminar los telopéptidos potencialmente inmunogénicos (también la fuente principal de entrecruzamientos entre fibrillas), y se disuelven para

eliminar los componentes no colagenosos asociados. La matriz se formula dispersando el colágeno reconstituido en ácido acético para formar una matriz desordenada de moléculas de colágeno elementales que después se mezcla con una sustancia osteogénica y se liofiliza para formar una "espuma semi-rígida o esponja" que está preferiblemente entrecruzada. La matriz formulada no se somete a ensayo *in vivo*.

5 La Patente de los Estados Unidos Núm. 4.172.128 describe un método para degradar y regenerar material de tipo óseo con una inmunogenicidad reducida, que se dice que es útil entre distintas especies. Las partículas de hueso desmineralizado se tratan con un agente expansor para disolver cualquier mucopolisacárido asociado (glucosaminoglicanos), y las fibras de colágeno se disuelven con posterioridad para formar una solución coloidal homogénea. Después se puede formar un gel de fibras reconstituidas utilizando mucopolisacáridos fisiológicamente
10 inertes y un electrolito para ayudar a la formación de fibrillas.

Se conoce el uso de material de crecimiento de hueso exógeno pulverizado, p. ej., derivado de hueso alogénico o xenogénico desmineralizado, en la reparación o la reconstrucción quirúrgica de hueso defectuoso o enfermo. Con respecto a esto, véanse las descripciones de las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.394.370, 4.440.750, 4.472.840, 4.485.097, 4.678.470, y 4.743.259; Bolander et al., "The Use of Demineralized Bone Matrix in the Repair of Segmental Defects", The Journal of Bone and Joint Surgery, Vol. 68-A, No. 8, págs. 1264-1273; Glowacki et al, "Demineralized Bone Implants", Symposium on Horizons in Plastic Surgery, Vol. 12, No. 2; págs. 233-241 (1985); Gepstein et al., "Bridging Large Defects in Bone by Demineralized Bone Matrix in the Form of a Powder", The Journal of Bone and Joint Surgery, Vol. 69-A, No. 7, págs. 984-991 (1987); Mellonig, "Decalcified Freeze-Dried Bone Allograft as an Implant Material In Human. Periodontal Defects", The International Journal of Periodontics and
15 Restorative Dentistry, págs. 41-45 (Junio 1984); Kaban et al., "Treatment of Jaw Defects with Demineralized Bone Implants", Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, págs. 623-626 (6 Jun, 1989); y Todescan et al., "A Small Animal Model for Investigating Endosseous Dental Implants: Effect of Graft Materials on Healing of Endosseous, Porous-Surfaced Implants Placed in a Fresh Extraction Socket", The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants Vol. 2, No. 4, págs. 217-223 (1987).
20

25 Se han explorado una variedad de enfoques en un intento de reclutar células progenitoras o condrocitos en un defecto osteocondral o condral. Por ejemplo, se ha llevado a cabo la penetración de hueso subcondral con el fin de acceder a las células pluripotenciales mesenquimáticas (MSC) en la médula ósea, que tienen el potencial de diferenciarse en cartílago y hueso. Steadman, et al., "Microfracture: Surgical Technique and Rehabilitation to Treat Chondral Defects", Clin. Orthop., 391 S:362-369 (2001). Además, se cree que algunos factores del organismo ayudan a la reparación del cartílago. Por ejemplo, los factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) tienen la capacidad de reclutar células progenitoras hacia un defecto condral desde la sinovia u otra parte cuando se cargan en el defecto. Hunziker, et al., "Repair of Partial Thickness Defects in Articular Cartilage: Cell Recruitment From the Synovial Membrane", J Bone Joint Surg., 78-A:721-733 (1996). Sin embargo, la aplicación de factores de crecimiento a implantes de hueso y cartílago no ha dado como resultado el incremento esperado en la actividad
30 osteoinductiva o condrogénica.
35

Cada una de las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.270.300 y 5.041.138 describe un método para tratar defectos o lesiones en el cartílago que proporciona una matriz, compuesta posiblemente por colágeno, con poros suficientemente grandes como para admitir población celular y contener factores de crecimiento (TGF- β u otros factores (tales como factores de angiogénesis)) apropiados para el tipo de tejido que se desee regenerar.

40 La Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2003/0044445 describe una composición osteogénica preparada mediante un procedimiento que incluye las etapas de someter hueso desmineralizado a un medio de extracción para producir un producto de extracción insoluble y un producto de extracción soluble, separar el producto de extracción insoluble y el producto de extracción soluble, secar el producto de extracción soluble para eliminar toda o sustancialmente toda la humedad del producto de extracción soluble, y combinar el producto de extracción
45 soluble seco con partículas de hueso desmineralizado. Este procedimiento implica varias etapas y es bastante laborioso. Los estudios en los que se utiliza el procedimiento han demostrado que la composición osteogénica formada no tiene propiedades osteoinductivas apreciablemente incrementadas cuando se compara con las partículas de hueso desmineralizado a las cuales se añade el producto de extracción soluble seco. Adicionalmente se determinó que el hueso desmineralizado del cual se extraen los productos de extracción no manifiesta
50 propiedades osteoinductivas apreciablemente disminuidas cuando se compara con sus propiedades antes de la extracción. Por consiguiente se teoriza que el procedimiento de extracción retira solamente una pequeña fracción de los factores de reparación del tejido disponibles.

En suma, las formulaciones para injerto de hueso y cartílago actuales tienen varias desventajas. Los factores osteoinductivos de las matrices se pueden degradar rápidamente y, de este modo, los factores asociados con la matriz solamente se encuentran disponibles para reclutar células hacia el sitio de la lesión durante un tiempo breve
55 después de la implantación. Adicionalmente, cuando se añaden a una matriz, los factores activos a menudo no incrementan apreciablemente la actividad osteoinductiva de la matriz o, al menos, no incrementan la actividad osteoinductiva de la matriz tanto como sería deseable.

De este modo, sería útil proporcionar una mayor actividad osteoinductiva procedente de una composición
60 osteogénica en una forma más concentrada de manera que el aumento de la actividad osteoinductiva se pueda

observar incluso con un pequeño espacio hueco en el hueso.

Breve Resumen

Un método para producir una composición osteoinductiva de acuerdo con la presente invención se define en la reivindicación 1. De acuerdo con ciertas realizaciones, se expone un portador a un tratamiento o a condiciones que incrementan al menos una actividad biológica del portador. Más específicamente, se añaden factores osteoinductivos al portador. Las actividades biológicas que se pueden incrementar incluyen, pero no están limitadas a, formación de hueso; curación de hueso; actividad osteoinductiva, actividad osteogénica, actividad condrogénica, actividad de curación de heridas, actividad neurogénica, actividad inductora de la contracción, actividad inductora de la mitosis, actividad inductora de la diferenciación, actividad quimiotáctica, actividad angiogénica o vasculogénica, y actividad inductora de la exocitosis o la endocitosis.

De este modo, se proporciona una composición osteoinductiva que comprende factores osteoinductivos, hueso desmineralizado, y un portador. La composición osteoinductiva proporciona una actividad osteoinductiva concentrada o intensificada. La composición osteoinductiva se prepara proporcionando hueso desmineralizado y añadiendo factores osteoinductivos extraídos a un portador. El portador y los factores osteoinductivos pueden formar un osteoimplante osteogénico. El osteoimplante, cuando se implanta en un organismo de mamífero, puede inducir en el lugar del implante la cascada de desarrollo completa de la formación de hueso endocondral incluyendo vascularización, mineralización, y diferenciación de médula ósea. Asimismo, en algunas realizaciones, la composición osteoinductiva se puede utilizar como un dispositivo de liberación para administrar agentes bioactivos adicionales.

El hueso desmineralizado se puede proporcionar de cualquier manera adecuada. En un procedimiento de desmineralización, el hueso se somete a una etapa de desmineralización ácida seguida de una etapa de desengrasado/desinfección.

En la presente memoria se proporciona un método simple y viable económicamente para extraer los factores osteoinductivos del hueso. Opcionalmente, se pueden utilizar en la presente invención métodos y materiales para la conservación de la actividad durante el almacenamiento. Se pueden emplear métodos alternativos de extracción de los factores osteoinductivos del hueso.

De este modo, los factores osteoinductivos extraídos se añaden a un portador. Cuando los factores osteoinductivos se añaden a un portador, el portador actúa como un almacén y ayuda a controlar la cinética de liberación. Se puede utilizar cualquier forma, tamaño, y porosidad adecuados de portador. Los portadores adecuados incluyen hueso desmineralizado; hueso desmineralizado en superficie; hueso mineralizado; armazones esponjosos (mineralizados o desmineralizados); hueso específico de la especie (alógeno), extraído con guanidina, desmineralizado, particulado; hueso xenogénico, desmineralizado, con proteína, ácidos grasos, fosfatos de calcio extraídos, particulado especialmente tratado; colágeno; hidroxiapatitas sintéticas; polímeros; hidrogeles; almidones; polietilenglicol, fosfato tricálcico, hidroxiapatita sinterizada, hidroxiapatita configurable; poli(ácido láctico); poli(carbonato de tirosina); sulfato de calcio; láminas de colágeno; fosfato de calcio configurable; polímeros configurables; cementos poliméricos; poli(alcoholes vinílicos) configurables; poliuretanos; y otros materiales configurables biocompatibles. Adicionalmente, el portador puede comprender combinaciones, modificaciones, o derivados de estos u otros. Opcionalmente, los portadores de polvo de hueso xenogénico también se pueden tratar con proteasas tales como tripsina. Los factores osteoinductivos y el portador (o sistema de liberación o soporte) forman juntos un osteoimplante útil en aplicaciones clínicas.

Se puede utilizar cualquier método adecuado para añadir, o dispersar, los factores osteoinductivos al portador. Cómo se produzca esto exactamente puede influir en la actividad biológica de la formulación final. Los factores osteoinductivos extraídos pueden haber sido liofilizados, dando como resultado una composición en polvo. Por razones obvias, añadir un polvo a una matriz ósea puede ser un desafío. De este modo, puede ser deseable procesar los factores osteoinductivos para formar una mezcla homogénea que pueda ser añadida más fácilmente a un portador. Esto puede tener un impacto significativo sobre la cinética de liberación de los factores osteoinductivos.

Opcionalmente, se pueden incluir otros aditivos en la composición osteoinductiva. Por ejemplo, se pueden añadir sustancias radiopacas, materiales promotores de la angiogénesis, inhibidores de citoquinas, agentes bioactivos, otras sustancias útiles médicamente/quirúrgicamente, agentes de unión, u otros agentes osteoinductores.

Se pretende que el osteoimplante osteogénico formado de este modo se aplique a un sitio de reparación ósea, o un sitio para aumentar el hueso o para la formación de hueso ectópico (p. ej., fusión lateral de la columna). Los ejemplos incluyen un sitio resultante de una lesión, un defecto ocasionado en el transcurso de cirugía, infección, malignidad o malformación genética. Las composiciones osteoinductivas también se puede utilizar como dispositivos de liberación de fármacos.

Esta solicitud hace referencia a diferentes patentes, publicaciones de patentes, artículos de revistas, y otras publicaciones. Los siguientes documentos son referidos en la presente memoria: PCT/US04/43999; PCT/US05/003092; US 2003/0143258 A1; PCT/US02/32941; Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science, and Current Protocols in Cell Biology, John Wiley &

Sons, N.Y., edición de Julio de 2002; Sambrook, Russell, y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Rodd 1989 "Chemistry of Carbon Compounds", vols. 1-5 y sups., Elsevier Science Publishers, 1989; "Organic Reactions", vols 1-40, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1991; Marzo de 2001, "Advanced Organic Chemistry", 5ª ed. John Wiley and Sons, Nueva York, NY. En los que los valores numéricos de la presente memoria se expresan en forma de intervalo, extremos incluidos.

Si bien se describen múltiples realizaciones, otras realizaciones más de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada. Como resultará evidente, la invención es susceptible de modificaciones en diferentes aspectos obvios, todas sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción detallada es de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

Definiciones

Agente Bioactivo o Compuesto Bioactivo se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a un compuesto o entidad que altera, inhibe, activa, o afecta de otro modo a eventos biológicos o químicos. Por ejemplo, los agentes bioactivos pueden incluir, pero no están limitados a, proteínas o péptidos osteogénicos o condrogénicos, sustancias anti-SIDA, sustancias anti-cancerosas, antibióticos, inmunosupresores, sustancias anti-virales, inhibidores de enzimas, hormonas, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, anti-histaminas, lubricantes, tranquilizantes, anti-convulsivos, relajantes musculares y sustancias anti-Parkinson, anti-espasmódicos y contractores musculares incluyendo bloqueadores de canales, mióticos y anti-colinérgicos, compuestos anti-glaucoma, compuestos anti-parasitarios y/o anti-protozoarios, moduladores de las interacciones de la matriz extracelular incluyendo inhibidores del crecimiento celular y moléculas anti-adherencia, agentes de vasodilatación, inhibidores de la síntesis de ADN, ARN o proteínas, anti-hipertensores, analgésicos, antipiréticos, agentes anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores anti-angiogénicos, factores angiogénicos, factores anti-secretorios, anticoagulantes y/o agentes antitrombóticos, anestésicos locales, sustancias oftálmicas, prostaglandinas, anti-depresivos, anti-psicóticos, anti-eméticos, y agentes para la formación de imágenes. En ciertas realizaciones, el agente bioactivo es un fármaco. En algunas realizaciones, el agente bioactivo es un factor de crecimiento, citoquina, molécula de la matriz extracelular o un fragmento o derivado de los mismos, por ejemplo, una secuencia de anclaje a la célula tal como RGD. Una lista más completa de los agentes bioactivos y fármacos específicos adecuados para su uso en la presente invención se puede encontrar en "Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications" de Axel Kleemann y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999; the "Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", Editado por Susan Budavari et al., CRC Press, 1996; y United States Pharmacopeia-25/National Formulary-20, publicada por United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville MD, 2001

Biocompatible, según se utiliza en la presente memoria, pretende describir los materiales que, tras su administración *in vivo*, no inducen efectos a largo plazo no deseables.

Hueso según se utiliza en la presente memoria hace referencia al hueso que es cortical, esponjoso o cortico-esponjoso de origen autógeno, alogénico, xenogénico, o transgénico.

Desmineralizado, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a cualquier material generado eliminando material mineral de un tejido, *p. ej.*, tejido tisular. En ciertas realizaciones, las composiciones desmineralizadas descritas en la presente memoria incluyen preparaciones que contienen menos de 5% de calcio y preferiblemente menos de 1% de calcio en peso. El hueso parcialmente desmineralizado (*p. ej.*, preparaciones con más de 5% de calcio en peso pero que contienen menos de 100% de la cantidad de calcio original) también se considera dentro del alcance de la invención. En algunas realizaciones, el hueso desmineralizado tiene menos de 95% de su contenido mineral original.

Se pretende que desmineralizado incluya expresiones como "sustancialmente desmineralizado", "parcialmente desmineralizado" y "totalmente desmineralizado".

Matriz ósea desmineralizada, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a cualquier material generado eliminando material mineral de tejido óseo. En realizaciones preferidas, composiciones de MOD según se utiliza en la presente memoria incluyen preparaciones – que contienen menos de 5% de calcio y preferiblemente menos de 1% de calcio en peso. El hueso parcialmente desmineralizado (*p. ej.*, preparaciones con más de 5% en peso de calcio pero que contienen menos de 100% de la cantidad de partida original de calcio) también se considera dentro del alcance de la invención.

Osteoconductor se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a la capacidad de una sustancia no osteoinductiva para servir como molde adecuado o sustancia junto con la cual puede crecer el hueso.

Osteogénico se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a la capacidad de un agente, material, o implante para intensificar o acelerar el crecimiento de nuevo tejido óseo por medio de uno o más mecanismos tales como osteogénesis, osteoconducción, y/o osteoinducción.

Osteoimplante según se utiliza en la presente memoria hace referencia a cualquier implante derivado de hueso preparado de acuerdo con las realizaciones de esta invención y por lo tanto se pretende que incluya expresiones

tales como membrana ósea, injerto óseo, etc.

Osteoinductivo, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la cualidad de ser capaz de reclutar células del anfitrión que tienen el potencial de estimular la formación de hueso nuevo. Cualquier material que pueda inducir la formación de hueso ectópico en el tejido blando de un animal se considera osteoinductivo. Por ejemplo, la mayor parte de los materiales osteoinductivos inducen la formación de hueso en ratas atímicas cuando se analizan de acuerdo con el método de Edwards et al., "Osteoinduction of Human Demineralized Bone: Characterization in a Rat Model", *Clinical Orthopaedics & Rel. Res.*, 357:219-228, Diciembre 1998. En otros casos, se considera que se produce osteoinducción por medio del reclutamiento celular y la inducción de las células reclutadas hacia un fenotipo osteogénico. La puntuación de *Osteoinductividad* hace referencia a una puntuación que oscila de 0 a 4 determinada de acuerdo con el método de Edwards *et al.* (1998) o un ensayo calibrado equivalente. En el método de Edwards *et al.*, una puntuación de "0" representa sin formación de hueso nuevo; "1" representa 1%-25% de implante implicado en la formación de hueso nuevo; "2" representa 26-50% de implante implicado en la formación de hueso nuevo; "3" representa 51%-75% de implante implicado en la formación de hueso nuevo; y "4" representa >75% de implante implicado en la formación de hueso nuevo. En la mayor parte de los casos, la puntuación se evalúa 28 días después de la implantación. No obstante, la puntuación de la osteoinductividad se puede obtener en los primeros momentos, por ejemplo 7, 14, o 21 días después de la implantación. En estos casos puede ser deseable incluir un control de MOD normal tal como polvo de MOD sin portador, y si es posible, un control positivo tal como BMP. Ocasionalmente la osteoinductividad también se puede puntuar en momentos más tardíos, por ejemplo 40, 60, o incluso 100 días después de la implantación. El porcentaje de osteoinductividad hace referencia a una puntuación de la osteoinductividad en un momento dado expresado como el porcentaje de actividad, de una puntuación de referencia especificada.

