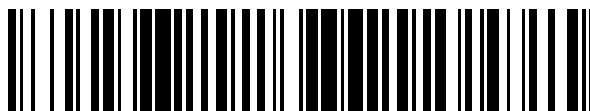


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 996**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 38/29** (2006.01)  
**A61K 38/39** (2006.01)  
**A61L 27/00** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2006 E 06701133 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1833505**

54 Título: **Tratamiento local de defectos óseos con matriz de liberación de PTH**

30 Prioridad:

**06.01.2005 US 641830 P**  
**10.01.2005 US 642848 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.07.2014**

73 Titular/es:

**KUROS BIOSURGERY AG (100.0%)**  
**TECHNOPARKSTRASSE 1**  
**8005 ZURICH, CH**

72 Inventor/es:

**SCHENSE, JASON;**  
**WATSON, JOHN y**  
**ARRIGHI, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 476 996 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**

Tratamiento local de defectos óseos con matriz de liberación de PTH

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de tratamiento local de áreas en huesos no sanos afectados por osteoporosis.

Antecedentes de la invención

Osteoporosis

10 La pérdida ósea es una parte natural de envejecimiento con pérdida de masa ósea tanto en hombres como mujeres a una velocidad de 0,6 a 1,2% por año, partiendo en promedio entre las edades de 40 a 50. Después de la menopausia en mujeres, se acelera la pérdida ósea a 2-3% por año. Sin embargo, en particular en mujeres posmenopáusicas, la velocidad de pérdida ósea puede incrementarse dramáticamente. Este estado de enfermedad es llamado osteoporosis. La osteoporosis es de principal importancia en todo el mundo, afectando casi a 200 millones de personas. En la actualidad, 10 millones de personas en los Estados Unidos sufren de osteoporosis y además 18 millones tienen osteopenia que los pone en riesgo de desarrollar la enfermedad. De esta población en riesgo, 80% son mujeres. La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica, que afecta en general al esqueleto completo en el cual la masa total ósea se disminuye y la estructura ósea se deteriora, lo cual incrementa la porosidad ósea. Estos cambios en la masa y estructura ósea, reducen la resistencia total del hueso y lo hacen propenso a fracturas.

20 La osteoporosis es una interacción compleja entre las hormonas sistémicas y factores locales y los mecanismos celulares exactos de osteoporosis permanecen por definirse. Como un resultado de las terapias actuales, no se abordan directamente las causas de la condición. Por ejemplo, derivados de los terapéuticos más comúnmente usados, los bisfosfonatos son como máximo, solamente 50% eficaces en la reducción de la incidencia de fractura. Los bisfosfonatos actualmente aprobados para uso incluyen, alendronato (FOSAMAX®), etidronato (DIDROCAL®) y risedronato (ACTONEL®). Considerados ya sea en forma de tableta o intravenosamente, los bisfosfonatos son una familia de fármacos usados para prevenir y tratar osteoporosis mediante el revestimiento de huesos y la prevención de actividad de osteoclastos.

Quistes óseos

30 Los quistes óseos son áreas líticas uniloculares benignas usualmente en el extremo próximo de un hueso largo con márgenes endosteales estrechos y bien definidos. Un quiste óseo unicameral, de otro modo conocido como quiste óseo simple, es una cavidad llena de fluido en el hueso, revestida por tejido fibroso comprimido. Ocurre usualmente en los huesos largos de un niño en crecimiento, especialmente la parte superior del húmero (50-60% del tiempo) o parte superior del fémur (25-30% del tiempo). Otros huesos, sin embargo, pueden verse afectados. Estos quistes usualmente afectan a los niños principalmente entre las edades de 5 a 15, pero pueden afectar niños más grandes o adultos. En niños más grandes y adultos, tiende a ocurrir en huesos planos (tales como la pelvis, mandíbula, cráneo o caja torácica) o en el hueso largo del talón (calcáneo).

40 Los quistes óseos unicamerales son considerados benignos. No son metastatizados (esparcidos) más allá del hueso. Algunos sanan espontáneamente, mientras otros se amplían. Los quistes más invasivos pueden crecer para llenar la mayoría de la metáfisis ósea (la zona de transición en donde el eje del hueso une el extremo del hueso) y causa lo que se conoce como fractura patológica. Un quiste más invasivo podría también destruir la placa de crecimiento óseo, conduciendo al acortamiento del hueso. Estos quistes son algunas veces, clasificados como o bien "activos" o bien "latentes". Un quiste activo es adyacente a la placa de crecimiento y tiende a ampliarse, causando los problemas mencionados anteriormente. Un quiste latente es uno que es más apto para sanar con tratamiento debido a que la placa de crecimiento ha migrado lejos del quiste.

45 El tratamiento actual está indicado principalmente en prevención de fracturas recurrentes. Se aplican actualmente los siguientes procedimientos quirúrgicos: Raspadas/Injerto óseo (un raspado quirúrgico del quiste con un instrumento especial llamado una cureta que tiene una cuchara, rizo o anillo en su punta), inyección de esteroide o inyección de médula ósea.

50 El quiste óseo subcondral periarticular, también referido como lesiones quísticas subcondrales (SCL), pueden ocurrir en caballos jóvenes y son una entidad clínica similar a quistes óseos unicamerales en humanos. Son entidades patológicas comúnmente reconocidas las cuales a menudo, conducen a cojera en caballos jóvenes. El sitio más común en el cual se encuentran SCL es en la babilla (el equivalente a la rodilla humana). Específicamente, los quistes óseos se encuentran en su mayoría en el aspecto que lleva el peso de la babilla (el cóndilo femoral medio) y

rara vez en otras ubicaciones dentro de la articulación (tibia lateral próxima y cóndilo femoral lateral). Los SCL son áreas radiolucientes del hueso que, dependiendo de su etapa de desarrollo, están bien demarcados del tejido circundante a través de un borde esclerótico y están, en general, llenos con tejido conjuntivo fibroso y fluido seroso que se asemeja al fluido sinovial. En caballos, una conexión de articulación a la superficie articular superpuesta puede encontrarse en un tercio de los casos. El tamaño de un quiste femoral medio varía desde defectos en forma de domo poco profundo (aproximadamente 8 mm x 3 mm) hasta quistes en forma ovoide grandes de 40 mm x 30 mm.

Las opciones de tratamiento para SCL que causan cojera incluyen reposo de largo plazo, terapia y cirugía corticoesteroide anti-artrítica e intra-articular. La terapia conservativa, la cual puede requerir de nueve a doce meses de reposo de ejercicios, ha sido asociada con la resolución de la cojera. Desafortunadamente, el número de caballos manejados por terapia conservativa que han sido evaluados en la literatura veterinaria es muy limitado, pero las relaciones de éxito son aproximadamente 50%.

Se han usado numerosas técnicas quirúrgicas en el tratamiento de quistes óseos equinos. El tratamiento recomendado actual involucra remoción artroscópica (raspada) de los contenidos quísticos, revestimiento de quiste y cartílago no soportado superpuesto. Técnicas adicionales usadas en un intento por intensificar la cicatrización y mejorar los resultados han incluido taladrado e injerto óseo, ambos de los cuales se considera ahora que no ofrecen beneficio. Además, los quistes óseos pueden continuar expandiéndose y finalmente, conducir a osteoartritis secundaria en la articulación equina.

Durante los pasados veinte años, se han investigado varios factores bioactivos por su capacidad para influenciar la regeneración de tejido óseo. La hormona paratiroides (PTH) es un péptido de 84 aminoácidos que es elaborado y secretado por la glándula paratiroides. Esta hormona juega un papel principal en controlar los niveles de calcio en el suero a través de su acción en varios tejidos, que incluyen hueso. Estudios en humanos con varias formas de hormona paratiroides han demostrado un efecto anabólico en el hueso cuando se aplica sistémicamente. Esto hace a la hormona paratiroides interesante para el tratamiento sistémico de osteoporosis y trastornos óseos relacionados (patente estadounidense n.º 5.747.456 por Chorev, *et al.*, y documento WO 00/10596 por Eli Lilly & Co.). La hormona paratiroides actúa en las células uniéndolas a un receptor de superficie celular. Este receptor es conocido por encontrarse en los osteoblastos, las células que son responsables de formar nuevos huesos.

El dominio de 34 aminoácidos N-terminal de la hormona paratiroides humana se ha notificado que es biológicamente equivalente a la hormona paratiroides de longitud completa. La hormona paratiroides<sub>1-34</sub> y su modo de acción se notificaron por primera vez en la patente estadounidense n.º 4.086.196. La investigación se ha hecho en la hormona paratiroides<sub>1-34</sub> y otras versiones truncadas de la forma de hormona paratiroides humana nativa, tal como por ejemplo, 1 a 25, 1 a 31 y 1 a 38 (véase por ejemplo, Rixon RH, *et al.*, *J Bone Miner. Res.*, 9(8): 1179-89 (Agosto de 1994).

El mecanismo por el cual la PTH influencia la remodelación ósea es complicado, el cual ha conducido a resultados conflictivos y subsecuentemente, a un número significativo de estudios en los mecanismos exactos involucrados. Se ha demostrado que si la PTH es administrada sistémicamente en una manera continua, tal densidad ósea disminuirá. Por el contrario, se ha reportado que si la misma molécula es administrada sistémicamente en forma pulsátil, la densidad ósea se incrementará (véase por ejemplo, documento WO 99/31137 por Eli Lilly & Co.). Esta contradicción aparente puede ser explicada por el mecanismo en el cual la PTH modula la remodelación ósea y subsecuentemente el parámetro observable de la densidad ósea. Dentro del hueso maduro, se ha mostrado sólo que el receptor de PTH está presente en la superficie de las células del linaje de osteoblastos, pero no en osteoclastos. El papel que juega la PTH en la remodelación ósea, es dirigido a través de los osteoblastos, en contraposición a los osteoclastos. Sin embargo, las células a diferentes etapas del linaje de osteoblasto, responden diferentemente cuando se unen a la hormona paratiroides. Por lo tanto, las diferencias dramáticas que se observan cuando la PTH es administrada usando diferentes métodos, pueden ser explicadas por el entendimiento de los efectos diferentes que tiene la misma molécula en las células diferentes dentro del linaje de osteoblastos.

Cuando la PTH se une a una célula madre mesenquimal, la célula es inducida a diferenciarse en un preosteoblasto. De este modo, agregando PTH al sistema, existe un incremento en la población de preosteoblastos. Sin embargo, estas células de preosteoblastos tienen el receptor de PTH también, y el subsecuente enlace de la PTH al receptor en estas células conduce a una respuesta diferente. Cuando la PTH se une a los preosteoblastos, resulta en dos consecuencias separadas que conducen a la resorción ósea. Primero, inhibe la diferenciación adicional de los preosteoblastos en osteoblastos. Segundo, incrementa la secreción de interleucina 6 (IL-6) de los preosteoblastos. La IL-6 inhibe tanto la diferenciación de preosteoblastos así como incrementa la diferenciación de preosteoclastos en osteoclastos. Esta respuesta dual a partir de las células dentro del linaje de osteoblastos, es la que proporciona la reacción compleja entre la remodelación ósea y exposición de PTH. Si la PTH se dosifica periódicamente por periodos cortos de tiempo, entonces las células madre mesenquimales son inducidas a diferenciarse en osteoblastos. Los periodos de dosificación cortos entonces previene que los preosteoblastos recientemente formados produzcan IL-6, previniendo la activación de los osteoclastos. Por lo tanto, durante los intervalos de dosificación, estos preosteoblastos recientemente formados pueden además diferenciarse en osteoblastos,

resultando en formación ósea. Sin embargo, si se aplica una dosis constante de PTH, entonces los preosteoblastos tendrán la oportunidad de comenzar a producir IL-6, activando de este modo los osteoclastos e inhibiéndolos, conduciendo al efecto opuesto: resorción ósea.

Otro factor bioactivo el cual ha sido explorado es el grupo de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), y factores de crecimiento transformantes (TGF  $\beta$ ). Existen al menos 20 BMP estructuralmente y funcionalmente relacionadas y varios TGF- $\beta$ , los cuales son elementos de la superfamilia de TGF-beta. Las BMP fueron originalmente identificadas como reguladores de proteína de formación ósea y cartílago. También están involucradas en la embriogénesis y morfogénesis de varios tejidos y órganos. Las BMP regulan el crecimiento, diferenciación, quimiotaxis y apoptosis de varios tipos celulares, que incluyen células mesenquimales, células epiteliales, células hematopoyéticas y células neuronales. Similares a otras proteínas de la familia de TGF-beta, las BMP están altamente conservadas entre especies animales.

Las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 7 (BMP 2 y 7) son de interés específico en las aplicaciones de formación de cartílago y hueso. La BMP 2 induce la formación de tanto cartílago como hueso. La proteína es sintetizada como un prepeptido. La BMP 2 prepeptido humana de longitud completa es un polipéptido glicosilado que tiene una secuencia de 396 aminoácidos, que consiste de una secuencia señal de 19 aminoácidos, una proregión de 263 aminoácidos y un segmento maduro de 114 aminoácidos. La escisión de la proregión ocurre antes de la segregación. La forma madura tiene 7 restos cisteína y un sitio de glicosilación ligado a N. La forma funcional de la proteína consiste de dos cadenas maduras ligadas a disulfuro. Se ha encontrado que las variantes de BMP 2 que consistentemente solamente de la secuencia de aminoácidos madura de BMP 2, tal como los aminoácidos 283 a 396, también exhiben actividad biológica.

La BMP 7 humana, o proteína-1 osteogénica (Op-1), es una preproteína de 431 aminoácidos que se escinde, similarmente a BMP 2, en una preproregión de 292 aminoácidos y un segmento maduro de 139 aminoácidos. El segmento maduro contiene tres sitios de glicosilación ligados a N posibles más siete residuos de cisteína.

