

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 051**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2006 PCT/EP2006/050069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2006 WO06072622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2006 E 06707674 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 1833522**

54 Título: **Matrices suplementadas para la reparación de fracturas óseas**

30 Prioridad:

06.01.2005 US 641715 P
10.01.2005 US 642644 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2016

73 Titular/es:

KUROS BIOSURGERY AG (100.0%)
Technoparkstrasse 1
8005 Zürich, CH

72 Inventor/es:

SCHENSE, JASON;
WATSON, JOHN y
ARRIGHI, ISABELLE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 593 051 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

Matrices suplementadas para la reparación de fracturas óseas

Campo de la invención

5 La presente solicitud se refiere a matrices suplementadas y usos de las mismas para la reparación y la curación de fracturas óseas.

Antecedentes de la invención

10 Tanto en Europa como en los Estados Unidos se estima que de 5 a 6 millones de personas sufren fracturas óseas cada año debido a un trauma, o lesiones deportivas o relacionadas con la actividad u osteoporosis. La mayoría de estas lesiones se pueden tratar con la reducción manual y fijación externa (por ejemplo, una escayola). Sin embargo, aproximadamente 20 a 25% de las fracturas requieren hospitalización, por lo general con procedimientos quirúrgicos abiertos.

15 Una fractura se define como una discontinuidad en la estructura ósea cortical, generalmente como resultado de un exceso de fuerza mecánica. Una fractura completa se define por una discontinuidad o rotura, que se produce a través de toda la estructura ósea, la creación de dos o más distintos segmentos de hueso. Los fragmentos de hueso no tienen que separarse por la lesión que se clasifica como una fractura. En algunos casos el periostio mantiene los fragmentos de hueso en su posición anatómica original. En otros casos, la fractura hace que la extremidad se doble, rompa el periostio o incluso la piel y el tejido muscular circundante. En otros casos, como suele ser el caso de lesiones o accidentes graves por misiles de alta velocidad, grandes porciones de hueso son fragmentados o incluso eliminados de su ubicación original. Los objetivos principales de tratamientos de fracturas son la unión estrecha y la restauración de la función de la médula y sin que resulte en deformidad. La obtención de estos objetivos de forma rápida es una preocupación cada vez más importante debido a la problemática de la discapacidad y la contención de costos. En una parte significativa de la población de pacientes, ambos objetivos, es decir, unión estrecha y una rápida restauración de la función ósea, están en riesgo debido a la edad del paciente y/o el estado general de salud y/o el tipo y/o ubicación de la fractura. En particular, en el caso de pacientes con osteoporosis, el riesgo de falta de unión y el aumento de los tiempos de curación es alto. Como enfermedad del esqueleto, la osteoporosis se caracteriza por baja masa ósea y el deterioro estructural del tejido óseo que conduce a un aumento de la fragilidad ósea, el aumento de los tiempos de curación y la aparición de pseudoartrosis.

30 Los injertos óseos y sustitutos de injerto óseo son ampliamente utilizados en muchos procedimientos ortopédicos para tratar los problemas asociados con la pérdida de masa ósea, la unión retardada y fracturas no consolidadas o como un material de fijación del implante. En caso de fracturas graves y complicadas, de injerto óseo y de injerto de hueso los sustitutos se utilizan para fortalecer los huesos antes de que la fractura se estabilice a continuación, con soporte físico. Los materiales de injerto óseos pueden ser autogénicos, alogénicos, xenogénicos, matrices óseas desmineralizadas (DBM), de origen sintético y mezclas de los mismos. Los materiales de injerto óseo se pueden clasificar en materiales con propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteoogénicas. Los materiales osteoconductoras no crean hueso; sino que simulan la migración de las células óseas que viven cerca en el material. Los materiales osteoinductivos estimulan el sistema propio del paciente para generar tejido óseo. Los materiales osteoogénicos crean directamente el tejido óseo. Los materiales osteoogénicos se limitan a los osteoblastos y células madre mesenquimales que generan tejido óseo. Algunos materiales exhiben más de una de las propiedades descritas.