Proteasas, según se utiliza en la presente memoria, son enzimas que escinden proteínas que escinden enlaces peptídicos que unen los aminoácidos en las moléculas de proteína para generar péptidos y fragmentos de proteínas. Se ha identificado una gran colección de proteasas y familias de proteasas. Algunas proteasas ilustrativas incluyen serina proteasas, aspartil proteasas, proteasas ácidas, proteasas alcalinas, metaloproteasas, carboxipeptidasa, aminopeptidasa, cisteína proteasa, colagenasa, etc. Una familia de proteasas ilustrativa es la familia de la proproteína convertasa, que incluye la furina. Dubois et al., *American Journal of Pathology* (2001) 158(1):305316. Los miembros de la familia de proteasas de la proproteína convertasa son conocidos por procesar proteolíticamente proTGF y proBMP a sus formas maduras activas. Dubois et al., *American Journal of Pathology* (2001) 158(1):305-316; Cui et al., *The Embo Journal* (1998) 17(16):4735-4743; Cui et al., *Genes & Development* (2001) 15:2797-2802.

Inhibidores de proteasa, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a compuestos químicos capaces de inhibir la actividad enzimática de las enzimas que escinden proteínas (esto es, proteasas). Las proteasas inhibidas por estos compuestos incluyen serina proteasas, proteasas ácidas, metaloproteasas (en la Figura 6 se muestran ejemplos de algunos inhibidores de metaloproteasa de la matriz), carboxipeptidasa, aminopeptidasa, cisteína proteasa, etc. El inhibidor de proteasa puede actuar específicamente para inhibir solamente una proteasa o clase de proteasas específicas, o puede actuar más generalmente para inhibir la mayor parte si no todas las proteasas. Los inhibidores de proteasa preferidos se basan en péptidos o proteínas y se encuentran disponibles en el mercado de compañías químicas tales como Aldrich-Sigma. Los inhibidores basados en proteínas o péptidos que se adhieren a la MOD (o un portador de fosfato de calcio o cerámico) son particularmente preferidos ya que permanecen asociados con la matriz proporcionando un efecto estabilizador durante un período de tiempo más prolongado que los inhibidores difundibles libremente. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen aprotinina, fluoruro de 4-(2-aminoetil)benzenosulfonilo (AEBSF), amastatina-HCl, antiqumotripsina alfa 1, antitrombina III, antitripsina alfa 1, fluoruro de 4-aminofenilmetanosulfonilo (APMSF), arfamenina A, arfamenina B, E-64, bestatina, CA-074, CA-074-Me, inhibidor de calpaína I, inhibidor de calpaína II, inhibidor de catepsina, quimostatina, diisopropilfluorofosfato (DFP), inhibidor de dipeptidilpeptidasa IV, diprotina A, E-64c, E-64d, E-64, ebelactona A, ebelactona B, EGTA, elastatinal, foroximitina, hirudina, leuhistina, leupeptina, alfa 2 macroglobulina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pepstatina A, febestina, 1,10-fenantrolina, fosforamidona, quimostatina, benzamidina HCl, antipaína, ácido epsilon-aminocaproico, N-etilmaleimida, inhibidor de tripsina, 1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona (TLCK), 1-cloro-3-tosilamido-4-fenil-2-butanona (TPCK), inhibidor de tripsina, EDTA sódico. *Agente estabilizador* es cualquier entidad química que, cuando se incluye en una composición de la invención que comprende MOD y/o un factor de crecimiento, potencia la osteoinductividad de la composición medida frente a una muestra de referencia especificada. En la mayor parte de los casos, la muestra de referencia no contendrá el agente estabilizador, pero en todos los demás aspectos será la misma que la composición con el agente estabilizador. El agente estabilizador también tiene generalmente poca o ninguna osteoinductividad por sí mismo y funciona incrementando la vida media de una o más de las entidades activas de la composición de la invención en comparación con otra composición idéntica por lo demás que carece del agente estabilizador, o prolongando o retrasando la liberación de un factor activo. En ciertas realizaciones, el agente estabilizador puede actuar proporcionando una barrera entre las proteasas y las enzimas que degradan los azúcares protegiendo de ese modo los factores osteoinductivos encontrados en o sobre la matriz de la degradación y/o la liberación. En otras realizaciones, el agente estabilizador puede ser un compuesto químico que inhibe la actividad de las proteasas o las enzimas que degradan los azúcares. En una realización preferida, el agente estabilizador retarda el acceso de enzimas que se sabe que liberan y solubilizan los factores activos. Se puede determinar la vida media por medio de análisis inmunológico o enzimático de un factor específico, ya sea anclado a la matriz o extraído de ella.

Alternativamente, la medición de un incremento en la vida media de la osteoinductividad, o la medición de la mejor apariencia de los productos del proceso osteoinductivo (*p. ej.*, hueso, cartílago o células osteogénicas o indicadores de los mismos) es un indicador útil de los efectos estabilizadores para una composición de matriz osteoinductiva mejorada. La medición de la apariencia prolongada o retardada de una respuesta osteoinductiva fuerte será
 5 indicativa generalmente de un incremento en la estabilidad de un factor acoplado a un desenmascaramiento retardado de la actividad del factor.

Desmineralizado superficialmente según se utiliza en la presente memoria hace referencia a elementos derivados de hueso que poseen al menos aproximadamente 90 por ciento en peso de su contenido mineral inorgánico original, la expresión "desmineralizado parcialmente" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a elementos
 10 derivados de hueso que poseen de aproximadamente 8 a aproximadamente 90 por ciento en peso de su contenido mineral inorgánico original y la expresión "totalmente desmineralizado" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a hueso que contiene menos de 8% de su contexto mineral original.

Descripción detallada

I. Introducción

15 La presente invención proporciona la producción de una composición osteoinductiva. De acuerdo con ciertas realizaciones, se expone un portador a un tratamiento o unas condiciones que incrementan al menos una actividad biológica del portador, como se ha descrito más arriba. En ciertas realizaciones, el portador contiene péptidos o fragmentos de proteínas que incrementan las propiedades osteoinductivas o condrogénicas del portador. Los expertos en la técnica apreciarán que no se comenta específicamente más abajo una variedad de realizaciones o
 20 versiones de la invención pero sin embargo está dentro del alcance de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

El hueso está formado principalmente por células, y también por colágeno, minerales, y otras proteínas no colagenosas. Las matrices óseas pueden ser no desmineralizadas, parcialmente desmineralizadas, desmineralizadas, desorganizadas, anorgánicas, o mezclas de las mismas. La MOD está constituida principalmente
 25 por proteínas y glicoproteínas, siendo el colágeno el principal componente proteico de la MOD. Si bien el colágeno es relativamente estable, al ser degradado normalmente solo por enzimas colagenasa relativamente raras, otras diferentes proteínas y factores activos presentes en la MOD son rápidamente degradadas por las enzimas presentes en el anfitrión. Estas enzimas derivadas del anfitrión incluyen proteasas y enzimas de degradación de azúcares (*p. ej.*, endo- y exoglicosidasas, glicanasas, glicolasas, amilasa, pectinasa, galactosidasas, etc.). Muchos de los factores de crecimiento activos responsables de la actividad osteoinductiva de la MOD existen en forma críptica, en la matriz hasta que son activados. La activación puede implicar el cambio de una función pre o pro del factor, o la liberación de la función de un segundo factor o la entidad que se une al primer factor de crecimiento. De este modo, las proteínas factores de crecimiento de una MOD o añadidas a una MOD pueden tener un efecto osteoinductivo limitado debido a que son rápidamente inactivadas por el entorno proteolítico del sitio del implante, o incluso dentro
 35 de la propia MOD.

Se han identificado numerosos factores endógenos que juegan papeles importantes en el desarrollo y/o la reparación del hueso y/o el cartílago. Las BMP tales como BMP-2 y BMP-4 inducen la diferenciación de las células mesenquimáticas a células del linaje osteoblástico, incrementando de ese modo la reserva de células maduras, y también intensifican las funciones características de los osteoblastos diferenciados. Canalis et al., *Endocrine Rev.*
 40 24(2):218-235, 2003. Además, las BMP inducen la osificación endocondral y la condrogénesis. Las BMP actúan uniéndose a receptores específicos, lo que da como resultado la fosforilación de una clase de proteínas referidas como SMAD. Las SMAD activadas penetran en el núcleo, donde regulan la transcripción de genes diana concretos. Las BMP también activan rutas independientes de SMAD tales como las que implican la señalización Ras/MAPK. A diferencia de la mayor parte de las BMP tales como BMP-2 y BMP-4, ciertas BMP (*p. ej.*, BMP-3) actúan como reguladores negativos (inhibidores) de la osteogénesis. Además, la BMP-1 es distinta, tanto estructuralmente como en términos de su mecanismo de acción, de otras BMP que son miembros de la superfamilia del TGF- β . A diferencia de otras ciertas BMP (*p. ej.*, BMP-2, Bump-4), BMP-1 no es osteoinductiva. En vez de eso, BMP-1 es una proteína colagenolítica que también se ha demostrado que escinde la cordina (un inhibidor endógeno de BMP-2 y BMP-4). Toloide es una metaloproteasa que está relacionada estructuralmente con BMP-1 y tiene actividad proteolítica hacia la cordina. Véase Canalis, más arriba, para los detalles adicionales referentes a las actividades de las BMP y sus papeles en la osteogénesis y la condrogénesis.
 50

Se ha descubierto una variedad de inhibidores endógenos de las BMP además de la cordina. Estas proteínas actúan como antagonistas de BMP e incluyen pseudoreceptores (*p. ej.*, Bambi) que compiten con los receptores de la señalización, SMAD inhibidores que bloquean la señalización, proteínas de unión intracelulares que se unen a SMAD activadores, factores que inducen la ubiquitinación y la proteólisis de las SMAD activadoras, y proteínas extracelulares que se unen a BMP y evitan su unión a receptores de señalización. Entre las proteínas extracelulares están nogina, cordina, folistatina, miembros de la familia Dan/Cerberus, y twisted gastrulación. Estas proteínas y sus secuencias son conocidas y fácilmente asequibles para un experto en la técnica.
 55

II. Incremento de la actividad biológica de un portador

Se proporcionan los métodos para incrementar la actividad biológica de un hueso, cartílago, u otro portador. Se proporcionan además osteoimplantes osteoinductivos. Los osteoimplantes osteoinductivos comprenden portadores y factores osteoinductivos, en donde el portador tiene una mayor actividad biológica con respecto a un portador que no ha sido expuesto a un tratamiento o condición. Las actividades biológicas que se pueden incrementar incluyen, pero no están limitadas a, la actividad osteoinductiva, la osteogénica, la actividad condrogénica, la actividad de curación de heridas, la actividad neurogénica, la actividad inductora de la contracción, la actividad inductora de la mitosis, la actividad inductora de la diferenciación, la actividad quimiotáctica, la actividad angiogénica o vasculogénica, y la actividad inductora de exocitosis o endocitosis. Se apreciará que los procedimientos de formación de hueso incluyen frecuentemente una primera fase de formación de cartílago que crea la forma básica del hueso, que después se mineraliza (formación de hueso endocondral). De este modo, en muchos casos, se puede considerar la condrogénesis una etapa temprana de la osteogénesis, aunque por supuesto también puede ocurrir en otros contextos.

Se proporciona una composición osteoinductiva que comprende factores osteoinductivos, hueso desmineralizado, y un portador. La composición osteoinductiva proporciona una actividad osteoinductiva concentrada o intensificada. La composición osteoinductiva se prepara proporcionado hueso desmineralizado, extrayendo los factores osteoinductivos y añadiendo los factores osteoinductivos extraídos a un portador. El portador y los factores osteoinductivos pueden formar un osteoimplante osteogénico. El osteoimplante, cuando se implanta en un organismo mamífero, puede inducir en el locus del implante la cascada de desarrollo completa de la formación de hueso endocondral que incluye vascularización, mineralización, y diferenciación de la médula ósea. Asimismo, en algunas realizaciones, se puede utilizar la composición osteoinductiva como dispositivo de liberación para administrar agentes bioactivos.

En ciertas realizaciones, el portador contiene péptidos o fragmentos de proteínas que incrementan sus propiedades osteoinductivas o condrogénicas. Los péptidos o fragmentos de proteínas se pueden añadir exógenamente al portador. Adicionalmente, se pueden añadir otros agentes al portador, *p. ej.*, agentes que mejoran la actividad osteogénica y/o condrogénica de la matriz por medio de la regulación transcripcional o post-transcripcional de factores que potencian o inhiben la síntesis de hueso o cartílago por las células dentro del portador.

III. Provisión de hueso desmineralizado

El hueso desmineralizado del cual se extraen los factores osteoinductivos puede ser proporcionado de cualquier manera adecuada. El hueso útil en la invención se obtiene en la presente memoria utilizando métodos bien conocidos en la técnica, *p. ej.*, hueso donador alogénico. Los elementos derivados de hueso se pueden obtener fácilmente a partir de hueso donador mediante diferentes métodos adecuados, *p. ej.*, como se describe en Patente de los Estados Unidos Núm. 6.616.698. El hueso puede ser cortical, esponjoso, o cortico-esponjoso de origen autógeno, alogénico, xenogénico, o transgénico.

Se han utilizado preparaciones de MOD durante muchos años en la medicina ortopédica para promover la formación de hueso. Por ejemplo, la MOD ha encontrado uso en la reparación de fracturas, en la fusión de vértebras, en la cirugía de sustitución de articulaciones, y en el tratamiento de la destrucción ósea debida a una enfermedad subyacente tal como la artritis reumatoide. Se piensa que la MOD promueve la formación de hueso *in vivo* por medio de procedimientos osteoconductivos y osteoinductivos. Se piensa que el efecto osteoinductivo de las composiciones de MOD implantadas resulta de la presencia de factores de crecimiento activos presentes en la matriz con una base de colágeno aislada. Estos factores incluyen miembros de las familias de proteínas TGF- β , IGF, y BMP. Los ejemplos concretos de los factores osteoinductivos incluyen TGF- β , IGF-1, IGF-2, BMP-2, BMP-7, hormona paratiroidea (PTH), y factores angiogénicos. También es probable que estén presentes en las preparaciones de MOD otros factores osteoinductivos tales como osteocalcina y osteopontina. Asimismo es posible que estén presentes en la MOD otros factores osteoinductivos sin nombre o no descubiertos.

En un procedimiento de desmineralización, el hueso es sometido a una etapa de desmineralización ácida seguida de una etapa de desengrasado/desinfección. El hueso se sumerge en ácido durante un tiempo para llevar a cabo la desmineralización. Los ácidos que se pueden emplear en esta etapa incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico y también ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido peracético, ácido cítrico, ácido propiónico, *etc.* La profundidad de la desmineralización en la superficie del hueso se puede controlar ajustando el tiempo de tratamiento, la temperatura de la solución de desmineralización, la concentración de la solución de desmineralización, y la intensidad de la agitación durante el tratamiento.

El hueso desmineralizado se enjuaga con agua estéril y/o una o varias soluciones tamponadas para eliminar las cantidades residuales de ácido y de ese modo elevar el pH. Una solución de desengrasado/desinfección adecuada es una solución acuosa de etanol, al ser el etanol un buen disolvente para los lípidos y al ser el agua un buen portador hidrófilo para permitir que la solución penetre más profundamente en las partículas de hueso. La solución acuosa de etanol también desinfecta el hueso eliminando los microorganismos y virus vegetativos. Normalmente, al menos aproximadamente de 10 a 40 por ciento en peso de agua (*esto es*, aproximadamente de 60 a 90 por ciento en peso de agente desengrasante tal como alcohol) debe estar presente en la solución de

desengrasado/desinfección para producir una eliminación de lípidos y una desinfección óptimas en el período de tiempo más corto. El intervalo de concentración preferido de la solución de desengrasado es de aproximadamente 60 a aproximadamente 85 por ciento en peso de alcohol y lo más preferiblemente aproximadamente 70 por ciento en peso de alcohol.

5 IV. Extracción de factores osteoinductivos de la MOD

En la presente memoria se proporciona un método simple y económicamente viable para extraer factores osteoinductivos del hueso. El método comprende extraer los factores osteoinductivos tales como las proteínas no colagenosas (incluyendo los factores de crecimiento osteogénicos) de la MOD utilizando un disolvente caotrópico o un detergente. El disolvente caotrópico puede ser hidrocloreuro de guanidina de cualquier concentración adecuada, por ejemplo 4 M. El detergente puede ser dodecilsulfato de sodio a cualquier concentración adecuada, por ejemplo al 1%. El agente químico utilizado para la extracción se retira de una manera eficaz que conserve la actividad biológica de los factores de crecimiento. Los componentes biológicamente activos se concentran purificando las proteínas no esenciales y los inhibidores de la proteína morfogenética del hueso, y después se combinan los extractos de proteína con un vehículo de liberación biológicamente compatible.

15 La mayor parte de los trabajos previos publicados a cerca de los usos en sujetos complicó los esquemas de extracción que son costosos y difíciles de implementar en una aplicación comercial o industrial. Utilizando el método descrito, se optimiza el proceso utilizando agentes caotrópicos menos costosos, y detergentes que son más fáciles de eliminar que los utilizados previamente. Adicionalmente se proporcionan métodos innovadores para aumentar la velocidad de renaturalización de las proteínas extraídas. Típicamente, se utiliza la diálisis frente a agua para eliminar el detergente o el agente caotrópico. Sin embargo, al precipitar las proteínas con etanol, sulfato de amonio, o polietilenglicol, no es necesaria la diálisis frente a agua. Además, se puede utilizar la ultrafiltración, evitando de ese modo la diálisis.