Para reparación o regeneración de tejido, las células deben migrar a un lecho de la herida, proliferar, expresar componentes de matriz o formar matriz extracelular, y formar una forma de tejido final. Las poblaciones de células múltiples a menudo participan en esta respuesta morfogenética, frecuentemente incluyendo células vasculares y nervios. Las matrices que tienen los factores bioactivos incorporados en las mismas, han demostrado que mejoran enormemente, y en algunos casos, se ha encontrado que son esenciales para que esto ocurra. Se han hecho enfoques en el desarrollo de matrices a partir de orígenes naturales o sintéticos o una mezcla de ambos. Las matrices en crecimiento de células naturales son sometidas a remodelación por influencias celulares, todas basadas en proteólisis, por ejemplo, por plasmina (degradación de fibrina) y metaloproteinasas de matriz (degradación de colágeno, elastina, etc.). Tal degradación está altamente localizada y ocurre solamente después del contacto directo con la célula migrante. Además, el suministro de proteínas de señalización de células específicas tales como factores de crecimiento está estrechamente regulado. En el modelo natural, las matrices en crecimiento de células macroporosas no se usan, en su lugar, se forman matrices microporosas que las células pueden degradar, localmente y después de la demanda, conforme las células migran a la matriz. Debido a problemas referentes a inmunogenicidad, producción costosa, disponibilidad limitada, variabilidad de lotes y purificación, matrices basadas en moléculas precursoras sintéticas, tales como polietilenglicol modificado, han sido desarrolladas para la regeneración de tejidos en y/o sobre el cuerpo.

Aunque se ha hecho mucho trabajo estudiando los efectos sistémicos de la PTH, como se describe anteriormente, la investigación apenas ha explorado la administración local o tópica de la PTH. En el documento WO 03/052091, se ha descrito una forma para administrar localmente la PTH. El documento WO 03/052091 describe que la hormona paratiroides está covalentemente unida a matrices naturales y sistémicas, en particular, matrices de polietilenglicol y fibrina. En tal forma, la hormona paratiroides puede administrarse localmente y liberarse en el sitio de necesidad de forma controlada. Se ha mostrado en el documento WO 03/052091 que este sistema activa la formación de tejido óseo en huesos sanos.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un método de tratamiento local de áreas en huesos no sanos, es decir, huesos afectados por osteoporosis.

#### Sumario de la invención

Se ha encontrado sorprendentemente que áreas de huesos no sanos, por ejemplo, huesos o áreas de hueso específicas que están afectadas y debilitadas por osteoporosis, pueden tratarse eficazmente por la administración local de factores bioactivos.

De este modo, la presente invención se refiere al uso de una formulación que comprende un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de una PTH y una BMP o un péptido de fusión que comprende una PTH o BMP en un primer dominio, y un dominio de sustrato covalentemente reticulable en un segundo dominio, y una

composición capaz de formar una matriz en un sitio en el hueso en necesidad de tratamiento, para la manufactura de un medicamento para tratar localmente áreas de huesos no sanos.

5 Las matrices que contienen un factor bioactivo (también denominado en este documento "matrices suplementadas"), que son adecuadas para la regeneración local de áreas de huesos no sanos o el incremento local de densidad ósea en áreas de huesos no sanos y métodos para elaborar y usar las matrices, se describen en este documento. En una realización preferida, el factor bioactivo se incorpora de manera liberable en la matriz. La matriz puede formarse *in situ*, en el sitio de áreas de huesos no sanos o, dependiente de la indicación, puede formarse fuera del cuerpo y aplicarse en el cuerpo en una forma pre-configurada a través de cirugía. El factor bioactivo es liberado de la matriz y activa la regeneración de tejido óseo localmente. Los factores bioactivos adecuados incluyen moléculas, péptidos y proteínas que tienen las capacidades de activar la regeneración de tejido óseo. El factor bioactivo es preferiblemente PTH o una BMP. Las hormonas paratiroides pueden ser PTH<sub>1-84</sub> (nativa), PTH<sub>1-38</sub>, PTH<sub>1-34</sub>, PTH<sub>1-31</sub>, PTH<sub>1-28</sub> ó PTH<sub>1-25</sub>, o cualquiera de las versiones modificadas o alélicas de PTH que tienen las capacidades de activación de regeneración de tejido óseo. Los factores bioactivos más preferidos son PTH<sub>1-34</sub> o BMP<sub>2</sub>. En una realización, el factor bioactivo es un péptido de fusión. El péptido de fusión contiene un primer dominio que comprende el factor bioactivo, preferiblemente PTH o BMP, y un segundo dominio que comprende un dominio de sustrato reticulable.

En una realización preferida adicional, el factor bioactivo forma parte de una composición precursora adecuada para formar una matriz suplementada en el sitio de necesidad en el hueso afectado. La composición para formar la matriz suplementada es preferiblemente inyectable y se forma a partir de componente(s) precursor(es) líquido(s) (a 25°C). Un método para administrar la matriz suplementada a y/o en áreas de huesos no sanos requiere al menos un componente precursor líquido capaz de formar una matriz a temperaturas fisiológicas y un factor bioactivo y aplicar el componente precursor y el factor bioactivo a y/o en el área de huesos no sanos. Los defectos óseos, es decir, las áreas de huesos no sanos, son en general áreas de huesos que están afectadas por osteoporosis. En el caso de hueso osteoporótico, el tratamiento resulta en un incremento local de densidad ósea en la parte osteoporótica del hueso, las cuales pueden ser, por ejemplo, el cuello femoral o vértebra (y de este modo, la tasa de fractura inferior del hueso o parte del hueso). En tal sentido, el método para tratar áreas no sanas de huesos con la matriz suplementada tal como se describe en la presente solicitud es un tratamiento profiláctico, en particular, para la prevención de fracturas óseas.

Preferiblemente, la matriz es una matriz de fibrina o una matriz a base de polietilenglicol.

30 Las células también pueden agregarse a la matriz antes de o al tiempo del implante, o incluso subsecuentemente al implante, ya sea en o subsecuente a la reticulación del polímero para formar la matriz. Esto puede ser además de o en lugar de la reticulación de la matriz para producir el espacio intersticial diseñado para promover la proliferación celular o en crecimiento.

En una realización, la matriz contiene uno o más agentes de contraste, y también puede formarse en la ausencia de un factor de crecimiento. En general, los agentes de contraste permiten obtener imágenes de la distribución y posicionamiento de la formulación durante la inyección y gelificación. Si se usa la formulación sin un factor bioactivo, la matriz puede usarse preferiblemente en el tratamiento de quistes llenos de fluido tales como quistes Tarlov, quistes de ovario, quistes aracnoides, quistes óseos aneurismales o quistes hepáticos.

Por lo tanto, la presente invención también da a conocer una formulación que comprende

- i) una composición capaz de formar una matriz bajo condiciones fisiológicas;
- 40 ii) una PTH, una BMP o un péptido de fusión que comprende al menos dos dominios en donde el primer dominio comprende una PTH y el segundo dominio comprende un dominio de sustrato reticulable; y
- iii) un agente de contraste.

La presente invención también está relacionada con una matriz suplementada que comprende un material de matriz natural o sintética, una PTH y un agente de contraste.

45 La presente invención también está relacionada con un kit que comprende fibrinógeno, trombina, una fuente de calcio, PTH y un agente de contraste.

#### Breve descripción de las figuras

50 La figura 1 muestra la bioactividad de variantes de PTH. Las células transfectadas con un gen indicador ligado a un promotor para un receptor de PTH se trataron con cantidades iguales de o bien PTH<sub>1-34</sub>, TG-pl-PTH<sub>1-34</sub> (descrito posteriormente) o bien el patrón internacional de 84 aminoácidos. La inhibición de la expresión del gen indicador de luciferasa se midió y comparó con células transfectadas que no se expusieron a PTH en solución (control).

La figura 2 muestra los resultados de un ensayo de liberación de PTH a partir de una matriz de fibrina.

#### Descripción detallada de la invención

Se describe en este documento un método para el tratamiento local de defectos y estructuras óseas en huesos no sanos (áreas resumidas de huesos no sanos). Preferiblemente, son áreas tratadas en hueso osteoporótico. El método usa matrices naturales y sintéticas que tienen PTH, incorporada de manera liberable en la matriz. Las matrices suplementadas son inyectables, biocompatibles y biodegradables y pueden formarse *in vitro* o *in vivo* al tiempo del implante. El factor bioactivo puede incorporarse en las matrices y retener su bioactividad completa. El factor bioactivo particularmente preferido PTH<sub>1-34</sub> puede ser incorporarse de manera liberable por interacción covalente o no covalente con la matriz, usando técnicas que proporcionan control sobre cómo y cuándo y a qué grado la PTH se libera, de manera que la matriz suplementada puede usarse para la reparación de tejido directamente o indirectamente, usando la matriz suplementada como un vehículo de liberación controlada.

#### Definiciones

“*Sitio de adhesión o sitio de unión celular*” como se usa en general en este documento, se refiere a una secuencia peptídica en la cual una molécula, por ejemplo, un receptor que promueve la adhesión en la superficie de una célula, se enlaza. Ejemplos de sitios de adhesión incluyen, pero no se limitan a, la secuencia RGD a partir de fibronectina, y la secuencia YIGSR (SEQ ID NO: 1) de laminina. Los sitios de adhesión pueden incorporarse opcionalmente en la matriz, incluyendo un dominio de sustrato reticulable a la matriz de fibrina.

“*Actividad biológica*”, como se usa en general en este documento, se refiere a eventos funcionales mediados por una proteína de interés. En algunas realizaciones, esto incluye eventos ensayados midiendo las interacciones de un polipéptido con otro polipéptido. También incluye ensayar el efecto que la proteína de interés tiene en el crecimiento, diferenciación, muerte, migración, adhesión celular, interacciones con otras proteínas, actividad enzimática, fosforilación o desfosforilación de proteína, transcripción o traducción.

“*Enlace insaturado conjugado*”, como se usa en general en este documento, se refiere a la alternancia de enlaces múltiples carbono-carbono, carbono-heteroátomo o heteroátomo-heteroátomo con enlaces únicos, o el enlace de un grupo funcional a una macromolécula, tal como un polímero sintético o una proteína. Tales enlaces pueden someterse a reacciones de adición.

“*Grupo insaturado conjugado*”, como se usa en general en este documento, se refiere a una molécula o una región de una molécula que contiene una alternancia de enlaces múltiples carbono-carbono, carbono-heteroátomo o heteroátomo-heteroátomo con enlaces únicos, que tiene un enlace múltiple el cual puede someterse a reacción de adición. Ejemplos de grupos insaturados conjugados incluyen, pero no se limitan a vinilsulfonas, acrilatos, acrilamidas, quinonas y vinipiridinos, por ejemplo, 2- o 4-vinilpiridinio e itaconatos.

“*Agentes de contraste*”, como se usa en general en este documento, significa una molécula o sustancia usada para incrementar un contraste de una imagen y que permite monitorizar la sustancia o molécula en el cuerpo.

“*Reticulación*”, como se usa en general en este documento, significa la formación de enlaces covalentes.

“*Densidad de reticulación*”, como se usa en general en este documento, se refiere al peso molecular promedio entre dos reticulaciones ( $M_c$ ) de las moléculas respectivas.

“*Estado de equilibrio*”, como se usa en general en este documento, como el estado en el cual un hidrogel no se somete a incremento o pérdida de masa cuando se almacena bajo condiciones constantes en agua.

“*Peso equivalente*”, como se usa en general en este documento, se refiere a mmol de grupo funcional/g de sustancia.

“*Matriz de fibrina*”, como se usa en general en este documento, significa el producto de un proceso en el cual, sustancialmente todo los componentes precursores fibrinógeno y trombina, se reticulan en la presencia de una fuente de calcio y factor XIIIa para formar una red tri-dimensional. Los términos matriz, gel y red polimérica o tri-dimensional, se usan de manera sinónima.

“*Funcionalizar*”, como se usa en general en este documento, se refiere a modificar una molécula en una manera que resulta en la unión de un grupo o porción funcional. Por ejemplo, una molécula puede ser funcionalizada por la introducción de una molécula que hace a la molécula un nucleófilo fuerte o una molécula insaturada conjugada. Preferiblemente, una molécula por ejemplo PEG, es funcionalizada para llegar a ser un tiol, amina, acrilato o quinona. Proteínas, en particular, pueden también ser efectivamente funcionalizadas por reducción parcial o completa de enlaces disulfuro para crear tioles libres.

“*Funcionalidad*”, como se usa en general en este documento, se refiere al número de sitios activos en una molécula.

“*Funcionalidad de los puntos de ramificación*”, como se usa en general en este documento, se refiere al número de ramas que se extienden de un punto en la molécula.

5 “*Proteínas o péptidos de fusión*”, como se usa en general en este documento, se refiere a un péptido o proteína que contiene al menos, un primer y un segundo dominio. Un dominio contiene un factor bioactivo, preferiblemente PTH 1-34, BMP 2 ó BMP 7 y el otro dominio contiene un dominio de sustrato reticulable a una matriz durante o después de su formación. Un sitio de degradación hidrolítica o enzimática, también puede estar presente entre el primer y el segundo dominio.

10 “*Matriz*”, como se usa en general en este documento, se refiere a un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido o función del tejido, dependiendo del material ya sea permanentemente o temporalmente. La matriz puede servir como un dispositivo de suministro para factores bioactivos incorporados en este y/o como una matriz de crecimiento celular. Las matrices descritas aquí, se forman de componentes precursores líquidos los cuales son capaces de formar un andamiaje en el cuerpo en el sitio de necesidad. Los términos “matriz” y “gel” se usan de manera sinónima en este documento. Los términos “matriz” y  
15 “gel”, se refieren a la composición formada después que los componentes precursores son mezclados en conjunto. De este modo, los términos “matriz” y “gel”, abarcan redes poliméricas parcialmente o completamente reticuladas. Pueden estar en la forma de un líquido, semi-sólido, tal como pasta, o un sólido.