40 El autoinjerto se refiere a cualquier tejido o hueso que se recolecta de una parte del cuerpo del paciente para ser utilizado en el sitio de la lesión. Los autoinjertos óseos se recolectan generalmente de la cresta ilíaca. A pesar de su ventaja de ser biocompatibles, seguros, de una composición vascularizada y que exhibe propiedades osteoinductivas, las desventajas son importante. Los autoinjertos requieren una segunda operación que puede llevar a complicaciones postoperatorias que incluyen la pérdida de sangre, infecciones y dolor. Los autoinjertos son costosos debido a estancias hospitalarias más prolongadas y tiempo de operación. El suministro de autoinjertos por el paciente es limitado, y el dolor post-operatorio después de la recolección de material autógeno es a menudo mayor que la propia fractura ósea. A pesar de las desventajas, el autoinjerto se considera el "patrón oro" en términos de materiales de injerto óseo. Los aloinjertos son tejidos óseos tomados de varios lugares del cuerpo de un cadáver humano, que pueden ser manufacturados con diferentes estructuras y en diferentes formas. Los aloinjertos son mínimamente osteoinductivos, hay una oferta limitada solamente, y que suponen en el paciente el riesgo de infecciones debido a que pueden albergar patógenos. Los materiales sintéticos de injerto óseo se desarrollan como una alternativa "lista para usar" para los materiales de injerto óseo autógeno. Los sustitutos sintéticos de injerto óseo incluyen materiales cerámicos y polímeros de auto-ajuste que imitan las propiedades de los huesos humanos, como la hidroxiapatita y polimetilmetacrilato, colágeno, fosfato tricálcico, y fosfatos de calcio sulfates. Estos materiales presentan pobres propiedades de manejo y la falta de propiedades osteoinductivas.

55 En los últimos años se han hecho esfuerzos para desarrollar sustitutos de injerto óseo que muestran propiedades osteoinductivas como una verdadera "alternativa lista para usar" para los autoinjertos. DBM es un ejemplo de un

5 sustituto de injerto óseo osteoinductivo. Sin embargo DBM como un material alogénico se enfrenta a los mismos inconvenientes que el hueso alogénico. Otros ejemplos son de Stryker Corp.'s OP-1®, que suministrado produce de forma recombinante la proteína morfogenética ósea 7 (BMP 7) a partir de una matriz de colágeno o material sustituto del injerto óseo Sofamor Danek's INFUSE® producido de forma recombinante utilizando BMP2 de esponjas de colágeno. Aparte del proceso de producción largo y costoso de las BMP, las proteínas de ambos productos se suministran a partir de una matriz de colágeno en altas concentraciones. Las matrices de colágeno de origen bovino conllevan todos los riesgos de los materiales xenogénicos, muestran propiedades de manipulación pobres en el procedimiento quirúrgico, por ejemplo, no son moldeables para adaptarse estrechamente a la forma del sitio de la lesión, y la alta concentración de BMP suministrada al cuerpo puede conducir en algunos de los pacientes a la calcificación de órganos o a la formación de hueso en otras partes del cuerpo.

10 Otras matrices para el tratamiento local de defectos óseos, incluyen el uso de la hormona humana paratiroidea (PTH) o de sus derivados que se suministran al cuerpo como en un inyectable para la formación in situ de una composición sellante de fibrina. La hormona paratiroidea es un péptido de 84 aminoácidos que es hecho y se secretado por la glándula paratiroidea. La hormona en su longitud completa sirve en la regulación de los niveles sistémicos de calcio y el recambio óseo. La hormona paratiroidea es un factor anabólico directo potente para osteoblastos precursores y un factor anabólico indirecta de los osteoclastos. Por la regulación del equilibrio de los osteoblastos y osteoclastos, la hormona paratiroidea tiene un efecto directo sobre el recambio óseo resultante y la posterior liberación de calcio en el cuerpo. Muchos estudios en animales han señalado los posibles efectos anabólicos de la hormona paratiroidea en la densidad mineral ósea (DMO). La hormona paratiroidea actúa sobre las células mediante la unión a un receptor de superficie celular. Este receptor es conocido que se encuentran en los osteoblastos, las células que son responsables de la formación de hueso nuevo.

