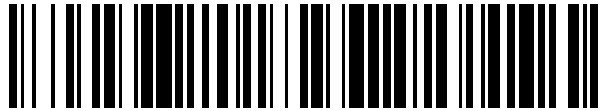


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 515**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61K 33/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2007 E 07836194 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2049040**

54 Título: **Dispositivo de coágulo derivado de sangre entera para el tratamiento de defectos óseos**

30 Prioridad:

**21.07.2006 US 832732 P**

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

**01.07.2015**

73 Titular/es:

**GENERA ISTRAZIVANJA D.O.O. (100.0%)  
Svetonedjeljska 2, Kalinovica  
10436 Rakov Potok, HR**

72 Inventor/es:

**VUKICEVIC, SLOBODAN;  
GRGUREVIC, LOVORKA y  
OPPERMANN, HERMANN**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 539 515 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

Dispositivo de coágulo derivado de sangre entera para el tratamiento de defectos óseos

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/832.732, presentada el 21 de julio de 2006.

10 **Campo de la Invención**

La presente invención se incluye en el campo de tratamientos de defectos óseos. En particular, la invención proporciona una composición que comprende un coágulo derivado de sangre entera para su uso en el tratamiento de defectos óseos.

15

**Antecedentes**

Durante más de 30 años, las proteínas morfogenéticas óseas ("BMP", "morfógenos", proteínas osteoinductoras"), una subclase particular de la súper familia de proteínas del factor  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), se han estudiado para entender el papel que estas proteínas desempeñan no solo en la formación de hueso y cartílago sino también en la regeneración de tejido blando (por ejemplo, riñón, corazón, ojo) y desarrollar dicho entendimiento en terapias clínicamente eficaces (véase, por ejemplo, Hoffmann *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 57: 294-308 (2001); Reddi, J. Bone Joint Surg., 83-A(Supp. 1): S1-S6 (2001); las patentes de Estados Unidos Nos 4.968.590; 5.011.691; 5.674.844; 6.333.312). En un esfuerzo para desarrollar dichas terapias basadas en BMP para tratar defectos óseos, pronto se hizo evidente que el modo preferido para tratar un defecto óseo sería implantar en un sitio de defecto algún tipo de matriz implantable portadora de una cantidad eficaz de una BMP.

Las BMP osteogénicas aplicadas localmente dan soporte a la formación de nuevo hueso, cartílago y ligamentos. Actualmente, tan solo pocas terapias basadas en BMP se han aprobado para el tratamiento de fracturas. Stryker Biotech (Hopkinton, Massachusetts, Estados Unidos) fabrica y distribuye la BMP-7 (OP-1) para el tratamiento de fracturas de huesos largos sin unión. Wyeth Pharmaceuticals (Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos) fabrica y distribuye la BMP-2 para fracturas agudas de huesos largos y Medtronic, Inc. (Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos) para fusiones espinales. En cada una de esas terapias aprobadas, el ingrediente activo de la BMP se combina con una matriz de colágeno derivada de bovino (colágeno bovino de tipo 1). Debido a su fuente bovina, el colágeno debe purificarse altamente para eliminar la inmunogenicidad y la contaminación viral. Además, la fuente bovina del colágeno también presenta un riesgo de encefalopatía esponjiforme bovina (EEB, enfermedad de las vacas locas). Por consiguiente, la purificación y el procesamiento, necesarios para la matriz del colágeno en las terapias actualmente aprobadas, añade costes considerables que sitúan a estos dispositivos mucho más allá del alcance de muchas personas en todo el mundo. Además, aunque bajo, el riesgo de EEB asociado con productos bovinos puede limitar adicionalmente la aceptación por parte del paciente de estas terapias basadas en BMP disponibles en el comercio. Dado que incluso las preparaciones más puras de colágeno pueden estimular una respuesta inmunitaria en un paciente, se han ensayado diversos nuevos transportadores, incluyendo sales de hidroxil apatita y diversos polímeros sintéticos. Dichas alternativas no son naturales y pueden presentar sus propios problemas, tales como irritación de tejido local, inmunogenicidad y efectos desconocidos sobre la fisiología de células y tejidos en un paciente.

Aunque durante muchas décadas se han realizado amplias afirmaciones sobre el posible uso de muchas otras sustancias como posibles transportadores de matriz para terapias basadas en BMP para tratar defectos óseos, hasta ahora, tan solo se han desarrollado o aprobado las mencionadas anteriormente. Claramente, continúa habiendo una necesidad de medios y métodos que sean eficaces y accesibles para administrar proteínas osteogénicas a los sitios de defectos óseos.

Sumario de la invención

La invención resuelve los problemas anteriores proporcionando una composición descrita en el presente documento como un "dispositivo de coágulo derivado de sangre entera" ("WBCD", *Whole Blood Derived Coágulo Device*) que pueden servir como un transportador para un compuesto osteogénico para tratar defectos óseos, incluyendo fracturas y sitios en un hueso que se caracterizan por crecimiento óseo inadecuado como se observa en diversas enfermedades óseas metabólicas. El WBCD descrito en el presente documento es una composición que comprende sangre entera que forma un coágulo (grumo) que puede implantarse o inyectarse en un sitio de un defecto óseo deseado. El coágulo solo, carece de la integridad estructural que se requiere para aplicar a los defectos óseos por inyección o implante en un sitio de un defecto óseo deseado. Un WBCD, como el que se describe en el presente documento, es una composición que comprende sangre entera y también una cantidad suficiente de un ion de calcio para proporcionar un gel de coágulo, homogéneo, cohesivo, que puede utilizarse en una jeringa, inyectable y maleable.

65

En una realización, la invención proporciona un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) para el tratamiento de un defecto óseo en un individuo preparado por las etapas que comprenden:

(a) combinar:

- (1) sangre entera,
- (2) una proteína osteogénica,
- (3) cloruro de calcio proporcionado de manera exógena y
- (4) opcionalmente, una mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena,

(b) incubar los ingredientes combinados en la etapa (a) hasta que se forme un coágulo mecánicamente estable,

en el que el ion de calcio proporcionado de manera exógena está presente a una concentración que es eficaz para proporcionar un gel de coágulo, homogéneo, cohesivo, que puede utilizarse en una jeringa, que es inyectable y maleable.

Preferentemente, un WBCD descrito en el presente documento comprende sangre entera autóloga extraída del individuo o sangre entera que se ha compatibilizado con el individuo.

En un WBCD descrito en el presente documento puede usarse cualquiera de una variedad de proteínas osteogénicas. Preferentemente, la proteína osteogénica es una proteína morfogenética ósea osteogénica (BMP, *Bone Morphogenetic Protein*). Más preferentemente, una BMP osteogénica útil en las composiciones y métodos descritos en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, sus heterodímeros y sus combinaciones. Preferentemente, una BMP, u otra proteína osteogénica, están presentes en un WBCD descrito en el presente documento a una concentración en el intervalo de 50 µg/ml a 500 µg/ml.

En otra realización preferida, un WBCD descrito en el presente documento se prepara usando ion de calcio proporcionado de manera exógena en el intervalo de 1 mM a 2,5 mM, inclusive. Una fuente preferida de ion de calcio es cloruro de calcio. Un intervalo preferido para el uso de cloruro de calcio añadido de manera exógena en un WBCD es de 5 mM a 15 mM, inclusive.

En una realización preferida, un WBCD se prepara con una mezcla de fibrina y trombina (ingrediente opcional del punto 4 anterior) proporcionada de manera exógena. Las mezclas de trombina y fibrina útiles en un WBCD descrito en el presente documento pueden prepararse mezclando simplemente fibrina y trombina con el resto de ingredientes del WBCD. Como alternativa, la fibrina y la trombina pueden mezclarse previamente o adquirirse como una mezcla, y la mezcla puede después añadirse al resto de ingredientes. Las mezclas de fibrina y trombina útiles en un WBCD incluyen lo que se conoce en la técnica como "cola de fibrina" o "sellador de fibrina". Las preparaciones comerciales de mezclas de fibrina y trombina, colas de fibrina y selladores de fibrina están fácilmente disponibles. La fibrina y la trombina disponibles en la técnica para su uso en un WBCD como el descrito en el presente documento no son una fuente de inmunogenicidad significativa que normalmente suscitara una respuesta inmunitaria en la mayoría de individuos. Preferentemente, la mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena proporciona fibrina en el intervalo de 5 mg/ml a 10 mg/ml, inclusive, y trombina en el intervalo de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml. Para atrapar una BMP osteogénica y por lo tanto potenciar la retención de la BMP en el WBCD localmente en un sitio de defecto, se prefiere particularmente una mezcla de fibrina y trombina. La presencia de una mezcla de fibrina y trombina también mejora la consistencia y otras características del WBCD. Por consiguiente, a medida que el tamaño de un defecto óseo disminuye o disminuye la distancia a reconectar por el crecimiento se hueso nuevo entre extremos óseos de un defecto, pueden usarse menores cantidades de una mezcla de fibrina y trombina.

La incorporación de una mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena en un WBCD es particularmente útil para atrapar el ingrediente de proteína osteogénica antes de la adición de la sangre entera y su posterior coagulación. Dicho atrapamiento del ingrediente de proteína osteogénica en una matriz de fibrina y trombina antes de la coagulación aumenta la retención de la proteína osteogénica en el WBCD en un sitio de defecto y, por lo tanto, mejora la estimulación de la formación de nuevo hueso en el sitio del defecto.

En otra realización preferida, el WBCD se prepara como se ha mencionado anteriormente, excepto que la etapa (a) se realiza preparando una primera mezcla combinando la mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena, el cloruro de calcio proporcionando de manera exógena, y la proteína osteogénica, seguido de incubación de la primera mezcla durante al menos 15 minutos, y después de esto añadir la sangre entera a la primera mezcla para formar una segunda mezcla, e incubar la segunda mezcla durante aproximadamente 20 minutos. Esta realización atrapa las proteínas osteogénicas en la mezcla de fibrina y trombina y por lo tanto mejora la retención de la proteína osteogénica en el WBCD localmente en un sitio de defecto. Por consiguiente, esta realización es particularmente preferida para el tratamiento de defectos relativamente grandes, incluyendo defectos de tamaño crítico sin unión, donde una cantidad relativamente grande de hueso debe crecer para llenar y reconectar el defecto.

Un WBCD como se describe en el presente documento puede usarse para tratar un defecto óseo, que incluye, sin limitación, fracturas óseas y hueso caracterizado por crecimiento óseo inadecuado como sucede en diversas

enfermedades óseas metabólicas, por ejemplo, osteoporosis, osteopenia, y enfermedad de Paget.

Un WBCD como se describe en el presente documento se administra preferentemente en el sitio de un defecto óseo por inyección o por implante.

5 Un WBCD como se describe en el presente documento puede usarse inmediatamente después de finalizar su preparación para tratar un defecto óseo en un individuo o guardarse para uso futuro en el tratamiento de un defecto óseo del individuo. Preferentemente, un WBCD de la invención se usa para tratar un defecto óseo al cabo de aproximadamente 45 minutos del inicio de su preparación.

10 En otra realización, la invención proporciona un kit para preparar un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) que comprende:

- 15 1. un vial que contiene una BMP osteogénica liofilizada,
2. un tampón para reconstituir el polvo de la BMP liofilizada,
3. una jeringa para reconstituir la BMP liofilizada en el tampón,
4. un vacutainer para recoger la sangre de un paciente,
5. una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 1 M,
- 20 6. una mezcla de fibrina y trombina,
7. un envase siliconado, de plástico, para mezclar la sangre entera con la BMP reconstituida,
8. una espátula o jeringa para aplicar el WBCD a los extremos óseos durante la cirugía abierta, e
9. instrucciones para la preparación y uso del WBCD osteogénico usando sangre autóloga o compatibilizada.

#### 25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una inmunotransferencia de Western de la recuperación de BMP-7 soluble (sBMP) de muestras de sangre. Los carriles 1-6 muestran muestras de sangre "*in vivo*", es decir, muestras de sangre obtenidas de ratas después de inyección con sBMP-7. Los carriles 7-9 muestran muestras de sangre "*in vitro*", es decir, muestras de sangre obtenidas de ratas y después enriquecidas con sBMP-7. Carril 1: Muestra de sangre de rata inyectada con sBMP-7 recogida en tubo con EDTA. Carril 2: Muestra de sangre de rata de control recogida en tubos con EDTA. Carril 3: Muestra de sangre de rata inyectada con sBMP-7 recogida en tubo con citrato. Carril 4: Muestra de sangre de rata de control recogida en tubo con citrato. Carril 5: Muestra de sangre de rata inyectada con sBMP-7 recogida en tubo sin añadir anticoagulantes. Carril 6: Muestra de sangre de rata de control recogida en tubos sin anticoagulantes añadidos. Carril 7: Muestra de sangre de rata recogida en tubo con citrato al que se añadieron (enriquecida) 100 ng de BMP-7 inmediatamente después de extraer la sangre. Carril 8: Muestra de sangre de rata recogida en tubo sin anticoagulantes añadidos al que se añadieron 100 ng de sBMP-7 inmediatamente después de extraer la sangre. Carril 9: Muestra de sangre de rata recogida en tubo sin anticoagulantes añadidos al que se añadieron 100 ng de sBMP-7 después de producirse la formación del coágulo. Carril 10: sPMB-7 convencional 200 ng. Para detalles, véase, el Ejemplo 1 más adelante.

40 La Figura 2 muestra la retención de 2 µg (9.147.376 rpm) de proteína BMP-6 MAG3-99mTc añadida a muestras de 1 ml de sangre entera de rata. También se muestra la cantidad (en rpm) de BMP-6 marcada retenida en la fracción de suero y en el coágulo de la sangre entera. El 29 % (266.0594 rpm) de la BMP-6 marcada se retuvo en el coágulo. Para detalles, véase el Ejemplo 2, más adelante.