“*Multifuncional*”, como se usa en general en este documento, se refiere a más de un grupo funcional electrófilo y/o nucleófilo por molécula (es decir, monómero, oligo y polímero).

20 “*Polímeros o componentes precursores que se originan naturalmente*”, como se usa en general en este documento, se refiere a moléculas las cuales podrían encontrarse en la naturaleza.

25 “*Hueso no sano o áreas de huesos no sanos*”, como se usa en general en este documento, se refiere a un hueso o partes del hueso, las cuales tienen trastornos causados por deterioro estructural o genético, causados por osteoporosis, inflamación local como en quistes óseos o crecimiento de tumor como en cáncer, es decir, a la estructura ósea en un estado enfermo, independientemente del tipo de enfermedad. Se contempla que las fracturas óseas en hueso osteoporótico son un defecto óseo en el sentido de la presente invención.

30 “*Osteoporosis*”, como se usa en general en este documento, se refiere a una enfermedad esquelética, sistémica caracterizada por masa ósea baja y deterioro estructural de tejido óseo, lo que incrementa la porosidad ósea y susceptibilidad a fracturas. La pérdida ósea es asintomática, algunas personas pueden no ser conscientes de que tienen osteoporosis hasta que sufren fracturas óseas. Se conocen dos tipos principales de osteoporosis: osteoporosis primaria y osteoporosis secundaria. La osteoporosis primaria es subdividida en osteoporosis tipo I, la cual afecta mujeres en quienes el comienzo de la menopausia ha causado pérdida ósea acelerada; y osteoporosis tipo II, la cual afecta personas en quienes el proceso de envejecimiento ha conducido a una reducción en la densidad ósea. La osteoporosis secundaria ocurre en personas quienes experimentan pérdida ósea secundaria a  
35 otras enfermedades o quienes usan ciertos tipos de fármacos. La muñeca, vértebras y cadera son principalmente susceptibles a fracturas relacionadas con osteoporosis. Se prefiere el tratamiento de osteoporosis tipo I.

40 “*Matrices de polietilenglicol*”, como se usa en general en este documento, significa el producto de un proceso en el cual al menos dos componentes de polietilenglicol precursores con grupos funcionales, se reticulan auto-selectivamente entre sí para formar una red reticulada tri-dimensional. Estos sistemas se conocen y describen, tal como en el documento WO 03/052091.

45 “*PTH*”, como se usa en este documento, incluye la secuencia humana de PTH<sub>1-84</sub> y todas las versiones truncadas, modificadas y alélicas de PTH, la cual exhibe propiedades de formación ósea, en particular, cuando se incorpora preferiblemente unida covalentemente a una matriz de fibrina. Las versiones truncadas preferidas de PTH son PTH<sub>1-38</sub>, PTH<sub>1-34</sub>, PTH<sub>1-31</sub> o PTH<sub>1-25</sub>. Se prefiere más PTH<sub>1-34</sub>. Preferiblemente, la PTH es la PTH humana, aunque la PTH de otras fuentes, tales como PTH bovina, pueden ser adecuadas.

“*Periostio*”, como se usa en este documento, significa la capa externa de huesos que forma una capa fibrosa, densa, con la excepción de aquellas porciones que forman una estructura de articulación la cual cubre la estructura ósea completa y contiene la vasculatura que alimenta el tejido óseo exterior.

50 “*Fisiológico*”, como se usa en general en este documento, significa condiciones que se pueden encontrar en vertebrados vivos. En particular, las condiciones fisiológicas se refieren a las condiciones en el cuerpo humano, tales como temperatura y pH. Las temperaturas fisiológicas significan, en particular, un intervalo de temperatura de entre 35°C y 42°C, preferiblemente de aproximadamente 37°C.

"Red polimérica", como se usa en general en este documento, significa el producto de un proceso en el cual sustancialmente todos los monómeros, oligos o polímeros se unen por enlaces covalentes intermoleculares a través de sus grupos funcionales disponibles para dar como resultado una molécula inmensa.

5 "Nucleófilo fuerte", como se usa en general en este documento, se refiere a una molécula la cual es capaz de donar un par de electrones a un electrófilo en una reacción que forma enlace polar. Preferiblemente, el nucleófilo fuerte es más nucleófilo que el agua a pH fisiológico. Ejemplos de nucleófilos fuertes son tioles y aminas.

"Moléculas precursoras sintéticas", como se usa en general en este documento, se refiere a moléculas las cuales no existen en la naturaleza.

10 "Reacción auto-selectiva", como se usa en general en este documento, significa que el primer componente precursor de una composición reacciona mucho más rápido que el segundo componente precursor de la composición y *vice versa*, que con otros compuestos presentes en una mezcla o en el sitio de la reacción. Como se usa en este documento, el nucleófilo preferencialmente se une a un electrófilo y un electrófilo preferencialmente se une a un nucleófilo fuerte, en vez de a otros compuestos biológicos.

15 "Hinchamiento" como se usa en general en este documento, se refiere al incremento en volumen y masa por captación de agua por la matriz. Los términos "captación de agua" e "hinchamiento", son usados sinónimamente a través de esta solicitud.

"Matriz suplementada" como se usa en general en este documento, se refiere a una matriz en la cual se incorporan de manera liberable factores bioactivos, opcionalmente péptidos de fusión. Los factores bioactivos son incorporados a través de interacción ya sea covalente o no covalente.

## 20 I. Matrices suplementadas

### A. Materiales de matriz

25 La matriz se forma por reticulación iónicamente, covalentemente, o por combinaciones de las mismas, de moléculas precursoras para dar una red polimérica y/o por hinchamiento de uno o más materiales poliméricos, es decir, matrices, para formar una red polimérica que tiene suficiente espaciado entre polímeros, para permitir crecimiento o migración en la matriz de células. En una realización, la matriz se forma de proteínas, preferiblemente proteínas naturalmente presentes en el paciente en el cual va a implantarse la matriz. Una proteína de matriz particularmente preferida es fibrina, aunque también pueden usarse matrices elaboradas de otras proteínas, tales como colágeno y gelatina. Polisacáridos y glicoproteínas, también pueden ser usados para formar la matriz. También es posible usar polímeros sintéticos, los cuales son reticulables por enlace covalente o iónico.

### 30 *Matrices de fibrina*

35 La fibrina es un material natural, el cual se ha notificado para varias aplicaciones biomédicas. La fibrina ha sido descrita como material para matrices en crecimiento celular en la patente estadounidense n.º 6.331.422 por Hubell *et al.* Los geles de fibrina han sido usados como sellantes debido a su capacidad para enlazarse a muchos tejidos y su papel natural en la cicatrización de heridas. Algunas aplicaciones específicas incluyen uso como un sellante para unión de injerto vascular, unión de válvula cardíaca, posicionamiento óseo en reparación de fracturas y tendón. Adicionalmente, estos geles han sido usados como dispositivos de suministro de fármacos, y para regeneración neuronal. Aunque la fibrina proporciona un soporte sólido para regeneración de tejido y crecimiento celular, existen pocas secuencias activas en el monómero que directamente mejoran estos procesos.

40 El proceso por el cual el fibrinógeno es polimerizado para dar fibrina, también ha sido caracterizado. Existen varias proteasas posibles que pueden escindir el fibrinógeno, que incluyen trombina, peptidasa y proteasa III, y cada una corta la proteína en un sitio diferente. Una vez escindido el fibrinógeno, ocurre una etapa de auto-polimerización en la cual los monómeros de fibrinógeno se juntan y forman un gel de polímero no covalentemente reticulado. Este auto-montaje ocurre debido a que los sitios de enlace llegan a exponerse después de ocurrir la escisión de proteasa. Una vez que se exponen, estos sitios de enlace en el centro de la molécula pueden enlazarse a otros sitios en las cadenas de fibrinógeno, las cuales están presentes en los extremos de las cadenas peptídicas. De esta manera, se forma una red polimérica. El factor XIIIa, una transglutaminasa activada a partir del factor XIII por proteólisis de trombina, puede entonces covalentemente reticular la red polimérica. Existen otras transglutaminasas y también pueden estar involucradas en reticulación covalente e injerto a la red de fibrina.

50 Una vez que se forma un gel de fibrina reticulado, la degradación subsecuente es estrechamente controlada. Una de las moléculas claves en controlar la degradación de fibrina es el inhibidor de  $\alpha$ 2-plasmina. Esta molécula actúa por reticulación en la cadena  $\alpha$  de fibrina a través de la acción del factor XIIIa. Al unirse al gel, una alta concentración de inhibidor puede ser localizado en el gel. El inhibidor entonces actúa previniendo el enlace de plasminógeno a fibrina



e inactivando plasmina. El inhibidor de  $\alpha$ 2-plasmina contiene un sustrato de glutamina. La secuencia exacta ha sido identificada como NQEQVSPL (SEQ ID NO: 2), siendo la primera glutamina el aminoácido activo para reticulación.

Se ha demostrado que los péptidos bi-dominios, los cuales contienen una secuencia de sustrato del factor XIIIa y una secuencia peptídica bioactiva, pueden ser reticulados en la matriz de fibrina y que este péptido bioactivo retiene su actividad celular *in vitro*.

Dependiendo de la indicación y sustancias mezcladas en la matriz de fibrina, la concentración de trombina podría variar. En una realización preferida, la matriz de fibrina contiene fibrinógeno en un intervalo de 5 a 65 mg por mililitro de matriz de fibrina, más preferiblemente de 15 a 60 mg por mililitro de matriz de fibrina, aún más preferiblemente desde 25 hasta 55 mg por mililitro de matriz de fibrina, y lo más preferiblemente de 30 a 45 mg por mililitro de matriz de fibrina. La trombina está presente en un intervalo de 0,5 a 5 U.I. por mililitro de matriz de fibrina, más preferiblemente en un intervalo de entre 1,25 y 3,25 U.I. por mililitro de matriz de fibrina, lo más preferiblemente desde 1,5 hasta 2,5 U.I. por mililitro de matriz de fibrina. Adicionalmente, una fuente de ión de calcio, ayuda a formar la matriz de fibrina. La fuente de ión de calcio es preferiblemente  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en una concentración de 0,5 a 5 mg por ml de matriz de fibrina, aún más preferiblemente de 2 a 3,5 mg por ml de matriz de fibrina, lo más preferiblemente de 2,5 a 3 mg por ml de matriz de fibrina. U.I. representa una unidad internacional de trombina y está definido como la actividad contenida en 0,0853 mg del Primer Estándar Internacional de Trombina Humana. Las matrices de fibrina suplementada formadas de materiales presentes en estos intervalos de concentración, son preferiblemente usadas para todas las indicaciones las cuales no requieren la adición de un agente de contraste, como quistes óseos y tumores óseos.

Cuando uno o más agentes de contraste están presentes en la matriz, la cantidad de trombina en la matriz de fibrina es en general mayor que la cantidad de trombina en la misma matriz de fibrina en la ausencia de un agente de contraste. Los agentes de contraste son preferiblemente agregados cuando se usa la matriz suplementada como un tratamiento profiláctico, para prevenir fracturas en huesos osteoporóticos, es decir, inyección en la vértebra o cuello femoral. En estos casos, la matriz de fibrina típicamente contiene trombina en un intervalo de concentración de entre 7,5 y 125 U.I. de trombina por mililitro de matriz de fibrina, preferiblemente, en un intervalo de entre 25 y 50 U.I. de trombina por mililitro de matriz de fibrina y lo más preferido en un intervalo de entre 35 y 40 U.I. de trombina por mililitro de matriz de fibrina.

#### Soluciones precursoras para formar matrices de fibrina

Preferiblemente, se usan dos soluciones precursoras para formar una matriz de fibrina. La primera solución precursora contiene fibrinógeno, preferiblemente de 10 a 130 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 30 a 120 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, aún más preferiblemente desde 50 hasta 110 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, y lo más preferiblemente de 60 a 90 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora. Si tiene que agregarse trombina para formar la matriz y en aquellos casos en los cuales la indicación requiere uno o más agentes de contraste, la segunda solución precursora contiene trombina, preferiblemente de 15 a 250 U.I. de trombina por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 50 a 100 U.I. de trombina por mililitro de solución precursora, y lo más preferiblemente de 70 a 80 U.I. de trombina por mililitro de solución precursora. Adicionalmente, una fuente de ión de calcio puede estar presente en al menos una de las soluciones precursoras. La fuente de ión de calcio es preferiblemente  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , preferiblemente en una concentración de 1 a 10 mg por ml de solución precursora, aún más preferible de 4 a 7 mg por ml de solución precursora, lo más preferiblemente de 5 a 6 mg por ml de solución precursora. Opcionalmente, una enzima capaz de catalizar la formación de matriz, tal como el factor XIIIa, se agrega en al menos una solución precursora. Preferiblemente, el factor XIIIa está presente en una concentración de 0,5 a 100 U.I. por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 1 a 60 U.I. por mililitro de solución precursora, y lo más preferiblemente de 1 a 10 U.I. por mililitro de solución precursora.

En casos en los cuales la presencia de un agente de contraste no se requiere, la matriz de fibrina es preferiblemente formada a partir de, preferiblemente, dos soluciones precursoras. La primera solución precursora típicamente contiene fibrinógeno, preferiblemente en un intervalo de concentración de desde 10 hasta 130 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, más preferiblemente desde 30 hasta 120 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, aún más preferiblemente desde 50 hasta 110 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, y lo más preferiblemente desde 60 hasta 90 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora. Si tiene que agregarse trombina para formar la matriz, la segunda solución precursora contiene trombina, preferiblemente en un intervalo de concentración de desde 1 hasta 10 U.I. de trombina por mililitro de solución precursora, más preferiblemente desde 2,5 hasta 6,5 U.I. de trombina por mililitro de solución precursora, lo más preferiblemente desde 3 hasta 5 U.I. de trombina por mililitro de solución precursora. Adicionalmente, hay una fuente de ión de calcio en una de las soluciones precursoras. La fuente de ión de calcio es preferiblemente  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en un intervalo de concentración de desde 1 hasta 10 mg por ml de solución precursora, aún más preferiblemente, desde 4 hasta 7 mg por ml de solución precursora, lo más preferiblemente desde 5 hasta 6 mg por ml de solución precursora. Opcionalmente una enzima capaz de catalizar la formación de matriz, como el factor XIIIa, se agrega a una solución precursora. Preferiblemente, el factor XIIIa está presente en un intervalo de concentración de desde 0,5 hasta

100 U.I. por mililitro de solución precursora, más preferiblemente desde 1 hasta 60 U.I. por mililitro de solución precursora, y lo más preferiblemente desde 1 hasta 10 U.I. por mililitro de solución precursora.