15 El dominio de 34 aminoácidos N-terminal de la hormona paratiroidea humana se ha informado que es biológicamente equivalente a la longitud completa de la hormona. La hormona paratiroidea 1-34 y su modo de acción se han reportado primero en la Patente de Estados Unidos No. 4,086,196. La hormona paratiroidea 1-34 se sabe que es una versión truncada totalmente activa de la hormona paratiroidea, que no tiene enlaces disulfuro o estructuras terciarias significativas. Contiene una estructura secundaria moderada, incluyendo varias hélices alfa. Muchos estudios clínicos se han llevado a cabo utilizando la hormona paratiroidea que se administra sistémicamente para aumentar la masa ósea en general en pacientes con osteoporosis, con la mayoría se requieren inyecciones diarias de hormona paratiroidea o de la hormona paratiroidea 1-34 sola, o en combinación con otras sustancias activas, durante muchos meses. Más detalles acerca de PTH y de la hormona paratiroidea 1- 34 se describen en WO 03/052091.

20 Otras versiones truncadas de la hormona paratiroidea con actividad biológica incluyen la hormona paratiroidea 1-25, 1-31 y 1-38.

25 Mientras tanto se ha hecho trabajos el estudiando los efectos sistémicos del PTH, la administración local del PTH apenas ha sido explorada. WO 03/052091 describe matrices para la administración local de PTH. Específicamente, WO 03/052091 describe la hormona paratiroidea estando covalentemente unida a matrices sintéticas y naturales, en particular de fibrina o matrices de polietilenglicol, para la administración local y la liberación en el sitio que se necesita de una forma controlada.

30 Sin embargo, WO 03/052091 no describe matrices que sean apropiadas para la curación de fracturas óseas, en particular para las fracturas óseas graves, como la reparación de fracturas en riesgo de convertirse en uniones con retraso o falta de unión.

Es por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una matriz que es adecuado para la reparación de locales de fracturas óseas.

Resumen de la invención

35 Se ha encontrado sorprendentemente que una matriz que contiene PTH ("matrices suplementadas") se puede utilizar para suministrar localmente PTH al sitio de una fractura de hueso para reparar y curar la fractura.

Por lo tanto, la presente invención se relaciona con una formulación que comprende

- 40 (i) un péptido seleccionado del grupo que consiste de PTH y un péptido de fusión PTH;
- (ii) un material granular que comprende un mineral de calcio y
- 50 (iii) una composición capaz de formar una matriz de fibrina bajo condiciones fisiológicas que comprenden un componente precursor fibrinógeno y un componente precursor de la trombina,

en donde el PTH o péptido de fusión PTH está presente en un intervalo de concentración entre 0.01 a 2 mg/ml de matriz de fibrina o componentes precursores que forman la matriz, con la condición de que una concentración de 0.4 mg/ml de matriz de fibrina o componentes precursores que forman la matriz no está incluida.

La presente invención también se relaciona con una matriz suplementada que comprende

- (i) PTH o un péptido de fusión PTH;
- (ii) un material granular que comprende un mineral de calcio y
- (iii) fibrina;

5 en donde dicho PTH o péptido de fusión PTH está presente en un intervalo de concentración entre 0.01 a 2 mg/ml de matriz de fibrina, con la condición de que una concentración de matriz de fibrina 0.4 mg/ml no se incluye.

La presente invención también se relaciona con el uso de dicha formulación y la matriz suplementada para la fabricación de un medicamento de administración local para la reparación de fracturas óseas.

10 Preferiblemente, el PTH se incorpora de forma liberable en la matriz y la matriz suplementada se aplica o se forma en el sitio de la fractura. Preferiblemente, el PTH se une covalentemente a la matriz. En una realización, la matriz es una matriz de fibrina. La hormona paratiroidea puede ser PTH₁₋₈₄ (nativa), PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁, o PTH₁₋₂₅, o cualquier versión modificada o alélicas de PTH que exhiba propiedades, la formación de hueso es decir, similar a la anterior ("PTH"). Preferiblemente, el PTH es PTH₁₋₃₄. En una realización preferida, el PTH es un péptido de fusión ("péptido de fusión PTH") que contiene al menos dos dominios en la que el primer dominio comprende PTH y el segundo dominio
15 comprende un dominio de sustrato covalentemente reticulable capaz de entrecruzarse a la matriz durante o después de su formación.