45 La Figura 3 muestra la retención de 5 µg (1.924.768 rpm) de BMP-6 MAG3-99mTc añadida a muestras de 1 ml de sangre entera de rata. También se muestra la cantidad (en rpm) de BMP-6 marcada retenida en la fracción de suero y en el coágulo de la sangre entera. El 45 % (8.586.759 rpm) de la proteína BMP-6 marcada se retuvo en el coágulo. Para detalles, véase el Ejemplo 2, más adelante.

50 La Figura 4 muestra la retención de 10 µg de BMP-6 MAG3-99mTc (33.690.011 rpm) añadida a muestras de 1 ml de sangre entera de rata. También se muestra la cantidad (en rpm) de BMP-6 marcada retenida en la fracción de suero y en el coágulo de la sangre entera. El 44 % (14.824.426 rpm) de la proteína BMP-6 marcada se retuvo en el coágulo. Para detalles, véase el Ejemplo 2, más adelante.

55 La Figura 5 muestra una inmunotransferencia de Western de BMP en diversas muestras de sangre. Los carriles 1-6 muestran muestras de sangre "*in vivo*", es decir, muestras de sangre obtenidas de ratas después de inyección con sBMP-7. Los carriles 7 y 8 muestran muestras de sangre "*in vitro*", es decir, muestras de sangre obtenidas de ratas y después enriquecidas con sBMP-7. Carril 1: Muestra de sangre 1 minuto después de inyección de la rata con sBMP-7 recogida tubo que contenía EDTA. Carril 2: Muestra de sangre 5 minutos después de inyección de la rata con sBMP-7 recogida en tubo que contenía EDTA. Carril 3: Muestra de sangre 10 minutos después de inyección de rata con sBMP-7 recogida en tubo que contenía EDTA. Carril 4: Muestra de sangre 15 minutos después de inyección de la rata con sBMP-7 recogida en tubo que contenía EDTA. Carril 5: Muestra de sangre 20 minutos después de inyección de rata con sBMP-7 recogida en tubo que contenía EDTA. Carril 6: Muestra de sangre 30 minutos después de inyección de rata con sBMP-7 recogida en tubo que contenía EDTA. Carril 7: Muestra de sangre de una rata recogida en un tubo sin anticoagulantes añadidos, al que se añadieron 100 ng de sBMP-7 inmediatamente después de extraerse ("*in vitro*"). Carril 8: Muestra de sangre de una rata recogida en un tubo sin anticoagulantes añadidos, al que se añadieron 100 ng de sBMP-7 5 minutos después de extraer la sangre. Carril 9: sBMP-7 convencional de 200 ng. Carril 10: Marcadores convencionales. Para detalles, véase más adelante el Ejemplo 3.

Las Figuras 6A y 6B muestran rayos X de un defecto cubital de tamaño crítico representativo en un conejo tratado con un coágulo de sangre autóloga sin BMP-7 ("WBCD de control") después de 8 semanas (Grupo A en el Ejemplo 8). Para detalles, véase más adelante el Ejemplo 8.

Las Figuras 7A y 7B muestran rayos X de un defecto cubital de tamaño crítico representativo en un conejo tratado con un coágulo de sangre autóloga que contenía BMP-7 (100 µg) (Grupo C en el Ejemplo 8). Los rayos X muestran que el defecto se había reconectado 8 semanas después de la cirugía. Las flechas indican bordes de defecto original. Para detalles, véase más adelante el Ejemplo.

Las Figuras 8A y 8B muestran rayos X de un defecto cubital de tamaño crítico representativo en un conejo tratado con una esponja de colágeno disponible en el comercio a la que se añadió BMP-7 (200 µg) (Grupo E en el Ejemplo 8). Los rayos X muestran que el defecto se había reconectado 8 semanas después de la cirugía. Las flechas indican bordes del defecto original. Para detalles, véase más adelante el Ejemplo 8.

La Figura 9 muestra rayos X de un defecto cubital de tamaño crítico en un conejo tratado con un coágulo de sangre que contenía BMP-7 (100 µg) después de 6 semanas como se describe en el Ejemplo 9. Los rayos X indican que la consistencia del coágulo era insuficiente para mantener una conexión entre los dos extremos óseos durante un periodo de tiempo necesario para formar hueso en toda la longitud del defecto.

La Figura 10 muestra rayos X de un defecto cubital de tamaño crítico en un conejo tratado con un coágulo de sangre que contenía BMP-7 (100 µg) después de 6 semanas como se describe en el Ejemplo 9. Los rayos X indican que la consistencia del coágulo era insuficiente para mantener una conexión entre los dos extremos óseos durante un periodo de tiempo necesario para formar hueso en toda la longitud del defecto.

La Figura 11 muestra rayos X de un defecto cubital de tamaño crítico en un conejo tratado con un coágulo de sangre que contenía BMP-7 (100 µg) a las 6 semanas (Figura 11A) y a las 8 semanas (Figura 11B) como se describe en el Ejemplo 9. Los rayos X indican que el coágulo se deshace en un momento temprano y que solo se aprecian lamente son manchas de tejido mineralizado en el área del defecto.

La Figura 12 muestra rayos X de un defecto cubital de tamaño crítico en un conejo tratado con un coágulo de sangre que contenía cloruro de calcio proporcionado de manera exógena (Figura 12A) o que contenía cloruro de calcio proporcionado de manera exógena y sellador de fibrina proporcionado de manera exógena (mezcla de fibrina y trombina) (Figura 12B) a las 8 semanas. El cloruro de calcio mejoró la viscosidad del coágulo en el sitio del defecto para promover el crecimiento óseo en el defecto como se muestra en la Figura 12A. La Figura 12B muestra que, usando un coágulo que contenía cloruro de calcio y el sellador de fibrina en el defecto, la calidad radiográfica de hueso recién formado es incluso mejor. Para detalles, véase más adelante el Ejemplo 9.

### Descripción de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que la sangre entera extraída de un individuo puede emplearse en una composición para proporcionar un transportador útil y asequible para la administración de un compuesto osteogénico, tal como una proteína morfogenética ósea (BMP) osteogénica, a un defecto óseo. En particular, la invención proporciona un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) que puede prepararse para la administración a un defecto óseo en un individuo al cabo de una hora o menos de preparar el dispositivo.

Para que la invención pueda entenderse más claramente, se definen los siguientes términos.

Los términos "proteína morfogenética ósea", "BMP" y "morfógeno" son sinónimos y se refieren a cualquier miembro de una subclase particular (es decir, la familia de BMP) de la súper familia de proteínas del factor-β de crecimiento transformante (TGF-β) (véase, por ejemplo, Hoffmann *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 57: 294-308 (2001); Reddi, J. Bone Joint Surg., 83-A (Sup. 1): S1-S6 (2001); las patentes de Estados Unidos Nos 4.968.590; 5.011.691; 5.674.844; 6.333.312). Todas dichas BMP tienen un péptido señal, un prodominio, y un dominio carboxi-terminal (maduro). El dominio carboxi-terminal es la forma madura del monómero de BMP y contiene una región altamente conservada caracterizada por siete cisteínas que forman un nudo de cisteína (véase, Griffith *et al.*; Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 93: 878-883 (1996)).

Las BMP se aislaron originalmente de hueso de mamífero usando métodos de purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Urist *et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 173: 194-199 (1983); Urist *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 371-375 (1984); Sampath *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7109-7113 (1987); la patente de Estados Unidos N° 5.496.552). Sin embargo, las BMP también se han detectado en, o aislado de, otros tejidos y órganos de mamífero incluyendo riñón, hígado, pulmón, cerebro, músculo, dientes e intestino. Las BMP también pueden producirse usando tecnología convencional de ADN recombinante *in vitro* para la expresión en cultivos de células procariotas o eucariotas (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2220-2224 (1990); Wozney *et al.*, Science, 242: 1528-1534 (1988)). Algunas BMP se encuentran disponibles en el comercio para uso local también (por ejemplo, Stryker Biotech (Hopkinton, Massachusetts, Estados Unidos) fabrica y distribuye la BMP-7 para el tratamiento de fracturas de huesos largos sin unión; Wyeth (Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos) fabrica y distribuye la BMP-2 para fracturas agudas de huesos largos y también Medtronic, Inc. (Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos) para fusiones espinales.

Las BMP normalmente existen como dímeros de los mismos polipéptidos monoméricos (homodímeros) sujetos entre sí por interacciones hidrófobas y al menos un enlace disulfuro intercatenario (entre monómeros). Sin embargo, las

- BMP también pueden formar heterodímeros combinando los monómeros de diferentes grados (longitudes) de procesamiento (por ejemplo, un monómero no procesado, de longitud completa, asociado con un monómero procesado, maduro), monómeros de diferentes BMP (por ejemplo, un monómero de BMP-6 asociado con un monómero de BMP-7). Un dímero de BMP de monómeros no procesados o un heterodímero de BMP de un monómero de BMP procesado y un monómero de BMP no procesado son típicamente solubles en soluciones acuosas, mientras que un homodímero de BMP que comprende dos monómeros completamente procesados (maduros) es sólo soluble en una solución acuosa a un pH bajo (por ejemplo, tampón acetato, pH 4,5) (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Growth Factors*, 11: 215-225 (1994)).
- Las BMP útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento son aquellas que tienen actividad osteogénica, es decir, la capacidad de estimular la formación de hueso. La actividad osteogénica (u "osteoinductora") puede detectarse usando cualquiera de una diversidad de ensayos convencionales. Dichos ensayos osteogénicos incluyen ensayos de formación de hueso ectópico en los que una matriz transportadora que comprende colágeno y una BMP se implantan en un sitio ectópico en un roedor, y después el implante se monitoriza para la formación de hueso (Sampath y Reddi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7599-7603 (1981)). En una variación de dicho ensayo, la matriz puede implantarse en un sitio ectópico y la BMP puede administrarse en el sitio, por ejemplo, por inyección intravenosa en el roedor. Otra manera de ensayar la actividad osteogénica de la BMP es incubar células progenitoras de fibroblastos cultivadas con una BMP y después monitorizar las células para la diferenciación en condrocitos y/u osteoblastos (véase, por ejemplo, Asahina *et al.*, *Exp. Cell. Res.*, 222: 38-47 (1996)). Las BMP que tienen actividad osteogénica y que son por tanto útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9, BMP-12, BMP-13 y sus heterodímeros, bien purificados de una fuente natural, producidos de manera recombinante por células eucariotas (por ejemplo, de mamífero, levaduras, insectos, peces) o procariotas (por ejemplo bacterianas), o producidas en parte o totalmente por métodos de síntesis de proteínas *in vitro*. Una BMP tiene una actividad osteogénica también puede poseer una o más actividades farmacológicas beneficiosas distintas tales como la capacidad de reestablecer o regenerar tejidos u órganos blandos dañados, por ejemplo, riñones isquémicos (Vukicevic *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 102: 202-214 (1998)).
- También se entiende que las composiciones y los métodos, como se describe en el presente documento, pueden comprender de manera alternativa una proteína osteogénica que no sea un miembro de la familia de BMP osteogénica descrita anteriormente siempre que dicha proteína osteogénica sea funcionalmente equivalente a una BMP en que la proteína tenga actividad osteogénica como se demuestra en un ensayo osteogénico convencional, tal como un ensayo de formación de hueso ectópico descrito anteriormente. Las proteínas funcionalmente equivalentes pueden incluir diversos homólogos de BMP osteogénicas, es decir, proteínas osteogénicas que tienen una secuencia de aminoácidos que es homóloga a la de una BMP osteogénica conocida (por ejemplo, aproximadamente el 80 % o más de homología con una proteína osteogénica conocida). Dichos homólogos de BMP pueden ser de origen natural, producirse de manera recombinante, o producirse de manera sintética por completo o en parte (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.674.844; 6.333.312).
- Los términos "trastorno" y "enfermedad" son sinónimos y se refieren a cualquier afección patológica independientemente de la causa o agente etiológico.
- Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente, químicamente, o de cualquier otra manera, incompatible con la química y el metabolismo corporal y que tampoco afecta de manera adversa a la actividad efectiva, deseada, de una BMP osteogénica o de cualquier otro componente en una composición que puede administrarse a un individuo para tratar un defecto óseo de acuerdo con la invención. En la preparación de un WBCD de la invención para el tratamiento de defectos óseos en un individuo (ser humano u otro mamífero) solo se usan componentes farmacéuticamente aceptables.
- "Cohesivo", como se usa en el presente documento para describir un gel de coágulo significa que, en ausencia de dividirse por una fuerza (por ejemplo, el borde de una espátula), el gel de coágulo tiene una naturaleza autónoma, adhesiva y viscosa, y no es un líquido fluido o un conjunto de dominios o piezas separadas.
- "Gel" significa un material gelatinoso semisólido.
- "Homogéneo" o "de forma homogénea", aplicado a un gel de coágulo, significa que el gel de coágulo tiene una consistencia uniforme en lugar de una red fibrosa no uniforme que conecta aglomeraciones de coágulos.
- "Que puede utilizarse en una jeringa", como se usa en el presente documento para describir un gel de coágulo, significa que el gel de coágulo puede extraerse al interior de una jeringa con una aguja de calibre en el intervalo de 18 a 23, inclusive, sin obstruir la aguja o degradarse en aglomeraciones.
- "Inyectable", como usa en el presente documento para describir un gel de coágulo, significa que el gel de coágulo puede expulsarse de la jeringa a través de la abertura de la jeringa o a través de una aguja de calibre en el intervalo de 18 a 23, inclusive, sin obstruir la abertura o la aguja y sin degradarse en aglomeraciones.

“Maleable”, como se usa en el presente documento para describir un gel de coágulo, significa que el gel de coágulo es capaz de conformarse o formarse para rellenar o cubrir un defecto óseo. Un gel de coágulo maleable es autónomo (o mecánicamente estable) y conservará sustancialmente la forma en la que se ha formado.

- 5 A menos que se indique otra cosa, un intervalo, por ejemplo, para cantidades, concentraciones, tiempo o distancia, incluye los valores numéricos en los extremos inferior y superior del intervalo.