#### Matrices sintéticas y soluciones precursoras

5 Las reacciones de reticulación para formar matrices sintéticas para aplicación en el cuerpo incluyen (i) polimerización por radicales libres entre dos o más precursores que contienen enlaces dobles insaturados, como se describe en Hern *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 39:266-276 (1998), (ii) reacción de sustitución nucleófila tal como por ejemplo, entre un precursor que incluye un grupo amina y un precursor que incluye un grupo succinimidilo como se describe en la patente estadounidense n.º 5.874.500 por Rhee *et al.*, (iii) reacciones de condensación y adición, y (iv) reacciones de adición de tipo Michael entre un nucleófilo fuerte y un grupo o enlace insaturado conjugado (como un electrófilo fuerte). Se prefiere particularmente la reacción entre una molécula precursora que tiene un grupo tiol o amina como grupo nucleófilo y moléculas precursoras que incluyen grupos de acrilato o vinilsulfona como grupos electrófilos. El grupo nucleófilo más preferido es el grupo tiol. Las reacciones de adición de tipo Michael son descritas en el documento WO 00/44808 por Hubbell *et al.* Las reacciones de adición de tipo Michael, permiten reticulación *in situ* de al menos un primer y segundo componente precursor bajo condiciones fisiológicas en una manera auto-selectiva, incluso en la presencia de materiales biológicos sensibles. Cuando uno de los componentes precursores tiene una funcionalidad de al menos dos, y al menos uno de los otros componentes precursores tiene una funcionalidad mayor de dos, el sistema reaccionará auto-selectivamente para formar una matriz tri-dimensional reticulada.

20 Preferiblemente, los grupos insaturados conjugados o enlaces insaturados conjugados son acrilatos, vinilsulfonas, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, acrilonitrilos, vinilsulfonas, 2- o 4-vinilpiridinio, maleimidadas o quinonas.

25 Los grupos nucleófilos son preferiblemente grupos tiol, grupos amino o grupos hidroxilo. Los grupos tiol son sustancialmente más reactivos que los grupos amina no protonados. El pH es importante en esta consideración: el tiol desprotonado es sustancialmente más reactivo que el tiol protonado. Por lo tanto, las reacciones de adición que involucran una insaturación conjugada, tal como un acrilato o una quinona, con un tiol para convertir dos componentes precursores en una matriz, a menudo serán mejor llevados a cabo más rápidamente y auto-selectivamente a un pH de aproximadamente 8. A un pH de aproximadamente 8, la mayoría de los tioles de interés están desprotonados (y de este modo, son más reactivos) y la mayoría de las aminas de interés todavía están protonadas (y de este modo, son menos reactivas). Cuando se usa un tiol como la primera molécula precursora, una estructura conjugada que es selectiva en su reactividad para el tiol con relación a las aminas es altamente deseable.

30 Las primeras y segundas moléculas precursoras adecuadas incluyen proteínas, péptidos, polioxialquilenos, poli(alcohol vinílico), poli(etileno-co-alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-ácido acrílico), poli(etiloxazolina), poli(vinilpirrolidona), poli(etileno-co-vinilpirrolidona), poli(ácido maleico), poli(etileno-co-ácido maleico), poli(acrilamida), y copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-co-poli(óxido de propileno). Una molécula precursora particularmente preferida es polietilenglicol.

35 El polietilenglicol (PEG), proporciona un bloque de construcción conveniente. Se pueden adquirir fácilmente o sintetizar PEG lineales (lo que significa con dos extremos) o ramificados (lo que significa más de dos extremos) y después funcionalizar los grupos de extremos PEG para introducir ya sea un nucleófilo fuerte, tal como tiol, o una estructura conjugada, tal como un acrilato o una vinilsulfona. Cuando estos componentes son mezclados ya sea entre sí o con un componente correspondiente en un ambiente ligeramente básico, se formará una matriz por reacción entre el primer y segundo componente precursor. Se puede hacer reaccionar un componente PEG con un componente no PEG, y el peso molecular o hidrofiliidad de cualquier componente se puede controlar para manipular las características mecánicas, la permeabilidad, y el contenido de agua de la matriz resultante.

45 En la formación de matrices, especialmente matrices que se desea que se degraden *in vivo*, los péptidos proporcionan un bloque de construcción muy conveniente. Es directo sintetizar péptidos que contienen dos o más residuos de cisteína, y este componente puede fácilmente servir como el primer componente precursor con grupos nucleófilos. Por ejemplo, un péptido con dos residuos de cisteína libres puede fácilmente formar una matriz cuando se mezcla con una tri-vinilsulfona de PEG (un PEG que tiene tres ramas con vinilsulfonas en cada una de sus ramas), a pH fisiológico o ligeramente superior (por ejemplo, de 8 a 9). La gelificación también puede proceder bien a pH aún superior, pero a costa posiblemente de la auto-selectividad. Cuando se mezclan juntos dos componentes precursores líquidos, reaccionan durante un periodo de algunos minutos para formar un gel elástico, que consiste en una red de cadenas de PEG, que portan los nodos de la red, con los péptidos como enlaces de conexión. Los péptidos pueden ser seleccionados como sustratos de proteasas, para hacer que la red capaz pueda infiltrarse y degradarse por las células, como se hace en una red a base de proteínas, tal como en una matriz de fibrina. Preferiblemente, las secuencias en los dominios son sustratos para enzimas que están involucradas en la migración celular (por ejemplo, como sustratos para enzimas tales como colagenasa, plasmina, metaloproteinasas (MMP) o elastasa), aunque los dominios adecuados no están limitados a estas secuencias. Una secuencia particularmente útil es un sustrato para la enzima plasmina. Las características de degradación de los geles pueden ser manipuladas cambiando los detalles del péptido que sirve como los nodos de reticulación. Se puede hacer un gel que es

degradable por colagenasa pero no plasmina, o por plasmina pero no colagenasa. Además, es posible hacer que el gel se degrade más rápidamente o más lentamente en respuesta a tal enzima, simplemente cambiando la secuencia de aminoácidos para alterar la  $K_m$  o  $k_{cat}$ , o ambas, de la reacción enzimática. Se puede hacer de este modo una matriz que es biomimética, ya que es capaz de ser remodelada por las características de remodelación normal de las células. Por ejemplo, tal estudio muestra sitios de sustrato para la proteasa importante plasmina. La gelificación del PEG con el péptido es auto-selectiva.

Opcionalmente, pueden incorporarse agentes bifuncionales en la matriz para proporcionar enlaces químicos a otras especies (por ejemplo, una superficie de tejido). Tener sustratos de proteasas incorporados en la matriz es importante cuando se forma la matriz de la vinilsulfona de PEG. Aparte de las matrices formadas de la reacción de acrilatos de PEG y tioles de PEG, matrices formadas de vinilsulfonas de PEG y tioles de PEG, no contienen enlaces hidrolíticamente degradables. Por lo tanto, la incorporación de sustratos de proteasas permite a la matriz degradarse en el cuerpo.

Las matrices sintéticas son operacionalmente simples de formar. Se mezclan dos precursores líquidos; un precursor contiene una molécula precursora con grupos nucleófilos y la otra molécula precursora contiene los grupos electrófilos. La solución salina fisiológica puede servir como el solvente. Se genera calor mínimo por la reacción. Por lo tanto, la gelificación se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*, en contacto directo con tejido, sin toxicidad indeseada. De este modo, polímeros distintos de PEG pueden ser usados, ya sea telequímicamente modificados o modificados en sus grupos laterales.

Para la mayoría de las indicaciones de cicatrización, la velocidad de crecimiento celular o migración de células en la matriz en combinación con una velocidad de degradación adaptada de la matriz es crucial para la respuesta de cicatrización global. La posibilidad de que matrices hidrolíticamente no degradables se invadan por células es principalmente una función de la densidad de red. Si el espacio existente entre los puntos o nodos de ramificación es demasiado pequeño con relación al tamaño de las células o si la velocidad de degradación de la matriz, la cual da como resultado la creación de más espacio dentro de la matriz, es demasiado lenta, se observará una respuesta de cicatrización muy limitada. Se sabe que matrices de cicatrización encontradas en la naturaleza, como por ejemplo, matrices de fibrina, las cuales se forman como una respuesta a la lesión en el cuerpo, consisten en una red muy holgada la cual muy fácilmente puede ser invadida por las células. La infiltración es promovida por ligandos para adhesión celular, los cuales son una parte integrada de la red de fibrina.

Las matrices elaboradas a partir de moléculas precursoras hidrófilas sintéticas, como polietilenglicol, se hinchan en ambiente acuoso después de la formación de la red polimérica. Para lograr un tiempo de gelificación suficientemente corto (entre 3 y 10 minutos a un pH de entre 7 y 8 y una temperatura en un intervalo de 36 a 38°C) y reacción cuantitativa durante la formación *in situ* de la matriz en el cuerpo, la concentración de partida de las moléculas precursoras debe ser suficientemente alta. Bajo tales condiciones, el hinchamiento después de la formación de la red no tendrá lugar, y las concentraciones de partida necesarias conducirán a matrices demasiado densas para la infiltración celular cuando la matriz no es degradable en un ambiente acuoso. De este modo, el hinchamiento de la red polimérica es importante para ampliar y ensanchar el espacio entre los puntos de ramificación.

Independientemente de la concentración de partida de las moléculas precursoras, los hidrogeles elaborados a partir de las mismas moléculas precursoras sintéticas, tales como una vinilsulfona de PEG de cuatro ramas y un péptido con grupos SH, se hinchan hasta el mismo contenido de agua en estado de equilibrio. Esto significa que cuanto mayor es la concentración de partida de las moléculas precursoras, mayor es el volumen final del hidrogel cuando alcanza su estado de equilibrio. Si el espacio disponible en el cuerpo es demasiado pequeño para permitir suficiente hinchamiento y en particular si el enlace formado a partir de los componentes precursores no es hidrolíticamente degradable, la velocidad de infiltración celular y la respuesta de cicatrización disminuirán. Como consecuencia, debe encontrarse el punto óptimo entre dos requerimientos contradictorios para aplicación en el cuerpo. La buena infiltración celular y las subsecuentes respuestas de cicatrización han sido observadas con una red polimérica tridimensional formada a partir de la reacción de un polímero ramificado trifuncional con al menos tres ramas sustancialmente similares en cuanto al peso molecular y una segunda molécula precursora que es al menos una molécula bifuncional. La relación de peso equivalente de los grupos funcionales de la primera y segunda moléculas precursoras es de entre 0,9 y 1,1. Los pesos moleculares de las ramas de la primera molécula precursora, el peso molecular de la segunda molécula precursora y la funcionalidad de los puntos de ramificación, son seleccionados de manera tal que el contenido de agua de la red polimérica resultante es entre el % en peso en equilibrio y 92% en peso del peso total de la red polimérica después de la terminación de captación de agua. Preferiblemente, el contenido de agua es de entre 93 y 95% en peso del peso total de la red polimérica y el agua después de la terminación de la captación de agua. La terminación de la captación de agua se puede lograr ya sea cuando se alcanza la concentración de equilibrio o cuando el espacio disponible en la matriz no permite incremento de volumen adicional. Por lo tanto se prefiere elegir las concentraciones de partida de los componentes precursores tan bajas como sea posible. Esto es cierto para todas las matrices que se pueden hinchar, pero en particular, para aquellas matrices que experimentan degradación mediada por la célula y no contienen enlaces hidrolíticamente degradables en la red polimérica.

El equilibrio entre el tiempo de gelificación y la concentración de partida baja, en particular para geles hidrolíticamente no degradables, debe ser optimizado basándose en la estructura de las moléculas precursoras. En particular, el peso molecular de las ramas de la primera molécula precursora, el peso molecular de la segunda molécula precursora y el grado de ramificación, es decir, la funcionalidad de los puntos de ramificación, tienen que ajustarse por consiguiente. El mecanismo de reacción real tiene una influencia menor en esta interacción.

Si la primera molécula precursora es un polímero de tres o cuatro ramas con un grupo funcional en el extremo de cada rama y la segunda molécula precursora es una molécula bifuncional lineal, preferiblemente un péptido que contiene al menos dos grupos de cisteína, entonces el peso molecular de las ramas de la primera molécula precursora y el peso molecular de la segunda molécula precursora son preferiblemente elegidos de manera tal que los enlaces entre los puntos de ramificación después de la formación de la red tienen un peso molecular en el intervalo de entre 10 y 13 kDa (bajo las condiciones que los enlaces son lineales, no ramificados), preferiblemente entre 11 y 12 kDa. Esto permite una concentración de partida de la suma de la primera y segunda moléculas precursoras en un intervalo de entre 8 y 12% en peso, preferiblemente entre 9 y 10% en peso del peso total de la primera y segunda molécula precursora en solución (antes de la formación de red). En el caso de que el grado de ramificación del primer componente precursor se incrementa a ocho y la segunda molécula precursora sea todavía una molécula bifuncional lineal, el peso molecular de los enlaces entre los puntos de ramificación es preferiblemente incrementado hasta un peso molecular de entre 18 y 24 kDa. Cuando el grado de ramificación de la segunda molécula precursora se incrementa de un componente precursor lineal a uno de tres o cuatro ramas, el peso molecular, es decir, la longitud de los enlaces se incrementa por consiguiente. En una realización preferida, se elige una composición que incluye como primera molécula precursora un polímero de tres ramas trifuncional de 15 kD, es decir, cada rama tiene un peso molecular de 5 kD, y como la segunda molécula precursora una molécula lineal bifuncional de un peso molecular en el intervalo de entre 0,5 y 1,5 kD, aún más preferiblemente, aproximadamente 1 kD. Preferiblemente, el primer y segundo componente precursor es un polietilenglicol.