En una realización, una matriz suplementada de fibrina se forma a partir de una formulación que comprende (i) un material granular, (ii) una composición apropiada para formar una matriz de fibrina que contiene fibrinógeno y
20 trombina y (iii) el PTH en un intervalo entre 0.01 a 2 mg de PTH/ml de matriz de fibrina, que es adecuado para la reparación y la curación de fracturas óseas con la condición de que una concentración de matriz de fibrina 0.4 mg de PTH/ml no esté incluida.

También se proporciona un kit que comprende la formulación anterior, en donde al menos uno de los componentes adecuados para formar una matriz se almacena por separado de los otros componentes para formar la matriz.

25 Las formulaciones y matrices suplementadas se utilizan preferiblemente para la reparación y la curación de fracturas óseas, en particular para fracturas óseas con un riesgo de convertirse en uniones con retraso o no uniones. Las indicaciones preferidas son las fracturas de la muñeca (fracturas del radio distal), fracturas de huesos largos, como la tibia, y fracturas de cadera.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 muestra la bioactividad de variantes de PTH. Las células transfectadas con un gen indicador unido a un promotor para un receptor de PTH fueron tratadas con la misma cantidad de cualquiera de los dos PTH₁₋₃₄, TG-pl-PTH₁₋₃₄ (en adelante se describe) o el 84 amino ácido PTH estándar internacional. Se midió la inhibición de la expresión del gen indicador de luciferasa y se comparó con las células transfectadas que no fueron expuestas al PTH en solución (control).

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

35 La figura 3 muestra los resultados de una prueba de estabilidad de defectos tibiales segmentarios tras el tratamiento con la matriz suplementada, presentándose como la puntuación de la curación.

La figura 4 muestra los resultados de una prueba de estabilidad de defectos tibiales segmentarios tras el tratamiento con la matriz completada, presentado en porcentaje de permanencia de las juntas no estables.

Descripción detallada de la invención

40 Matrices suplementadas comprenden un PTH liberable incorporado en el mismo, que contiene opcionalmente un material granular, se describen en el presente documento. La PTH se incorpora ya sea a través de un enlace covalente a la matriz o a través de la interacción no covalente con la matriz y/o los gránulos. Estas matrices suplementadas disminuyen el tiempo de curación en comparación con el autoinjerto y desencadenan la curación de fracturas óseas que de otro modo no se consolidarían. Las matrices son biocompatibles y biodegradables y se pueden
45 formar in vitro o in vivo, en el momento de la implantación. El PTH puede ser incorporado en las matrices con retención completa de su bioactividad. El PTH se puede incorporar de forma liberable, utilizando técnicas que proporcionan control sobre cómo y cuándo y en qué grado el PTH se libera usando la matriz como un vehículo de liberación controlada para curar fracturas óseas.