25 Generalmente, los factores osteoinductivos extraídos tienen una menor actividad de formación de hueso específico cuando se compara con el material de partida. Esto puede estar causado por la desnaturalización de las proteínas que resulta de la extracción. Por ejemplo, cuando se utiliza guanidina para extraer las proteínas osteoinductivas hidrófobas, las proteínas pierden su conformación tridimensional nativa. Como resultado, a menos que conserven su conformación normal tras la eliminación de la guanidina, ya no son activas. La adición de chaperonas químicas a la solución de guanidina puede evitar esta desnaturalización de proteínas irreversible. Las chaperonas químicas adecuadas incluyen glicerol, trehalosa, prolina, glicina betaína, y dextrosa, junto con mezclas de estas. Estas chaperonas químicas permiten que las proteínas osteoinductivas recuperen su conformación tridimensional cuando se elimina la guanidina. También evitan la desnaturalización de las proteínas durante la liofilización.

35 De este modo, se proporciona un método para extraer los factores osteoinductivos del componente mineral del hueso para recuperar la actividad del factor de crecimiento que normalmente se pierde durante el proceso de desmineralización. Se sabe que el hidrocloreuro de guanidina 4 M puede extraer los factores osteoinductivos de hueso mineralizado finamente pulverizado. Adicionalmente, se pueden recuperar los factores osteoinductivos del ácido que se utiliza típicamente para el hueso desmineralizado, por ejemplo HCL 0,6 N. Estos factores osteoinductivos se pierden normalmente durante el procedimiento de desmineralización y se tratan como residuo.

40 Los factores de crecimiento se pueden extraer de la fase mineral del hueso utilizando, por ejemplo, el siguiente procedimiento. Como se ha descrito previamente, el hueso es desmineralizado al menos parcialmente. El hueso puede comprender polvo, fibras, virutas, u otros. El hueso puede ser desmineralizado en un ácido, por ejemplo ácido cítrico 1 M, ácido cítrico 2 M, o HCl 0,6 N, a temperaturas que oscilan, por ejemplo de 1°C a 28°C durante un período de tiempo, por ejemplo de 10 minutos a 96 horas. En una realización, el hueso es desmineralizado en un ácido a una temperatura de 4°C. Después de la desmineralización, el ácido utilizado para la desmineralización contiene factores de crecimiento y minerales. El ácido se puede someter a diálisis frente a agua para hacer que la fase mineral y los factores de crecimiento proteicos precipiten simultáneamente. Este material bifásico (proteína y mineral) se puede recoger después mediante filtración o centrifugación y combinar con un portador o liofilizar.

45 En realizaciones alternativas, el material proteico y mineral en el ácido se pueden separar sometiendo a diálisis el ácido, también referido como baño de desmineralización, frente a un ácido débil, por ejemplo, ácido cítrico 0,25 M. En dicha realización, la fase mineral pasa a través de la bolsa de diálisis y la fase de proteína (fragmentos de colágeno, factores de crecimiento, etc.) se deja en el interior de la bolsa. Después la fase de proteína puede ser recuperada sometiendo a diálisis frente a agua y separando las proteínas solubles en agua e insolubles en agua entre sí.

55 En una realización, el método para extraer los factores de crecimiento comprende desmineralizar el hueso pulverizado con ácido diluido en el interior de una bolsa de diálisis. El ácido diluido adecuado incluye HCl de 0,05 M a 1,0 M y ácido cítrico 1 M o 2 M. Después de separar el hueso desmineralizado, los contenidos de la bolsa se pueden someter a diálisis adicionalmente frente a ácido diluido para separar los componentes minerales. Se puede utilizar un ácido volátil, tal como ácido acético, para facilitar la recuperación mediante liofilización.

De este modo, el hueso mineralizado o el mineral del hueso recuperado a partir de la desmineralización con ácido se

pueden utilizar como un método de purificación de las proteínas recuperadas. La fase de proteína recuperada del baño de desmineralización se puede solubilizar en urea u otra forma de solución detergente. Los factores de crecimiento estimuladores de hueso se pueden purificar después, por ejemplo utilizando un esquema de cromatografía de afinidad de hidroxiapatita, descrito más abajo.

5 En una realización se proporciona una composición de proteína sustancialmente libre de componentes inorgánicos. La composición de proteína puede comprender menos de 5% en peso de componentes inorgánicos. En una realización alternativa, se proporciona una composición de proteína que comprende componentes orgánicos que oscilan de aproximadamente 6% a aproximadamente 20% en peso. En otra realización, se puede proporcionar una composición de proteína que comprende componentes orgánicos que oscilan de aproximadamente 21% a aproximadamente 50%. En otra realización más, se puede proporcionar una composición de proteína que comprende componentes orgánicos que oscilan de aproximadamente 51% a aproximadamente 90%. La composición de proteína se puede recuperar del ácido utilizado para desmineralizar el hueso. El material proteináceo de la composición de proteína se puede purificar mediante cromatografía, electroforesis, u otros medios químicos o físicos. La composición de proteína se puede combinar con otro material tal como hueso desmineralizado, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato dicálcico u otros. En algunas realizaciones, la composición de proteína puede mostrar la capacidad de inducir formación de hueso heterotópico en un animal atímico. En otras realizaciones la composición de proteína puede servir como una fuente de colágeno de Tipo I y otras proteínas de la matriz extracelular que pueden apoyar los procedimientos de reparación de tejido tales como la angiogénesis, la osteoconducción y la curación de heridas. Puesto que el material de proteína tiene propiedades de manipulación deseables cuando se combina con agua o glicerol, la proteína también puede servir como portador para una variedad de matrices formadoras de hueso incluyendo MOD.

En algunas realizaciones, la composición de proteína se puede solubilizar en un medio apropiado, tal como urea 6 M, exponer a hidroxiapatita, TCP, DCP, hueso mineralizado, hueso desmineralizado en superficie, o mineral recuperado del ácido utilizado para desmineralizar hueso. Adicionalmente se puede permitir que la proteína se adsorba sobre superficies minerales y se lava con una solución que comprende, por ejemplo, fosfato de sodio con una concentración que oscila de aproximadamente 1 mM a 50 mM. Las proteínas se pueden hacer eluir después con una solución que comprende, por ejemplo, fosfato de sodio con concentraciones que oscilan entre aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM.

Como se describe más abajo, los factores de crecimiento recuperados de la fase mineral del hueso se recombinan con un portador osteoinductivo.

Las proteasas pueden reducir la actividad de los factores osteoinductivos en hueso desmineralizado destruyendo esos factores osteoinductivos. Este efecto negativo se puede reducir o eliminar añadiendo inhibidores de proteasa a la solución de HCl. Los inhibidores de proteasa adecuados para su uso en la presente invención incluyen N-etilmaleimida, benzamidina HCl, cisteína, o ácido yodoacético. Alternativamente, el hueso se puede calentar brevemente para inactivar las proteasas, que son relativamente más sensibles al calor que los factores de crecimiento. Un régimen de calentamiento adecuado es de 5 minutos a 60°C, o 1 minuto a 90°C.

En realizaciones alternativas, la extracción de factores osteoinductivos de hueso mineralizado se puede realizar de cualquier manera adecuada. Adicionalmente, durante la extracción, se pueden utilizar coprecipitados. Así, por ejemplo, se puede tratar hueso con un disolvente caotrópico tal como hidrocloreuro de guanidina. El hueso y el disolvente caotrópico se someten a diálisis frente a agua. A medida que el disolvente caotrópico disminuye, éste es remplazado por agua. Después se extraen los precipitados. Se pueden extraer coprecipitados, tales como proteína, colágeno, fragmentos de colágeno, albúmina, o proteína con secuencias RGD. Los factores osteoinductivos extraídos y los coprecipitados se pueden combinar después en una mezcla homogénea.

Las proteínas de la matriz ósea tienden a ser insolubles y se pueden asociar con la matriz ósea. Generalmente, los colágenos están entre los factores osteoinductivos más insolubles. Se pueden utilizar métodos de extracción para incrementar la solubilidad de los factores osteoinductivos para facilitar la extracción de los factores osteoinductivos. Generalmente, los factores de crecimiento son hidrófobos y no son fácilmente solubles. Los factores de crecimiento se pueden tratar para mejorar la solubilidad.

La solubilidad del hueso desmineralizado en uno o más disolventes (*p. ej.*, un medio acuoso) se puede cambiar, *p. ej.*, incrementar, por ejemplo, con respecto a la solubilidad de una MOD convencional no expuesta al tratamiento. Preferiblemente, el medio acuoso está en condiciones fisiológicas, *p. ej.*, pH, presión osmótica, concentración de sal, *etc.* se encuentran dentro de intervalos fisiológicamente apropiados. Por ejemplo, el pH puede ser de aproximadamente 7,2-8,0, o preferiblemente de 7,4-7,6. La presión osmótica puede ser de aproximadamente 250-350 mosm/kg, 280-300 mosm/kg, *etc.* Más generalmente, el pH puede estar entre aproximadamente 3-11, 4-10, 5-9, 6-8,5, *etc.* La presión osmótica puede estar entre 50-500 mosm/kg, 100-350 mosm/kg, *etc.* La concentración de sal puede ser NaCl aproximadamente 100-300 mM, *p. ej.*, NaCl aproximadamente 150 mM. El medio acuoso puede ser medio para el cultivo de tejidos, sangre, fluido extracelular, *etc.*, y las condiciones fisiológicas pueden ser condiciones tales como las que se encuentran típicamente en estos fluidos y/o en un tejido corporal tal como músculo. La solubilidad se puede incrementar a cualquier temperatura, *p. ej.*, a la temperatura ambiente, a la temperatura corporal de un sujeto tal como un ser humano o un animal, *etc.*

El tratamiento con colagenasa de la MOD humana convencional incrementa significativamente su solubilidad con respecto a la de la MOD humana convencional no tratada. La solubilidad de la MOD se puede incrementar mediante la exposición a un tratamiento o unas condiciones apropiadas, *p. ej.*, tratamiento con colagenasa, radiación, calor, *etc.* El grado en el cual se incrementa la solubilidad se puede variar cambiando la naturaleza del tratamiento (*p. ej.*, la concentración de enzima) y/o el tiempo a lo largo del cual se aplica. Se puede utilizar una combinación de tratamientos. En ciertas realizaciones de la invención, la solubilidad de la composición de MOD humana es mayor que la de una composición de MOD convencional entre 10% y 4000% por ciento. Por ejemplo, la solubilidad puede ser mayor entre 10% y 100%, 100% y 500%, 500% y 1000%, 1000% y 2000%, 2000% y 3000%, 3000% y 4000% o cualquier otro intervalo entre 10% y 4000%. La solubilidad se puede evaluar en cualquier momento después del tratamiento. Por ejemplo, la MOD se puede poner en un medio acuoso durante un período de tiempo tal como 244-8 horas, 3, 4, 5, 6, o 7 días, 10 días, 14 días, *etc.* La cantidad de MOD que queda después del período de tiempo se cuantifica (*p. ej.*, se mide el peso seco) y se compara con la cantidad que estaba presente inicialmente. El grado en el que disminuye la cantidad después de un período de tiempo sirve como indicador del grado de solubilización.

La extracción puede extraer tanto los factores osteoinductivos como sus inhibidores. Si se extraen los inhibidores, puede ser deseable en algunos casos separar los factores osteoinductivos. Esto puede ser referido como eliminación de los inhibidores o concentración de los factores osteoinductivos.

En un sentido general, tanto los factores osteoinductivos como los inhibidores se pueden extraer y tanto los factores osteoinductivos como los inhibidores se pueden utilizar para la fabricación del osteoimplante osteogénico. Alternativamente, se extraen solamente los factores osteoinductivos (y no sus inhibidores) y se utilizan solamente los factores osteoinductivos para la fabricación del osteoimplante osteogénico. Por último, se pueden extraer tanto los factores osteoinductivos como los inhibidores y se pueden utilizar solamente los factores osteoinductivos para fabricar el osteoimplante osteogénico. La realización de la extracción y el uso resultante de los factores osteoinductivos con o sin inhibidores no es una característica limitante de la presente invención.

En una realización, se utiliza un proceso de extracción simplificado que es susceptible de procesamiento por lotes. K. Behnam, E. Brochmann, y S. Murray; Alkaliurea extraction of demineralized bone matrix removes noggin, an inhibitor of bone morphogenetic proteins; Connect Tissue Res. 2004, 45(4-5):257-60.

En ciertas realizaciones, el hueso se expone a un tratamiento o a condiciones que generan péptidos y fragmentos de proteínas que tienen actividad osteoinductiva o condrogénica. En contraste con diferentes proteínas más largas, ciertos péptidos y fragmentos de proteínas son menos susceptibles de degradación proteolítica y es más probable mantener sus propiedades osteoinductivas o condrogénicas en el entorno proteolítico de la matriz o el lugar del implante. Muchas proteínas osteoinductivas y condrogénicas, por ejemplo, factores de crecimiento tales como BMP, moléculas de señalización celular, factores de transcripción, hormonas, *etc.*, tienen dominios que son responsables de la unión a receptores y/o del inicio de transducción de la señal en rutas de crecimiento de hueso y cartílago. Estos dominios son capaces de funcionar independientemente como fragmentos de péptidos y proteínas. En ciertas realizaciones, la actividad osteoinductiva o condrogénica de las matrices de hueso y cartílago se incrementa escindiendo los factores osteoinductivos y condrogénicos en la matriz para generar péptidos o fragmentos de proteínas activos y/o para generar péptidos o fragmentos de proteínas activos que sean menos susceptibles de degradación que sus precursores más largos. El incremento del número de factores de la matriz da como resultado un incremento en la formación de hueso o cartílago.

Si se desea, se pueden modificar los factores osteoinductivos de una o más maneras, *p. ej.*, se puede aumentar o modificar su contenido de proteína como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.743.259 y 4.902.296. Tal como se analiza más exhaustivamente más adelante, los factores osteoinductivos se pueden mezclar con una o más sustancias opcionales tales como aglutinantes, cargas, fibras, mallas, sustancias que proporcionan radiopacidad, plastificantes, agentes biostáticos/biocidas, agentes tensioactivos, y similares, antes, durante o después de añadirlos al portador.

Se han descrito numerosas proteínas de origen natural de factores osteoinductivos recombinantes en la bibliografía y son adecuadas para su uso en la composición osteoinductiva. Diversas entidades han producido factores osteoinductivos producidos recombinantemente. Creative Biomolecules of Hopkinton, Mass., produce un factor osteoinductivo referido como Proteína Osteogénica 1, u OP1. Genetics Institute of Cambridge, Mass., produce una serie de factores osteoinductivos referidos como Proteínas Morfogénicas de Hueso 1-13 (esto es, BMP 1-13), algunas de las cuales se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.106.748 y 5.658.882 y en la Publicación PCT Núm. WO 96/39.170. Diversas entidades han desarrollado factores osteoinductivos purificados. Collagen Corporación of Palo Alto, Calif., desarrolló una mezcla de proteínas purificada que se supone que tiene actividad osteogénica, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.774.228, 4.774.322, 4.810.691, y 4.843.063. Urist desarrolló una mezcla de proteínas purificada que se supone que es osteogénica, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.455.256, 4.619.989, 4.761.471, 4.789.732, y 4.795.804. International Genetic Engineering, Inc. of Santa Monica, Calif., desarrolló una mezcla de proteínas purificada que se supone que es osteogénica, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.804.744.

Un factor osteoinductivo que se puede utilizar en la composición osteoinductiva se describe con detalle en la Patente

de los Estados Unidos Núm. 5.290.763. Este factor osteoinductivo tiene una actividad osteogénica y un grado de pureza elevados. El factor osteoinductivo de la patente '763 muestra actividad osteoinductiva a aproximadamente 3 microgramos cuando se deposita sobre un portador adecuado y se implanta subcutáneamente en una rata. En una realización, el factor osteoinductivo es una mezcla de proteínas osteoinductivamente activa que muestra el perfil de separación en gel mostrado en la Fig. 1 de la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.563.124.

En algunas realizaciones, los factores de crecimiento estimuladores de hueso, por ejemplo recuperados de la fase mineral del hueso, se pueden purificar utilizando un esquema de cromatografía de afinidad con apatita. De este modo, se puede utilizar hueso mineralizado o desmineralizado en superficie como resina de la cromatografía. El mineral del hueso comprende sales de fosfato de calcio similares a la hidroxiapatita. Para utilizar hueso mineralizado o desmineralizado en superficie como resina de la cromatografía, se puede separar el exceso de lípido y proteína de las superficies del hueso. En otras realizaciones, se puede llevar a cabo un esquema similar utilizando matriz ósea desmineralizada como resina. En otras realizaciones adicionales, se puede utilizar mineral de hueso inorgánico recuperado (sinterizado o sin sinterizar) como resina de la cromatografía.

En una realización, el protocolo para dicho esquema puede ser el siguiente. Se preparan partículas de hueso mineralizado que oscilan por ejemplo de 100 μm a 5 mm. La superficie de las partículas de hueso mineralizado se limpia, por ejemplo empapando o agitando las partículas de hueso en una base diluida tal como NaOH 0,1 M durante varios minutos. Generalmente, dicha limpieza de la superficie elimina las proteínas y los lípidos. En realizaciones alternativas, la limpieza de la superficie se puede realizar utilizando CO_2 supercrítico. Los extractos de factores de crecimiento de la fase mineral se pueden solubilizar en un disolvente caotrópico tal como urea 6 M. La solución de factor de crecimiento se puede mezclar después con las partículas de hueso mineralizado, por ejemplo, durante varios minutos. Durante dicho mezclado, las proteínas que tienen afinidad por la hidroxiapatita se unen a las superficies del hueso. Después precipita el complejo de hueso-proteína y se separa el sobrenadante. El complejo de hueso-proteína se puede tratar para eliminar las proteínas débilmente unidas tales como los fragmentos de colágeno a la vez que retiene las proteínas osteoinductivas (las proteínas osteoinductivas permanecen unidas al material). Dicho tratamiento puede comprender el tratamiento del complejo de hueso-proteína con urea 6 M que contiene bajas concentraciones de fosfato de sodio. El complejo de hueso-proteína tratado se puede centrifugar y el sobrenadante se puede aspirar. En algunas realizaciones, el complejo de hueso-proteína se puede tratar con urea que contiene concentraciones más altas de fosfato de sodio (p. ej., 100 mM, 180 mM, o 250 mM) para liberar las proteínas osteoinductivas unidas. Alternativamente, el complejo de hueso-proteína osteoinductiva se puede liofilizar y formular con un portador, por ejemplo para aplicaciones ortopédicas. Adicionalmente, el complejo de hueso-proteína se puede utilizar como un microportador de factor de crecimiento que se puede distribuir en un macroportador de MOD.