En una realización preferida, el primer componente precursor incluye como grupos funcionales grupos o enlaces insaturados conjugados, lo más preferido un acrilato o una vinilsulfona y los grupos funcionales de la segunda molécula precursora incluyen un grupo nucleófilo, preferiblemente un grupo tiol o amino. En otra realización preferida de la presente invención, la primera molécula precursora es un polímero de cuatro ramas de 15 a 20 kD, preferiblemente un polímero de 15 kD, que tiene grupos funcionales en el extremo terminal de cada rama y la segunda molécula precursora es una molécula lineal bifuncional de un peso molecular en el intervalo de entre 3 y 4 kDa, se prefiere entre 3,4 kDa. Preferiblemente, la primera molécula precursora es un polietilenglicol que tiene grupos acrilatos y la segunda molécula precursora es un polietilenglicol que tiene grupos tiol. En ambas realizaciones preferidas, la concentración de partida de la suma de la primera y segunda molécula precursora varía desde 8 hasta 11% en peso, preferiblemente entre 9 y 10% en peso del peso total de la primera y segunda molécula precursora y agua (antes de la formación de la red polimérica), preferiblemente entre 5 y 8% en peso para lograr un tiempo de gelificación por debajo de 10 minutos. Estas composiciones tienen un tiempo de gelificación a pH 8,0 y 37°C de aproximadamente 3-10 minutos después del mezclado.

Cuando la matriz contiene enlaces hidrolíticamente degradables, formados, por ejemplo, por la reacción preferida entre acrilatos y tioles, la densidad de red con respecto a infiltración celular es especialmente importante en el inicio, pero en ambiente acuoso, los enlaces serán hidrolizados y la red será aflojada, para permitir la infiltración celular. Con un incremento en el grado de ramificación global de la red polimérica, el peso molecular de los interenlaces, es decir, la longitud de los enlaces, debe incrementar.

#### B. Sitios de unión celular

Las células interactúan con su ambiente a través de interacciones proteína-proteína, proteína-oligosacárido y proteína-polisacárido en la superficie celular. Las proteínas de matriz extracelular proporcionan una gran cantidad de señales bioactivas a la célula. Esta red densa es requerida por soportar las células, y se ha mostrado que muchas proteínas en la matriz controlan la adhesión celular, propagación, migración y diferenciación. Algunas de las proteínas específicas que se ha mostrado que son particularmente activas incluyen laminina, vitronectina, fibronectina, fibrina, fibrinógeno y colágeno. Se han realizado muchos estudios de laminina, y se ha mostrado que la laminina juega un papel vital en el desarrollo y regeneración de nervios *in vivo* y células nerviosas *in vitro*, así como en angiogénesis. Se han identificado algunas de las secuencias específicas que directamente interactúan con receptores celulares y causan ya sea adhesión, propagación o transducción de señal.

Se ha mostrado que la laminina, una proteína multidominio grande, consiste en tres cadenas con varios dominios que se unen al receptor. Estos dominios que se unen al receptor incluyen la secuencia YIGSR (SEQ ID NO: 1) de la cadena B1 de laminina, LRGDN (SEQ ID NO: 3) de la cadena A de laminina y PDGSR (SEQ ID NO: 4) de la cadena B1 de laminina. Varias otras secuencias de reconocimiento para células se han identificado. Estas incluyen IKVAV (SEQ ID NO: 5) de la cadena A de laminina y la secuencia RNIAEIIKDI (SEQ ID NO: 6) de la cadena B2 de laminina. Se prefiere particularmente la secuencia RGD de fibronectina.

En una realización preferida adicional, se incorporan en la matriz sitios de péptido para adhesión celular,

concretamente péptidos que se unen a receptores que promueven la adhesión en las superficies celulares. Tales péptidos que promueven la adhesión incluyen aquellos descritos anteriormente. Se prefieren particularmente la secuencia RGD de fibronectina, la secuencia YIGSR (SEQ ID NO: 1) de laminina. Se prefiere particularmente la incorporación de sitios de unión celular con matrices sintéticas. Sin embargo, los sitios de unión celular también pueden ser incluidos con algunas de las matrices naturales. La incorporación puede lograrse, por ejemplo, mezclando un péptido de unión celular que contiene cisteína con la molécula precursora que incluye el grupo insaturado conjugado, tal como acrilato de PEG, acrilamida de PEG o vinilsulfona de PEG. Esta etapa puede ocurrir inmediatamente, por ejemplo, uno pocos minutos, antes del mezclado con el resto del componente precursor que incluye el grupo nucleófilo, tal como componente precursor que contiene tiol. Si el sitio de unión celular no incluye una cisteína, puede ser químicamente sintetizado por incluir una. Durante esta etapa, el péptido que promueve la adhesión llegará a ser incorporado en un extremo del precursor funcionalizado de manera múltiple con una insaturación conjugada; cuando se agrega el resto del multi-tiol al sistema, se formará una red reticulada.

La concentración de sitios de adhesión covalentemente unidos en la matriz, puede influenciar la velocidad de infiltración celular. Por ejemplo, para un hidrogel dado, se pueden incorporar un intervalo de concentración de RGD en la matriz que soporta el crecimiento celular y la migración celular de una manera óptima. El intervalo de concentración óptima de sitios de adhesión similar a RGD es de entre 0,04 y 0,05 mM y aún más preferible de 0,05 mM en particular para una matriz que tiene un contenido de agua entre concentración de equilibrio y 92% en peso después de la terminación de captación de agua.

Una realización preferida es una matriz suplementada que contiene un factor bioactivo, un polietilenglicol de cuatro ramas con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da reticulado con un sitio GCRPQGIWGQDRC de degradación de proteasa (SEQ ID NO: 7) y 0,050 mM de RGD; esta matriz demuestra particularmente buenos resultados en crecimiento celular y cicatrización de defectos óseos. Preferiblemente la matriz contiene PTH 134 covalentemente unido a la matriz. La concentración de partida de PEG y péptido es inferior a 10% en peso del peso total de las moléculas y agua (antes de hincharse). Los geles tienen una consistencia indeseable y permiten a los osteoblastos y célula precursora fácilmente infiltrar la matriz.

### C. Factores bioactivos

Factores bioactivos son los ingredientes activos para el tratamiento de áreas de defectos óseos específicos de huesos no sanos, por ejemplo, osteoporosis y quistes óseos. Se ha encontrado sorprendentemente que factores bioactivos específicos, es decir, PTH, en particular PTH<sub>1-34</sub>, son adecuados para tratamiento local de huesos y áreas de huesos osteoporóticos. En el pasado, estos factores óseos se han explorado para tratamiento sistémico. Sin embargo no hay sugerencia de que puedan ser ingredientes activos útiles de formulaciones localmente aplicadas, en cuanto al tratamiento de los defectos óseos. Se ha encontrado que cuando estos factores bioactivos se incorporan en una formulación de matriz inyectable y se inyectan en áreas de defectos óseos específicos de huesos no sanos, incrementan la densidad ósea en el área del hueso. Preferiblemente, el factor bioactivo es covalentemente unido a las matrices descritas anteriormente, así asegurando una liberación controlada de factores bioactivos. El factor bioactivo puede estar en la forma de un péptido de fusión, el cual contiene el factor bioactivo en un primer dominio y un dominio de sustrato covalentemente reticulable en un segundo dominio. Opcionalmente, se localiza un sitio de degradación entre el primer y segundo dominios.

#### a. PTH

El término "PTH" como se usa en este documento, incluye la secuencia humana de PTH<sub>1-84</sub> y todas las versiones truncadas, modificadas y alélicas de PTH, las cuales exhiben propiedades de formación de hueso cuando covalentemente se unen a matrices biodegradables naturales o sintéticas. Versiones truncadas preferidas de PTH son PTH<sub>1-38</sub>, PTH<sub>1-34</sub>, PTH<sub>1-31</sub>, PTH<sub>1-28</sub> o PTH<sub>1-25</sub>. La más preferida es PTH<sub>1-34</sub>. Preferiblemente, la PTH es PTH humana, aunque puede ser adecuada PTH de otras fuentes, tal como PTH bovina.

#### c. Péptidos de fusión

##### Dominios de sustrato reticulables

Los péptidos de fusión comprenden al menos dos dominios en donde el primer dominio comprende el factor bioactivo y el segundo dominio comprende un dominio de sustrato reticulable a la matriz antes de, durante o después de su formación. El dominio de sustrato puede ser un dominio para una enzima, preferiblemente un dominio de sustrato para una transglutaminasa ("dominio de sustrato de transglutaminasa"), más preferiblemente para una transglutaminasa de tejido ("dominio de sustrato de transglutaminasa de tejido"), y lo más preferiblemente es un dominio de sustrato para el factor XIIIa ("dominio de sustrato del factor XIIIa").

Las transglutaminasas catalizan reacciones de transferencia de acilo entre el grupo gamma-carboxamida de residuos de glutamilo unidos a la proteína y el grupo épsilon-amino de residuos de lisina, dando como resultado la

formación de puentes de cadenas laterales de isopéptidos de N-épsilon-(gamma-glutamil)lisina. Se puede diseñar la secuencia de aminoácidos del péptido de fusión para contener adicionalmente un sitio de escisión enzimática o hidrolítica, así el factor bioactivo puede ser liberado con poca o sin modificación de la estructura primaria. Los dominios de sustrato de transglutaminasa, y en particular los dominios del sustrato del factor XIIIa, son adecuados para unir el péptido de fusión a matrices de fibrina, pero también a matrices sintéticas en caso de que estén presentes grupos amino primario colgantes en la molécula sintética. Cuando se usa con una matriz de fibrina, el sitio de degradación en el péptido de fusión es preferiblemente enzimáticamente degradable, para que la liberación de PTH sea controlada por procesos específicos celulares, tales como proteólisis localizada.

El dominio de sustrato reticulable puede incluir GAKDV (SEQ ID NO: 8), KKKK (SEQ ID NO: 9), YRGDTIGEGQQHHLGG (SEQ ID NO: 10) o NQEQVSPL (SEQ ID NO: 2).

El dominio de sustrato del factor XIIIa más preferido tiene una secuencia de aminoácidos NQEQVSPL (SEQ ID NO: 2) y en este documento se denomina "TG" y TG-PTH.

El péptido de fusión de PTH puede ser producido recombinantemente o por síntesis química. El péptido de fusión de PTH 1-34 es preferiblemente producido por síntesis química. El péptido de fusión de BMP es producido recombinantemente preferiblemente por procesos bacterianos.

Para la incorporación de PTH en una matriz formada a partir de componentes del precursor sintético, el péptido de fusión de PTH o cualquier otro péptido puede también ser incorporado cuando se sintetiza con al menos un grupo cisteína adicional (-SH) preferiblemente en el extremo N-terminal de PTH<sub>1-34</sub>, como el dominio de sustrato reticulable. La cisteína puede ser unida ya sea directamente al PTH<sub>1-34</sub> o a través de una secuencia enlazadora. La secuencia enlazadora puede adicionalmente incluir una secuencia de aminoácidos enzimáticamente o hidrolíticamente degradable, para que el PTH pueda ser escindido de la matriz por enzimas en forma sustancialmente nativa. El grupo cisteína libre reacciona con el grupo insaturado conjugado del componente precursor en una reacción de adición de tipo Michael. El grupo tiol de la cisteína puede reaccionar con un enlace insaturado conjugado en el polímero sintético para formar un enlace covalente.

Estos sitios pueden ser degradables ya sea por hidrólisis no específica (es decir, un enlace éster), o pueden ser sustratos para degradación enzimática específica (ya sea degradación proteolítica o polisacáridos).

Los sitios de degradación permiten a la PTH ser liberada con poca o ninguna modificación en la secuencia peptídica primaria, la cual puede dar como resultado actividad superior del factor. Además, permite a la liberación del factor ser controlada por procesos específicos celulares. Esto permite a los factores ser liberados a diferentes velocidades dentro del mismo material dependiendo de la ubicación de las células dentro del material. Esto también reduce la cantidad de PTH<sub>1-34</sub> total necesario, puesto que su liberación es controlada por procesos celulares. En una explicación posible para la cicatrización fuerte de los defectos óseos mencionados anteriormente con PTH incorporada y preferiblemente unida a la matriz, se considera importante que la PTH se administre localmente a lo largo de un periodo prolongado de tiempo (es decir, no solo una dosis pulsada única), pero no de una forma continua. Esto es realizado por una degradación lenta, ya sea a través de escisión enzimática o escisión hidrolítica de la matriz. De esta forma, la molécula es entonces suministrada a través de un efecto pseudo-pulsado que ocurre sobre un periodo sostenido de tiempo. Cuando una célula preosteoblástica infiltra la matriz, encontrará una molécula de PTH la cual inducirá una proliferación adicional del preosteoblasto, así como también una síntesis de factores de crecimiento múltiples cruciales para nueva formación ósea. Sin embargo, si tal célula particular no continua liberando PTH unida de la matriz, no comenzará a producir interleucina-6, evitando con ello la etapa posterior de efectos catabólicos en la formación de osteoclastos. El resultado neto es entonces densidad mineral ósea superior y formación neta de matriz ósea. Finalmente, los efectos terapéuticos del péptido están localizados en la región de defecto y son subsecuentemente amplificados.