10 El significado de otros términos será obvio por el contexto de uso y, salvo que se indique otra cosa, será coherente con el significado entendido por los expertos en la técnica, incluyendo los campos de regeneración tisular, medicina, farmacología, trastornos óseos metabólicos y biología molecular.

15 Como se muestra en el presente documento, las BMP osteogénicas desaparecen de la sangre que experimenta coagulación (formación de grumos) y comienzan a localizarse en el coágulo. En particular, las BMP osteogénicas tienen una afinidad por diversas moléculas en suero y en el coágulo sanguíneo. Además, como se observa en el presente documento, la consistencia de un coágulo sanguíneo puede modificarse de tal manera que tenga la integridad apropiada y otras propiedades necesarias para la administración de una cantidad eficaz de una BMP osteogénica en un sitio de un defecto óseo. A diferencia de un coágulo sanguíneo no modificado, un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) como se describe en el presente documento es un gel de coágulo que es homogéneo, cohesivo, que puede utilizarse en una jeringa, que es inyectable y maleable. Esas propiedades se obtienen añadiendo a la sangre entera una cantidad suficiente de ion de calcio exógeno y permitiendo que se produzca la coagulación. Por consiguiente, un WBCD descrito en el presente documento es fácil de fabricar, manipular y administrar a un defecto óseo. Los defectos óseos que pueden tratarse con un WBCD como el que se describe, incluyen fracturas y huesos que se caracterizan por un crecimiento óseo inadecuado como ocurre en diversos trastornos metabólicos óseos, incluyendo, pero sin limitación, osteoporosis, osteopenia y Enfermedad de Paget.

20 Un WBCD de la invención puede administrarse convenientemente a un defecto óseo de un individuo por inyección usando una jeringa opcionalmente provista de una aguja, preferentemente de calibre en el intervalo de 18 a 23, inclusive, o puede aplicarse a un defecto óseo con una espátula durante la cirugía.

30 En una realización preferida, la invención proporciona un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) para el tratamiento de un defecto óseo en un individuo preparado mediante las etapas que comprenden:

35 (a) combinar:

- (1) sangre entera,
- (2) una proteína osteogénica,
- (3) cloruro de calcio proporcionado de manera exógena y
- (4) opcionalmente, una mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena,

40 (b) incubar los ingredientes combinados en la etapa (a) hasta que se forme un coágulo mecánicamente estable,

45 en el que el ion de calcio proporcionado de manera exógena está presente a una concentración que es eficaz para proporcionar un gel de coágulo, homogéneo, cohesivo, que puede utilizarse en una jeringa, que es inyectable y maleable.

50 Preferentemente, la sangre entera usada en la preparación de un WBCD descrito en el presente documento es sangre entera autóloga extraída del individuo en necesidad de tratamiento ya que la sangre entera autóloga no introduce ningún inmunógeno potencial en el individuo. No obstante, se reconoce que, en algunas situaciones, puede usarse sangre entera compatibilizada cuando como, por ejemplo, un paciente puede haber perdido ya una cantidad significativa de sangre o puede haber recibido ya una transfusión sanguínea. En dichas situaciones, el uso de sangre entera compatibilizada en un WBCD introduce el mismo riesgo, o similar, de enfermedad del suero asociada con cualquier transfusión que emplee sangre entera compatibilizada.

55 Un WBCD descrito en el presente documento se prepara usando ion de calcio proporcionado de manera exógena. La cantidad de calcio controla enormemente las propiedades del gel de coágulo que permiten que el WBCD no solo se manipule y administre fácilmente (por ejemplo, por inyección o implante) en un sitio de defecto, sino también que se mantenga en el sitio de defecto durante un periodo de tiempo suficiente sin que se destruya o fluya para promover el crecimiento de hueso nuevo para rellenar el defecto o reconectar los extremos óseos de un defecto, incluyendo algunas fracturas de tamaño crítico sin unión. Por consiguiente, el ion de calcio se añade a sangre entera en una cantidad suficiente para proporcionar un gel de coágulo homogéneo, cohesivo, que puede utilizarse en una jeringa, que es inyectable y maleable. Dichas propiedades del gel de coágulo también se proporcionan si el ion de calcio proporcionado de manera exógena está presente en el intervalo de 1 mM a 2,5 mM, inclusive. Una fuente preferida de ion de calcio es el cloruro de calcio. Un intervalo preferido para el uso de cloruro de calcio añadido de manera exógena en un WBCD descrito en el presente documento es de 5 mM a 15 mM, inclusive. Cuando el ion de calcio proporcionado de manera exógena está presente a una concentración mayor de 2,5 mM o cuando el cloruro

de calcio proporcionado de manera exógena está presente a una concentración mayor de 15 mM, el gel de coágulo no es un gel homogéneo, cohesivo, que puede utilizarse en una jeringa, que es inyectable y maleable, sino que es demasiado rígido y frágil para su manipulación y administración en defectos.

5 Preferentemente, un WBCD también se prepara con una mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena. Las mezclas de fibrina y trombina útiles en un WBCD descrito en el presente documento pueden prepararse mezclando simplemente fibrina y trombina con el resto de ingredientes del WBCD. Como alternativa, la fibrina y la trombina pueden mezclarse previamente o adquirirse como una mezcla y la mezcla puede añadirse después al resto de ingredientes. Las mezclas de trombina y fibrina útiles en un WBCD descrito en el presente documento pueden prepararse mezclando simplemente fibrina y trombina con el resto de ingredientes del WBCD. Como alternativa, la fibrina y la trombina pueden mezclarse previamente o adquirirse como una mezcla, y la mezcla puede después añadirse al resto de ingredientes. Las mezclas de fibrina y trombina útiles en un WBCD incluyen lo que se conoce en la técnica como “cola de fibrina” o “sellador de fibrina”. Las preparaciones comerciales de mezclas de fibrina y trombina, colas de fibrina y selladores de fibrina están fácilmente disponibles. La fibrina y la trombina usadas en la preparación de un WBCD como el descrito en el presente documento son de calidad farmacéuticamente aceptable y no son una fuente de inmunogenicidad significativa que normalmente suscita una respuesta inmunitaria en la mayoría de individuos.

20 Una mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena puede potenciar una o más de las propiedades proporcionadas al gel de coágulo por el ion de calcio, como se ha mencionado anteriormente. Además, también puede usarse una mezcla de fibrina y trombina para atrapar el componente de proteína osteogénica de un WBCD. Dicho atrapamiento de la proteína osteogénica potencia la retención de la proteína osteogénica por el WBCD y por lo tanto disminuye la velocidad de migración de la proteína osteogénica del WBCD y del sitio del defecto local al cual se ha aplicado el WBCD. La retención potenciada de una proteína osteogénica en un WBCD es particularmente importante a medida que aumenta el tamaño de un defecto o aumenta la distancia entre extremos óseos de un defecto porque en dichos defectos se necesita que crezca nuevo hueso más progresivamente para rellenar el defecto o reconectar los extremos óseos del defecto. Cuanto mayor es el periodo de tiempo de persistencia de una proteína osteogénica localmente en un sitio de defecto, mayor es el periodo de tiempo que la proteína osteogénica puede estimular para la formación de nuevo hueso.

30 Preferentemente, la mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena usada en un WBCD descrito en el presente documento proporciona fibrina en el intervalo de 5 mg/ml a 10 mg/ml, inclusive, y proporciona trombina en el intervalo de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml. Para atrapar una BMP osteogénica y por lo tanto potenciar la retención de la BMP en el WBCD localmente en un sitio de defecto, se prefiere particularmente una mezcla de fibrina y trombina. La presencia de una mezcla de fibrina y trombina también potencia la consistencia y otras características del WBCD. Por consiguiente, a medida que disminuye el tamaño de un defecto óseo o que disminuye la distancia a reconectar entre extremos óseos de un defecto óseo mediante el crecimiento de nuevo hueso, pueden usarse menores concentraciones del intervalo de concentración mencionado anteriormente.

40 La incorporación de una mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena en un WBCD es particularmente útil para atrapar el ingrediente de proteína osteogénica antes de la adición de sangre entera y su posterior coagulación. Como se ha mencionado anteriormente, dicho atrapamiento del ingrediente de proteína osteogénica en una matriz de fibrina y trombina antes de la coagulación aumenta la retención de la proteína osteogénica en el WBCD, conduciendo a una tasa de curación potenciada del defecto al cual se administra el WBCD. Además, el potenciar la retención de la proteína osteogénica es particularmente beneficioso cuando un WBCD se administra al defecto en una zona del cuerpo que tiene escasa o ninguna fuente de tejido local de proteínas osteogénicas endógenas, por ejemplo, como puede ser el caso en el tratamiento de defectos dentales o periodontales. Por consiguiente, a la vista del beneficio de potenciar la retención del ingrediente de proteína osteogénica en un WBCD y por lo tanto potenciar la retención de la proteína localmente en un defecto, la incorporación de una mezcla de fibrina y trombina en un WBCD es muy recomendable y preferida, incluso si un defecto es relativamente pequeño o si los extremos óseos de una fractura están muy próximos o en contacto entre sí.

55 El atrapamiento potenciado de una proteína osteogénica se realiza fácilmente preparando el WBCD como se ha mencionado anteriormente, salvo que la etapa (a) se realiza preparando una primera mezcla combinando la mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena, el ion de calcio proporcionado de manera exógena y la proteína osteogénica, seguido de incubación de la primera mezcla durante al menos 15 minutos, y después de esto añadir la sangre entera a la primera mezcla para formar una segunda mezcla, e incubar la segunda mezcla durante aproximadamente 20 minutos. Esta realización atrapa la BMP osteogénica en la mezcla de fibrina y trombina y por lo tanto potencia la retención de la BMP en el WBCD. De esta manera, la migración de la proteína osteogénica fuera de la zona del sitio del defecto local a la cual se aplica el WBCD disminuye, lo que a su vez aumenta el periodo de tiempo durante el cual la proteína osteogénica estimula la formación de hueso nuevo.

65 En la invención puede usarse cualquiera de una variedad de BMP osteogénicas. Preferentemente, una BMP osteogénica usada en las composiciones y métodos descritos en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, sus heterodímeros y sus combinaciones. Cualquiera de una



variedad de proteínas osteogénicas puede usarse en un WBCD descrito en el presente documento. Preferentemente, la proteína osteogénica es una proteína morfogenética ósea (BMP) osteogénica. Más preferentemente, una BMP osteogénica útil en las composiciones y métodos descritos en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, sus heterodímeros y sus combinaciones.

5 Preferentemente, una BMP u otra proteína osteogénica, están presentes en un WBCD descrito en el presente documento a una concentración en el intervalo de 50 µg/ml a 500 µg/ml.

Un WBCD descrito en el presente documento puede usarse en combinación con cualquiera de una variedad de varillas, tornillos o cualquier otro aparato empleado por cirujanos ortopédicos para reconectar y sujetar huesos que

10 tienen fracturas importantes prolongadas o pérdida de masa ósea. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, fracturas de tamaño crítico sin unión, fracturas múltiples o compuestas de uno o más huesos, y degeneración excepcional de masa ósea. Un WBCD puede inyectarse o implantarse en cualquier defecto o en cualquier superficie ósea como parte de dicha cirugía o reconstitución principal. Un WBCD también puede aplicarse a prótesis, tales como caderas y rodillas artificiales, y a pernos que van a insertarse permanentemente en el esqueleto de un

15 individuo. Debido a sus propiedades, un WBCD descrito en el presente documento también puede usarse en cirugía reconstructiva o cosmética para reestablecer, potenciar o modificar características, por ejemplo, en el rostro y cabeza, para las que puede requerirse el aumento de masa ósea. Esto es particularmente importante en el caso de características faciales y en la cabeza que pueden haberse perdido o disminuido debido a pérdida de masa ósea como resultado de traumatismo o enfermedad.

20 La inducción de la formación de hueso nuevo con un WBCD que contenía una BMP osteogénica mostró curación ósea acelerada en comparación tanto con cuidados de tratamiento convencionales como con un dispositivo de BMP basado en colágeno bovino de uso comercial (véase, el Ejemplo 8 más adelante).

25 Las composiciones y métodos descritos en el presente documento también pueden usarse en procedimientos dentales y periodontales para regenerar dentina y tejido periodontal, incluyendo hueso, cemento y ligamento periodontal.

También se proporcionan kits para preparar un WBCD para el tratamiento de defectos óseos en un individuo. Por

30 ejemplo, en una realización preferida, un kit para preparar un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) osteogénico para el tratamiento de defectos óseos comprende:

1. un vial que contiene una BMP osteogénica liofilizada,
2. un tampón para reconstituir el polvo de la BMP liofilizada,
- 35 3. una jeringa para reconstituir la BMP liofilizada en el tampón,
4. un vacutainer para recoger sangre del paciente,
5. una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 1 M,
6. una mezcla de fibrina y trombina,
7. un envase para mezclar la sangre entera con la BMP reconstituida,
- 40 8. una espátula y/o una jeringa para aplicar el WBCD a extremos óseos o a defectos óseos durante cirugía abierta, e
9. instrucciones para la preparación y el uso del WBCD usando sangre autóloga o compatibilizada.

Un WBCD como el descrito en el presente documento puede usarse inmediatamente después de prepararse para

45 tratar a un individuo o puede guardarse para su uso futuro en el tratamiento del individuo. El WBCD está listo para su uso tan pronto como alcance una consistencia deseada, para que sea semisólido y maleable pero incluso que pueda utilizarse con una jeringa y que sea inyectable. Preferentemente, un WBCD como el que describe en el presente documento se usa al cabo de aproximadamente 15 a 45 minutos desde el inicio de su preparación. Éste es un

50 plazo particularmente conveniente con respecto a realizar muchas, si no la mayoría, de las operaciones quirúrgicas ortopédicas.