Definiciones

- 5 "Lugar de adhesión o sitio de unión celular" como generalmente se usa en este documento se refiere a una secuencia de péptidos a la que una molécula, por ejemplo, un receptor que promueve la adhesión en la superficie de una célula, se une. Ejemplos de sitios de adhesión incluyen, pero no se limitan a, la secuencia RGD de la fibronectina, y la secuencia (SEQ ID NO: 1) YIGSR de la laminina. Los sitios de adhesión se pueden incorporar opcionalmente en la matriz mediante la inclusión de un dominio de sustrato reticulable a la matriz de fibrina.
- 10 La "Actividad biológica" como generalmente es utilizada en este documento, se refiere a los acontecimientos funcionales mediados por una proteína de interés. En algunas realizaciones, esto incluye eventos de ensayo por la medición de la interacción de un polipéptido con otro polipéptido. También incluye someter a ensayo el efecto que la proteína de interés tiene en el crecimiento celular, la diferenciación, muerte, migración, adhesión, las interacciones con otras proteínas, la actividad enzimática, la fosforilación de proteínas o la desfosforilación, la transcripción, o la traslación.
- 15 "Fractura de hueso", como se usa en este documento, se refiere a una discontinuidad o ruptura a través de toda la estructura ósea creando dos o más distintos segmentos óseos.
- 15 "Mineral de calcio", como se usa generalmente en la presente memoria se refiere a sustancias naturales homogéneas que contienen iones de calcio. Un ejemplo de un mineral de calcio es la hidroxiapatita ($\text{Ca}_5 [(\text{OH}) (\text{PO}_4)_3]$), que es el componente principal de los dientes y huesos.
- "Reticulación" como generalmente se usa en este documento, significa la formación de enlaces covalentes.
- 20 "Unión retardada" como generalmente se usa en este documento, significa una fractura de hueso que no ha sanado dentro de 3-4 meses, es decir, un lapso de tiempo que se considera suficiente para la unión ósea normal. La unión retardada sugiere que la unión es lenta pero con el tiempo se producirá sin necesidad de intervención quirúrgica o no quirúrgica adicional. Sin embargo, un retraso de unión puede, en algunos casos, progresar a una falta de unión en un punto de tiempo posterior.
- 25 "Matriz de fibrina" como generalmente se usa en este documento significa el producto de un proceso en donde sustancialmente todos los componentes precursores, fibrinógeno y trombina, hacen reticulación en presencia de una fuente de calcio y el Factor XIIIa para formar una red tridimensional.
- 30 "Matriz" tal como se utiliza en este documento generalmente se refiere a un material destinado a interactuar con los sistemas biológicos para tratar, aumentar, o reemplazar cualquier tejido o la función del tejido en función del material, ya sea de forma permanente o temporal. La matriz puede servir como un dispositivo de administración de PTH incorporado en el mismo y/o como una matriz de células de crecimiento hacia el interior. Las matrices descritas en este documento se forman a partir de componentes precursores líquidos que son capaces de formar un andamio en el cuerpo en el lugar de la necesidad. Los términos "matriz" "gel" o biomateriales se utilizan como sinónimos en este documento. Los términos "matriz" y "gel" se refieren a la composición formada después de que los componentes precursores se mezclan entre sí. Así, los términos "matriz" y "gel" abarcan redes poliméricas parcial o totalmente reticuladas. Pueden ser en forma de un líquido, semi-sólido, tal como una pasta o un sólido. Dependiendo del tipo de materiales precursores, la matriz puede estar hinchada con agua pero no se disuelve en agua, es decir, formar un hidrogel que permanece en el cuerpo durante un determinado período de tiempo.
- 35 "Componentes precursores o polímeros de origen natural" como generalmente es utilizado en este documento, se refiere a moléculas que se podrían encontrar en la naturaleza.
- 40 "No unión", como generalmente se usa en este documento significa una fractura ósea, que no muestra la progresión de la curación de la fractura dentro de 3 a 6 meses después de la lesión (en función del tipo y la ubicación de la fractura) en estudios radiográficos mensuales.
- 45 "PTH" como se usa en este documento incluye la secuencia humana PTH_{1-84} de todos y versiones truncadas, modificados y alélicas de PTH que exhiben propiedades de formación de hueso, en particular cuando se incorporan preferiblemente unidos covalentemente a una matriz de fibrina. Versiones truncadas preferidas del PTH son PTH_{1-38} , PTH_{1-34} , PTH_{1-31} o PTH_{1-25} . El más preferido es PTH_{1-34} . Preferiblemente, el PTH es PTH humano, aunque el PTH de otras fuentes, tales como PTH bovina, puede ser adecuado.
- 50 "Péptido PTHfusion" como generalmente utilizado en este documento, se refiere a un péptido que contiene al menos un primero y un segundo dominio. Un dominio contiene un PTH, preferiblemente PTH_{1-34} y el otro dominio contiene un dominio de sustrato reticulable a una matriz de fibrina durante o después de su formación. Un sitio de degradación enzimática o hidrolítico también puede estar presente entre el primer y el segundo dominio.
- "Periostio" como se usa en este documento significa la capa exterior de los huesos que forma una capa densa, fibroso, con la excepción de aquellas partes que forman una estructura de unión que abarca toda la estructura ósea y contiene la vasculatura que alimenta al tejido óseo exterior.