#### Sitios de degradación del péptido de fusión

Un sitio de degradación enzimática o hidrolítica puede estar presente entre el primero y segundo dominios del péptido de fusión. Los sitios de degradación pueden ser degradables por degradación enzimática específica. Preferiblemente, el sitio de degradación es escindible por una enzima seleccionada del grupo que consiste de plasmina y metaloproteinasas de matriz. Por selección cuidadosa de  $K_m$  y  $k_{cat}$  de este sitio de degradación enzimática, la degradación puede ser controlada para que ocurra ya sea antes o después de la formación de matriz y/o por utilización de enzimas similares o no similares para degradar la matriz. Estos sitios degradables permiten el diseño por ingeniería de liberación más específica de factores bioactivos a partir de matrices. El sitio degradable puede ser escindido por enzimas liberadas de células que invaden la matriz. El sitio de degradación permite variar la velocidad de suministro en diferentes ubicaciones dentro de la matriz, dependiendo de la actividad celular en la ubicación y/o dentro de la matriz. Los beneficios adicionales incluyen la dosis de fármaco total inferior dentro del sistema de suministro y la regulación espacial de liberación la cual permite liberar un mayor porcentaje del fármaco en el momento de mayor actividad celular. El sitio de degradación es abreviado en este documento como "pl".

Los sitios proteolíticamente degradables pueden incluir sustratos para activadores de colagenasa, plasmina, elastasa, estromelisina o plasminógeno. Sustratos ejemplares son listados abajo. N1-N5 denota posiciones de aminoácidos 1-5 hacia el extremo amino-terminal de la proteína a partir del sitio en donde ocurre la proteólisis. N1'-N4' denota posiciones 1-4 de aminoácidos hacia el extremo carboxilo-terminal de la proteína a partir del sitio en donde ocurre la proteólisis.

5

Tabla 1: Secuencias de sustrato de muestra para proteasa

Proteasa	N5	N4	N3	N2	N1	N1'	N2'	N3'	N4'	SEQ ID NO:
Plasmina <sup>1</sup>			L	I	K	M	K	P		SEQ ID NO:
Plasmina <sup>1</sup>			N	F	K	S	Q	L		SEQ ID NO:
Estromelisina <sup>2</sup>	Ac	G	P	L	A	L	T	A	L	SEQ ID NO:
Estromelisina <sup>2</sup>		Ac	P	F	E	L	R	A	NH <sub>2</sub>	SEQ ID NO:
Elastasa <sup>3</sup>			Z-	A	A	F	A	NH <sub>2</sub>		SEQ ID NO:
Colagenasa <sup>4</sup>		G	P	L	G	I	A	G	P	SEQ ID NO:
t-PA <sup>5</sup>	P	H	Y	G	R	S	G	G		SEQ ID NO:
u-PA <sup>5</sup>	P	G	S	G	R	S	A	S	G	SEQ ID NO:
Referencia:										
1. Tagaki and Doolittle, (1975) <i>Biochem.</i> 14:5149-5156.										
2. Smith et al., (1995). <i>J. Biol. Chem.</i> 270:6440-6449.										
3. Besson et al., (1996) <i>Analytical Biochemistry</i> 237:216-223.										
4. Netzel-Arnett et al., (1991) <i>J. Biol. Chem.</i> 266:6747-6755.										
5. Coombs et al., 1998. <i>J. Biol. Chem.</i> 273:4323-4328										

En una realización preferida, la secuencia YKNR (SEQ ID NO. 11), está localizada entre el primer dominio y el segundo dominio y hace el enlace de plasmina degradable.

10 Un péptido de fusión de PTH particular preferido es TGp1PTH:

NQEQVSPLYKNRSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 12).

Las enzimas que podrían ser usadas para degradación proteolítica son numerosas. Los sitios proteolíticamente degradables podrían incluir sustratos para activadores de colagenasa, plasmina, elastasa, estromelisina o plasminógeno.

15 En otra realización preferida, un dominio de oligo-éster puede ser insertado entre el primer y segundo dominio. Esto puede ser realizado usando un oligo-éster, tal como oligómeros de ácido láctico.

Diseño de proteínas de fusión para incorporación

Las proteínas de fusión preferidas incluyen:

20 TG-PTH<sub>1-34</sub>: Esta es una forma modificada de PTH que comprende los aminoácidos 1-34 de la PTH nativa, así como también un dominio de sustrato de TG (transglutaminasa):

NQEQVSPVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 13).

TG-pl-PTH<sub>1-34</sub>: Esta forma corresponde a TG-PTH excepto que adicionalmente contiene una secuencia degradable por plasmina (pl) entre la secuencia TG y la PTH<sub>1-34</sub>: NQEQVSPVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 12).

5 También se da a conocer:

TG-BMP<sub>283-396</sub>: Esta es una forma modificada de BMP 2 que comprende los aminoácidos 283-396 de la PTH nativa, así como también un dominio de sustrato de TG (transglutaminasa):

Met-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Pro-Val-Glu-Leu-Pro-Leu-Ile-Lys-Met-Lys-Pro-His-BMP<sub>283-396</sub> (SEQ ID NO: 14).

10 Combinación de matrices o componentes precursores y factores bioactivos

En una realización preferida, la matriz de fibrina o sintética suplementada (respectivamente sus soluciones precursoras), comprende la matriz y PTH o péptido de fusión de PTH, preferiblemente en un intervalo de concentración de entre 0,01 y 2 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz, preferiblemente entre 0,02 y 1,0 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz, más preferiblemente de entre 0,03 y 0,5 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz y lo más preferiblemente en un intervalo de entre 0,05 y 0,2 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz. Dependiendo de la edad del paciente, se prefieren ciertos subintervalos de la concentración de PTH o concentración de péptido de fusión de PTH. Si la matriz suplementada es aplicada para tratar quistes óseos en niños, la concentración de PTH o péptido de fusión de PTH está preferiblemente en un intervalo de entre 0,01 y 0,35 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz y lo más preferiblemente en un intervalo de concentración de entre 0,05 y 0,15 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz. Mientras que si la formulación se aplica para incrementar localmente la densidad ósea de hueso osteoporótico en adultos, la concentración preferida de PTH o péptido de fusión de PTH está en un intervalo de entre 0,5 y 2 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz, más preferiblemente entre 0,7 y 1,5 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores y lo más preferiblemente entre 0,9 y 1,1 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz. En una realización preferida, la matriz es una matriz de fibrina.

30 II. Métodos para incorporación y/o liberación de factores bioactivos

En una realización preferida para incorporación de un factor bioactivo como PTH o un péptido de fusión dentro de la matriz, el factor bioactivo será incorporado, físicamente o químicamente, dentro de la matriz durante su gelificación. En el caso de una matriz de fibrina, el factor XIIIa es una transglutaminasa que es activada durante la coagulación para dar fibrina. Esta enzima, formada naturalmente a partir del factor XIII por escisión por trombina o adicionalmente agregada a las soluciones precursoras de fibrina si se requieren concentraciones superiores, funciona para unir cadenas de fibrina entre sí vía enlaces amida, formados entre cadenas laterales de glutamina y cadenas laterales de lisina. La enzima también funciona para unir otros péptidos a fibrina durante la coagulación. Específicamente, se ha demostrado que la secuencia NQEQVSPV (SEQ ID NO: 2) funciona como un sustrato efectivo para el factor XIIIa. En el caso de matrices sintéticas, el péptido de fusión debe ser un grupo funcional que sea capaz de reaccionar con un grupo funcional de los componentes precursores que forman la matriz sintética bajo condiciones fisiológicas en el cuerpo. Por ejemplo, si la molécula precursora contiene grupos acrilato, el péptido de fusión debe contener los grupos tiol libres los cuales reaccionan con el grupo acrilato en una reacción de adición de tipo Michael. Dependiendo de la naturaleza del factor bioactivo, la mezcla de un factor no modificado también es posible para lograr una liberación sostenida a partir de la matriz.

45 III. Métodos de aplicación

Las matrices suplementadas pueden ser formadas *in situ* en la ubicación deseada después de la inyección de los componentes precursores separados, o pueden ser preformadas y después implantadas en la ubicación deseada. Dependiendo de la indicación, las matrices suplementadas son aplicadas o inyectadas en diferentes etapas de gelificación. Si la inyección de la matriz suplementada está en áreas de huesos no sanos los cuales son afectados por osteoporosis, son preferiblemente inyectadas en un estado pre-gelificado. Las soluciones precursoras son mezcladas y después de la gelificación (usualmente después de aproximadamente 30 segundos a 2 minutos), el gel es inyectado a través de una aguja gruesa en el área afectada en el hueso. Esto se hace para prevenir el derrame de una matriz todavía líquida en la circulación sanguínea.



Para algunas de las indicaciones puede ser deseable la distribución del material en el área ósea en la cual es aplicada durante la inyección. En una realización preferida, un agente de contraste de rayos X, preferiblemente uno que es soluble en el material de matriz, se agrega al material precursor de matriz.

5 En general, los agentes de contraste son clasificados como agentes de contraste iónicos y no iónicos. Los agentes de contraste no iónicos son preferidos, aunque los agentes de contraste iónicos también pueden ser usados. Los agentes de contraste de rayos X que contienen yodo son preferidos.

10 Los agentes de contraste no iónicos preferidos incluyen iodixanol, iohexol, iopamidol, iopentol, iopromida, iorneprol, iosimida, iotasul, iotrolano, ioversol, ioxilano y metrizamida. El agente de contraste no iónico más preferido es iohexol (n.º CAS 66108-95-0). Si se agrega iohexol para visualizar el gel bajo fluoroscopia o rayos X, la matriz preferiblemente contiene de 100 a 600 mg por mililitro de la matriz o soluciones precursoras que forman la matriz, más preferiblemente de 250 a 500 mg por mililitro de la matriz o los componentes precursores que forman la matriz, lo más preferiblemente de 300 a 450 mg por mililitro en la matriz o los componentes precursores que forman la matriz.

15 Los agentes de contraste iónicos preferidos incluyen diatrizoato, iobenzamato, iocarmato, iocetamato, iodamida, iodipamida, iodoxamato, ioglicato, ioglicamato, iopanoato, iofendilato, iopronato, ioserato, iotalamato, iotroxato, ioxaglato, ioxitalamato y metrizoato.

Los agentes de contraste son comercialmente disponibles y pueden ser fácilmente sintetizados, como es bien sabido por el experto en la técnica.

20 El monitoreo de los agentes de contraste puede ser realizado con los métodos usados en general en la técnica, por ejemplo, por rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o formación de imágenes por ultrasonidos. Es bien sabido que los agentes de contraste funcionan modificando ya sea las características de absorción de rayos X de los sitios corporales en los cuales son distribuidos, modificando los tiempos de relajación de protones acuosos y de este modo son observables vía formación de imágenes por resonancia magnética, o modificando la velocidad de sonido o densidad en los sitios corporales en los cuales son distribuidos. De conformidad con la presente invención, se prefiere usar agentes de contraste los cuales pueden ser monitoreados por formación de imágenes por rayos X.

30 Como se describe en este documento, la formulación de matriz suplementada inyectada en el cuerpo en diferentes etapas de gelificación puede gelificarse *in situ* o en el cuerpo. En otra realización, la matriz suplementada puede ser formada fuera del cuerpo y después aplicada en la forma preconfigurada. Independientemente del tipo de componente precursor usado, los componentes precursores deben ser separados antes de la aplicación de la mezcla al cuerpo para prevenir la combinación o contacto entre sí bajo condiciones que permiten la polimerización o gelificación de los componentes. Para prevenir contacto previo a la administración, se puede usar un kit el cual separa las composiciones una de otra. Después de mezclar bajo condiciones que permiten la polimerización, las composiciones forman una red tridimensional suplementada con factor bioactivo. Dependiendo de los componentes precursores y sus concentraciones, puede ocurrir gelificación casi instantáneamente después del mezclado.

40 En una realización, la matriz es formada a partir de fibrinógeno. El fibrinógeno, a través de una cascada de varias reacciones, se gelifica para formar una matriz, cuando se pone en contacto con trombina y una fuente de calcio a temperatura y pH apropiados. Los tres componentes, fibrinógeno, trombina y fuente de calcio, deben ser almacenados separadamente. Sin embargo, siempre que al menos uno de los tres componentes se mantenga separado, los otros dos componentes pueden ser combinados antes de la administración.

45 En una realización, el fibrinógeno se disuelve (el cual puede contener adicionalmente aprotinina para incrementar la estabilidad) en una solución tampón a pH fisiológico (en un intervalo de desde pH 6,5 hasta 8,0, preferiblemente desde pH 7,0 hasta 7,5) para formar una primera solución precursora y se almacena separadamente de una solución de trombina en un tampón de cloruro de calcio (por ejemplo, un intervalo de concentración de desde 40 hasta 50 mM). La solución tampón para el fibrinógeno puede ser una solución tampón de histidina a una concentración preferida de 50 mM que incluye NaCl adicionalmente a una concentración preferida de 150 mM o solución salina tamponada con TRIS (preferiblemente a una concentración de 33 mM).

50 En una realización preferida, un kit contiene una proteína de fusión, fibrinógeno, trombina y una fuente de calcio. Opcionalmente, el kit puede contener una enzima de reticulación, tal como el factor XIIIa. La proteína de fusión contiene un factor bioactivo, un dominio de sustrato para una enzima de reticulación y, opcionalmente, un sitio de degradación entre el dominio de sustrato y el factor bioactivo. La proteína de fusión puede estar presente ya sea en el fibrinógeno o la solución precursora de trombina. En una realización preferida, la solución precursora de fibrinógeno contiene la proteína de fusión.

Las soluciones son preferiblemente mezcladas por un dispositivo de jeringa de dos vías, en el cual ocurre el

mezclado apretando los contenidos de ambas jeringas a través de una cámara de mezclado y/o aguja y/o mezclador estático.