En otra realización más, se proporciona una composición osteoinductiva con inmunogenicidad reducida. La composición osteoinductiva comprende proteínas no colagenosas y ácido con mineral recuperado. Las proteínas no colagenosas se pueden extraer de hueso desmineralizado o recuperar del ácido utilizado para desmineralizar hueso. El ácido con el mineral recuperado puede proceder del ácido utilizado para desmineralizar el hueso. Las proteínas no colagenosas y el ácido con el mineral recuperado se pueden combinar de manera que la composición osteoinductiva muestre la capacidad de inducir la formación de hueso heterotópico en un ratón normal (eufímico).

V. Procesamiento opcional

Como se ha mencionado antes, en algunos casos puede ser deseable eliminar los inhibidores o concentrar los factores osteoinductivos. Esto es opcional y se puede realizar mediante cualquier método adecuado. Generalmente, puede ser deseable eliminar los inhibidores rápidamente sin desnaturalizar los factores osteoinductivos.

Los factores osteoinductivos adecuados se pueden obtener mediante purificación de proteínas de hueso de origen natural o mediante técnicas de ADN recombinante. Según se utiliza en la presente memoria, el término factores osteoinductivos producidos recombinantemente hace referencia a la producción de factores osteoinductivos utilizando la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican proteínas que tienen actividad osteogénica se pueden identificar produciendo anticuerpos que se unen a las proteínas. Los anticuerpos también se pueden utilizar para aislar, mediante cromatografía de afinidad, poblaciones purificadas de una proteína osteogénica concreta. La secuencia de aminoácidos se puede identificar mediante secuenciación de la proteína purificada. Es posible sintetizar oligonucleótidos de ADN a partir de la secuencia de aminoácidos conocida. Los oligonucleótidos se pueden utilizar para escrutar una genoteca de ADN genómico y/o de ADNc elaborada, por ejemplo, a partir de ADN bovino, para identificar ácidos nucleicos que codifican la proteína osteogénica. El oligonucleótido correcto hibridará con el ADNc apropiado, identificando de ese modo el ADNc que codifica el gen que codifica la proteína osteogénica.

En otras realizaciones, la MOD puede incluir y/o ser tratada con agentes que inhiben la actividad de una o más enzimas, proteasas, o glicosidasas. Se espera que tales agentes inhibidores reduzcan la actividad de enzimas específicas (ya sean derivadas del anfitrión o de la MOD)) que de otro modo interaccionarían con los agentes osteoinductivos u otros agentes activos de la MOD, reduciendo de ese modo la osteoinductividad o la curación de heridas.

El tratamiento o las condiciones pueden escindir un factor inhibidor que de otro modo inhibiría un agente que actúa

positivamente (lo que quiere decir un agente que potencia la actividad biológica de la matriz ósea). Por ejemplo, se sabe que una variedad de proteínas o fragmentos de proteínas inhibe la actividad osteoinductiva y/o osteogénica de ciertas proteínas morfogenéticas de hueso tales como BMP-2. En ciertas realizaciones el efecto inhibitor de una proteína o fragmento de proteína se reduce mediante la exposición a un tratamiento o unas condiciones que ocasionan la escisión o la degradación del agente inhibitor. El tratamiento o las condiciones pueden bloquear la interacción del agente inhibitor con su diana (p. ej., BMP-2) o pueden inhibir la síntesis, la secreción, la modificación post-traducciona, el transporte, etc., del agente inhibitor. Por ejemplo, se puede exponer el hueso a un anticuerpo para un agente inhibitor o se puede añadir el anticuerpo al hueso.

Como apreciarán los expertos en la técnica, los factores que tienen actividad osteoinductiva, osteogénica, y/o condrogénica se pueden inhibir por medio de una variedad de mecanismos que incluyen la degradación proteolítica, la unión o el secuestro del factor, etc. Una variedad de proteínas o fragmentos de proteínas inhiben la actividad osteoinductiva y/o osteogénica de ciertas proteínas morfogenéticas del hueso, tales como las BMP -2, -4, -5, -6, y -7. Entre estos agentes inhibidores están nogina, cordina, gremlina, Dan, Cerberus, la proteína relacionada con Dan y Cerberus (PRDC), caronte, Dante, esclerostina, folistatina, el gen relacionado con folistatina (FLRG), ventroptina, y alfa2 HSGlicoproteína. La nogina bloquea el efecto de las BMP en células del linaje osteoblástico, y la adición de nogina a osteoblastos en cultivo bloquea la síntesis de colágeno y de proteínas distintas de colágeno inducida por BMP, y también inhibe el efecto estimulador de las BMP sobre la actividad de la fosfatasa alcalina. La cordina actúa de una manera similar. Se encuentran más detalles referentes a estos agentes inhibidores en Canalis, más arriba, y referencias allí citadas.

También se cree que ciertos fragmentos de colágeno inhiben las BMP. Por ejemplo, un fragmento de colágeno potencialmente inhibitor corresponde al extremo C terminal del procolágeno que se libera durante la remodelación de la matriz extracelular y el ensamblaje del colágeno. La secuencia para un fragmento de colágeno de tipo cordina (de Tipo I) es YVEFQEAGSCVQDGQRYNKDVWKPEPCRICVCDTGTVLC DDIICEDVKD CLSPEIPFGECCPICPADLAAAA (SEQ ID NO: 1).

Los factores inhibidores de hueso y cartílago (BCIF) se pueden inactivar o inhibir mediante varios métodos. Por ejemplo, se puede utilizar una proteasa específica que escinde o degrada los BCIF. Otro enfoque consiste en utilizar un anticuerpo que se une al BCIF y bloquea su interacción con un factor que actúa positivamente tal como BMP-2 o BMP-4. El anticuerpo puede inhibir la modificación post-traducciona, el transporte, etc., del agente inhibitor. Los anticuerpos para los agentes inhibidores mencionados en la presente memoria (y otros) son conocidos en la técnica o podrían ser generados utilizando métodos conocidos sin una experimentación indebida. Se pueden utilizar anticuerpos policlonales o monoclonales, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Del mismo modo se podrían utilizar otros agentes que tuvieran una capacidad de unión específica (p. ej., anticuerpos). Un experto normal en la técnica será capaz de generar anticuerpos, anticuerpos, etc. apropiados basándose en las secuencias conocidas de las proteínas inhibitoras.

VI. Provisión de un portador

De este modo, los factores osteoinductivos extraídos (y posiblemente los inhibidores) se puede añadir a un portador. Para facilitar la referencia, a menos que se indique de otro modo, la referencia a los factores osteoinductivos hace referencia a factores osteoinductivos con o sin inhibidores. Cuando se añaden los factores osteoinductivos a un portador, el portador actúa primero como un medio volumétrico para aplicar una pequeña cantidad de material extraído. El portador también puede servir como armazón, y puede ayudar a controlar la cinética de liberación. Los portadores adecuados incluyen MOD, incluyendo hueso desmineralizado en superficie; hueso mineralizado; armazones esponjosos no desmineralizados; armazones esponjosos desmineralizados; hueso específico de la especie (alógeno), extraído con guanidina, desmineralizado, particulado; hueso xenogénico, desmineralizado, con proteína extraída, particulado especialmente tratado; colágeno; hidroxiapatitas sintéticas; polímeros; hidrogeles; almidones; polietilenglicol, fosfato tricálcico, hidroxiapatita sinterizada, hidroxiapatita configurable; poli(ácido láctico); poli(carbonato de tirosina); sulfato de calcio; láminas de colágeno; fosfato de calcio configurable; cementos poliméricos; poli(alcoholes vinílicos) configurables, poliuretanos; polímeros reabsorbibles; polisacáridos y otros polímeros grandes; polímeros configurables líquidos; y otros materiales configurables biocompatibles. Se pueden utilizar materiales configurables, y se pueden configurar o bien *in situ*, o bien antes de la implantación. Opcionalmente, los portadores en polvo de hueso xenogénico también se pueden tratar con proteasas tales como tripsina. Preferiblemente, los portadores xenogénicos se tratan con uno o más agentes modificadores de fibrillas para incrementar el volumen e intrusión intrapartículas (porosidad) y el área de superficie. Los agentes útiles incluyen disolventes tales como diclorometano, ácido tricloroacético, acetonitrilo y ácidos tales como ácido trifluoroacético y fluoruro de hidrógeno. Los factores osteoinductivos y el portador (o sistema de liberación o soporte) forman juntos un osteoimplante útil en aplicaciones clínicas.

Se puede utilizar cualquier forma, tamaño, y porosidad de portador adecuados. Los estudios con ratas demuestran que el nuevo hueso que se forma tiene esencialmente las dimensiones del dispositivo implantado. Generalmente, el tamaño de partícula influye en la respuesta cuantitativa del nuevo hueso; las partículas de entre 70 µm y 420 µm logran la máxima respuesta. Sin embargo, se pueden utilizar otros tamaños de partículas. La contaminación del portador con mineral óseo puede inhibir la formación de hueso.

En algunas realizaciones, el portador puede ser configurable y/o inyectable. Dicho portador puede ser, por ejemplo, un cemento polimérico, un fosfato de calcio configurable, un poli(alcohol vinílico) configurable, un poliuretano, o un polímero configurable líquido. Los fosfatos de calcio configurables adecuados se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.336.264 y 6.953.594.

5 Un portador satisfactorio para los factores osteoinductivos realiza diversas funciones. Porta los factores osteoinductivos y permite una cinética de liberación apropiada. Un portador satisfactorio también se adapta apropiadamente a cada etapa de la respuesta celular durante el desarrollo del hueso, y en algunos casos protege los factores osteoinductivos de la proteólisis no específica. Además, los materiales seleccionados deben ser biocompatibles *in vivo* y opcionalmente biodegradables. En algunos usos, el portador debe actuar como un almacén temporal hasta que sea remplazado completamente por hueso nuevo. El poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), y sus diversas combinaciones tienen diferentes velocidades de disolución *in vivo*. En el hueso, las velocidades de disolución pueden variar dependiendo de que el implante se coloque en hueso cortical o trabecular.

10 El portador puede comprender un sólido que conserve la forma constituido por material particulado adherido laxamente, p. ej., con colágeno. También puede comprender un sólido poroso, moldeado, o simplemente una agregación compacta de partículas mantenidas en su sitio por el tejido circundante. También se puede utilizar músculo masticado u otro tejido. Los implantes óseos alogénicos grandes pueden actuar como un portador si sus cavidades medulares se limpian y se empaquetan con las partículas y los factores osteoinductivos.

15 El osteoimplante resultante del portador y los factores osteoinductivos puede adoptar una forma o configuración determinada o regular tal como una lámina, placa, disco, embudo, cono, o tubo, por nombrar unas pocas. La geometría prefabricada incluiría, pero no estaría limitada a, un reborde creciente para su uso en un solo sitio, una forma de I para colocarla entre los dientes para defectos intraóseos, un babero rectangular para defectos que afectan a crestas alveolares tanto bucales como linguales, placas de neutralización, placas reconstructivas, placas de apoyo, placas de apoyo en T, placas de cuchara, placas en forma de trébol, placas condilares, placas de compresión, placas puente, o placas onda. Se pueden fabricar placas tubulares parciales así como planas a parir del osteoimplante. Tales placas pueden incluir conformaciones tales como, p. ej., contorno cóncavo, forma de cuenco, o con la forma de un defecto. El osteoimplante se puede elaborar a máquina o conformar mediante cualquier método de moldeado mecánico adecuado. El modelado por ordenador puede proporcionar la arquitectura tridimensional moldeada íntimamente del osteoimplante hecho a la medida para el sitio de reparación del hueso con gran precisión.

20 En una realización, el osteoimplante induce formación de hueso endocondral de forma fiable y reproducible en un organismo mamífero. El portador comprende partículas de materiales porosos. Los poros deben tener una dimensión que permita la migración de las células progenitoras al portador y la subsiguiente diferenciación y proliferación. El tamaño de partícula debe estar en el intervalo de 70 μm -850 μm , preferiblemente de 70 μm -420 μm , lo más preferiblemente de 150 μm -420 μm . Puede estar fabricado de material particulado compacto en una forma que abarque el defecto del hueso, o estructurando de otro modo según se desee un material que sea biocompatible, y preferiblemente biodegradable *in vivo* para que sirva como "almacén temporal" y sustrato para el reclutamiento de células progenitoras migratorias, y como base para su posterior anclaje y proliferación. Los materiales portadores útiles incluyen colágeno; homopolímeros o copolímeros de ácido glicólico, ácido láctico, y ácido butírico, incluyendo derivados de los mismos; y cerámicas, tales como hidroxiapatita, fosfato tricálcico y otros fosfatos de calcio. También se pueden utilizar combinaciones de estos materiales portadores.

30 Alternativamente se pueden utilizar como portador partículas de hueso mineralizado o desmineralizado en superficie. De este modo, se proporciona una composición osteoinductiva que comprende partículas de hueso mineralizado o desmineralizado en superficie y extractos de MOD. Los extractos de MOD se pueden adsorber sobre las superficies de las partículas de hueso mineralizado o parcialmente desmineralizado. Los componentes débilmente unidos se pueden hacer eluir utilizando, por ejemplo, bajas concentraciones de fosfato de sodio (por ejemplo, de 5 mM a 50 mM), concentrando de ese modo los factores de crecimiento. En algunas realizaciones, el análisis de las proteínas unidas a las superficies de las partículas de hueso mineralizado o desmineralizado en superficie indica una proporción de Histona H2A con respecto a la proteína total unida elevado en un factor de 2 a 10.000 veces por encima de la proporción normal encontrada en extractos de matriz de hueso desmineralizado o proteína recuperados del ácido utilizado para desmineralizar el hueso. En algunas realizaciones, el análisis de las proteínas unidas a las superficies de las partículas de hueso mineralizado o desmineralizado en superficie indica una proporción de Fosfoproteína Secretada 24 con respecto a la proteína total unida elevada en un factor de 2 a 10.000 veces por encima de la proporción normal encontrada en extractos de matriz de hueso desmineralizado o proteína recuperados del ácido utilizado para desmineralizar el hueso. En algunas realizaciones, el análisis de las proteínas unidas a las superficies de las partículas de hueso mineralizado o desmineralizado en superficie indica una proporción de BMP-2 con respecto a la proteína total unida elevada en un factor de 2 a 10.000 veces por encima de la proporción normal encontrada en extractos de matriz de hueso desmineralizado o proteína recuperados del ácido utilizado para desmineralizar el hueso. En algunas realizaciones, el análisis de las proteínas unidas a las superficies de las partículas de hueso mineralizado o desmineralizado en superficie indica una proporción de BMP-4 con respecto a la proteína total unida elevada en un factor de 2 a 10.000 veces por encima de la proporción normal encontrada en extractos de matriz de hueso desmineralizado o proteína recuperados del ácido utilizado para desmineralizar el hueso. En algunas realizaciones, el análisis de las proteínas unidas a las superficies de las partículas de hueso mineralizado o desmineralizado en superficie indica una proporción de TGF-Beta con respecto a

la proteína total unida elevada en un factor de 2 a 10.000 veces por encima de la proporción normal encontrada en extractos de matriz de hueso desmineralizado o proteína recuperados del ácido utilizado para desmineralizar el hueso.

Uso de MOD como portador

5 Se puede utilizar cualquiera de una variedad de preparaciones de MOD como portador. Se puede emplear MOD preparada por medio de cualquier método, incluyendo preparaciones particuladas o basadas en fibras, mezclas de preparaciones particuladas y de fibras, preparaciones totalmente o parcialmente desmineralizadas, mezclas de preparaciones totalmente y parcialmente desmineralizadas, y preparaciones desmineralizadas en superficie. Véanse la Patente de los Estados Unidos 6.326.018, Reddi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1972) 69:1601-1605; 10 Lewandrowski et al., Clin. Ortho. Rel. Res., (1995) 317:254-262; Lewandroski et al., J. Biomed. Mater. Res. (1996) 31:365-372; Lewandrowski et al. Calcified Tiss. Int., (1997) 61:294-297; Lewandrowski et al., I Ortho. Res. (1997) 15:748-756. Las composiciones de matriz ósea desmineralizada preferidas se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.507.813. La MOD puede estar en forma de una sección que conserva sustancialmente la forma del hueso original (o una porción del mismo) del cual deriva. También son útiles las preparaciones de MOD 15 que comprenden aditivos o portadores tales como compuestos polihidroxilados, polisacáridos, proteínas con glucosaminoglicano, ácidos nucleicos, polímeros, polaxómeros, resinas, arcillas, sales de calcio, y/o sus derivados.

El componente de la MOD se puede triturar o procesar de otro modo en partículas de un tamaño apropiado antes o después de la desmineralización. En ciertas realizaciones, el tamaño de partícula es mayor de 75 micras, oscilando más preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 3000 micras, y lo más preferiblemente de 20 aproximadamente 200 a aproximadamente 2000 micras. Después de triturar el componente de la MOD, la mezcla se puede tamizar para seleccionar aquellas partículas con un tamaño deseado. En ciertas realizaciones, las partículas de la MOD se pueden tamizar a través de un tamiz de 50 micras, más preferiblemente un tamiz de 75 micras, y lo más preferiblemente un tamiz de 100 micras.

Un modo de proteger partículas de pequeño tamaño de la ingestión celular y/o proporcionar una barrera a la difusión consiste en embeberlas en una matriz bioabsorbible monolítica, y después fragmentar la matriz monolítica que contiene las partículas en tamaños de partículas mayores de 70 micras, preferiblemente mayores de 100 micras, y lo más preferiblemente mayores de 150 micras en su dimensión más pequeña. Las matrices preferidas para embeber partículas de MOD pequeñas incluyen polímeros biocompatibles y cementos de fosfato de calcio configurable. Generalmente la proporción en peso de MOD particulada/polímero oscilará de aproximadamente 1:5 a 30 aproximadamente 1:3. En el caso del fosfato de calcio, la MOD estará presente hasta un 75% en peso. La particulación del monolito se puede lograr por medio de molienda o trituración convencionales, o por medio del uso de criomolienda, o congelación seguida de pulverización. En una realización, la MOD liofilizada se embebe en un polímero reabsorbible. En una realización adicional, la MOD liofilizada se embebe en uno de los fosfatos de calcio configurables conocidos en la técnica.