"Fisiológica" como se usa generalmente en este documento significa condiciones que se pueden encontrar en los vertebrados vivos. En particular, las condiciones fisiológicas se refieren a las condiciones en el cuerpo humano, tales como la temperatura y el pH. Las temperaturas fisiológicas, en particular significan un intervalo de temperatura entre 35°C a 42°C, preferiblemente alrededor de 37°C.

- 5 "Reparación o curación de fracturas óseas" como generalmente se utiliza en la presente memoria significa reunir y realinear los extremos de los huesos rotos.

"Matrices Suplementadas" o biomaterial como se usa generalmente en la presente memoria significa una matriz que tiene incorporado PTH.

I. Matrices Suplementadas

10 A. Materiales de la Matriz

Para la reparación o regeneración tisular, las células deben migrar a un lecho de la lesión, proliferar, expresar componentes de matriz o formar matriz extracelular y formar una forma de tejido final. Poblaciones de células múltiples a menudo deben participar en esta respuesta morfogénica, incluyendo con frecuencia las células vasculares y nerviosas. Las matrices han demostrado que pueden causar mejora en gran medida, y en algunos casos se ha encontrado que son esenciales para que esto ocurra.

15

Se han hecho enfoques en el desarrollo de matrices de origen natural o sintético o una mezcla de ambos. La matriz de fibrina, que se describe en WO 03/052091, se ha encontrado que es un material de matriz adecuado para la reparación de fracturas óseas.

20

La matriz se forma reticulando iónicamente, covalentemente o por combinaciones de las mismas moléculas precursoras y/o por la hinchazón de uno o más materiales poliméricos, es decir, matrices, para formar una red polimérica que tiene suficiente espacio entre polímeros para permitir el crecimiento o la migración de las células en la matriz. En una realización, la matriz está formada por proteínas, preferiblemente proteínas presentes de forma natural en el paciente en donde la matriz será implantada. Una proteína de la matriz particularmente preferida es la fibrina, aunque matrices hechas de otras proteínas, como el colágeno y la gelatina también se pueden utilizar. Los polisacáridos y glicoproteínas también se pueden usar para formar la matriz.

25

Matrices de Fibrina

La fibrina es un material natural que se ha reportado para varias aplicaciones biomédicas. Matrices hechas de fibrina se han descrito como material para células matrices en crecimiento en la Patente de Estados Unidos No. 6,331,422 en Hubbell et al. La fibrina se ha utilizado en los selladores debido a su capacidad para unirse a muchos tejidos y su papel natural en la cicatrización de heridas. Algunas aplicaciones específicas incluyen el uso como un sellador para la unión de injerto vascular, la unión de válvula cardíaca. Además, estas matrices se han utilizado como dispositivos de administración de fármacos, y para la regeneración neuronal. Aunque las matrices de fibrina proporcionan un soporte sólido para la regeneración de tejidos y células en crecimiento, hay pocas secuencias activas en el monómero que mejoran directamente estos procesos.

30

El proceso por el que el fibrinógeno se polimeriza en fibrina también se ha caracterizado. Inicialmente, un proteasa escinde la molécula de fibrinógeno dimérica en los dos sitios simétricos. Hay varias proteasas posibles que puede escindir el fibrinógeno, incluyendo trombina, peptidasa, proteasa y III, y cada uno corta la proteína en un sitio diferente. Una vez se escinde el fibrinógeno, una etapa de auto polimerización se produce en donde los monómeros de fibrinógeno se juntan y forman un gel polímero no covalentemente reticulado. Este auto ensamblaje se debe a que los sitios de unión quedaran al descubierto después de que ocurra la escisión de la proteasa. Una vez que están expuestos, estos sitios de unión en el centro de la molécula pueden unirse a otros sitios en las cadenas de fibrinógeno, que están presentes en los extremos de las cadenas peptídicas. De esta manera, se forma una red de polímero. El factor XIIIa, una transglutaminasa activa del Factor XIIIa por proteolisis trombina, puede entonces reticular covalentemente la red de polímero. Existen otros transglutaminasas y también pueden estar involucrados en la reticulación covalente y el injerto a la red de fibrina.