Para una mayor ilustración de la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

55 Ejemplo 1. Unión de Proteína Morfogenética Ósea 7 (BMP-7) adicionada a sangre entera.

#### Materiales y métodos

60 La biodistribución de BMP-7 en fluidos biológicos se evaluó usando análisis de inmunotransferencia de Western de suero y plasma de ratas Sprague-Dawley de 5 meses de vida tomados 5 minutos después de la administración intravenosa (i.v.) de BMP-7 (BMP-7 soluble 25 µg/kg). En primer lugar, las ratas recibieron una inyección de 25 µg/kg de la forma soluble de la molécula BMP-7 (sBMP-7) en la vena de la cola, y 5 minutos después se extrajeron muestras de sangre. Estas muestras, se denominaron muestras "in vivo". Además se evaluaron muestras de sangre

65 de rata a las que se añadió (adicionó) BMP-7 a sangre extraída de ratas en tubos. Estas muestras se denominaron muestras "in vitro". El volumen de cada muestra de sangre fue de 1 ml.

Se extrajeron muestras de sangre del plexo orbital de la rata en tubos hematológicos convencionales con y sin una sustancia anticoagulante (citrato y EDTA). Se añadió directamente a los tubos BMP-7 (100 ng de BMP-7) *ex vivo* con muestras de sangre inmediatamente después de extraer la sangre.

#### 5 Formación de complejo entrecruzado e inmunoprecipitación

Se incubó un anticuerpo monoclonal de ratón (Genera Research Laboratory) contra un dominio maduro monomérico de la molécula BMP-7 con perlas de proteína G agarosa durante 15 minutos en un agitador. Para recuperar el anticuerpo monoclonal (MAb) de ratón de los sueros de rata con proteína G, el MAb anti-BMP se inmovilizó sobre proteína G Sepharose antes de añadirlo a las muestras de suero de rata. De esta manera, el MAb de ratón pudo recuperarse a una cantidad 1000 veces superior de la IgG humana.

Después, al complejo se le añadió un anticuerpo policlonal de conejo (Genera Research Laboratory), que reconocía el prodominio y la forma madura de BMP-7 y se incubó durante otros 5 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 12.000 x g, y el exceso de suero de retiró. Después, se añadió formalina (500 µl de formalina al 4 %) al sedimento y se incubó durante otros 30 minutos en un agitador. La muestra se centrifugó durante 2 minutos a 12.000 x g y el sobrenadante se retiró. El complejo se resuspendió en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió a muestras de suero o plasma recogidas para inmunoprecipitación.

Durante una noche se incubaron muestras de sangre y suero no coaguladas de sangre coagulada con perlas acopladas a anticuerpo. Después de esto, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 12.000 x g. El sobrenadante se retiró y los sedimentos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato, y se prepararon para una electroforesis en gel.

#### 25 Electroforesis en gel e inmunotransferencia de Western

Las alícuotas de las muestras se analizaron por electroforesis e inmunotransferencia en un sistema mini-gel Novex. Al sedimento se añadió tampón de muestra de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS). Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 99 °C durante 3 minutos. Después de esto, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 12.000 x g. Los sobrenadantes se analizaron en un gel de poliacrilamida/SDS al 10 % (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron por electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron primero con el MAb de ratón y con el anticuerpo policlonal BMP-7 de conejo. Los anticuerpos unidos se detectaron con inmunoglobulina anti-IgG de conejo y anti-ratón conjugada con fosfatasa salina (Kit de Inmunodetección, Invitrogen).

#### 35 Resultados

Una gran cantidad de BMP-7 añadida a sangre entera permanecía en el coágulo posteriormente formado (coágulo sanguíneo). Esto se confirmó analizando muestras de suero por inmunoprecipitación con anticuerpos entrecruzados (Figura 1). Las muestras de sangre de una rata a la que se inyectó BMP-7 recogida en tubos con EDTA como anticoagulante (Fig. 1, carril 1) mostraron una mejor recuperación de BMP-7 que las muestras recogidas en tubos que contenían citrato como anticoagulante (Fig. 1, carril 3) o tubos sin anticoagulantes (Fig. 1, carril 5). Cuando las muestras de sangre se enriquecieron con BMP-7 inmediatamente después de extraer la sangre del plexo orbital en los tubos (Fig. 1, carril 7) se obtuvo el mismo resultado. La recuperación de BMP-7 añadida a la sangre de los tubos sin anticoagulantes fue muy lenta (Fig. 1, carriles 5 y 8). Además, se obtuvo una recuperación relativamente buena cuando se añadió BMP-7 a muestras después de que el coágulo estuviese ya formado (Figura 1, carril 9). El uso de EDTA y citrato para impedir la coagulación sanguínea confirmó que la recuperación de BMP-7 era mejor que en las muestras sin anticoagulantes sanguíneos. Esto se debía a la unión de BMP-7 con componentes sanguíneos, tales como fibrina, fibrinógeno, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina y plaquetas como se demuestra por transferencias puntuales en las que los componentes sanguíneos anteriormente mencionados se mostraron puntos sobre papel de nitrocelulosa al que se añadió BMP-7. Estos resultados llevan a la conclusión de que después de la formación de un coágulo sanguíneo (coágulo) la BMP-7 añadida a sangre entera no se detecta en el sobrenadante debido a la unión a diversas moléculas de componente sanguíneo. La BMP-7 permaneció en el coágulo y no pudo recuperarse después de formarse el coágulo (Figura 1, carril 8).

#### 55 Conclusión

Una gran cantidad de BMP-7 añadida a sangre entera queda retenida en el coágulo posteriormente formado, como se confirma analizando muestras de suero por inmunoprecipitación con anticuerpos entrecruzados. La BMP-7 añadida a sangre entera no se detecta en el sobrenadante después de la formación del coágulo sanguíneo debido a la unión a diversas moléculas de componente sanguíneo. La BMP-7 permaneció en el coágulo y no pudo recuperarse en el suero sobrenadante después de formarse el coágulo. Este sorprendente descubrimiento es la base del desarrollo de un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) como se describe en el presente documento para el tratamiento de defectos óseos.

65

Ejemplo 2. Unión de BMP-6 marcada con <sup>99m</sup>Tc a muestras de sangre entera.

#### Materiales y métodos

- 5 Se usaron ratas Sprague-Dawley de 4-6 meses de vida. Se extrajeron muestras de sangre (1 ml) del plexo orbital venoso en tubos sin añadir anticoagulante.

#### Marcaje de BMP-6

- 10 La BMP-6 madura se queló con mercaptoacetilglicina (MAG3), y después el complejo se marcó con pertecnecio 99 m (<sup>99m</sup>Tc) radioactivo. La cromatografía reveló que más del 97 % del <sup>99m</sup>Tc se ligaba al complejo.

#### Protocolo

- 15 Se añadieron diferentes cantidades de BMP-6 marcada a las muestras de sangre entera. En 1 ml de sangre entera de rata se añadieron 2, 5 o 10 µg de proteína marcada (la concentración de BMP-6 marcada fue de 1 µg/ml). Después de la formación del coágulo, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 8000 x g para separar el suero del coágulo. La cantidad de radioactividad se midió por separado en la sangre entera, suero y coágulo con un contador gamma.

20

#### Medición de BMP-6 radioactiva

- La cantidad de radioactividad se midió con un contador gamma y se expresó como recuentos por minuto (rpm). Los resultados se expresaron como un porcentaje de las dosis aplicadas, comparando la radioactividad medida con la radioactividad de un estándar que tenía la misma radioactividad que la dosis total adicionada. Todos los valores se corrigieron dependiendo del factor de semivida de <sup>99m</sup>Tc.

25

#### Resultados

- 30 La adición de 2 µg (9.147.376 rpm) de proteína BMP-6 marcada a muestras de 1 ml de sangre entera de rata dio como resultado la retención del 29 % (266.0594 rpm) de BMP-6 marcada en el coágulo (Figura 2). La adición de 5 µg de BMP-6 marcada con <sup>99m</sup>Tc (1.924.68 rpm) a muestras de 1 ml de sangre entera de rata dio como resultado la retención del 45 % (8.586.759) de BMP-6 marcada en el coágulo, y la adición de 10 µg de BMP-6 marcada con <sup>99m</sup>Tc (33.690.011 rpm) a muestras de 1 ml de sangre entera de rata dio como resultado la retención del 44 % (14.824.426 rpm) de proteína BMP-6 marcada en el coágulo (Figuras 3 y 4).

35

#### Conclusión

- Una retención máxima de dosis crecientes de BMP-6 marcada con <sup>99m</sup>Tc añadida a sangre entera fue del 45 % en el coágulo sanguíneo. Esto puede reflejar las diferencias específicas de unión de proteínas marcadas con <sup>99m</sup>Tc o una diferencia entre la biología de BMP-6 y BMP-7. La MAG3 también puede ejercer influencia sobre la capacidad de unión de BMP-6 con componentes sanguíneos.

40

Ejemplo 3. Disponibilidad biológica de BMP-7 en la circulación de rata.

45

#### Materiales y métodos

- Muestras de suero o plasma "*in vivo*" eran de muestras de sangre de rata analizadas después de administración sistémica a ratas de BMP-7 soluble (25 µg/kg). Las muestras "*in vitro*" eran muestras en las que se añadió sBMP-7 (100 ng) a muestras de sangre inmediatamente después de extraerse de las ratas así como 5 minutos más tarde. Las muestras de sangre se extrajeron del plexo orbital venoso en tubos con y sin sustancia anticoagulante (citrato y EDTA).

50

#### Anticuerpos inmovilizados y químicamente entrecruzados con proteína G agarosa

55

La IgG de suero produjo bandas pesadas en el gel y posteriormente reaccionó con el anticuerpo secundario. Para impedir la entrada de la IgG en el gel, se entrecruzó en el anticuerpo BMP-7 monoclonal de ratón con la proteína G Sepharose usando solución de formaldehído al 4 %. La recuperación en inmunoprecipitados fue casi completa incluso después del entrecruzamiento durante 30 minutos con formalina.

60

#### Formación de complejo entrecruzado e inmunoprecipitación

- Durante 15 minutos, un anticuerpo monoclonal de ratón (Genera Research Laboratory) contra un dominio maduro monomérico de la molécula BMP-7 se incubó con perlas de proteína G agarosa en un agitador, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

65

Electroforesis en gel e inmunotransferencia de Western

Las alícuotas de las muestras se analizaron por electroforesis en inmunotransferencia en un sistema mini-gel Novex como se ha descrito en el Ejemplo 1.

5

Protocolo

Las ratas recibieron inyección de BMP-7 (250 µg/kg). Se extrajeron muestras de sangre en tubos con EDTA al cabo de 1, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos de la inyección. La recuperación *in vitro* de la BMP-7 añadida de manera exógena de suero de rata se ensayó en muestras de sangre entera extraídas en tubos con anticoagulantes añadidos.

10

Resultados

Los resultados muestran que la BMP-7 estaba disponible en el suero hasta 30 minutos después de la inyección en la vena de la cola de la rata (véase, muestras "*in vivo*" de la Figura 5, carriles 1-6). En dichas muestras de sangre extraídas en tubos que contenían EDTA y precipitadas con anticuerpos entrecruzados, la recuperación de BMP-7 exógena fue satisfactoria. Sin embargo, la recuperación de BMP-7 de muestras de sangre a las que se añadió BMP-7 en tubos que no contenían anticoagulantes, no fue satisfactoria (véase, la Figura 5, carril 7). La recuperación de BMP-7 añadida a sangre 5 minutos después de extraer la sangre en tubos sin anticoagulantes (cascada de coagulación casi finalizada) fue baja (Figura 5, carril 8).

15

20

Conclusión

La BMP-7 estaba disponible en suero 30 minutos después de la inyección en la vena de la cola de la rata después de extraer sangre en los tubos con EDTA. Cuando la cascada de coagulación se impidió con anticoagulante, la BMP-7 pudo recuperarse en el plasma. La inmunoprecipitación con los anticuerpos entrecruzados demostró ser un método muy eficaz para analizar las muestras de sangre.

25

Ejemplo 4. Formulación del Dispositivo de Coágulo Derivado de Sangre Entera (WBCD) como un transportador de proteínas BMP osteogénicas de mamífero y su eficacia en un modelo de rata de formación de hueso ectópico.

30

Composición de WBCD no modificada (BMP presente, sin cloruro de calcio, sin reactivo de trombina)

Se extrajeron muestras de sangre de plexo orbital de rata en tubos sin ningún anticoagulante en un volumen de 300 µl. Se añadió BMP-2 humana producida en células de mamífero ("mBMP-2") o BMP-2 humana producida en *Escherichia coli* ("*E. coli* BMP-2") en la sangre en una cantidad de 25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg y 500 µg. Cada composición de WBCD (véase, más adelante) se dejó después coagular durante 2 horas a +4 °C. Las composiciones se centrifugaron a 8000 x g durante 5 minutos, la parte líquida se retiró y se guardó y las composiciones de WBCD estaban listas para su uso.

35

40

Composición de WBCD (Modificación 1)

Se extrajeron muestras de sangre del plexo orbital de la rata en tubos sin ningún anticoagulante en un volumen de 300 µl. Después se añadió cloruro de calcio (100 µl de CaCl<sub>2</sub> 1 M) en la sangre entera. La BMP-2 de mamífero o BMP-2 de *E. coli* se añadió en la sangre en una cantidad de 25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg y 500 µg. Las composiciones de WBCD se dejaron después coagular durante 2 horas a +4 °C. Las composiciones de WBCD se centrifugaron y la parte líquida se retiró como se ha descrito.

45

Dispositivo WBCD (Modificación 2)

Se extrajeron muestras de sangre del plexo orbital de la rata en tubos sin ningún anticoagulante en un volumen de 300 µl. Un reactivo de trombina (100 µl) preparado con CaCl<sub>2</sub> 1 M se añadió a la sangre entera. La BMP-2 de mamífero o BMP-2 de *E. coli* se añadió después en cantidades de 25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg y 500 µg. Después las composiciones se dejaron coagular durante 2 horas a +4 °C. Las composiciones de WBCD se centrifugaron y la parte líquida se retiró como se ha descrito.