35 Después de la particulación, la MOD se trata para eliminar el mineral del hueso. Si bien el ácido clorhídrico es el agente de desmineralización de elección reconocido en la industria, la bibliografía contiene numerosos informes de métodos para preparar MOD (véase, por ejemplo, Russell et al., Orthopaedics 22(5):524-53 1, Mayo 1999). Cualquier material que proporcione un andamiaje que contenga factores osteoinductivos activos se considera MOD. La MOD se puede preparar mediante métodos conocidos en la técnica o mediante otros métodos que puedan ser 40 desarrollados por los expertos en la técnica sin experimentación indebida. En algunos casos, se pueden desmineralizar fragmentos grandes o incluso todo el hueso, y después se pueden particular tras la desmineralización.

En una realización, se proporciona una composición osteoinductiva que comprende partículas de matriz ósea parcialmente desmineralizada. Las partículas de matriz ósea parcialmente desmineralizada pueden tener un tamaño 45 que oscila, por ejemplo, de 500 μm a 4 mm. En una realización se elimina 10-80% del mineral del contenido mineral del hueso. El hueso parcialmente desmineralizado se puede calentar a temperaturas que oscilan de aproximadamente 40°C a aproximadamente 120°C durante un período de tiempo que oscila de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 96 horas. El calentamiento se puede realizar con el hueso parcialmente desmineralizado en estado seco, en agua destilada, en una solución tampón neutra, u otras. La composición osteoinductiva puede 50 mostrar la capacidad de inducir la formación de hueso heterotópico en un animal de orden superior tal como un perro, ser humano, u oveja. En algunas realizaciones, la composición osteoinductiva se puede combinar con factores de crecimiento osteoinductivos extraídos de hueso, recuperar del ácido utilizado para desmineralizar el hueso, u otros.

Se pueden emplear mezclas de uno o más tipos de elementos derivados de hueso desmineralizado. Por otra parte, 55 se pueden emplear uno o más tipos de elementos derivados de hueso desmineralizado combinados con elementos no derivados de hueso no desmineralizado, esto es, elementos derivados de hueso que no han sido sometidos a un proceso de desmineralización. De este modo, p. ej., la razón en peso de elementos de hueso no desmineralizado con respecto a desmineralizado puede oscilar ampliamente de aproximadamente 0:1 a aproximadamente 1:0. Las cantidades adecuadas pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica o caso por caso mediante 60 experimentación rutinaria.

De este modo se proporciona adicionalmente un almacén de matriz ósea desmineralizada osteoinductiva. En una realización, el almacén de matriz ósea desmineralizada osteoinductiva comprende componentes derivados de hueso y muestra, sin pretratamiento con colagenasa, la capacidad de inducir niveles de actividad fosfatasa alcalina específica superiores a los de las preparaciones de matriz ósea desmineralizada convencionales, por ejemplo, de 2 a 100.000.000 superiores a los de las preparaciones de matriz ósea desmineralizada convencionales en células C2C12 cultivadas. En otra realización, el almacén de matriz de ósea desmineralizada osteoinductiva comprende factores de crecimiento osteoinductivos, por ejemplo extraídos de MOD o recuperados de baños ácidos utilizados para la desmineralización de la matriz ósea, y matriz ósea desmineralizada y muestra la capacidad de inducir niveles de actividad fosfatasa alcalina específica superiores a los de las preparaciones de matriz ósea desmineralizada convencionales, por ejemplo, de 2 a 100.000.000 superiores a los de las preparaciones de matriz ósea desmineralizada convencionales en células C2C12 cultivadas.

Además de la etapa de desmineralización, el hueso se somete opcionalmente a una etapa de configuración para formar un implante. La etapa de configuración se puede emplear utilizando el equipo convencional conocido por los expertos en la técnica para producir una amplia variedad de geometrías, *p. ej.*, superficies cóncavas o convexas, superficies escalonadas, clavijas cilíndricas, cuñas, bloques, tornillos, y similares. Un material implantable quirúrgicamente fabricado de partículas de hueso elongadas que han sido desmineralizadas, que se puede moldear en forma de lámina, y los procedimientos para fabricar materiales moldeados a partir de partículas de hueso desmineralizado se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.507.813 y 6.436.138, respectivamente. Las laminas adecuadas incluyen aquellas comercializadas bajo el nombre de fábrica Grafton® DBM Flex, que deben ser humedecidas/hidratadas antes de su utilización para que resulten útiles para su implantación. Se ha referido recientemente que tales láminas son eficaces en la siembra de células estromáticas de médula ósea humana (BMSC), que pueden ser útiles en la reparación de defectos de huesos grandes. Kasten et al., "Comparison of Human Bone Marrow Stromal Cells Seeded on Calcium-Deficient Hydroxyapatite, Betatricalcium Phosphate and Demineralized Bone Matrix," *Biomaterials*, 24(15):2593-603, 2003. También son útiles las preparaciones de matriz ósea desmineralizada y otras matrices que comprenden aditivos o portadores tales como aglutinantes, cargas, plastificantes, agentes humectantes, agentes tensioactivos, agentes bioestáticos, agentes biocidas, y similares. Algunos aditivos y portadores ilustrativos incluyen compuestos polihidroxilados, polisacáridos, proteínas con glucosaminoglicano, ácidos nucleicos, polímeros, polaxómeros, resinas, arcillas, sales de calcio, y/o derivados de los mismos.

El hueso utilizado en la creación de la matriz ósea se puede obtener de cualquier fuente de tejido vivo o muerto. A menudo, se preferirá que la fuente de hueso se adecue al receptor eventual de la composición de la invención. Como mínimo, a menudo es deseable que el donante y el receptor sean de la misma especie, aunque se permiten incluso fuentes xenogénicas. De este modo para su uso en seres humanos, generalmente se prefiere utilizar MOD derivada al menos en parte de hueso humano. Por ejemplo, el material óseo puede ser al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más material óseo humano. En ciertas realizaciones 100% del material óseo es material óseo humano.

La matriz puede ser completamente insoluble o se puede solubilizar lentamente después de la implantación. Tras la implantación, las matrices preferidas se reabsorben o se degradan, quedando sustancialmente intactas durante al menos uno a siete días, lo más preferiblemente durante dos o cuatro semanas o más y a menudo más de 60 días. Los agentes bioactivos pueden estar presentes endógenamente en la matriz como en el caso de la mayor parte del hueso desmineralizado, o se pueden añadir exógenamente a la matriz. Las matrices también pueden comprender combinaciones de agentes bioactivos endógenos y exógenos.

La matriz puede comprender numerosos materiales combinados, algunos o todos los cuales pueden estar en forma de fibras y/o partículas. La matriz puede comprender fosfatos de calcio. Driessens et al. "Calcium phosphate bone cements," Wise, D.L., Ed., *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part B, Applications* Nueva York: Marcel Decker; Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Phosphates* Elsevier, Amsterdam, 1994. Las matrices con fosfato de calcio incluyen, pero no están limitadas a, fosfato dicálcico dihidratado, monetita, fosfato tricálcico, fosfato tetracálcico, hidroxiapatita, hidroxiapatita nanocristalina, hidroxiapatita escasamente cristalina, hidroxiapatita sustituida, e hidroxiapatitas carentes de calcio.

En una realización, se proporciona un material osteoinductivo que comprende un material particulado mineralizado, factores de crecimiento osteoinductivos, y un almacén de matriz ósea desmineralizada. El material particulado mineralizado puede ser TCP, hidroxiapatita, mineral recuperado de hueso, virutas esponjosas, virutas corticales, hueso desmineralizado en superficie, u otro material. Los factores de crecimiento osteoinductivos pueden ser obtenidos sintéticamente, extraídos de matriz ósea desmineralizada, recuperados de baño con ácido para la desmineralización, u otros. El almacén de matriz ósea desmineralizada se puede combinar con un portador tal como almidón o glicerol. En diversas realizaciones, los factores de crecimiento osteoinductivos se pueden solubilizar y combinar con el material particulado mineralizado, permitiendo de ese modo la adsorción de los factores de crecimiento sobre las superficies de mineral, como se ha descrito previamente. El material compuesto de factor de crecimiento/mineral se puede distribuir después por todo el almacén de matriz ósea desmineralizada. El material compuesto de factor de crecimiento/mineral puede comprender de este modo un microportador y el almacén de matriz ósea desmineralizada puede comprender un macroportador. El tamaño de las partículas mineralizadas del microportador puede oscilar, por ejemplo, de 50 nm a 5 mm.

En otra realización, se proporciona una composición osteoinductiva con inmunogenicidad reducida que comprende proteínas no colagenosas y un almacén de matriz ósea desmineralizada. Las proteínas no colagenosas se pueden extraer, por ejemplo, de hueso desmineralizado o recuperar del ácido utilizado para desmineralizar el hueso. Las proteínas no colagenosas y el almacén de matriz ósea desmineralizada se pueden combinar de manera que la composición osteoinductiva muestre la capacidad de inducir la formación de hueso heterotópico en un ratón normal (eutímico).

Tratamiento del portador

En otras realizaciones, la presente invención proporciona adicionalmente métodos para incrementar la osteoinductividad de un portador exponiendo el portador a al menos un tratamiento (*p. ej.*, un agente biológico o químico). Además de la dispersión de los factores osteoinductivos extraídos sobre el portador, el portador se puede exponer a un compuesto químico o a condiciones que degraden selectivamente los inhibidores de la actividad osteogénica y/o a un compuesto químico o a condiciones que activen los factores osteoinductivos en el portador. De este modo, el portador resultante tiene una osteoinductividad, una actividad osteogénica o condrogénica incrementadas en comparación con un portador similar no expuesto al tratamiento o las condiciones, debido a que la inhibición de un factor osteoinductivo, osteogénico, o condrogénico se bloquea. En general, los agentes que inhiben o reducen la actividad osteoinductiva, osteogénica, o condrogénica pueden ser referidos como factores inhibidores de hueso/cartílago (BCIF).

Reducción de inhibidores

Como se ha establecido más arriba, el portador se puede tratar para reducir los inhibidores de factores osteoinductivos. Como se comentará con más detalle más adelante, los factores osteoinductivos extraídos se añaden al portador. La adición de los factores osteoinductivos y el tratamiento del portador para reducir los inhibidores se pueden realizar combinada o sucesivamente. Se pueden utilizar una o más rondas de tratamiento, esto es, los tratamientos pueden alternar:

De este modo, el portador se puede tratar para escindir o degradar una proteína específica tal como un inhibidor de BMP. El portador se trata de tal manera que una proteína específica que no es un componente estructural principal del portador resulta afectada. La proteína específica constituye generalmente menos de 1% del peso seco de la matriz, *p. ej.*, menos de 0,5%, menos de 0,1%, etc. La proteína específica puede ser un factor que actúa negativamente, *p. ej.*, un inhibidor de una BMP o un inhibidor de una ruta de señalización de BMP, en donde la escisión o la degradación del inhibidor permiten un incremento de la actividad de la proteína que de otro modo resultaría inhibida.

Alternativamente o adicionalmente, el portador puede incluir agentes inhibidores presentados en una formulación de liberación controlada (*p. ej.*, encapsulados en un polímero biodegradable). En el caso de las enzimas activadoras, esto es, enzimas que conducen a la liberación, presentación, o creación de factores osteoinductivos), los agentes inhibidores que reducen la actividad de las enzimas activadoras conducen preferiblemente a un incremento de la osteoinductividad a lo largo de un período de tiempo prolongado en lugar de solo una ráfaga inmediatamente después de la implantación.

Activación

Ciertos factores osteoinductivos o condrogénicos encontrados en una matriz ósea o cartilaginosa se encuentran en forma críptica y deben ser "activados" o "liberados" para que sean osteoinductivos. La activación de factores osteoinductivos puede implicar un cambio conformacional, una modificación post-traducciona, una escisión de proteína, un cambio en la estructura terciaria o cuaternaria, o una liberación de una proteína de unión. Los factores osteoinductivos, ya sean aquellos extraídos y añadidos al portador ya sean aquellos que ya están presentes en el portador, pueden estar en una forma pre o pro, que requiere escisión proteolítica para ser activa. Los factores osteoinductivos también pueden estar asociados con una proteína de unión o una proteína de una matriz ósea o cartilaginosa. La proteólisis también puede estar implicada en la activación o inactivación de una proteína de unión, lo que podría dar como resultado la activación del péptido o fragmento de proteína osteoinductivo. Por lo tanto, todos los tratamientos de una matriz ósea o cartilaginosa con cualquier condición específica o no específica puede afectar a las velocidades de activación de los fragmentos de péptidos y proteínas osteoinductivos.

La presencia o activación de péptidos y/o fragmentos de proteínas que tienen actividad osteoinductiva o condrogénica pueden compensar la degradación de proteínas osteoinductivas o condrogénicas en el portador, que se puede producir durante la preparación del portador. En ciertas realizaciones puede ser deseable tanto inhibir la degradación del factor osteoinductivo o condrogénico como activar o añadir factores osteoinductivos o condrogénicos tales como péptidos o fragmentos de proteínas osteoinductivos o condrogénicos. Variables tales como el pH y la concentración de iones pueden afectar a la función de la proteína y/o al plegamiento del péptido o fragmento de proteína, y puede afectar a la activación de los factores osteoinductivos o condrogénicos. Estas variables también pueden afectar a la liberación de un factor osteoinductivo de su proteína de unión. Por ejemplo, cuando el pH juega un papel en la activación de un factor, el portador puede incluir un compuesto químico tal como un polímero que se romperá con el tiempo y liberará un subproducto ácido; activando de ese modo los factores

osteoinductivos del portador. Alternativamente, un polímero biodegradable puede liberar iones o una proteasa que sea capaz de "activar" los factores osteoinductivos del portador.

En ciertas realizaciones, se añaden una o más enzimas, tales como proteasas, lipasas, y glucosidasas, al portador para activar los factores osteoinductivos o condrogénicos ya presentes (*p. ej.*, para convertir uno o más factores osteoinductivos de una forma inactiva en una activa o de una forma activa en una forma más activa, o de una forma que es susceptible de degradación en una forma que es menos susceptible de degradación, *p. ej.*, una forma que tiene una vida media más larga).

Muchos de los factores de crecimiento responsables de la actividad osteoinductiva o condrogénica de un portador, tal como un portador de matriz ósea, existen en forma críptica, en el portador hasta que se activan. La activación puede implicar el cambio de una función pre o pro de un factor, o la liberación de la función desde un segundo factor o entidad, que se une al primer factor de crecimiento. Por ejemplo, la escisión proteolítica da como resultado la separación de la proproteína inactiva (*p. ej.*, una proproteína de la superfamilia de proproteínas de TGF, *p. ej.*, TGF-(3) y la liberación de un péptido maduro activo). A medida que las proteínas de las matrices óseas y cartilagosas se degradan naturalmente o artificialmente, se rompen en fragmentos de péptidos y proteínas que contienen dominios activos y funcionan como ligandos de receptores y transductores de señales en las rutas de señalización de crecimiento óseo y cartilaginoso. Estas reacciones se pueden promover para potenciar la señalización osteoinductiva y condrogénica en el portador.

Generación de Péptidos Osteoinductivos y/o Factores de Proteínas en el Portador

Se puede utilizar una amplia variedad de agentes, seleccionados entre agentes biológicos tales como enzimas, productos químicos, y condiciones para generar péptidos y fragmentos de proteínas osteoinductivos, y estos son bien conocidos en la técnica. Las proteasas, los productos químicos, y las condiciones de la presente invención pueden ser específicos del sitio, específicos de aminoácidos, específicos de proteínas, semi-específicos del sitio, específicos de lípidos, o específicos de azúcares. Las enzimas se pueden obtener de fuentes endógenas, exógenas, autógenas (autólógicas), alogénicas, o xenogénicas. Se pueden purificar a partir de fuentes naturales o producir recombinantemente. En muchas realizaciones las enzimas se adquieren de fuentes comerciales (Worthington Biochemical Industries, Sigma, etc.) y o bien se utilizan directamente o bien se purifican con posterioridad para que estén libres de contaminantes que puedan afectar negativamente a la actividad del producto final. Las enzimas, péptidos, o fragmentos de proteínas (*p. ej.*, generados por medio de proteasas concretas) y otros tratamientos también se pueden purificar mediante métodos convencionales. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; Ausubel et al. *"Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, Nueva York, V 1 & 21996. La purificación se puede llevar a cabo mediante una variedad de técnicas cromatográficas. Comúnmente se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaños. Otros métodos incluyen la cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, y de afinidad. Los péptidos o fragmentos de proteínas se pueden utilizar en matrices de reparación hueso y cartilago como preparaciones no purificadas con tal que los péptidos o fragmentos de proteínas conserven su actividad osteoinductiva o condrogénica. Alternativamente, las enzimas, péptidos, o fragmentos de proteínas se pueden sintetizar artificialmente utilizando técnicas convencionales, producir recombinantemente, etc. Puede ser preferible utilizar preparaciones que tengan un alto grado de pureza. Por ejemplo, una preparación de enzima puede contener al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% de la enzima en peso. La preparación puede estar esencialmente libre de componentes bacterianos, concretamente componentes bacterianos que pudieran ocasionar reacciones inflamatorias o inmunológicas en un anfitrión, tales como endotoxinas, lipopolisacáridos, etc. Se pueden utilizar preparaciones que tengan una pureza mayor de 99,5%.