35

40

45

Una vez que se forma una matriz de fibrina reticulada, la degradación posterior está estrechamente controlada. Una de las moléculas clave en el control de la degradación de la fibrina es un inhibidor α 2-plasmina. Esta molécula actúa por reticulación de la cadena α de la fibrina a través de la acción del factor XIIIa. Uniéndose a la matriz, una alta concentración de inhibidor puede estar localizada en la matriz. El inhibidor actúa entonces al impedir la unión de plasminógeno a fibrina y la inactivación de la plasmina. El inhibidor de α 2-plasmina contiene un sustrato de glutamina. La secuencia exacta se ha identificado como NQEQVSPL (SEQ ID NO: 2), siendo la primera glutamina el aminoácido activo para la reticulación.

50

Se ha demostrado que los péptidos bi-dominio, que contienen una secuencia de sustrato de factor XIIIa y una secuencia de péptido bioactivo, pueden ser reticulados en la matriz de fibrina y que este péptido bioactivo conserva su actividad celular in vitro.

5 Dependiendo de la indicación y sustancias mezcladas en la matriz de fibrina la concentración de trombina puede variar. En una realización preferida, la matriz de fibrina contiene fibrinógeno en una gama de 5 a 65 mg por mililitro de matriz de fibrina, más preferiblemente 15 a 60 mg por mililitro de matriz de fibrina, aún más preferiblemente de 25 a 55 mg por mililitro de matriz de fibrina, y lo más preferiblemente 30 a 45 mg por mililitro de matriz de fibrina. La trombina está presente en una gama de 0.5 a 5 U.I. por mililitro de matriz de fibrina, más preferiblemente en un rango entre 1.25 a 3.25 U.I. por mililitro de matriz de fibrina, lo más preferiblemente de 1.5 a 2.5 U.I. por mililitro de matriz de fibrina. Además, una fuente de iones de calcio ayuda a formar la matriz de fibrina. La fuente de iones de calcio es preferiblemente $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un intervalo de concentración de 0.5 a 5 mg por ml de matriz de fibrina, incluso más preferiblemente en una concentración de 2 a 3.5 mg por ml de matriz de fibrina, lo más preferiblemente en un intervalo de concentración desde 2.5 hasta 3 mg por ml de matriz de fibrina. Esta composición no tiene en cuenta el agua utilizada para humedecer algunos gránulos potenciales antes de mezclarse en la matriz de fibrina dado que dicha agua se queda en los poros de los gránulos a lo largo de todo el proceso de formación de la matriz y por lo tanto no tendrá ningún efecto de dilución de la concentración de fibrinógeno y trombina en la matriz de fibrina. UI representa una unidad internacional de trombina y se define como la actividad correspondiente a 0.0853 mg de la primera norma internacional de trombina humana.

Componentes precursores para la formación de matrices de fibrina

20 La matriz de fibrina se forma preferiblemente a partir de dos componentes precursores que pueden estar en forma de soluciones. El primer componente precursor, típicamente en forma de una solución, contiene fibrinógeno, preferiblemente en un intervalo de concentración desde 10 hasta 130 mg de fibrinógeno por mililitro de solución de precursora, más preferiblemente de 30 a 120 mg de fibrinógeno por mililitro de solución de precursora, incluso más preferiblemente de 50 a 110 mg de fibrinógeno por mililitro de solución de precursora, y lo más preferiblemente de 60 a 90 mg por mililitro de fibrinógeno de solución precursora. Si la trombina tiene que ser añadida para formar la matriz, el segundo componente precursor, también típicamente en forma de una solución, contiene trombina, preferiblemente en un intervalo de concentración de 1 a 10 U.I. de trombina por mililitro solución precursora, más preferiblemente 2.5 a 6.5 U.I. de trombina por mililitro solución precursora, lo más preferiblemente del 3 al 5 U.I. de trombina por mililitro de solución precursora. Además, una fuente de iones de calcio se encuentra en una de las soluciones precursoras. La fuente de iones de calcio es preferiblemente $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un intervalo de concentración de 1 a 10 mg por ml de solución precursora, incluso más preferiblemente 4-a 7 mg por ml de solución precursora, más preferiblemente de 5 a 6 mg por ml de solución precursora. Opcionalmente, una enzima capaz de catalizar la formación de la matriz, como Factor XIIIa, se añade a una solución precursora. Preferiblemente, el Factor XIIIa está presente en un intervalo de concentración de 0.5 a 100 U.I. por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 1 a 60 U.I. por mililitro solución precursora, y lo más preferiblemente de 1 a 10 U.I. por mililitro de solución precursora.