50

55

Dispositivo WBCD (Modificación 3)

Las muestras de sangre se extrajeron del plexo orbital de la rata en tubos sin ningún anticoagulante en un volumen de 300 µl. Se añadió sellador de fibrina (100 µl) a la sangre entera. El sellador de fibrina contiene proteína coagulable, fibrinógeno, fibronectina plasmática, factor XIII, plasminógeno, aprotinina, y trombina. Se añadió cloruro de calcio (100 µl de CaCl<sub>2</sub> 1 M). Después se añadió BMP-2 de mamífero o BMP-2 de *E. coli* en la sangre en cantidades de 25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg y 500 µg. La composición se dejó coagular durante 2 horas a +4 °C. Las composiciones de WBCD se centrifugaron y la parte líquida se retiró como se describe anteriormente.

60

65

Dispositivo de WBCD (Modificación 4 – atrapamiento)

Se añadió BMP-2 de mamífero o BMP-2 de *E. coli* en tubos en cantidades de 25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg y 500 µg. Después se añadió mezcla de sellador de fibrina (100 µl) a cada tubo que contenía BMP-2 de mamífero o de *E. coli* y se mezcló. La mezcla de sellador de fibrina contenía: proteína coagulable, fibrinógeno, fibronectina plasmática, factor XIII, plasminógeno, aprotinina, trombina y CaCl<sub>2</sub> 1 M. Este procedimiento atrapa la BMP en la matriz de fibrina polimerizante.

Las muestras de sangre se extrajeron del plexo orbital de la rata en tubos en un volumen de 300 µl y se transfirieron lentamente en la matriz de fibrina polimerizante que contenía BMP-2. El dispositivo de la composición de WBCD se dejó después coagular durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 8000 x g durante 5 minutos, la parte líquida se retiró y se guardó, y el dispositivo WBCD modificado se usó.

Animales y protocolo de tratamiento

Ratas Sprague-Dawley, con un peso de aproximadamente 200 g se sometieron a cirugía. El dispositivo WBCD que contenía proteína BMP-2 derivada de mamífero o de *E. coli* se implantó por vía subcutánea en la región axilar. Los animales se dividieron en los siguientes grupos, con cuatro implantes por grupo:

1. Animales de control; implantados con WBCD sin la proteína osteoinductora
2. Dispositivo WBCD que contenía 25, 50, 100, 200 o 500 µg de BMP-2 de mamífero o BMP-2 de *E. coli* con modificaciones como se ha indicado anteriormente
3. Dispositivo Helistat (colágeno comercial) que contenía 25, 50, 100, 200 o 500 µg de BMP-2 de mamífero o BMP-2 de *E. coli*.

Los animales se sacrificaron 15 días después de la cirugía, y los implantes se fijaron y se procesaron para histología e histomorfometría.

Histología

Se fijaron sedimentos óseos en formalina al 4 %, se descalcificaron y se incluyeron en parafina. Las secciones se tiñeron con azul de Toluidina, Safranina O, fosfatasa alcalina (AP) y fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). Los sedimentos se consideraron positivos en presencia de formación de hueso nuevo.

Resultados

Las diversas composiciones de WBCD modificadas descritas anteriormente proporcionaron cantidades similares de hueso recién formado. Sorprendentemente, tanto la BMP-2 derivada de mamífero como la derivada de *E. coli*, que contenía los WBCD, mostraron resultados similares en la cantidad y aparición de hueso formado, lo cual no sucedía cuando se usaba BMP-2 derivada de *E. coli* con Helistat como un transportador. En ratas con dispositivos WBCD implantados, no hubo reacción inflamatoria detectable en comparación con las del implante Helistat que contenía BMP-2 derivada de *E. coli* en las que hubo una respuesta inflamatoria pronunciada. La distribución de hueso recién formado fue mejor en el WBCD preparado en un proceso en el que la BMP se atrapó primero en una matriz de fibrina (Modificación 4, anterior). En estos implantes, la distribución de nuevo hueso fue igual en el centro y en la periferia de los implantes. Estos resultados indican que los WBCD modificados proporcionan formación de hueso más rápida que un dispositivo basado en colágeno. Además, los WBCD con BMP atrapada mostraron formación de nuevo hueso en todas las superficies del implante en un periodo de 15 días, mientras que un dispositivo que contenía Helistat (colágeno) mostró una formación de hueso retardada en el centro del implante debido a una penetración disminuida de vasos sanguíneos recién formados. Finalmente, tanto la BMP-2 de mamífero como la de *E. coli* fueron igualmente inductoras de hueso cuando se usaban con los WBCD. Los animales de control no formaron hueso nuevo.

Ejemplo 5. Efecto de la BMP-2 de mamífero y BMP-2 de *E. coli* sobre la formación de hueso en un modelo de formación de hueso ectópico.

Como marcador sustituto de formación de hueso se implantó matriz ósea extraída y desmineralizada (DBM) por vía subcutánea.

Sedimento óseo

Para la preparación de sedimento óseo los donantes fueron ratas Sprague-Dawley de 20 semanas de vida. Después del sacrificio, se extrajeron las diáfisis de fémures y tibias, se desmineralizaron y se extrajeron proteínas no colágenas con urea 8 M. Los sedimentos de DBM implantados por vía subcutánea no indujeron la formación de hueso nuevo.

Animales y protocolo de tratamiento

Ratas Sprague-Dawley, con un peso de aproximadamente 200 g se sometieron a cirugía. Sedimentos óseos de DBM se implantaron por vía subcutánea en la región axilar. Los animales se dividieron en los siguientes grupos, con 4 sedimentos por grupo:

1. Animales de control. Sedimentos óseos implantados que consistían en DBM sin la adición de una molécula osteoinductora.
2. Sedimentos óseos con 50 µg de BMP-2 de mamífero.
3. Sedimentos óseos con 100 µg de BMP-2 de mamífero.
4. Sedimentos óseos con 200 µg de BMP-2 de mamífero.
5. Sedimentos óseos con 50 µg de molécula BMP-2 de *E. coli*.
6. Sedimentos óseos con 100 µg de molécula BMP-2 de *E. coli*.
7. Sedimentos óseos con 200 µg de molécula BMP-2 de *E. coli*.

Los animales se sacrificaron 15 días después de la cirugía y los sedimentos óseos se extrajeron para histología.

Histología

Los sedimentos óseos se fijaron en formalina al 4 %, se descalcificaron, y se incluyeron en parafina. Las secciones se tiñeron con azul de Toluidina, Safranina O, fosfatasa alcalina (AP), y fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). Los sedimentos se consideraron positivos si se observaba formación de hueso nuevo.

Resultados

La BMP-2 de mamífero (mBMP-2) mostró mejor actividad osteoinductora en el modelo de rata de formación de hueso ectópico en comparación con la BMP-2 de *E. coli* (*E. coli* BMP-2) usando la misma dosis y colágeno de DBM como transportador. En los sedimentos óseos de DBM, que no contenían una BMP, no se observó formación de hueso.

Los sedimentos óseos que contenían mBMP-2 tenían más hueso recién formado en el centro de los sedimentos óseos DBM implantados en comparación con la BMP-2 de *E. coli*, lo cual se relacionó con un crecimiento aumentado hacia el interior de nuevos vasos sanguíneos en los sedimentos tratados con mBMP-2. El hueso recién formado expresado como área de sedimento aumentó en BMP-2 que contenía 100 y 200 µg en comparación con sedimentos que contenían cantidades similares de BMP-2 de *E. coli* (Tabla 1). Las secciones histológicas indican que tanto la mBMP-2 como la *E. coli* BMP-2 eran eficaces en la formación de nuevo hueso en un sitio ectópico. Sin embargo, secciones de sedimentos que contenían *E. coli* BMP-2 mostraron reacción más inflamatoria con una fuerte formación de cápsula de sedimento y carecían de hueso recién formado en el centro del sedimento. Las proteínas morfogenéticas óseas humanas recombinantes, incluyendo la BMP-2 producida en *E. coli*, pueden usarse eventualmente en seres humanos, aunque las BMP de mamífero podrían ser más eficaces y menos inmunogénicas cuando se usasen con un transportador de colágeno de rata heterólogo (DBM).

Tabla 1. Resultados resumidos de formación de hueso usando mBMP-2 frente a *E. coli* BMP-2

Grupo	sedimento positivo/implantado	hueso recién formado/área del sedimento (%)
Control	0/4	0
mBMP-2 50 µg	4/4	27
mBMP-2 100 µg	3/4	76†
mBMP-2 200 µg	4/4	87†
<i>E. coli</i> BMP-2 50 µg	2/4	24
<i>E. coli</i> BMP-2 100 µg	3/4	37
<i>E. coli</i> BMP-2 200 µg	3/4	54
† Significativamente diferente de los sedimentos tratados con BMP-2 de <i>E. coli</i>		

Ejemplo 6. Efecto de BMP-2 de mamífero y de BMP-7 de dispositivo comercial sobre la formación de hueso en un modelo de formación de hueso ectópico

Como marcador sustituto de formación de hueso se implantó matriz ósea extraída y desmineralizada por vía subcutánea.

Sedimento óseo

Para la preparación de sedimento óseo los donantes fueron ratas Sprague-Dawley de 20 semanas de vida. Después del sacrificio, se extrajeron las diáfisis de fémures y tibias, se desmineralizaron y se extrajeron proteínas no

colágenas con urea 8 M. Los sedimentos de DBM implantados por vía subcutánea no indujeron la formación de hueso nuevo.

Animales y protocolo de tratamiento

5 Ratas Sprague-Dawley, con un peso de aproximadamente 200 g se sometieron a cirugía. Sedimentos óseos de DBM se implantaron por vía subcutánea en la región axilar. Los animales se dividieron en los siguientes grupos, con 4 sedimentos por grupo:

- 10 1. Animales de control. Sedimentos óseos implantados sin una molécula osteoinductora.
- 2. Sedimentos óseos con 50 µg de BMP-2 de mamífero.
- 3. Sedimentos óseos con 100 µg de BMP-2 de mamífero.
- 4. Sedimentos óseos con 200 µg de BMP-2 de mamífero.
- 5. Sedimentos óseos con 50 µg de BMP-7 de mamífero usada para el dispositivo comercial de BMP-7.
- 15 6. Sedimentos óseos con 100 µg de BMP-7 de mamífero usada para el dispositivo comercial de BMP-7.
- 7. Sedimentos óseos con 200 µg de BMP-7 de mamífero usada para el dispositivo comercial de BMP-7.

Los animales se sacrificaron 15 días después de la cirugía y los sedimentos óseos se extrajeron para histología.

20 Histología

Los sedimentos óseos se fijaron en formalina al 4 %, se descalcificaron, y se incluyeron en parafina. Las secciones se tiñeron con azul de Toluidina, Safranina O, fosfatasa alcalina (AP), y fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). Los sedimentos se consideraron positivos si se observaba formación de hueso nuevo.

25 Resultados

Los resultados se observan en la Tabla 2. Una cantidad similar de BMP-2 de mamífero mostró actividad osteoinductora similar en el modelo de rata de formación de hueso ectópico al igual que la BMP-7 de mamífero usada en el dispositivo comercial. En los sedimentos óseos de los animales de control no hubo signos de formación de hueso nuevo.

Tabla 2.

Grupo	sedimento positivo/implantado
Control	0/4
mBMP-2 50 µg.	4/4
mBMP-2 100 µg.	4/4
mBMP-2 200 µg.	4/4
BMP-7 50 µg	4/4
BMP-7 100 µg	4/4
BMP-7 200 µg	4/4

35 El análisis histológico de sedimentos de hueso ectópico que contenían BMP-2 de mamífero y BMP-7 de mamífero (OP-1) usando colágeno de rata DBM como un transportador mostró que la cantidad y aparición del hueso recién formado era similar en ambos tratamientos. Esto indica que las dos BMP de mamífero son igualmente fuertes en el bioensayo de formación de hueso nuevo y por lo tanto podría usarse en la regeneración ósea posiblemente con similar resultado de tratamiento.

40 Ejemplo 7. Saturación de WBCD con diferentes cantidades de proteína BMP-7

Preparación de coágulo sanguíneo

45 Se extrajeron muestras de sangre del plexo orbital de rata en tubos sin ningún anticoagulante solo en el tubo de control, en un volumen de 300 µl. Se añadió BMP-7 de mamífero en la sangre en cantidades de 4, 8, 16 t 24 µg. Las muestras de sangre se dejaron coagular durante 2 horas a +4 °C. Las muestras se centrifugaron a 8000 x g durante 5 minutos, la parte líquida se retiró y se procesó adicionalmente para análisis de inmunoprecipitación.

50 Formación de complejo entrecruzado e inmunoprecipitación

Se incubó un anticuerpo monoclonal de ratón (Genera Research Laboratory) contra un dominio maduro monomérico de la molécula BMP-7 con perlas de proteína G agarosa durante 15 minutos en un agitador. Para recuperar el anticuerpo monoclonal (MAb) de ratón de los sueros de rata con proteína G, el MAb anti-BMP se inmovilizó primero sobre proteína G Sepharose antes de añadirlo a las muestras de suero de rata. De esta manera, fue posible recuperar el MAb de ratón a una cantidad 1000 veces superior de la IgG humana. Después de esto, al complejo se

le añadió un anticuerpo policlonal de conejo (Genera Research Laboratory), que reconocía el predominio y la forma madura de BMP-7 y se incubó durante otros 5 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 12.000 x g, y el exceso de suero se retiró. Después, se añadió formalina (500 µl de formalina al 4 %) al sedimento y se incubó durante otros 30 minutos en un agitador. La muestra se centrifugó durante 2 minutos a 12.000 x g y el sobrenadante se retiró. El complejo se resuspendió en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió a muestras de suero o plasma recogidas para inmunoprecipitación. Durante una noche las muestras se incubaron con perlas acopladas a anticuerpo. Después de esto, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 12.000 x g. El sobrenadante se retiró y los sedimentos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato, y se prepararon para una electroforesis en gel.