Una proteasa adecuada es una colagenasa. Las colagenasas y su actividad sobre los colágenos de diversos tipos han sido estudiadas exhaustivamente. Se encuentran disponibles de Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ numerosas preparaciones de colagenasa. Como se describe en la página web de la empresa y se conoce en la técnica, el colágeno consiste en fibrillas compuestas por moléculas de tropocolágeno polarizadas, agregadas lateralmente (PM 300.000). Cada unidad de tropocolágeno consiste en tres cadenas a polipeptídicas enrolladas helicoidalmente en torno a un único eje. Las hebras tienen residuos de glicina repetitivos cada tres posiciones y numerosos residuos de prolina e hidroxiprolina, siendo la secuencia de aminoácidos concreta característica del tejido de origen. Las unidades de tropocolágeno se combinan uniformemente para crear una periodicidad de repetición axial. Los entrecruzamientos siguen desarrollándose y el colágeno se vuelve progresivamente más insoluble y resistente a la lisis al envejecer. Cuando el tropocolágeno soluble se desnaturaliza se produce gelatina, por ejemplo con calentamiento suave, y las cadenas polipeptídicas se dispersan al azar. En este estado las hebras pueden ser fácilmente escindidas por una amplia variedad de proteasas.

En general, se puede utilizar una variedad de colagenasas diferentes conocidas en la técnica. Las colagenasas se clasifican en la sección 3.4.24 de las recomendaciones de la nomenclatura de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) (véanse, *p. ej.*, 3.4.24.3, 3.4.24.7, 3.4.24.19). La colagenasa puede ser de origen eucariótico (*p. ej.*, mamífero) o procariótico (bacteriano). Las enzimas bacterianas difieren de las colagenasas de mamífero en que atacan muchos sitios a lo largo de la hélice. La colagenasa puede escindir simultáneamente las tres cadenas o atacar una sola hebra. Preferiblemente la colagenasa escinde el colágeno de Tipo I, *p. ej.*, degrada las regiones helicoidales del colágeno nativo, preferentemente en el enlace Y-Gly de la

secuencia Pro-Y-Gly-Pro-, en donde Y es muy frecuentemente un aminoácido neutro. Esta escisión proporciona productos susceptibles de una digestión con peptidasa adicional. Se puede utilizar cualquier proteasa que tenga una o más de estas actividades asociadas con la colagenasa como colagenasa de acuerdo con la presente invención.

5 Se apreciará que las preparaciones de colagenasa bruta contienen no solo varias colagenasas, sino también una sulfhidril proteasa, clostripaína, una enzima de tipo tripsina, y una aminopeptidasa. Esta combinación de actividades colagenolíticas y proteolíticas es eficaz para descomponer matrices intercelulares, la parte esencial de la disociación de tejidos. La colagenasa bruta es inhibida por agentes quelantes metálicos tales como cisteína, EDTA, u o-fenantrolina, pero no DFP. También es inhibida por la $\alpha 2$ -macroglobulina, una glicoproteína grande del plasma. Se requiere Ca^{2+} para la actividad de la enzima. Por lo tanto, puede ser deseable evitar agentes inhibidores de colagenasa cuando se trate matriz ósea con colagenasa. Además, aunque las proteasas adicionales presentes en algunas preparaciones de colagenasa pueden ayudar a descomponer el tejido, también pueden causar la degradación de constituyentes deseados de la matriz tales como los factores de crecimiento. Por consiguiente, puede ser deseable utilizar una colagenasa altamente purificada que contenga actividades proteolíticas secundarias mínimas junto con una elevada actividad colagenasa. Por ejemplo, una preparación de colagenasa puede contener al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% de colagenasa en peso. La preparación puede estar esencialmente libre de componentes bacterianos, concretamente componentes bacterianos que pudieran ocasionar reacciones inflamatorias o inmunológicas en un anfitrión, tales como endotoxinas, lipopolisacáridos, etc. Se pueden utilizar preparaciones que tengan una pureza mayor de 99,5%. Una preparación adecuada es la colagenasa CLSPA purificada cromatográficamente de Worthington Biochemical Corporation. Puede ser deseable incluir diversos inhibidores de proteasa que no inhiban la colagenasa pero que inhiban diversas proteasas que digieren BMP. Por ejemplo, los inhibidores de proteasa que se sabe que protegen la actividad de BMP de la degradación incluyen N-etil maleimida, hidrocloreuro de benzamidina, ácido yodoacético, PMSF, AEBSF, E-64. También se puede utilizar bestatina, concretamente si la preparación contiene actividad aminopeptidasa. Se puede incluir en un portador cualquiera de estos inhibidores de proteasa (u otros), tales como una composición de matriz ósea, o en cualquier composición que se utilice para tratar un portador.

Otra proteasa adecuada es la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1). BMP-1 es una proteína colagenolítica que también se ha demostrado que escinde la cordina (un inhibidor de BMP-2 y BMP-4). De este modo, BMP-1 puede ser útil para alterar la estructura física del portador (p. ej., descomponiendo el colágeno) y/o para escindir una o varias proteínas inhibitoras específicas, p. ej., cordina o nogina. También se pueden utilizar proteínas relacionadas con cualquiera de las proteasas descritas en la presente memoria, esto es, las proteínas o fragmentos de proteínas que tienen la misma especificidad de escisión. Se apreciará que se pueden utilizar variantes que tienen una identidad de secuencia sustancial con la proteasa de origen natural. Por ejemplo, se pueden utilizar variantes al menos 80% idénticas a lo largo de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o 100% de la longitud de la proteasa de origen natural (o cualquier fragmento activo conocido de las mismas que conserve la especificidad de escisión) cuando se alinean para una identidad máxima permitiendo espacios.

Algunas proteasas preferidas incluyen miembros de la familia de proteasas proproteína convertasa (PPC), tales como furina y proteasas relacionadas. Los miembros de esta familia de enzimas celulares escinden la mayor parte de las prohormonas y precursores de neuronas neuropeptídicas. Otras numerosas proteínas celulares, algunas proteínas virales, y toxinas bacterianas que son transportadas por la ruta secretora constitutiva también son elegidas como diana para su maduración por las PC. La furina y otros miembros de la familia de PC comparten similitudes estructurales que incluyen una pro-región amino terminal de ~10 kDa heterogénea, un dominio catalítico de tipo subtilisina de ~55 kDa altamente conservado, y un dominio carboxi terminal que tiene una longitud y una secuencia heterogéneas. Estas enzimas se vuelven catalíticamente activas después de la escisión de la pro-región en el compartimento celular apropiado. La furina es la principal enzima de procesamiento de la ruta secretora y se localiza en la red del trans-golgi. van den Ouweland, A. M. W. et al. (1990) Nucl. Acid Res. 18, 664; Steiner, D. F. (1998) Curr. Opin. Chem. Biol. 2, 31-39. Los sustratos de la furina incluyen factores de coagulación de la sangre, proteínas del suero, y receptores de factores de crecimiento tales como el receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico. Bravo D. A. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 25830-25873. El sitio de escisión mínimo para la furina es Arg-X-X-Arg. Sin embargo, la enzima prefiere el sitio Arg-X-(Lys/Arg)-Arg. Una arginina adicional en la posición P6 parece potenciar la escisión. Krysan D. J. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 23229-23234. La furina es inhibida por EGTA, $\alpha 1$ antitripsina Portland, Jean, F. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7293-7298, y compuestos de poliarginina, Cameron, A. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 36741-36749. Se ha demostrado que la furina procesa proteolíticamente las proteínas tanto proTGF como proBMP, por ejemplo, proTGF- β y proBMP-4, respectivamente, dando como resultado la liberación de la forma madura activa de cada molécula. Dubois et al., American Journal of Pathology (2001) 158(1):305-316; Cui et al., The Embo Journal (1998) 17(16):4735-4743; Cui et al., Genes & Development (2001) 15:2797-2802. También se ha mostrado que la furina escinde BMP-2, BMP-6, y BMP-7. Por ejemplo, la furina escinde entre los aminoácidos 282 y 283 en la BMP-2 humana madura. La BMP-2 humana recién sintetizada contiene una secuencia señal (aminoácidos 1-23), un propéptido (aminoácidos 24-282), y una porción activa (aminoácidos 283-396). La furina escinde la BMP-2 madura (aminoácidos 24-396) entre los aminoácidos 282 y 283 para liberar el propéptido y la molécula activa.

De este modo, el portador, por ejemplo la matriz de MOD, se puede tratar con PPC tales como furina y/u otras proteasas, que procesan los propéptidos de la superfamilia de TGF- β y/o BMP inmaduros a sus formas maduras activas y/o procesan los polipéptidos de la superfamilia de TGF- β y/o BMP activos o inactivos a fragmentos activos

más pequeños que son resistentes a la degradación o a la inactivación con respecto al polipéptido más largo, genera un portador con una mayor osteoinductividad en comparación con un portador que carece de proteasa, dando como resultado una mejor formación de hueso. Los títulos superiores de las especies maduras y/o resistentes a la degradación en estas preparaciones incrementan la capacidad osteoinductiva del portador.

- 5 Se sabe que el hueso desmineralizado esponjoso alogénico no es osteoinductivo. Cuando se trata con enzimas colagenasas durante períodos de tiempo utilizados rutinariamente en la técnica, por ejemplo 24 horas, el hueso desmineralizado esponjoso alogénico sigue siendo no osteoinductivo. Los solicitantes han hecho el descubrimiento sorprendente de que el hueso esponjoso alogénico, cuando se trata con enzimas colagenasas durante aproximadamente una hora, se vuelve osteoinductivo, aproximadamente tan osteoinductivo como el hueso desmineralizado cortical alogénico. Si bien no se desea estar ligado a ninguna teoría científica concreta, los solicitantes establecen que se cree que la desorganización de la matriz de colágeno deja biodisponibles los factores osteoinductivos. Cabría esperar que muchos tipos de enzimas colagenolíticas, tales como los mostrados en la presente memoria, hicieran osteoinductivo el hueso desmineralizado cuando se trataran como se describe en la presente memoria. También se espera que otros tratamientos proporcionen el mismo resultado, incluyendo el uso de sales o radiación ionizante o electromagnética, o diferentes categorías de enzimas, con tal que las enzimas desorganicen el colágeno sin dañar los factores osteoinductivos.

Sistema de liberación

- El portador y el método de adición de factores osteoinductivos al portador, comentado más completamente más abajo, puede dar como resultado un sistema de liberación mejorado. Más específicamente, los factores osteoinductivos se pueden añadir a un portador de manera que los factores osteoinductivos se dispersen por lo general de manera uniforme en tres dimensiones en contraste a la aplicación como revestimiento superficialmente de un portador. La dispersión completa del portador afecta al control de la cinética de liberación de los factores osteoinductivos del portador. En una realización, se proporciona una pluralidad de láminas finas de portador. Cada lámina de portador es estratificada con factores osteoinductivos. Estas láminas de portador estratificadas con factores osteoinductivos se apilan.

De este modo, opcionalmente, el osteoimplante se forma como una estructura laminar. Un osteoimplante de estructura laminar se puede moldear ventajosamente en tres dimensiones, como en la introducción de una forma de superficie cóncava. Adicionalmente, cada capa de la estructura laminada es continua, sin requerir unión de las articulaciones entre las piezas.

- El ensamblaje de las capas superpuestas en una estructura unitaria fuerte se puede completar por medio de una variedad de métodos/procedimientos, p. ej., aplicación de adhesivos biológicamente compatibles conocidos y convencionales tales como los cianoacrilatos; compuestos basados en resinas epoxídicas, selladores dentales de resina, cementos dentales de resina, cementos de ionómero vítreo, poli(metacrilato de metilo), pegamentos de gelatina-resorcinol-formaldehído, pegamentos basados en colágeno, agentes de unión inorgánicos tales como fosfato de cinc, fosfato de magnesio u otros cementos basados en fosfato, carboxilato de cinc, etc., y aglutinantes basados en proteínas tales como pegamentos de fibrina y proteínas adhesivas basadas en el mejillón; el uso de sujeciones mecánicas tales como clavos, tornillos, clavijas, etc., que se pueden fabricar a partir de materiales naturales o sintéticos y de materiales bioabsorbibles así como no bioabsorbibles; soldaduras de tejidos por láser; y, unión ultrasónica. Si se desea, las capas del osteoimplante osteogénico se pueden proporcionar con características de acoplamiento mecánico, p. ej., elementos de lengüeta y ranura, espiga y muesca, o cola de milano, para facilitar su ensamblaje en el producto final y/o para fijar las capas entre sí de una manera más segura. El método de ensamblaje óptimo se podría determinar caso por caso a través de experimentación rutinaria. Además de su portador y capas osteoinductivas, el osteoimplante de esta realización puede poseer opcionalmente una o más capas formadas a partir de uno o más materiales o sustancias.

- En otra realización, el portador puede comprender una sola lámina fina de material. Los sistemas de liberación pueden comprender de este modo una sola lámina fina de material recubierta con factores osteoinductivos. La lámina recubierta de material se puede enrollar o plegar sobre sí misma de manera que el contenido en factor de crecimiento en el interior de la lámina se aproxime a los niveles de factor de crecimiento en las superficies.

VII. Dispersión de factores osteoinductivos sobre el portador

- Los factores osteoinductivos extraídos se combinan con el portador apropiado. Cómo ocurre esto exactamente puede tener una influencia significativa sobre la actividad biológica de la formulación final. Los factores osteoinductivos extraídos pueden haber sido liofilizados, dando como resultado una composición en polvo. En algunas situaciones, la adición de un polvo a una matriz ósea puede constituir un reto. Así, puede ser deseable procesar los factores osteoinductivos para formar una mezcla homogénea que se pueda añadir más fácilmente a un portador. Esto puede tener un impacto significativo sobre la cinética de liberación del factor de crecimiento.

De este modo, en un ejemplo específico, si los factores osteoinductivos se liofilizan y se añaden a continuación a un portador de MOD, es probable que la solución no sea homogénea, concentrándose la mayoría de los factores osteoinductivos en el exterior del portador de MOD. Si los factores osteoinductivos se añaden a un portador que

comprende láminas de colágeno muy delgadas y el portador se pliega a continuación sobre sí mismo, la distribución del factor de crecimiento es más homogénea. Las láminas de colágeno en tal realización pueden ser muy delgadas, del orden de micras.

5 Se puede utilizar cualquier método adecuado de adición, o dispersión, de los factores osteoinductivos en el portador. Generalmente, los procedimientos utilizados para formular o dispersar factores osteoinductivos en el portador son sensibles al estado físico y químico tanto de los factores osteoinductivos como del portador. Los portadores se podrían añadir potencialmente a los extractos en su estado desnaturalizado, por ejemplo en guanidina, permitiendo que los factores de crecimiento precipiten directamente sobre los portadores.

10 En una realización, los factores osteoinductivos se combinan con un agente volumétrico para formar una mezcla homogénea. Esta mezcla se añade al portador.

15 Alternativamente, los factores osteoinductivos se pueden combinar con coprecipitados (descritos con más detalle anteriormente) y esta combinación se puede añadir al portador. Por ejemplo, el factor osteoinductivo y la combinación coprecipitada se pueden añadir a un portador tal como virutas esponjosas, fosfato de calcio sintético, o un polímero configurable líquido. Generalmente, el fosfato de calcio es una suspensión sólida-líquida mientras que el polímero es un líquido. De este modo, la elección del portador puede depender de las características deseadas de la composición. Adicionalmente, se puede añadir un lubricante, tal como agua, glicerol, o polietilenglicol.

20 En una realización alternativa, los factores osteoinductivos extraídos pueden actuar como su propio portador. En una realización adicional, el osteoimplante anterior se puede combinar de diferentes formas con otros osteoimplantes similares u otros materiales para formar un osteoimplante de construcción de tipo estructura laminar. Por ejemplo, las capas del osteoimplante de la invención en la presente memoria pueden hacer, a través de medios mecánicos o químicos, adherirse entre sí; u, opcionalmente, con otros materiales, p. ej., fibras reforzantes, tejidos, mallas, etc., entre algunas o todas las capas del osteoimplante. Tales materiales de estructura laminar diferirán de estructuras laminares de osteoimplantes conocidos tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.899.939 ya que el tamaño y la arquitectura finales estarán determinadas por la cantidad total de material donador de partida disponible en lugar del tamaño o la forma específicos del material donador utilizable disponible.

Formulación

30 El portador, la composición osteoinductiva, o el osteoimplante se pueden formular para un uso concreto. La formulación se puede utilizar para alterar las propiedades físicas, biológicas, o química del portador. Un médico sería capaz de determinar fácilmente la formulación necesaria para una aplicación concreta, teniendo en cuenta factores tales como el tipo de lesión, el sitio de la lesión, la salud del paciente, y el riesgo de infección. En diversas realizaciones, la composición osteoinductiva puede comprender, por ejemplo menos de aproximadamente 0,5% de agua, menos de aproximadamente 1% de agua, o menos de aproximadamente 5% de agua.

35 Por lo tanto, se pueden preparar portadores, composiciones osteoinductivas, u osteoimplantes para que tengan tasas de resorción/pérdida de osteoinductividad seleccionadas, o incluso para que tengan diferentes tasas en diferentes porciones de un implante. Por ejemplo, el proceso de formulación puede incluir la selección de partículas de MOD de un tamaño o composición concretos, combinada con la selección de uno o varios agentes estabilizadores concretos, y las cantidades de tales agentes.

40 En un ejemplo, puede ser deseable proporcionar un osteoimplante cuyos factores osteoinductivos sean activos en una cantidad relativamente constante a lo largo de un periodo de tiempo dado. Un portador de MOD que comprende factores con vidas medias más largas utilizando un polímero menos biodegradable o una cantidad mayor (p. ej., un revestimiento más grueso) de compuesto polimérico. Alternativamente o adicionalmente, el tamaño de partícula puede ser importante para determinar la vida media del osteoimplante. En ciertas realizaciones, una formulación de la invención puede incluir una mezcla de partículas, cada una con una vida media diferente. Tal mezcla podría proporcionar el desenmascaramiento continuo o posible de los factores osteoinductivos a lo largo de un período de tiempo prolongado que oscila de días a semanas a meses dependiendo de las necesidades de la lesión. Se pueden formular composiciones tales como ésta para estimular el crecimiento de hueso en un paciente humano comparable al crecimiento de hueso inducido mediante tratamiento con 10 µg de rhBMP sobre una esponja de colágeno, y preferiblemente comparable a 100 µg, y lo más preferiblemente 1-10 mg de rhBMP. Cuando la degradación del osteoimplante es preocupante, puede ser deseable analizar la vida útil del osteoimplante para determinar la vida útil, por ejemplo, a los 1, 2, o 3 años. Esto se puede realizar almacenando el osteoimplante, por ejemplo, a temperatura ambiente o, para el análisis acelerado, 38 grados Celsius, y verificación periódica de la inductividad del osteoimplante. Se hace referencia al documento PCT/US05/003092. Los implantes con vidas medias prolongadas pueden conservar más de aproximadamente 75% y aproximadamente 80% de su osteoinductividad después de tanto como, o más de, tres años.