En una realización preferida, tanto el fibrinógeno como la trombina son almacenados separadamente en forma liofilizada. Cualquiera de los dos puede contener el factor bioactivo, el cual es preferiblemente una proteína de fusión. Antes del uso, se agrega tampón tris o histidina al fibrinógeno, el tampón puede adicionalmente contener aprotinina. La trombina liofilizada es disuelta en la solución de cloruro de calcio. Subsecuentemente, las soluciones de fibrinógeno y trombina son colocadas en recipientes separados/viales/cuerpos de jeringa y mezcladas por un dispositivo de conexión de dos vías, tal como una jeringa de dos vías. Opcionalmente, los recipientes/viales/cuerpos de jeringa son bipartitos, teniendo de este modo dos cámaras separadas por una división ajustable la cual es perpendicular a la pared del cuerpo de jeringa. Una de las cámaras contiene el fibrinógeno liofilizado o trombina, mientras que la otra cámara contiene una solución tampón apropiada. Cuando el émbolo se presiona hacia abajo, la división se mueve y libera el tampón en la cámara de fibrinógeno para disolver el fibrinógeno. Una vez que tanto el fibrinógeno como la trombina están disueltos, ambos cuerpos de jeringa bipartitos se unen a un dispositivo de conexión de dos vías y los contenidos son mezclados apretándolos a través de la aguja de inyección unida al dispositivo de conexión. Opcionalmente, el dispositivo de conexión contiene un mezclador estático para mejorar el mezclado de los contenidos.

En una realización preferida, el fibrinógeno es diluido ocho veces y la trombina es diluida 20 veces antes del mezclado. Esta relación da como resultado un tiempo de gelificación de aproximadamente un minuto.

En otra realización preferida, la matriz suplementada está formada por componentes precursores sintéticos capaces de experimentar una reacción de adición Michael. Puesto que el componente precursor nucleófilo (el multi-tiol), solamente reacciona con el componente multi-aceptor (el grupo insaturado conjugado), a pH básico, los tres componentes que tienen que ser almacenados separadamente antes del mezclado son: la base, el componente nucleófilo y el componente multi-aceptor. Tanto el componente multi-aceptor como el componente multi-tiol, son almacenados como soluciones en tampones. Ambas composiciones pueden incluir el sitio de unión celular y adicionalmente la molécula bioactiva. De este modo, la primera composición del sistema puede incluir, por ejemplo, la solución del componente nucleófilo y la segunda composición del sistema puede incluir la solución del componente multi-aceptor. Cualquiera o ambas de las dos composiciones pueden incluir la base. En otra realización, el multi-aceptor y el multi-tiol, pueden ser incluidos como solución en la primera composición y la segunda composición puede incluir la base. La conexión y el mezclado ocurren de la misma forma que la descrita previamente para el fibrinógeno. El cuerpo de jeringa bipartito es igualmente adecuado para los componentes precursores sintéticos. En lugar del fibrinógeno y la trombina, los componentes multi-aceptor y multi-tiol son almacenados en forma pulverizada en una de las cámaras y la otra cámara contiene el tampón básico.

Adicionalmente, otros componentes, además de los ingredientes mencionados anteriormente, pueden ser incorporados en los sistemas de la presente invención. Por ejemplo, un material que contiene un mineral de calcio, es decir, una sustancia homogénea que se origina naturalmente que contiene iones de calcio tal como hidroxiapatita, puede ser usado.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Bioactividad de PTH<sub>1-34</sub> y TGpIPHT<sub>1-34</sub>

El péptido PTH<sub>1-34</sub>, que muestra actividad similar a la PTH<sub>1-84</sub> de longitud completa, y proteínas de esta longitud pueden ser sintetizados por métodos de síntesis peptídica de estado sólido estándar.

Todos los péptidos son sintetizados en resina sólida usando un sintetizador peptídico automatizado usando química estándar de 9-fluorenilmetoxicarbonilo. Los péptidos fueron purificados por cromatografía de c18 y analizados usando cromatografía de fase inversa vía HPLC para determinar la pureza, así como también espectroscopía de masas (MALDI), para identificar el peso molecular de cada producto. Usando este método, la PTH<sub>1-34</sub>, así como también TG-pl-PTH<sub>1-34</sub> (NQEQVSPLYKNRSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWL- RKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 12)) y TGPTH<sub>1-34</sub> (NQEQVSPLSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWL RKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 13)), fueron sintetizadas. Las TGpITPH<sub>1-34</sub> y TGPTH<sub>1-34</sub>, difieren de PTH<sub>1-34</sub> en que adicionalmente comprenden el dominio del sustrato del factor XIIIa, el cual está ligado a PTH<sub>1-34</sub> vía la secuencia pl degradable por plasmina YKNR (SEQ ID NO: 15), en el caso de TGpIPHT<sub>1-34</sub>, y directamente en el caso de TGPTH<sub>1-34</sub>.

Para estudiar la bioactividad de los péptidos de fusión de PTH, se estableció un ensayo de gen indicador. En este ensayo, un plásmido que contiene el gen indicador de luciferasa, el cual está ligado al promotor para el receptor de la hormona paratiroides, es transfectado en las células. Entonces, si la célula es expuesta a PTH y la PTH subsecuentemente se enlaza a su receptor en la célula, se inicia una cascada de señales, dirigida a través de los niveles elevados de cAMP. A través de una regulación de retroalimentación natural, entonces esto conduce a una reducción de los niveles del receptor de PTH. Como la reducción se dirige a través del promotor, entonces también

conduce a una disminución en la producción del gen indicador ligado. Usando este ensayo, la actividad tanto de PTH<sub>1-34</sub> nativa así como también de TG-pl-PTH<sub>1-34</sub>, se estudiaron y se compararon con un estándar internacional. Se observó que ambas de estas moléculas mostraron un nivel de actividad similar, ya que la reducción en la expresión del gen indicador para ambos fue la misma, y este nivel de actividad fue el mismo que para el estándar internacional. Los resultados se muestran en la figura 1.

### Ejemplo 2: Liberación de PTH a partir de una matriz de fibrina

Se hizo una matriz de fibrina a partir de componentes precursores de fibrina del kit TISSEEL® (Baxter AG, CH-8604 Volketswil/ZH). La composición se lista en la tabla 2. En la presencia de 0,1 µg/ml de PTH<sub>1-34</sub> o TGPTH<sub>1-34</sub> entonces se agregó a la trombina, y se mezcló para formar una concentración homogénea. La TGPTH<sub>1-34</sub>, solamente tiene una secuencia de transglutaminasa en el extremo amino-terminal, sin un sitio de degradación. De este modo, la TGPTH<sub>1-34</sub> solamente puede ser liberada por degradación de la propia matriz de fibrina. Este péptido se sintetizó como se describe anteriormente en el ejemplo 1.

Para el primer ensayo de liberación, se incubó una matriz de fibrina de 50 µl con 0,1 mg de PTH o TGPTH por ml de fibrina, a 37°C en 10 ml de tampón. Por lo tanto, la concentración de PTH o TGPTH en el tampón en el caso de una liberación total sería de 0,5 µg de PTH o TGPTH/ml de matriz de fibrina. Para comparar la estabilidad de PTH o TGPTH durante el ensayo, se diluyeron directamente en el tampón muestras de PTH o TGPTH, a una concentración de 0,5 µg de PTH o TGPTH/ml de matriz de fibrina. Se probaron tampones diferentes: agua destilada, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con tris.

Se tomaron alícuotas en los días 0, 1, 2, 4 y 6 y se analizaron directamente por ELISA. Los resultados mostraron que la PTH no fue estable durante más de 2 días en ninguno de los tampones. Por lo tanto, no pudo extraerse ninguna conclusión sobre los datos de liberación. La estabilidad de PTH se vio ciertamente afectada por su baja concentración y tampones que no fueron óptimos.

El experimento de liberación se repitió usando un tampón de estabilización que contenía 50 mM de manitol en 10 mM de tampón de acetato de sodio. Además, el tampón se intercambiaba cada 2 días para prevenir cualquier degradación peptídica. La concentración de PTH o TGPTH se incrementó hasta 1 mg de PTH o TGPTH/ml de matriz de fibrina en una matriz de fibrina de 100 µl y la incubación se logró en 1 ml de tampón. La concentración de PTH o TGPTH en el tampón en el caso de una liberación total sería de 100 µg/ml de matriz de fibrina (200 veces más que anteriormente). Como en el primer experimento, muestras con adiciones conocidas (la misma cantidad de PTH o TGPTH disuelta en el tampón como control) se prepararon para evaluar la estabilidad de PTH o TGPTH durante el experimento (100 µg/ml). Las muestras se recogieron cada 2 a 4 días (con un cambio de tampón) durante 2 semanas y se analizaron por ELISA directo. Las muestras con adiciones conocidas también se recogieron cada 2 días. Los resultados mostraron que bajo estas condiciones, la PTH y TGPTH son estables durante 2 semanas.

Como se puede ver de la figura 2, la liberación principal de la matriz de fibrina se logra en el plazo de 3 días. Casi 60% de PTH y 13% de TGPTH fueron liberados después del día 3. Estos datos demuestran que la retención de PTH en la matriz de fibrina es altamente mejorada por la adición de la secuencia de TG.

### Ejemplo 3: Síntesis de una matriz de fibrina suplementada que comprende un péptido de fusión de PTH

La matriz de fibrina se formó partiendo del kit TISSEEL® (Baxter AG, CH-8604 Volketswil/ZH) dando 4 ml de matriz de fibrina. El TISSEEL® se produjo de plasma combinado derivado de ser humano, y el contenido de los ingredientes activos puede variar de lote a lote dentro de intervalos predefinidos. La tabla 2 lista la composición final usada.

Tabla 2: Composición final que comprende TISSEEL® y componente activo

Ingredientes	Dosis por 2 ml de gel
<i>Jeringa 1</i>	
Componente activo:	
Péptido de fusión de PTH <sub>1-34</sub> (TGplPTH <sub>1-34</sub> )	de 0,2 a 20 mg
Agentes coagulantes	
Fibrinógeno	66-100 mg
Otras proteínas	
Aprotinina (bovina)	2046-3409 KIE
Albúmina humana	9,1-18,2 mg
Componentes tampones	
Niacinamida	2,7-8,2 mg
L-histidina	9,1-22,7 mg
Citrato de sodio	4,4-8,8 mg
Polisorbato 80	0,6-1,7 mg
Agua para inyección	hasta 1 ml
<i>Jeringa 2</i>	
Agentes coagulantes	
Trombina (humana)	2,5-6,5 U.I.
Componentes tampones	
Cloruro de calcio	5,8 + 0,6 mg
Cloruro de sodio	3,5-5,5 mg
Proteína (albúmina de suero humano)	45-55 mg
Agua para inyección	hasta 1 ml

5 El fibrinógeno se suspendió en una solución con aprotinina, un inhibidor de serina proteinasa el cual ayuda a reducir la fibrólisis para retener la integridad de la matriz de fibrina. Esta solución se insertó en una primera cámara de una jeringa de dos vías (jeringa 1). La trombina se proporciona separadamente en una solución de cloruro de calcio en una segunda cámara de una jeringa de dos vías (jeringa 2). Los sellantes de fibrina también contienen otros componentes de andamiajes de fibrina, tales como fibronectina plasmática, factor XIII, plasminógeno y albúmina

humana. La TGpl-PTH<sub>1-34</sub> se formuló en el componente de fibrinógeno para dar una concentración final en la matriz de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml en la matriz. La composición exacta usada se proporciona en la tabla 2.

5 Cuando los componentes de fibrinógeno y trombina se mezclaron en volúmenes iguales, ocurrió un proceso de coagulación para formar fibrina, una matriz extracelular natural. Durante el proceso de gelificación, la TGp-PTH<sub>1-34</sub> se reticuló en la matriz. El proceso de coagulación tuvo lugar durante 45-60 segundos lo que permitió la inyección simultánea de líquidos, a través de una punta mezcladora, en el defecto, en donde el gel se solidificó.

**Ejemplo 4:** Tratamiento de lesiones quísticas subcondrales en caballos usando PTH<sub>1-34</sub> reticulada en una matriz de fibrina inyectable.

10 Los quistes óseos subcondrales en caballos son una entidad clínica similar a quistes óseos unicamerales en seres humanos y, por lo tanto, han sido usados como un modelo para valorar el potencial de cicatrización de PTH<sub>1-34</sub> reticulada en matrices de fibrina.

Se sometieron a cirugía 12 caballos (12 quistes) por medio de lo cual el contenido del quiste se extrajo por cureta de drenaje. Los quistes se localizaron en varias articulaciones en la pata delantera, así como también en la pata trasera.

15 La composición del ejemplo 3 que contiene volúmenes iguales de fibrinógeno y trombina se inyectó en el SCL junto con TGplPTH<sub>1-34</sub> a concentraciones finales de 10, 1 y 0,4 mg/ml y se dejó polimerizar *in situ*. Se usó un volumen promedio de 2 ml de matriz suplementada para llenar los defectos, con volúmenes que variaron desde 0,2-5 ml de matriz suplementada. La edad de los caballos variaba desde 2 meses hasta 11 años. Los seguimientos se realizaron a 2, 4, 6 y 12 meses post-operativamente investigando radiografías, así como también la cicatrización clínica.

20 La administración intralesional dio como resultado cicatrización muy buena del SCL. Todos los caballos analizados mostraron progreso significativo en cicatrización clínica y radiográfica. La cicatrización radiográfica se reflejó por una densidad superior del contenido del quiste y una reducción en el tamaño de quistes y ocurrió 2-6 meses post-operativamente con una tendencia a cicatrización más rápida a concentraciones inferiores de PTH<sub>1-34</sub>. Casi todos los caballos fueron clínicamente curados después de solamente 2-4 meses post-operativamente, y de este modo ya no mostraron ninguna cojera.

Estos resultados son especialmente alentadores ya que se logró una cura satisfactoria en caballos adultos con una edad de 3 años o más, que se sabe que tienen un pronóstico particularmente malo de regeneración ósea.