#### 10 Electroforesis en gel e inmunotransferencia de Western

Las alícuotas de las muestras se analizaron por electroforesis e inmunotransferencia en un sistema mini-gel Novex como se describe en el Ejemplo 1.

#### 15 Resultados

Los resultados indican que una gran cantidad de BMP-7 añadida a la sangre permaneció posteriormente en el coágulo según se confirma analizando las muestras de suero por inmunoprecipitación con anticuerpos entrecruzados. La recuperación de BMP-7 añadida en la sangre de tubos sin anticoagulantes fue muy baja.

Ejemplo 8. Eficacia de WBCD que contiene BMP-7 humana recombinante en la curación de defecto de tamaño crítico de huesos largos en conejos.

#### 25 Materiales y Métodos

Se usó un modelo de defecto segmentario cubital para evaluar la curación de hueso en conejos Blancos de Nueva Zelanda macho adultos (de 2 a 14 kg de peso). Los implantes consistían en un coágulo sanguíneo como un transportador al cual se añadieron diferentes cantidades de BMP-7 madura humana recombinante (Genera Research Laboratory). Estos animales se compararon con animales que solo recibieron coágulo sanguíneo (control negativo) y esponja de colágeno (HELISTAT®, Integra LifeSciences, Holdings Corp., Plainsboro, Nueva Jersey) a los que se añadieron las mismas cantidades de BMP-7 (control positivo). Los conejos se trataron con antiparasitarios una semana antes de la cirugía. Los animales también recibieron enrofloxacina, por inyección intramuscular, un día antes de la operación y después diez días tras la cirugía. Estando el conejo con anestesia y analgesia, una pata delantera se rasuró y después se preparó y envolvió de manera estéril. Se realizó una incisión lateral, de aproximadamente 2,5 centímetros de longitud, y los tejidos por encima del cúbito se diseccionaron. Se creó un defecto osteoperiosteal segmentario de 1,5 centímetros en el centro del cúbito con una sierra oscilante. El radio se dejó intacto para estabilidad mecánica, y no se usaron dispositivos de fijación internos o externos. Después de una irrigación abundante con solución salina para retirar los restos de hueso y regar las células medulares, el implante de la proteína osteogénica y el coágulo sanguíneo o esponja de colágeno se rellenó cuidadosamente en el lugar para cubrir el defecto. Después, el coágulo se cubrió con suero. Los tejidos blandos se cerraron meticulosamente en capas que contenían el implante. Se permitió que los animales llevaran una actividad completa de carga, con agua y pienso para conejos.

#### 45 Preparación de WBCD

Se extrajeron muestras de sangre de las venas marginales de la oreja de conejo en tubos sin sustancias anticoagulantes en un volumen de 1,5 ml, un día antes de la cirugía. Se añadió BMP-7 a la sangre en cantidades de 50, 100 y 200 µg. Las muestras de sangre se dejaron coagular a +4 °C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 8000 x g durante 5 minutos. La parte líquida (suero) se extrajo y se guardó, y el coágulo estaba listo para usar. Las esponjas de colágeno comercial (HELISTAT®) usadas como controles positivos, se impregnaron de 200 µg de BMP-7, que se añadió 2 horas antes del implante (dispositivo óseo BMP-7 comercial). Los conejos se dividieron en los siete grupos siguientes:

- 55 Grupo A: Control. Defecto de tamaño crítico cubital relleno con coágulo de sangre autóloga sin BMP-7 (n = 8)
- Grupo B: Defecto de tamaño crítico cubital relleno con coágulo de sangre autóloga con 50 µg de BMP-7 (n = 8)
- Grupo C: Defecto de tamaño crítico cubital relleno con coágulo de sangre autóloga con 100 µg de BMP-7 (n = 8)
- Grupo D: Defecto de tamaño crítico cubital relleno con coágulo de sangre autóloga con 200 µg de BMP-7 (n = 8)
- 60 Grupo E: Control positivo. Defecto de tamaño crítico cubital relleno con esponjas de colágeno comercial (HELISTAT®, 4,0 x 3 cm) a las que se añadieron 200 µg de BMP-7 (n = 8) (dispositivo óseo BMP-7 comercial)
- Grupo F: Defecto de tamaño crítico cubital relleno con coágulo de sangre autóloga con 50 µg de BMP-4 (n = 4)
- Grupo G: Defecto de tamaño crítico cubital relleno con coágulo de sangre autóloga con 50 µg de BMP-6 (n = 2)

#### 65 Resultados



Los implantes con WBCD que contenían BMP-7 mostraron unión ósea radiográfica completa inducida a lo largo del defecto. Ninguno de los animales de control tratados solo con WBCD (es decir, sin BMP) consiguieron la reconexión completa del defecto (véanse, las Figuras 6A y 6B). Los implantes de BMP-7 parecen ser similarmente activos a todas las dosis proporcionadas.

5 Grupo A (WBCD de control, sin BMP). Ningún animal consiguió la reconexión del defecto durante el periodo de seguimiento. Se formó callo en los extremos de hueso libre, pero no se consiguió la reconexión completa del defecto, según se indica por rayos X a las 8 semanas (véanse, las Figuras 6A y 6B).

10 Grupo B (50 µg de BMP-7 en WBCD). Seis animales de 8 consiguieron la reconexión del defecto en el periodo de tiempo de 10 semanas. Un animal no mostró síntomas de estar sano.

15 Grupo C (100 µg de BMP-7 en WBCD). Siete animales de 8 consiguieron la reconexión del defecto en el periodo de tiempo de 10 semanas. Un animal murió después de la operación debido a la anestesia. Se muestra una reconexión del defecto a las 8 semanas según se indica por rayos X en las Figuras 7A y 7B.

Grupo D (200 µg de BMP-7 en WBCD). Ocho animales de 8 consiguieron la reconexión del defecto en el periodo de tiempo de 10 semanas.

20 Grupo E (esponja de colágeno comercial a la que se añadieron 200 µg de BMP-7). Ocho (n = 8) animales consiguieron la reconexión del defecto en el periodo de tiempo de 10 semanas. La formación de hueso nuevo en el defecto a las 8 semanas, según se indica por rayos X, se muestra en las Figuras 8A y 8B.

25 Ejemplo 9. Coágulo "normal" (no modificado) frente a WBCD con calcio y sellador de fibrina.

30 Un día antes de la cirugía se extrajeron muestras de sangre de las venas marginales de la oreja del conejo en tubos sin ninguna sustancia anticoagulante en un volumen de 1,5 ml. Se añadió BMP-7 a la sangre en una cantidad de 100 µg. Las muestras de sangre se dejaron coagular a +4 °C. Algunas muestras de sangre se usaron como "coágulo normal", es decir, sin cloruro de calcio añadido o mezcla de fibrina y trombina. Otras muestras de sangre se usaron para preparar los WBCD que contenían cloruro de calcio añadido o que contenían cloruro de calcio añadido y sellador de fibrina añadido (mezcla de fibrina y trombina). Al día siguiente, las muestras se centrifugaron y se implantaron en los defectos de tamaño crítico cubital de 8 conejos.

### 35 Resultados

40 Cuando se implantó coágulo normal (sin calcio añadido, sin mezcla de fibrina y trombina añadida) con BMP-7 añadida en un defecto cubital de conejo de tamaño crítico, se estimuló la regeneración de hueso. Sin embargo, como se indica por rayos X en las Figuras 9 y 10, la composición del coágulo normal carecía de la integridad y viscosidad necesarias para promover suficiente formación de hueso nuevo para reconexionar el defecto. En particular, la consistencia del coágulo fue insuficiente para mantener una conexión entre los dos extremos óseos durante el periodo de tiempo necesario para formar hueso en toda la longitud del defecto como se indica por rayos X a la semana 6 (Figura 9) y a la semana 8 (Figura 10). En otro animal, el coágulo normal (no modificado) que contenía BMP-7 se deshizo muy rápidamente y solo se observaron manchas de tejido mineralizado por rayos X en el área del defecto a la semana 6 (Figura 11A) y semana 8 (Figura 11B). Por otro lado, cuando el dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) se formuló con calcio y sellador de fibrina, el defecto se reconexionó. La adición de CaCl<sub>2</sub> 1 M mejoró la viscosidad del coágulo de tal manera que el defecto se llenó de hueso nuevo a la semana 8 (véase, la Figura 12A). A la semana 8 se observó la mejor calidad radiográfica de hueso recién formado cuando el WBCD se preparó tanto con calcio añadido como con sellador de fibrina añadido (véase, la Figura 12B).

50 Ejemplo 10. Evaluación *in vitro* de consistencia y viscosidad de formulaciones de gel de coágulo e intervalos preferidos de ingredientes componente.

55 El coágulo normal (no modificado) de sangre entera permaneció compacto y de una pieza durante tres días. Después de este periodo de tiempo, aunque en condiciones húmedas, el coágulo no mantuvo una forma continua sino que se deshizo en diversos cúmulos de material. Por otro lado, cuando se añadió cloruro de calcio a la sangre entera a una concentración en el intervalo de 5 mM a 15 mM (o, en términos de iones de calcio, solo, 1 mM – 2,5 mM), la viscosidad del gel de coágulo resultante se mantuvo durante más de siete días. El gel de coágulo también permaneció compacto y en una pieza cohesiva. Cuando la concentración de cloruro de calcio añadida estaba por debajo de 5 mM, la composición del coágulo era similar a la del coágulo normal no modificado deshecho. Cuando la concentración de cloruro de calcio añadido superó 15 mM, la composición era demasiada rígida y frágil y perdía continuidad después de cuatro días.

65 Estos resultados indican que el cloruro de calcio proporcionado de manera exógena mezclado con sangre entera a un intervalo de concentración de 5 mM a 15 mM, inclusive, o, en términos de iones de calcio solo de 1 mM a 2,5 mM, mejora la viscosidad y consistencia del gel de coágulo para un uso eficaz en el tratamiento de defectos óseos.

Observaciones adicionales indican que un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) preferido, como se describe en el presente documento, incluye fibrina proporcionada de manera exógena en el intervalo preferido de 5 mg/ml a 10 mg/ml, inclusive, y trombina proporcionada de manera exógena en el intervalo preferido de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml, inclusive.

- 5 La evaluación de datos de diversos estudios, como los descritos anteriormente, también indica que una BMP u otra proteína osteogénica se incorpora preferentemente en un WBCD para su uso en el tratamiento de defectos óseos en un intervalo preferido de 50 µg/ml a 500 µg/ml.
- 10 Otras variaciones y realizaciones de la invención descritas en el presente documento serán ahora obvias para los expertos en la técnica sin alejarse de la divulgación de la invención o de las reivindicaciones indicadas a continuación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) para el tratamiento de un defecto óseo en un individuo que comprende:
- 5 (1) sangre entera,  
 (2) una proteína osteogénica,  
 (3) cloruro de calcio proporcionado de manera exógena y  
 (4) opcionalmente, una mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena,
- 10 en el que el cloruro calcio proporcionado de manera exógena está presente en una cantidad que es eficaz para proporcionar un gel de coágulo homogéneo, cohesivo, que puede utilizarse en jeringa, que es inyectable y maleable.
2. Un WBCD según la reivindicación 1, en el que la sangre entera es una sangre entera autóloga extraída del individuo o sangre entera que se ha compatibilizado con el individuo.
- 15 3. Un WBCD según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la proteína osteogénica es una BMP osteogénica.
- 20 4. Un WBCD según la reivindicación 3, en el que la BMP osteogénica se selecciona del grupo que consiste en BMP-2, BMP-3, BMP-6, BMP-7, sus heterodímeros y sus combinaciones.
5. Un WBCD según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que está presente la mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena.
- 25 6. Un WBCD según la reivindicación 5, en el que la mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena comprende fibrina en el intervalo de 5 mg/ml a 10 mg/ml, inclusive.
7. Un WBCD según la reivindicación 5, en el que la mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena comprende trombina en el intervalo de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml.
- 30 8. Un WBCD según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que la mezcla de fibrina y trombina proporcionada de manera exógena se combina con el cloruro de calcio proporcionado de manera exógena y con la proteína osteogénica para formar una primera mezcla; seguido de la incubación de la primera mezcla durante al menos 15 minutos; y después de esto se añade la sangre entera a la primera mezcla para formar una segunda mezcla, y la segunda mezcla se incuba durante aproximadamente 20 minutos.
- 35 9. Un WBCD según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso como un medicamento para el tratamiento de un defecto óseo en un individuo que tiene necesidad de dicho tratamiento.
- 40 10. Un WBCD para su uso según la reivindicación 9, en el que la sangre entera es sangre entera autóloga extraída del individuo o sangre entera que se ha compatibilizado con el individuo.
- 45 11. Un WBCD para su uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que dicho medicamento es para administración por implante en el defecto óseo, o en el que dicho medicamento es para administración por inyección en el defecto óseo.
- 50 12. Un WBCD para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el defecto óseo es una fractura o en el que el individuo tiene una enfermedad ósea metabólica.
13. Un WBCD para su uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad ósea metabólica se selecciona del grupo constituido por osteoporosis, osteopenia y enfermedad de Paget.
- 55 14. Un kit para la preparación de un dispositivo de coágulo derivado de sangre entera (WBCD) según la reivindicación 1, para el tratamiento de un defecto óseo que comprende:
1. un frasco que contiene una BMP osteogénica liofilizada,  
 2. un tampón para la reconstitución del polvo de la BMP liofilizada,  
 3. una jeringa y una aguja para la reconstitución de la BMP liofilizada en el tampón,  
 60 4. un vacutainer para recoger la sangre de un paciente,  
 5. una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 1 M,  
 6. una mezcla de fibrina y trombina,  
 7. un recipiente de plástico, siliconado, para mezclar la sangre entera con la BMP reconstituida,  
 8. una espátula o una jeringa para la aplicación del WBCD en extremos óseos durante cirugía abierta, e  
 65 9. instrucciones para la preparación y el uso del WBCD osteogénico usando sangre autóloga o compatibilizada.