55 También se pueden seleccionar propiedades físicas tales como la deformabilidad y la viscosidad del portador dependiendo de la aplicación clínica concreta. Si se utiliza MOD como portador, las partículas de MOD se pueden mezclar con otros materiales y factores para mejorar otras características del implante. Por ejemplo, el material de MOD mejorado se puede mezclar con otros agentes para mejorar la curación de heridas. Estos agentes pueden

incluir fármacos, proteínas, péptidos, polinucleótidos, disolventes, compuestos químicos, y moléculas biológicas.

Adicionalmente, la composición se puede formular para que sea configurable y/o inyectable. De este modo, por ejemplo, la composición puede ser inyectable a través de una aguja del calibre 10, calibre 12, o calibre 18.

5 También se pueden formar partículas del portador de diferentes aspectos y configuraciones. Las partículas se pueden formar en cualquier configuración adecuada, incluyendo varillas, cuerdas, láminas, tejidos, sólidos, conos, discos, fibras, y cuñas. En ciertas realizaciones, la forma y el tamaño de las partículas en el portador afecta al curso de la osteoinductividad. Por ejemplo, en una forma de cono o cuña, el extremo cónico dará como resultado osteoinductividad poco después de la implantación del osteoimplante, mientras que el extremo más grueso conducirá a osteoinductividad más tarde en el proceso de curación (horas a días a semanas más tarde). En algunas realizaciones, la partícula tiene una longitud de más de 2 mm, de más de 1,5 mm, de más de 1 mm, preferiblemente de más de 500 micras, y muy preferiblemente de más de 200 micras a lo largo de su dimensión más ancha. Asimismo, un tamaño de partícula más grande habrá inducido la formación de hueso durante más tiempo que partículas más pequeñas. Se pueden utilizar partículas de características diferentes (p. ej., composición, tamaño, forma) en la formación de estos diferentes aspectos y configuraciones. Por ejemplo, en una lámina de MOD se puede alternar una capa de partículas de larga vida media entre capas de partículas de vida media más corta. Véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.899.939 para los ejemplos adecuados. En un tejido, las hebras compuestas de partículas de vida media más corta se pueden tejer junto con hebras de vidas medias más largas.

20 En una realización, la MOD fibrosa se moldea a un portador en forma de matriz como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.507.813. La MOD moldeada se embebe en una barrera para la difusión de tipo matriz, de manera que una porción de la matriz se deje expuesta sin material de la matriz. Las matrices de bloqueo particularmente preferidas son almidón, fosfatidilcolina, policarbonatos de tirosina, poliariatos de tirosina, poliláctidos, poligaláctidos, u otros polímeros o copolímeros reabsorbibles. Los dispositivos preparados de este modo a partir de estas matrices tienen una combinación de propiedades osteoinductivas inmediatas y de más larga duración y son particularmente útiles para promover la formación de masa ósea en indicaciones de fusión espinal posterolateral humana.

30 En otra realización, los portadores que tienen una forma tridimensional preseleccionada se preparan mediante aplicación repetida de capas individuales de MOD, por ejemplo mediante impresión 3-D como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.490.962, 5.518.680, y 5.807.437. Las diferentes capas pueden comprender preparaciones de MOD estabilizadas individuales, o alternativamente pueden comprender capas de MOD tratadas con agentes estabilizadores antes del depósito de múltiples capas.

35 En el proceso de preparación del osteoimplante, los materiales se pueden producir asépticamente en su totalidad o se pueden esterilizar para eliminar agentes infecciosos cualesquiera tales como HIV, hepatitis B, o hepatitis C. La esterilización se puede completar utilizando antibióticos, irradiación, esterilización química (p. ej., óxido de etileno), o esterilización térmica. También se pueden utilizar otros métodos conocidos en la técnica de preparación de MOD tales como desengrasado, sonicación, y liofilización al preparar un portador de MOD. Puesto que se sabe que la actividad biológica del hueso desmineralizado es afectada perjudicialmente por la mayoría de los procedimientos de esterilización finales, se deben adoptar precauciones cuando se esterilicen las composiciones de la invención.

VIII. Aditivos opcionales

40 Opcionalmente, se pueden incluir otros aditivos en la matriz ósea osteoinductiva. Se apreciará que la cantidad utilizada de aditivo variará dependiendo del tipo de aditivo, la actividad específica de la preparación de aditivo empleada, y el uso pretendido de la composición. La cantidad deseada es fácilmente determinable por el usuario. Se puede incorporar cualquiera de una variedad de sustancias opcionales útiles desde el punto de vista médico o quirúrgico en, o asociadas con, los factores osteoinductivos antes, durante, o después de la preparación de la composición osteogénica.

45 En algunas realizaciones, el aditivo es adsorbido o asociado de otro modo al osteoimplante. El aditivo puede estar asociado al osteoimplante a través interacciones específicas o no específicas, o interacciones covalentes o no covalentes. Los ejemplos de las interacciones específicas incluyen aquellas entre un ligando y un receptor, un epítipo y un anticuerpo, etc. Los ejemplos de las interacciones no específicas incluyen interacciones hidrófobas, interacciones electrostáticas, interacciones magnéticas, interacciones de dipolos, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, etc. En ciertas realizaciones, el aditivo se ancla al osteoimplante, por ejemplo, al portador, utilizando un conector de manera que el aditivo esté libre para asociarse con su receptor o sitio de acción *in vivo*. En otras realizaciones el aditivo se ancla covalentemente o no covalentemente al portador. En ciertas realizaciones, el aditivo se puede anclar a un compuesto químico tal como un péptido que es reconocido por el portador. En otra realización, el aditivo se ancla a un anticuerpo, o fragmento del mismo, que reconoce un epítipo encontrado en el portador. En algunas realizaciones al menos se anclan aditivos al osteoimplante. En otras realizaciones se anclan al osteoimplante al menos tres aditivos. Se puede proporcionar un aditivo en el osteoimplante en un formato de liberación sostenida. Por ejemplo, el aditivo se puede encapsular en nanosferas, microsferas biodegradables, etc.

Los expertos en la técnica entenderán que no se pretende que las listas de sustancias opcionales incluidas aquí

sean exahustivas y que se pueden mezclar otros materiales con elementos derivados de hueso en la práctica de la presente invención.

Sustancias radiopacas

5 Se pueden añadir sustancias radiopacas para conferir radiopacidad a la composición. Los ejemplos de las sustancias que confieren radiopacidad incluyen por ejemplo, partículas óseas completamente mineralizadas, compuestos y composiciones que contienen bario y yodo, p. ej., Sulfato de bario y Sulfato de Bario para Suspensión, Ácido Iopanoico, y similares. Cuando se emplean, las sustancias que confieren radiopacidad representarán típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 por ciento en peso de la composición que contiene la partícula ósea, calculado antes de formar el material moldeado.

10 Materiales promotores de la angiogénesis

El desarrollo de una vasculatura alrededor del sitio de implante puede ser también importante para formar nuevos tejidos de hueso y/o cartílago. La angiogénesis puede ser un factor crucial importante para la reposición de nuevos tejidos de hueso y cartílago. En ciertas realizaciones, se promueve la angiogénesis de manera que se forman vasos sanguíneos en el sitio para permitir el transporte eficaz de oxígeno y otros nutrientes y factores de crecimiento para el desarrollo de tejido de hueso o cartílago. De este modo, se pueden incluir en el osteoimplante factores que promueven la angiogénesis para incrementar la angiogénesis en esa región. Por ejemplo, las semaforinas de clase 3, p. ej., SEMA3, controlan la morfogénesis vascular por medio de la inhibición de la función de las integrinas en el sistema vascular, Serini et al., Nature, (Julio 2003) 424:391-397 y se pueden incluir en el osteoimplante.

Agentes bioactivos

20 La composición osteoconductiva puede proporcionar un sistema para la liberación de agentes bioactivos, tales como factores osteoinductivos, en animales anfitriones. De este modo, el osteoimplante posibilita una respuesta curativa mejorada al implante sin la necesidad de administrar separadamente el agente bioactivo. Un problema con la introducción del agente bioactivo en el sitio es que a menudo se diluye y se redistribuye durante el procedimiento de curación por los sistemas circulatorios (p. ej., sangre, linfa) del receptor antes de que se produzca la curación completa. Una solución a este problema de redistribución es fijar los componentes bioactivos al osteoimplante. Algunos agentes bioactivos preferidos que se pueden liberar utilizando una composición de MOD incluyen agentes que promueven el proceso de curación natural, esto es, resorción, vascularización, angiogénesis, nuevo crecimiento, etc. En una realización, se proporciona el osteoimplante en el que se utiliza MOD, junto con un agente estabilizador, para liberar el agente biológicamente activo. Se espera que el agente estabilizador proteja el agente biológicamente activo de la degradación, y por lo tanto prolongue su vida activa después de la liberación en el animal receptor. En ciertas realizaciones, el agente bioactivo es un agente osteoinductivo, y en ciertas realizaciones, la MOD se puede utilizar para liberar más de un agente bioactivo, preferiblemente más de dos, y más preferiblemente a veces más de tres agentes bioactivos. El agente bioactivo se puede asociar con la MOD. Por ejemplo, el agente bioactivo se puede asociar con la MOD a través de interacciones electrostáticas, enlace de hidrógeno, interacciones pi, interacciones hidrófobas, interacciones de van der Waals, etc. En ciertas realizaciones, el agente bioactivo se ancla a la MOD a través de interacciones específicas tales como aquellas entre un receptor y su ligando o entre un anticuerpo y su antígeno. En otras realizaciones, el agente bioactivo se ancla a la MOD a través de interacciones no específicas (p. ej., interacciones hidrófobas).

40 Las sustancias médicamente/quirúrgicamente útiles incluyen sustancias fisiológicamente o farmacológicamente activas que actúan localmente o sistémicamente en el anfitrión. Generalmente, estas sustancias pueden incluir sustancias bioactivas que se pueden incorporar fácilmente al osteoimplante e incluyen, p. ej., polvo de hueso desmineralizado como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.073.373 ; colágeno, derivados de colágeno insolubles, etc., y sólidos solubles y/o líquidos disueltos allí; antiviricidas, particularmente aquellos eficaces contra VIH y hepatitis; antimicrobianos y/o antibióticos tales como eritromicina, bacitracina, neomicina, penicilina, polimicina B, tetraciclinas, biomicina, cloromicetina, y estreptomycinas, cefazolina, ampicilina, azactam, tobramicina, clindamicina y gentamicina, etc.; azúcares biocidas/biostáticos tales como dextrano, glucosa, etc.; aminoácidos; péptidos; vitaminas; elementos inorgánicos; cofactores para la síntesis de proteínas; hormonas; tejido endocrino o fragmentos de tejido; sintetizadores; enzimas tales como fosfatasa alcalina, colagenasa, peptidasas, oxidasas, etc.; armazones celulares poliméricos con células parenquimáticas; agentes angiogénicos y portadores poliméricos que contienen tales agentes; retículas de colágeno; agentes antigénicos; agentes citoesqueléticos; fragmentos de cartílago; células vivas tales como condrocitos, células de médula ósea, células pluripotenciales mesenquimáticas; extractos naturales; células vivas diseñadas genéticamente o células vivas modificadas de otro modo; células expandidas o cultivadas; ADN liberado por plásmidos, vectores virales u otros medios; trasplantes de tejido; polvo de hueso desmineralizado; tejidos autógenos tales como sangre, suero, tejido blando, médula ósea, etc.; bioadhesivos; proteínas morfogénicas de hueso (BMP); factor osteoinductivo (IFO); fibronectina (FN); factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); extractos de anclaje de cementum (CAE); cetanserina; hormona de crecimiento humana (HGH); hormonas de crecimiento animales; factor de crecimiento epidérmico (EGF); interleuquinas, p. ej., interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2); trombina alfa humana; factor de crecimiento transformante (TGF-beta); factores de crecimiento de tipo insulínico (IGF-1, IGF-2); factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, BFGF, etc.);

factor quimiotáctico del ligamento periodontal (PDLGF); proteínas derivadas de la matriz del esmalte; factores de crecimiento y diferenciación (GDF); familia de proteínas hedgehog (erizo); moléculas receptoras de proteínas; péptidos pequeños derivados de los factores de crecimiento anteriores; promotores de hueso; citoquinas; somatotropina; digeridores de hueso; agentes antitumorales; atrayentes celulares y agentes de anclaje; inmunosupresores; potenciadores de la penetración, p. ej., ésteres de ácidos grasos tales como monoésteres de laureato, miristato y estearato de polietilenglicol, derivados de enamina, alfa-cetoaldehídos, etc.; y ácidos nucleicos. Las cantidades de tales sustancias añadidas opcionalmente pueden variar ampliamente determinándose fácilmente los niveles óptimos en un caso específico por medio de experimentación rutinaria.

En ciertas realizaciones, el agente que se va a liberar se absorbe o se asocia de otro modo con el osteoimplante. El agente se puede asociar con el osteoimplante a través de interacciones específicas o no específicas; o interacciones covalentes o no covalentes. Los ejemplos de las interacciones específicas incluyen aquellas entre un ligando y un receptor, un epítipo y un anticuerpo, etc. Los ejemplos de las interacciones no específicas incluyen interacciones hidrófobas, interacciones electrostáticas, interacciones magnéticas, interacciones de dipolos, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, etc. En ciertas realizaciones, el agente se ancla al osteoimplante utilizando un conector de manera que el agente esté libre para asociarse con su receptor o sitio de acción in vivo. En ciertas realizaciones, el agente que se va a liberar se puede unir a un compuesto químico tal como un péptido que es reconocido por la matriz de la composición de MOD. En otra realización, el agente que se va a liberar se ancla a un anticuerpo, o fragmento del mismo, que reconoce un epítipo encontrado dentro de la matriz de la composición de MOD. En una realización adicional, el agente es BMP, TGF- β , IGF, hormona paratiroidea (PTH), factores de crecimiento, o factores angiogénicos. En ciertas realizaciones se anclan al menos dos agentes bioactivos a la composición de MOD. En otras realizaciones se anclan al menos tres agentes bioactivos a la composición de MOD.

Agentes osteoinductores

Se pueden añadir al portador otros agentes osteoinductores además de los factores osteoinductivos extraídos. Estos agentes se pueden añadir en una forma activada o no activada. Estos agentes se pueden añadir en cualquier momento durante la preparación del material de la invención. Por ejemplo, en el caso de un portador de MOD, el agente osteoinductor se puede añadir después de la etapa de desmineralización y antes de la adición de los agentes estabilizadores para proteger el agente osteoinductor de enzimas degradantes exógenas una vez implantado. En algunas realizaciones la MOD se liofiliza en una solución que contiene el agente osteoinductor. En algunas otras realizaciones, los agentes osteoinductores se adhieren sobre la matriz ósea desmineralizada hidratada y no son solubles libremente. En otros casos, el agente osteoinductor se añade después de la adición de un agente estabilizador de manera que el agente osteoinductor esté disponible inmediatamente después de la implantación de la MOD.

Los agentes osteoinductores incluyen cualquier agente que conduzca a la formación de hueso o la potencia. El agente osteoinductor puede hacer esto de cualquier manera, por ejemplo, el agente puede conducir al reclutamiento de células responsables de la formación de hueso, el agente puede conducir a la secreción de matriz que puede experimentar con posterioridad mineralización, el agente conducir a la disminución de resorción de hueso, etc. Los agentes osteoinductores adecuados incluyen proteínas morfogénicas de hueso (BMP), factor de crecimiento transformante (TGF-0), factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF-1), hormona paratiroidea (PTH), y factores angiogénicos tales como VEGF. En una realización, el agente inductor se diseña genéticamente para que comprenda una secuencia de aminoácidos que promueva la unión del agente inductor a la MOD o al portador. Sebold et al., PCT/EPOO/00637 describe la producción de factores de crecimiento diseñados mediante ingeniería genética ilustrativos adecuados para su uso con MOD.

VIII. Tratamiento de composiciones

En el procedimiento para preparar hueso de la invención y materiales de la matriz del cartílago mejorados, los materiales se pueden producir asépticamente en su totalidad o esterilizar para eliminar agentes infecciosos cualesquiera tales como HIV, hepatitis B, o hepatitis C. La esterilización se puede completar utilizando antibióticos, irradiación, esterilización química (p. ej., óxido de etileno), o esterilización térmica. También se pueden utilizar otros métodos conocidos en la técnica de preparación de matrices de hueso y cartílago, tales como desengrasado, sonicación, y liofilización al preparar el portador. Puesto que se sabe que la actividad biológica de diversos materiales incluyendo hueso desmineralizado es afectada perjudicialmente por la mayoría de los procedimientos de esterilización finales, se deben adoptar precauciones cuando se esterilicen las composiciones de la invención. En algunas realizaciones, los osteoimplantes descritos en la presente memoria se prepararán asépticamente o se esterilizarán.