Las concentraciones de 0,4 a 10 mg/ml han mostrado ser efectivas con una tendencia de mejor cicatrización a concentraciones inferiores.

30 Los tratamientos con la matriz suplementada que contenía dosis inferiores de TGplPTH<sub>1-34</sub> (0,1 mg/ml), también han mostrado promover la cicatrización de SCL.

TABLA 3: Información general del paciente y ubicación del SCL

N.º interno	Raza	Sexo	Edad	Ubicación del SCL
1	Inländer	Yegua	1 año	1 <sup>era</sup> falange/articulación de cuartilla, izquierda frontal
2	Inländer	Yegua	10 años	Hueso de caña/articulación de espolón, derecha frontal
3	Württemberg-berger	Yegua	11 años	Radio, derecho
5	Pinto	Yegua	3 años	Rótula/babilla, derecha
7	Vollblut	Yegua	3 años	Hueso sesamoide/articulación de espolón, derecha frontal

(continuación)

N.º interno	Raza	Sexo	Edad	Ubicación del SCL
12	Olden-burger	Yegua	3 años	Hueso sesamoide/articulación de espolón, izquierda frontal
13	Inländer	Yegua	3 años	Fémur/babilla, derecha
15	Inländer	Yegua	2 meses	Osteomielitis de fémur/babilla, derecha
16	Inländer	Castrado	2 meses	Osteomielitis de fémur/babilla, derecha
18	Araber	Castrado	5 años	Hueso de caña/articulación de espolón, izquierda frontal
19	Inländer	Semental	3 años	Hueso de caña/articulación de espolón, derecha frontal
20	Inländer	Castrado	9 años	Hueso calcáneo, articulación de corvejón, derecha

TABLA 4: Grado de cojera antes y durante el tratamiento

N.º interno	TGpPTH <sub>1-34</sub> en matriz de fibrina [mg/ml]	Cicatrización clínica (grado de cojera)				
		Antes del tratamiento	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses
2	10	3	2	Curado	Curado	Curado
	1	3-4	1	Curado	-	Curado
3	1	2	Curado	Curado	-	-
5	1	3	Curado	-	Curado	
7	1	2	1	Curado	-	
19	1	1	Curado	Curado		
12	0,4	3	Curado	Curado	-	
13	0,4	2	Curado	-		
15	0,4	5	2	-	curado	
16	0,4	4	1			
18	0,4	1	Curado			
20	0,4	3	-	1		
Curado = sin cojera presente						
- = sin visita de control						

La cojera se graduó usando el criterio expuesto en la tabla 5.

TABLA 5: Grados de cojera y criterios correspondientes

Grado de cojera	Criterio
1 - menor, no clara	Cojera no consistentemente aparente: sin cojera al caminar, solamente irregular al trotar
2 – menor, clara	Cojera consistentemente aparente bajo circunstancias especiales: sin cojera al caminar, cojera en cada paso al trotar
3 – media	Cojera consistentemente aparente: cojera clara caminando y trotando
4 – cojera de grado alto	Cojera severa
5 – cojera de grado superior	Sin cargar nada

**Ejemplo 5:** Modelo de Hueso trabecular de conejo

- 5 Para estudiar el potencial de fibrina-TGpIPTH para inducir el engrosamiento intraóseo de hueso trabecular, se estableció un modelo de ratón. Se inyectaron 150 µl de varias dosis de TGpIPTH en fibrina en los fémures distales de dieciséis conejos blancos de Nueva Zelanda. Los conejos se anestesiaron y se expuso el cóndilo femoral. Se taladró un pequeño agujero a través del hueso cortical en el lado del cóndilo y el material se introdujo en el hueso a través de una aguja de 22G conectada a una jeringa de 1 ml. Las dosis probadas fueron 0, 0,1, 0,4 y 1,0 mg de TGpIPTH<sub>1-34</sub>/ml de matriz de fibrina siendo la pierna opuesta de cada conejo un control no tratado. Después de 8 semanas, los animales fueron sacrificados y los cóndilos femorales se sometieron a µCT para valorar la densidad ósea después del tratamiento. La densidad ósea incrementó en aproximadamente 10% después del tratamiento con 1 mg de TGP1PTH<sub>1-34</sub>/ml de matriz de fibrina.

**Ejemplo 6:** Visualización, monitoreo y pruebas de manipulación de fibrina radioopaca inyectada en hueso ovino

- 15 Para visualizar el flujo de una matriz de fibrina con hueso bajo fluoroscopia y rayos-X, se incorporó un agente de contraste a base de yodo, iohexol, en la matriz de fibrina. Se disolvieron 600-800 mg de iohexol en la solución precursora de trombina para dar concentraciones finales de 300-400 mg/ml de iohexol por matriz de fibrina. Se probó un intervalo de trombina en la composición precursora de trombina (4-10 U/ml). Los otros componentes de la matriz de fibrina son como se describen en la tabla 2.
- 20 Una prueba de gelificación mostró que se requerían concentraciones superiores de trombina para formar el gel. Ambos componentes se inyectaron como líquidos simultáneamente en la vértebra de ovejas y fémur distal vía una jeringa doble y una aguja colocada en el hueso y se dejaron polimerizar *in situ*. El gel podía ser claramente visualizado usando rayos X y fluoroscopia.

**Ejemplo 7:** Fibrina pre-polimerizada inyectada en hueso ovino, visualización y pruebas de manejo

- 25 Para visualizar y probar el manejo de una matriz de fibrina pre-polimerizada dentro del hueso bajo fluoroscopia y rayos-X, se incorporó un agente de contraste a base de yodo, iohexol, en el gel. Se disolvieron 600-800 mg de iohexol en el tampón de dilución de trombina para dar la concentración final de 300-400 mg/ml de iohexol en la matriz de fibrina. El precursor de trombina se agregó a la solución de tampón-iohexol a una concentración de 75 U/ml de solución tampón. Los otros componentes de la matriz de fibrina son como se describen en la tabla 2.

5 Una prueba de gelificación mostró que había una formación rápida de la matriz después del mezclado de los componentes precursores que comprendían los componentes de trombina y fibrinógeno. Ambas soluciones precursoras se inyectaron como líquidos simultáneamente en una tercera jeringa con una rosca de tornillo y se dejaron polimerizar completamente. La matriz que contenía agente de contraste se introdujo en vértebras ovinas a través de una aguja grande colocada en el hueso. El gel podía ser claramente visualizado usando rayos-X y fluoroscopia.

Lista de secuencias

<110> SCHENSE, JASON WATSON, JOHN ARRIGHI, ISABELLE

<120> Tratamiento local de defectos óseos

10 <130> KUROS 132

<150> Documento US 60/641.830

<151> 06-01-2005

<150> Documento US 60/642.848

<151> 10-01-2005

15 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Tyr Ile Gly Ser Arg  
1 5

<210> 2

<211> 8

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu  
1 5

<210> 3

30 <211> 5

<212> PRT



<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Leu Arg Gly Asp Asn  
1 5

<210> 4

5 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Pro Asp Gly Ser Arg  
1 5

10 <210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ile Lys Val Ala Val  
1 5

15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 6

Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile  
1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

Gly Cys Arg Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln Asp Arg Cys  
1 5 10

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

Gly Ala Lys Asp Val  
1 5

<210> 9

<211> 4

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Lys Lys Lys Lys  
1

<210> 10

15 <211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Tyr Arg Gly Asp Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly  
1 5 10 15

20 <210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Leu Ile Lys Met Lys Pro  
1 5

25

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 12

Asn Phe Lys Ser Gln Leu  
1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Acetilado

<222> (1)..(1)

<400> 13

Gly Pro Leu Ala Leu Thr Ala Leu  
1 5

15

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <220>

<221> Acetilado

<222> (1)..(1)

<400> 14

Pro Phe Glu Leu Arg Ala  
1 5

25 <210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Glx Ala Ala Phe Ala  
1 5

<210> 16

5 <211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Pro  
1 5

10 <210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Pro His Tyr Gly Arg ser Gly Gly  
1 5

15

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 18

Pro Gly Ser Gly Arg ser Ala ser Gly  
1 5

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

**Tyr Lys Asn Arg**  
1

<210> 20

<211> 46

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hormona paratiroides modificada (PHT), que comprende los aminoácidos 1-34 de la PTH nativa así como también un dominio de sustrato de transglutaminasa y una secuencia degradable por plasmina

<400> 20

**Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Tyr Lys Asn Arg Ser Val Ser Glu**  
1 5 10 15

**Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg**  
20 25 30

**Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe**  
35 40 45

10

<210> 21

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Hormona paratiroides modificada (PHT), que comprende los aminoácidos 1-34 de la PTH nativa así como también un dominio de sustrato de transglutaminasa

<400> 21

**Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met**  
1 5 10 15

**His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu**  
20 25 30

**Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe**  
35 40

20

<210> 22

<211> 21

ES 2 476 996 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína de fusión que comprende los aminoácidos 283-396 de la hormona paratiroides nativa y un dominio de sustrato de transglutaminasa

<400> 22

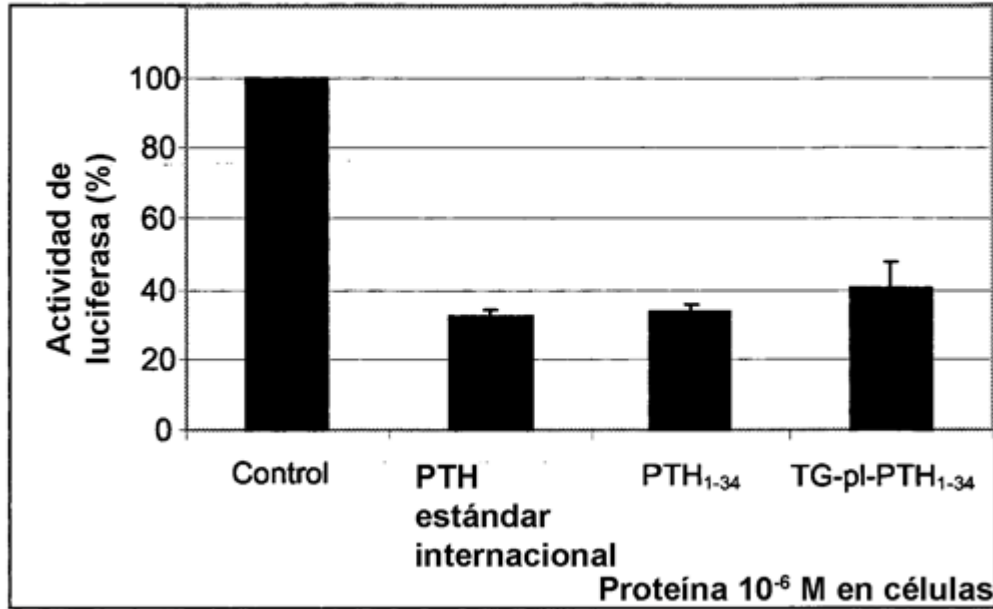
Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Pro Val Glu Leu Pro Leu Ile  
1 5 10 15

Lys Met Lys Pro His  
20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una formulación que comprende un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de una hormona paratiroides PTH y un péptido de fusión que comprende una PTH en un primer dominio, y un dominio de sustrato covalentemente reticulable en un segundo dominio, y una composición capaz de formar una matriz que puede servir como matriz en crecimiento de células en un sitio en un hueso en necesidad de tratamiento, para la prevención o el tratamiento de una fractura en áreas de huesos no sanos afectadas por osteoporosis, en la que la formulación es para la administración local al área de huesos no sanos.
2. Formulación para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el péptido de fusión está covalentemente unido a la matriz durante su formación.
- 10 3. Formulación de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, en donde la formulación es inyectable.
4. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido de fusión además comprende un sitio de degradación entre el primer y segundo dominio.
5. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la PTH se selecciona del grupo que consiste de PTH<sub>1-84</sub>, PTH<sub>1-28</sub>, PTH<sub>1-34</sub>, PTH<sub>1-31</sub> y PTH<sub>1-25</sub>.
- 15 6. Formulación para su uso de conformidad con la reivindicación 5, en donde la PTH es PT<sub>1-34</sub>.
7. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el segundo dominio del péptido de fusión comprende un dominio de sustrato de transglutaminasa.
8. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la formulación además comprende un agente de contraste.
- 20 9. Formulación para su uso de conformidad con la reivindicación 7, en donde el dominio de sustrato de transglutaminasa es un dominio de sustrato de factor XIIIa.
10. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición capaz de formar una matriz comprende fibrinógeno, trombina y una fuente de calcio.
- 25 11. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la matriz se forma por una reacción de adición de tipo Michael entre al menos una primera molécula precursora que comprende n grupos nucleófilos y al menos una segunda molécula precursora que comprende m grupos electrófilos, en donde n y m son al menos dos y la suma de n+m es al menos cinco.
- 30 12. Formulación para su uso de conformidad con la reivindicación 11, en donde la primera molécula precursora es un polietilenglicol que comprende grupos nucleófilos y la segunda molécula precursora es un polietilenglicol que comprende grupos electrófilos.
13. Formulación para su uso de conformidad con la reivindicación 12 ó 13, en donde los grupos electrófilos son grupos insaturados conjugados y los grupos nucleófilos se seleccionan del grupo que consiste de tioles y aminas.
14. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el segundo dominio del péptido de fusión comprende al menos una cisteína.
- 35 15. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la concentración de PTH o el péptido de fusión que comprende una PTH en la formulación oscila entre 0,01 y 2 mg de PTH o péptido de fusión de PTH/ml de composición capaz de formar la matriz.
- 40 16. Formulación para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la composición capaz de formar una matriz comprende más de al menos dos componentes, y en donde la formulación se proporciona en un kit en el cual un primer componente de la composición capaz de formar una matriz se almacena por separado de un segundo componente de la composición.
17. Formulación para su uso de conformidad con la reivindicación 16, en donde el kit además comprende una enzima de reticulación.

**FIG. 1**



**FIG. 2**