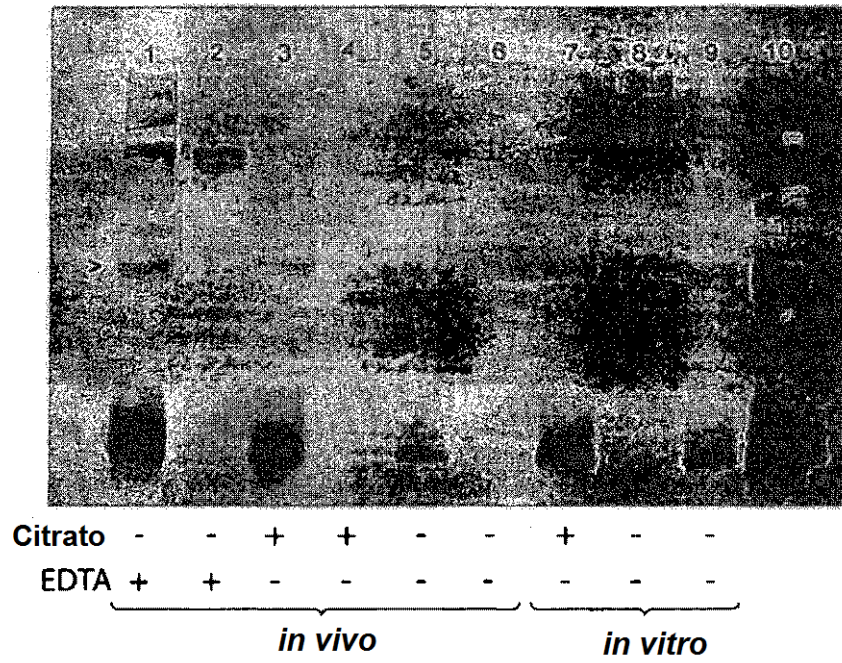


Fig. 1

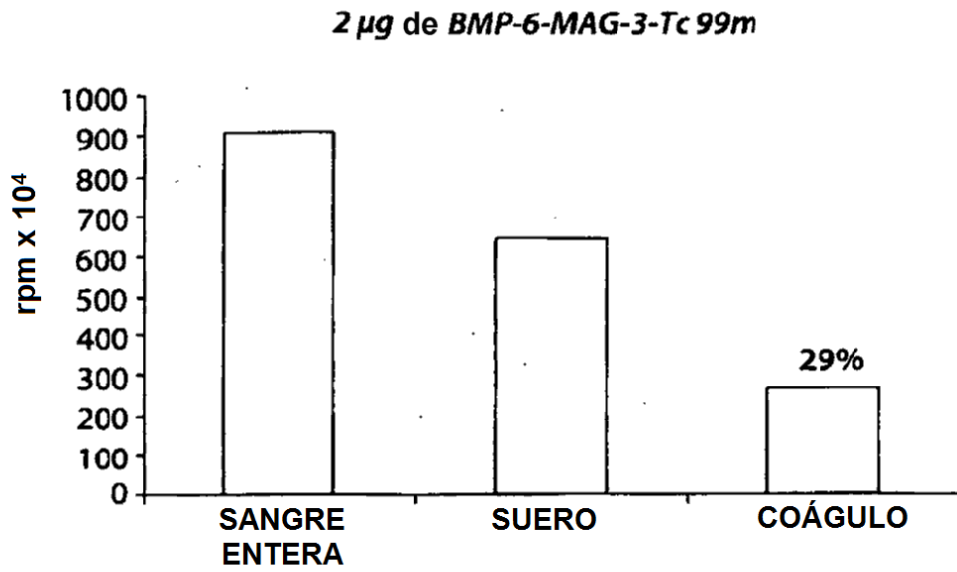


Fig. 2

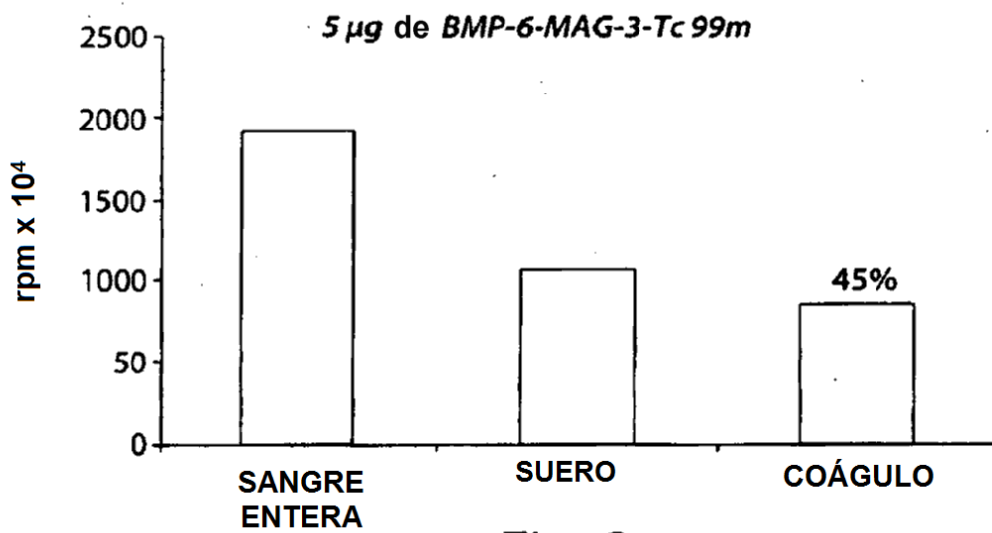


Fig. 3

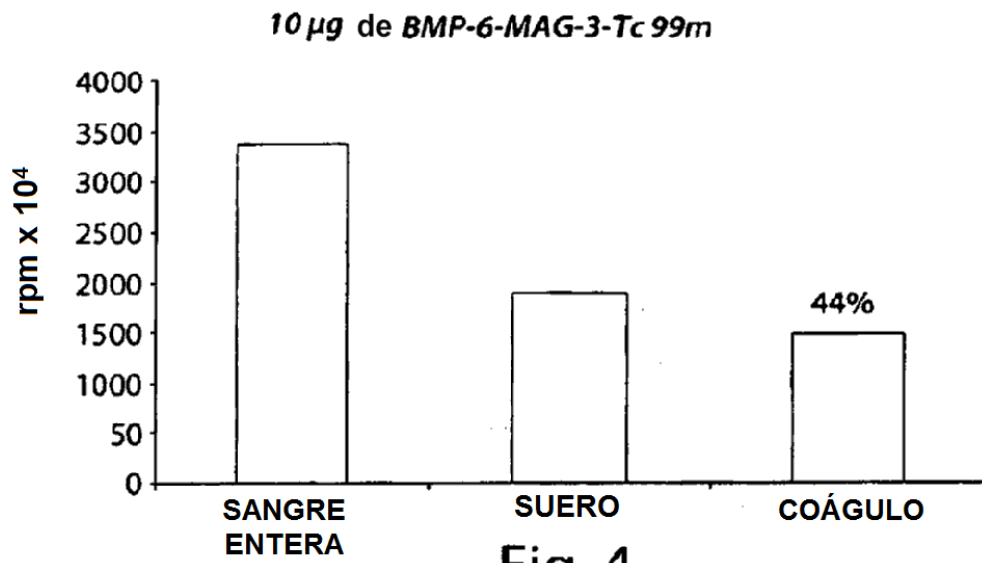


Fig. 4

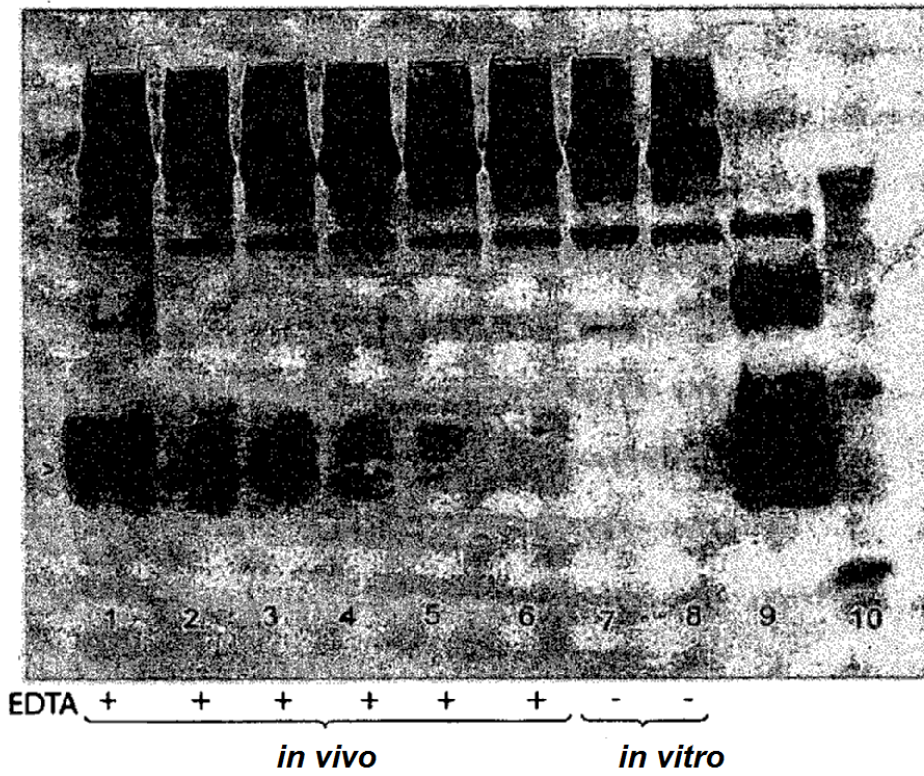


Fig. 5

WBCD de control (8 semanas)

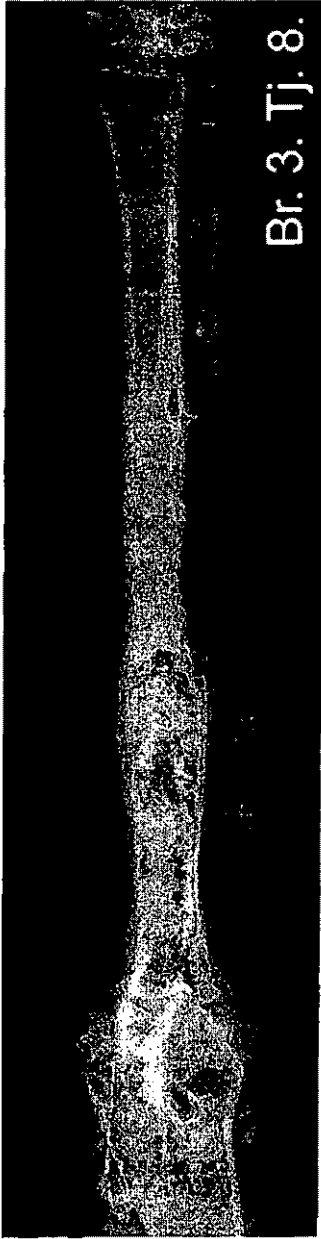


Fig. 6A

WBCD de control (8 semanas)

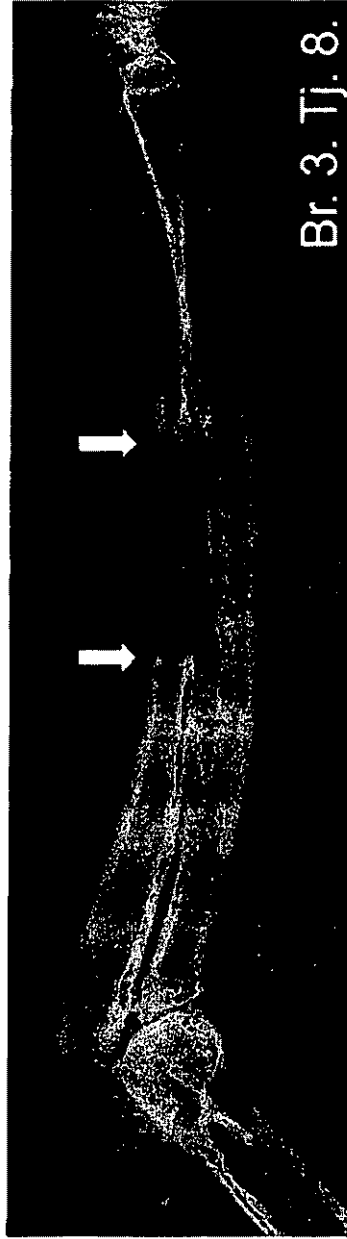


Fig. 6B

WBCD + 100 microgramos de BMP-7 (8 semanas)

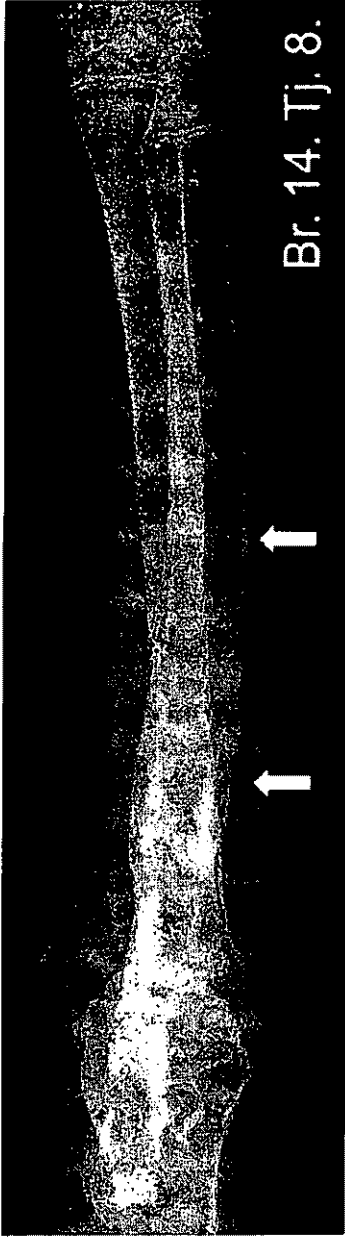


Fig. 7A

WBCD + 100 microgramos de BMP-7 (8 semanas)