IX. Composiciones para ejemplos

En una realización, el osteoimplante comprende una combinación de MOD y factores osteoinductivos de hueso que tiene una actividad de 2 a 150 veces mayor que la MOD a la que no se ha añadido ningún suplemento, según se mide mediante la capacidad de la composición para inducir la formación de hueso heterotópico en una rata o un ratón. Se pueden utilizar diversas proporciones de MOD con respecto a los factores osteoinductivos, que oscilan de 1 gramo de MOD:1 μ g de factores osteoinductivos a 1 gramo MOD:100 mg de factores osteoinductivos. El

osteimplante puede comprender factores de crecimiento osteoinductivos extraídos de MOD o recuperados de baños ácidos utilizados para la desmineralización de matriz ósea y matriz ósea desmineralizada y puede mostrar la capacidad de inducir actividad fosfatasa alcalina específica superior a la de las preparaciones de matriz ósea desmineralizada, por ejemplo, de 2 a 100.000.000 más alta que las preparaciones de matriz ósea desmineralizada convencional en C2C12 cultivadas.

5 En otra realización, el osteimplante comprende una combinación de MOD, factores osteoinductivos, y un portador en diversas proporciones. Se puede utilizar cualquier portador adecuado, incluyendo polietilenglicol, lecitina, almidón, colágeno, hidroxiapatita, o ácido hialurónico. Las proporciones adecuadas incluyen 1 gramo de MOD:10 µg a 100 mg de factores osteoinductivos:100 mg a 10 gramos de portador.

10 En una realización adicional, el osteimplante comprende una combinación de hueso no desmineralizado con factores osteoinductivos de hueso que tiene la capacidad de inducir fusión espinal posterolateral en animales superiores, tales como seres humanos y perros, sin la adición de factores de crecimiento recombinantes o autoinjerto de cresta ilíaca. Se pueden utilizar diversas proporciones de hueso con respecto a factores osteoinductivos que oscilan de 1 gramo de hueso: 1 µg de factores osteoinductivos a 1 gramo de hueso: 100 mg de factores osteoinductivos.

15 En otra realización adicional, el osteimplante comprende una combinación de hueso mineralizado, factores osteoinductivos, y un portador en diversas proporciones. Se puede utilizar cualquier portador adecuado, como se ha mostrado anteriormente. Las proporciones adecuadas incluyen 1 gramo de MOD:10 µg a 100 mg de factores osteoinductivos: 100 mg a 10 gramos de portador, con la capacidad de inducir fusión espinal posterolateral en seres humanos o perros sin la adición de factores de crecimiento recombinantes o autoinjerto de cresta ilíaca.

20 Como se ha descrito previamente, en otra realización, se proporciona un material osteoinductivo que comprende un material particulado mineralizado, factores de crecimiento osteoinductivos, y un armazón de matriz ósea desmineralizada.

25 En una realización descrita previamente adicionalmente, una composición osteoinductiva comprende proteínas no colagenosas extraídas de hueso desmineralizado o recuperadas del ácido utilizado para desmineralizar hueso y ácido para desmineralizar hueso con mineral recuperado. Alternativamente, la composición osteoinductiva puede comprender proteínas no colagenosas extraídas de hueso desmineralizado o recuperadas del ácido utilizado para desmineralizar hueso y un armazón de matriz ósea desmineralizada.

30 En otra realización adicional descrita previamente, se puede proporcionar una composición osteoinductiva que comprende partículas óseas mineralizadas o desmineralizadas en superficie y extractos de MOD.

X. Evaluación de la actividad osteogénica

La inducción de la formación de hueso se puede determinar mediante una evaluación histológica que muestra la formación de novo de hueso con osteoblastos, osteoclastos, y matriz osteoide acompañantes. Por ejemplo, la actividad osteoinductiva de un factor osteoinductivo se puede demostrar por medio de un ensayo utilizando un sustrato sobre el cual se deposita el material que se va a someter a ensayo. El sustrato con material depositado se implanta subcutáneamente a un animal de ensayo. El implante se elimina con posterioridad y se examina microscópicamente para determinar la presencia de formación de hueso incluyendo la presencia de osteoblastos, osteoclastos, y matriz osteoide. Un procedimiento adecuado para evaluar la actividad osteoinductiva se ilustra en el Ejemplo 5 de la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.290.763. Si bien no está aceptada generalmente la escala de evaluación del grado de actividad osteogénica, ciertos factores son ampliamente reconocidos como indicadores de la formación de hueso. Tales factores son citados en la escala de 0-8 que es proporcionada en la Tabla 3 del ejemplo 1 de la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.563.124. La porción 0-4 de esta escala corresponde al sistema de puntuación descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.290.763, que está limitada a puntuaciones de 0-4. La porción restante de la escala, puntuaciones 5-8, cita niveles adicionales de maduración de formación de hueso. La escala ampliada también incluye la consideración de la resorción de colágeno, un factor que no se describe en la patente '763.

En estudios, una cantidad típica de MOD para su implantación es de 20 mg en un ratón y 40 mg en una rata. Incrementos significativos en la dosis de factor de crecimiento, por ejemplo, dosis 150x (o 150 veces el factor de crecimiento encontrado en MOD normal), conducen a significativamente más y potencialmente más rápido crecimiento óseo con mayor volumen de crecimiento óseo, crecimiento óseo más denso, nódulos de crecimiento óseo más grandes, mayor densidad a los rayos x, y, generalmente, una puntuación osteoinductiva más alta. Asociado con este aumento de osteoinductividad puede haber un caparazón cortical que rodea el nódulo y cierto nivel de vascularización en el nódulo. Sin embargo, la capacidad de medición cuantitativa está limitada generalmente por el método utilizado, y los incrementos de actividad osteoinductiva medidos generalmente no son lineales con el incremento de dosificación. De este modo, si 20 mg de MOD producen una actividad osteoinductiva de 1, 100 veces la dosis de factor de crecimiento (2000 mg de factores de crecimiento MOD) no producen una actividad osteoinductiva de 100. En lugar de eso, puede dar como resultado una actividad osteoinductiva de aproximadamente 20. Una limitación de la medición utilizando puntuaciones osteoinductivas es que, en algunas

situaciones, la capacidad de los sistemas para responder puede estar saturada. Así, por ejemplo, si la puntuación oscila solo de 1 a 4, dos muestras pueden tener la misma puntuación (4) pero, de hecho, pueden no ser comparables. Este es particularmente el caso en el que el hueso resultante de un método o implante es cualitativamente mejor que el hueso resultante de otro método o implante. Esto es, ambos métodos o implantes pueden dar como resultado una puntuación osteoinductiva de 4 pero uno puede dar como resultado hueso cualitativamente mejor que el otro. De este modo, en algunas situaciones puede ser deseable someter a ensayo la velocidad de crecimiento, la densidad, la presencia de hueso cortical, la formación de caparazón, y/u otros factores que muestran un aumento sobre la matriz ósea desmineralizada normal. Adicionalmente, además de, o en lugar de, someterla a ensayo a los 28 días, puede ser deseable someter a ensayo la inductividad a los 21 días. Generalmente, la inductividad se puede medir histomorfométricamente mediante métodos conocidos en la técnica.

Adicionalmente, puede constituir un reto suministrar 100 veces la dosis de factor de crecimiento. Al rellenar un defecto óseo, solo se puede utilizar tanto relleno como espacio vacío de hueso haya.

XI. Usos

Usos terapéuticos

Se pretende que el osteoimplante osteogénico sea aplicado en un sitio de reparación de hueso, por ejemplo, un sitio resultante de lesión, defecto producido aproximadamente durante el curso de cirugía, infección, malignidad, o malformación genética. El osteoimplante se puede utilizar en una amplia variedad de procedimientos ortopédicos, periodontales, neuroquirúrgicos, y orales y de cirugía maxilofacial.

En el momento inmediatamente anterior a la colocación del osteoimplante de la invención en un sitio con defecto, se pueden combinar materiales opcionales, p. ej., aspirado de médula ósea para autoinjerto, hueso para autoinjerto, preparaciones de células de autoinjerto seleccionadas, células de autoinjerto que contienen genes que codifican una acción promotora de hueso, etc., con el osteoimplante. El osteoimplante se puede implantar en el sitio de reparación de hueso, si se desea, utilizando cualquier medio de fijación adecuado; p. ej., suturas, grapas, bioadhesivos, tornillos, clavos, remaches, otras sujeciones y similares o se puede mantener en el sitio mediante el cierre de los tejidos blandos de su entorno.

Las composiciones osteoinductivas se pueden utilizar también como dispositivos liberadores de fármacos. En ciertas realizaciones, la asociación con las composiciones osteoinductivas incrementa la vida media del agente o los agentes biológicamente activos relevantes. Los dispositivos de liberación de fármacos de la invención particularmente preferidos se utilizan para liberar factores de crecimiento osteoinductivos. Otros agentes preferidos que se van a liberar incluyen factores o agentes que promueven la curación de heridas. No obstante, las composiciones osteoinductivas se pueden utilizar alternativamente o adicionalmente para liberar otros agentes farmacéuticos incluyendo antibióticos, agentes antineoplásicos, factores de crecimiento, factores hematopoyéticos, nutrientes, y otros agentes bioactivos descritos anteriormente. La cantidad de agente bioactivo incluido con la composición de MOD puede variar ampliamente y dependerá de factores tales como el agente que esté siendo liberado, el sitio de administración, y el estado fisiológico del paciente. Los niveles óptimos se determinan en un caso específico basándose en el uso pretendido del implante.

Usos no terapéuticos

Además de los usos terapéuticos que implican la implantación en un sujeto, las composiciones osteoinductivas tienen otros varios usos. Por ejemplo, se pueden utilizar para generar líneas celulares, tejidos, u órganos que tienen propiedades osteogénicas o condrogénicas. En particular, las células se pueden retirar de un donante y cultivar en presencia de la composición osteoinductiva. La invención incluye tales células así como los tejidos y órganos derivados de allí. Las células, tejidos, u órganos se pueden implantar en el donante original después de un período de cultivo in vitro o se pueden implantar en un sujeto diferente.

XII. Conclusión

En ciertas realizaciones, las composiciones osteoinductivas y osteoimplantes asociados producen hueso o cartílago en un modelo animal y/o en pacientes humanos con una cadencia similar y a un nivel de actividad osteogénica, osteoinductiva o condrogénica al menos 10%, 20%, 35%, 50%, 100%, 200%, 300%, o 400% o mayor que la de un portador corolarario que no ha sido expuesto a un tratamiento o a condiciones como se ha descrito en la presente memoria. Por supuesto, un experto en la técnica apreciará que estos valores pueden variar ligeramente dependiendo del tipo de ensayo utilizado para medir la osteoinductividad o actividad osteogénica o condrogénica descrita anteriormente. Los resultados de ensayo puede encontrarse dentro del intervalo de 10% a 35%, 35% a 50%, 50% a 100%, 100% a 200%, y 200% a 400%. En ciertas realizaciones, cuando se implanta un osteoimplante en un sitio con defecto óseo, el osteoimplante tiene una puntuación de osteoinductividad de al menos 1, 2, 3, o 4 en un modelo animal y/o en seres humanos.

Si bien la invención se ha descrito con referencia a las realizaciones preferidas, los expertos en la técnica advertirán que se puede realizar cambios en la forma y el detalle sin apartarse del alcance de la invención definida en reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición osteoinductiva, comprendiendo el método proporcionar hueso desmineralizado que ha sido desmineralizado utilizando un ácido; proporcionar factores osteoinductivos;
- 5 proporcionar un portador; y añadir los factores osteoinductivos al portador, caracterizado por que la etapa de provisión de los factores osteoinductivos comprende extraer los factores osteoinductivos del ácido.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la extracción de los factores osteoinductivos del hueso desmineralizado comprende utilizar ácido, eliminar el ácido, y concentrar los factores osteoinductivos.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la extracción de los factores osteoinductivos comprende adicionalmente extraer un coprecipitado.
4. El método de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente combinar los factores osteoinductivos y el coprecipitado en una mezcla homogénea.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en donde la adición de los factores osteoinductivos al portador comprende combinar la mezcla homogénea con el portador.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el portador se selecciona del grupo que consiste en virutas de hueso esponjoso, virutas corticales, fosfato de calcio sintético, mineral recuperado de un baño con ácido durante el procedimiento de desmineralización y polímeros configurables líquidos.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en donde la provisión de factores osteoinductivos comprende recuperar los factores osteoinductivos de un baño ácido de desmineralización.
8. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente añadir un agente bioactivo a la composición.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la adición de un agente bioactivo a la composición comprende añadir el agente bioactivo al portador.
- 25 10. El método de la reivindicación 1, en donde la provisión de hueso desmineralizado comprende someter hueso a una etapa de desmineralización con ácido seguida de una etapa de desengrasado/desinfección.
11. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente combinar los factores osteoinductivos con un vehículo de liberación biológicamente compatible antes de añadir los factores osteoinductivos al portador.
- 30 12. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente añadir un aditivo a la composición, en donde el aditivo se selecciona del grupo que consiste en sustancias radiopacas, materiales promotores de la angiogénesis, inhibidores de citoquinas, agentes bioactivos, otras sustancias médicamente/quirúrgicamente útiles, y otros agentes osteoinductores.
13. El método de la reivindicación 1;
- 35 en donde los factores osteoinductivos están soportados por el portador y la composición osteoinductiva, que comprende el portador y los factores osteoinductivos, exhibe un aumento de actividad osteoinductiva cuando se compara con un portador que no soporta factores osteoinductivos.
14. El método de la reivindicación 13, en donde los factores osteoinductivos comprenden proteínas no colagenosas.
15. El método de la reivindicación 13 o 14, que comprende adicionalmente proporcionar un coprecipitado, en donde el coprecipitado y los factores osteoinductivos forman una mezcla homogénea soportada por el portador.
- 40 16. El método de la reivindicación 15, en donde el coprecipitado comprende colágeno, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, componentes minerales de hueso recuperados durante la desmineralización, fragmentos mineralizados de hueso cortical o esponjoso o hueso parcialmente desmineralizado.
- 45 17. El método de la reivindicación 15, en donde el coprecipitado se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un fragmento colagenoso, albumen, almidón, carbohidratos, proteoglicanos, sulfato de heparina, concanavalina, calmodulina, polietilenglicol, ácido hialurónico, proteoglicanos, resinas hidrófobas y una proteína con secuencias RGD.

18. El método de la reivindicación 13, que comprende adicionalmente proporcionar un agente bioactivo, donde el portador osteoinductivo actúa como dispositivo de liberación para administrar el agente bioactivo.
19. El método de la reivindicación 13, y que comprende adicionalmente proporcionar un agente bioactivo.
- 5 20. El método de la reivindicación 18 o 19, en donde el agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en proteínas o péptidos osteogénicos o condrogénicos, sustancias anti-SIDA, sustancias anti-cancerosas, antibióticos, inmunosupresores, sustancias anti-virales, inhibidores de enzimas, hormonas, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, anti-histaminas, lubricantes, tranquilizantes, anti-convulsivos, relajantes musculares y sustancias anti-Parkinson, anti-espasmódicos y contractores musculares incluyendo bloqueadores de canales, mióticos y anti-colinérgicos, compuestos anti-glaucoma, compuestos anti-parasitarios y/o anti-protozoarios, moduladores de las interacciones de la matriz extracelular incluyendo inhibidores del crecimiento celular y moléculas anti-adherencia, agentes de vasodilatación, inhibidores de la síntesis de ADN, ARN o proteínas, anti-hipertensores, analgésicos, antipiréticos, agentes anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores anti-angiogénicos, factores angiogénicos, factores anti-secretores, anticoagulantes y/o agentes antitrombóticos, anestésicos locales, sustancias oftálmicas, prostaglandinas, anti-depresivos, anti-psicóticos, anti-eméticos, y agentes para la formación de imágenes.
- 10 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en donde el portador es hueso desmineralizado, hueso desmineralizado en superficie, hueso mineralizado, colágeno, mineral recuperado de hueso o polietilenglicol.
- 15 22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en donde el portador se selecciona del grupo que consiste de armazones esponjosos (mineralizados o desmineralizados); hueso específico de la especie (allogénico), extraído con guanidina, desmineralizado, particulado; hueso xenogénico, desmineralizado, extraído con proteína, particulado especialmente tratado; hidroxapatitas sintéticas; polímeros; hidrogeles; almidones; fosfato tricálcico, hidroxapatita sinterizada, hidroxapatita configurable; poli(ácido láctico); poli(carbonato de tirosina); sulfato de calcio; láminas de colágeno; fosfato de calcio configurable; cementos poliméricos; poli(alcoholes vinílicos) configurables; y poliuretanos.
- 20 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en donde la composición es configurable.
- 25 24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23, en donde la composición es inyectable.
25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 24, en donde el portador y los factores osteoinductivos comprenden un sistema de liberación.
26. El método de la reivindicación 25, en donde el portador comprende una pluralidad de láminas, recubriéndose cada lámina con factores osteoinductivos, en donde las láminas se apilan, formando de ese modo una estructura laminar.
- 30 27. El método de la reivindicación 26, que comprende adicionalmente proporcionar una capa adhesiva entre cada lámina.
28. El método de la reivindicación 25, en donde el portador comprende una lámina, estando recubierta la lámina con factores osteoinductivos, donde la lámina se enrolla o se pliega de manera que el contenido de factor de crecimiento en el interior de la lámina se aproxima al contenido de factor de crecimiento en la superficie de la lámina.
- 35 29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 28, en donde los factores osteoinductivos comprenden una mezcla homogénea.
30. El método de la reivindicación 29, en donde la mezcla homogénea comprende adicionalmente un agente volumétrico.
- 40 31. El método de la reivindicación 13, en donde el portador es matriz ósea desmineralizada y los factores osteoinductivos son factores de crecimiento osteoinductivos recuperados de baños con ácido utilizados para la desmineralización de la matriz ósea, y donde los factores de crecimiento y la matriz ósea desmineralizada se combinan de manera que la composición osteoinductiva exhibe la capacidad de inducir niveles de actividad fosfatasa alcalina específica de 2 a 100.000.000 veces mayor que las preparaciones de matriz ósea desmineralizada
- 45 32. El método de la reivindicación 13, en donde el portador comprende partículas óseas mineralizadas o desmineralizadas en superficie y donde los factores osteoinductivos son adsorbidos sobre superficies de partículas óseas mineralizadas o desmineralizadas en superficie y en donde se hacen eluir extractos unidos débilmente.