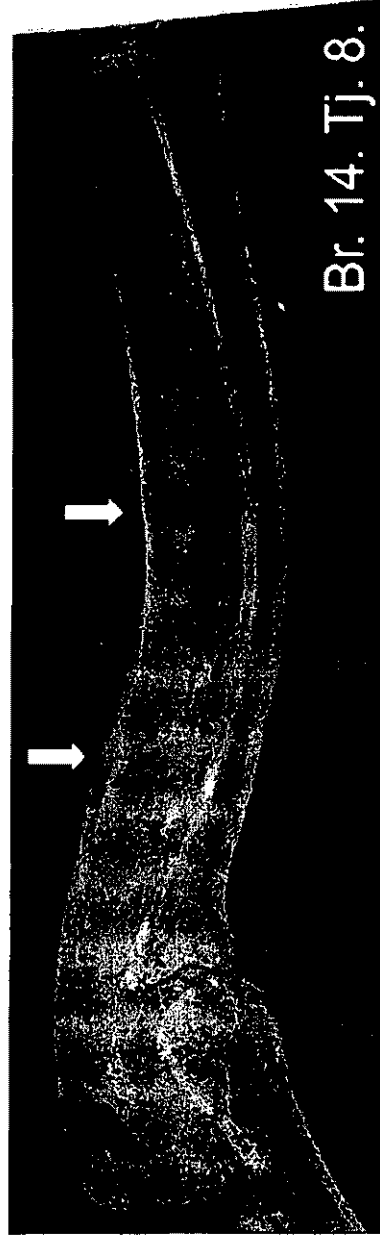


Fig. 7B



Dispositivo óseo con BMP-7 comercial (8 semanas)

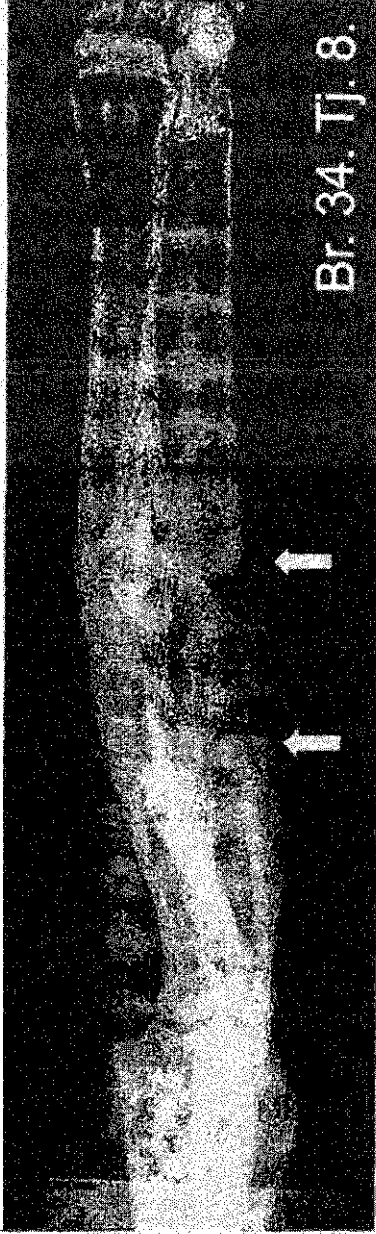


Fig. 8A

Dispositivo óseo con BMP-7 comercial (8 semanas)

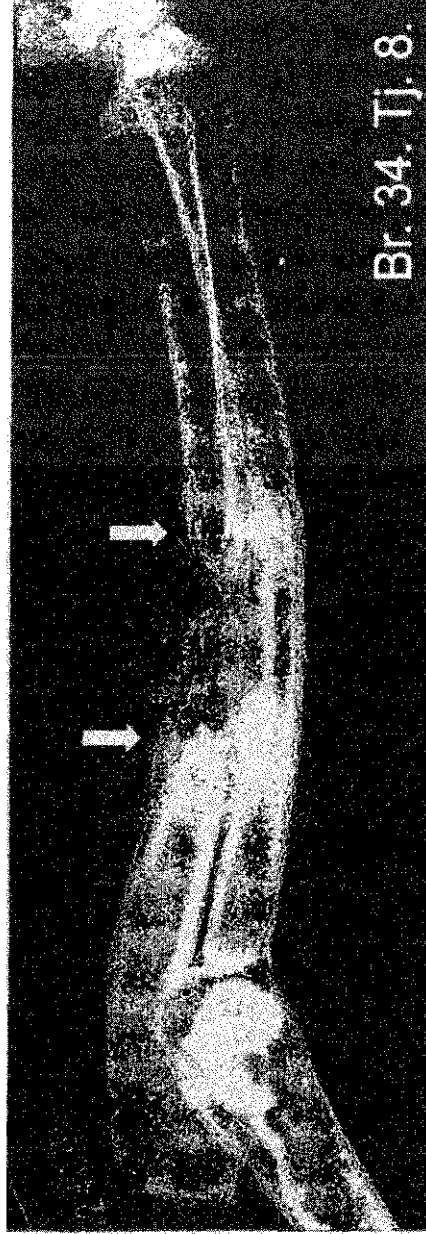


Fig. 8B

Coágulo normal con 100 microgramos de BMP-7 (6 semanas)

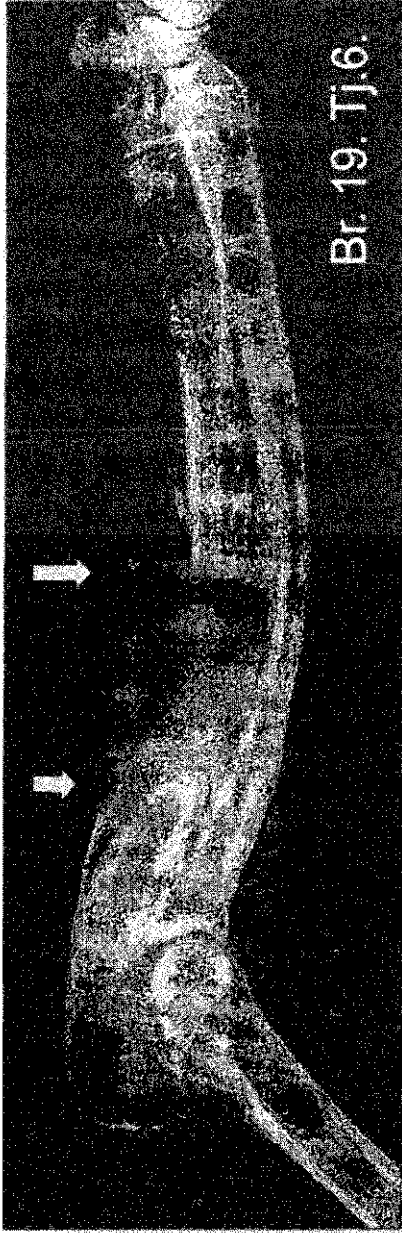


Fig. 9

Coágulo normal con 100 microgramos de BMP-7 (8 semanas)

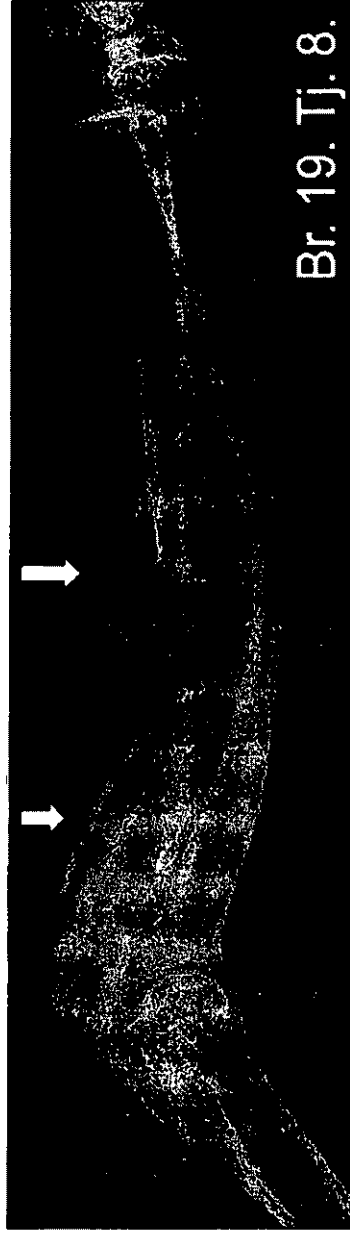


Fig. 10

Coágulo normal con 100 microgramos de BMP-7 (6 semanas)

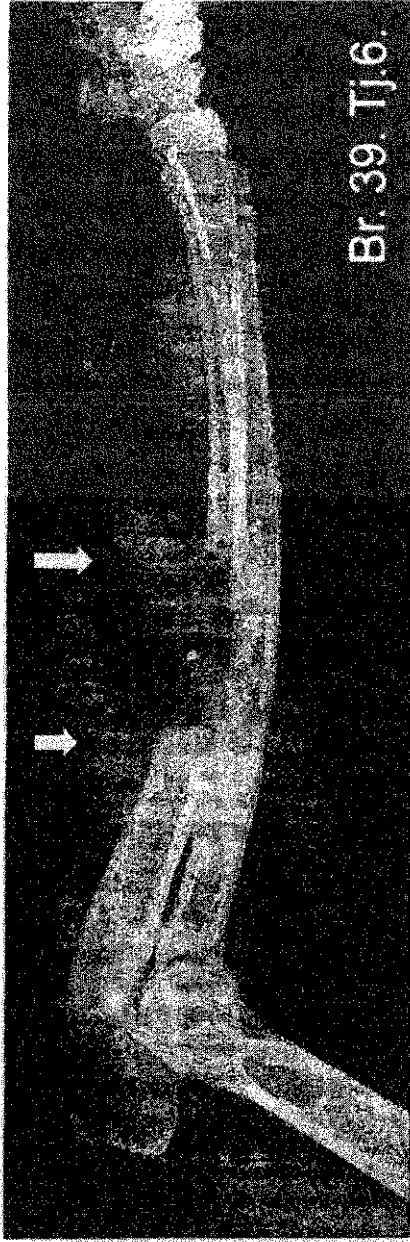


Fig. 11A

Coágulo normal con 100 microgramos de BMP-7 (8 semanas)

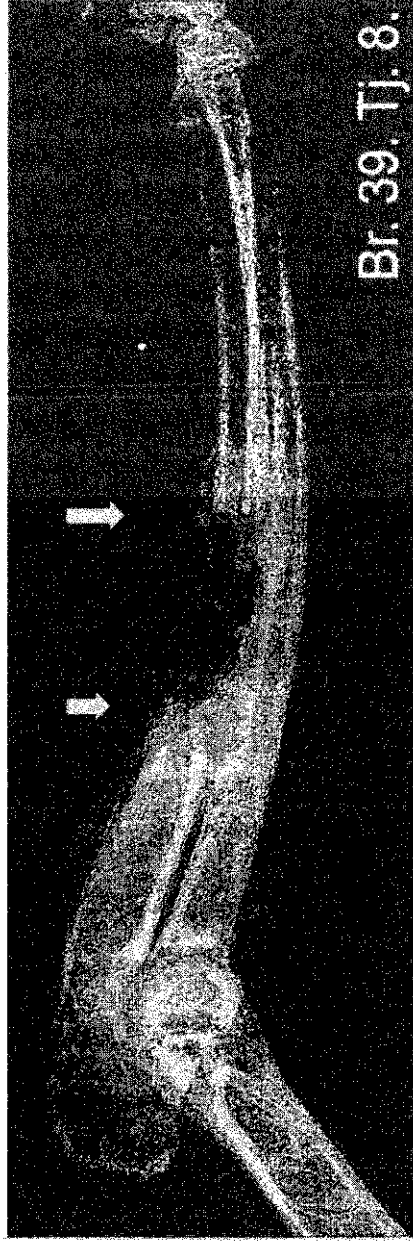


Fig. 11B

WBCD con calcio a las 8 semanas



Fig. 12A

WBCD con calcio y sellador de fibrina a las 8 semanas

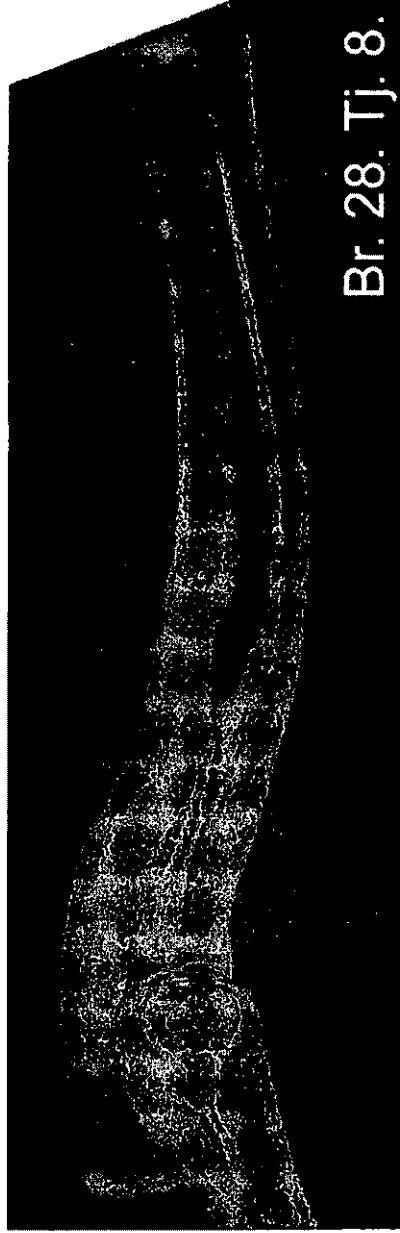


Fig. 12B