B. Sitios de unión de la célula

Las células interactúan con su entorno a través de las interacciones proteína-proteína, proteína-oligosacáridos y proteína-polisacárido en la superficie celular. Las proteínas de matriz extracelular proporcionan una serie de señales bioactivas a la célula. Se requiere de esta densa red para apoyar las células, y muchas proteínas de la matriz han demostrado control de la adhesión celular, la difusión, la migración y la diferenciación. Algunas de las proteínas específicas que han demostrado ser particularmente activas incluyen laminina, vitronectina, fibronectina, fibrina, fibrinógeno y colágeno. Se han realizado muchos estudios de laminina, y se ha demostrado que la laminina juega un papel vital en el desarrollo y regeneración de los nervios en las células in vivo y nerviosas in vitro, así como en la angiogénesis. Se han identificado algunas de las secuencias específicas que interactúan directamente con los receptores celulares y causan ya sea la adhesión, la difusión o de transducción de señal.

La laminina, una gran proteína multidominio, se ha demostrado que consta de tres cadenas con varios dominios de unión al receptor. Estos dominios de unión al receptor incluyen la secuencia YIGSR (SEQ ID NO: 1) de la cadena laminina B1, LRGDN (SEQ ID NO: 3) de la cadena de laminina A y PDGSR (SEQ ID NO: 4) de la cadena laminina B1. También se han identificado otras varias secuencias de reconocimiento para las células. Estos incluyen IKVAV (SEQ ID NO: 5) de la cadena de laminina A y la secuencia RNIAEIIKDI (SEQ ID NO: 6) de la cadena laminina B2. Particularmente preferida es la secuencia RGD de la fibronectina.

En otra realización preferida sitios peptídicos para la adhesión de células se incorporan en la matriz, es decir, péptidos que se unen a los receptores de promotores de la adhesión en las superficies de células. Tales péptidos promotores de la adhesión incluyen los descritos anteriormente. Particularmente preferidos son la secuencia RGD de la fibronectina y la YIGSR (SEQ ID NO: 1) la secuencia de laminina. Sitios de unión de la célula pueden ser incluidos con algunas de las matrices naturales. La incorporación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la mezcla de un péptido de unión celular que contiene cisteína con la molécula de precursor incluyendo el grupo insaturado conjugado, tal como acrilato de PEG, PEG acrilamida o vinilsulfona de PEG. Este paso puede ocurrir en poco tiempo, por ejemplo, unos minutos, antes de mezclarse con el resto del componente precursor que incluye el grupo nucleofílico,

como componente precursor que contiene tiol. Si el sitio de unión celular no incluye una cisteína, esta puede ser sintetizada químicamente para incluir una. Durante este paso, el péptido que promueve la adhesión llegará a ser incorporado en un extremo del precursor que se multiplican funcionalizado con un insaturación conjugada; cuando se añade el multi-tiol restante en el sistema, se forma una red reticulada.

- 5 La concentración de sitios de adhesión unidos covalentemente a la matriz puede influir en la tasa de infiltración de células. Por ejemplo, para un hidrogel dado, un intervalo de concentración RGD puede ser incorporado en la matriz con el crecimiento hacia dentro de células soportes y la migración celular de una manera óptima. El intervalo de concentración óptimo de los sitios de adhesión como RGD es entre 0.04 y 0.05 mM y aún más preferiblemente 0.05 mM, en particular, para una matriz que tiene un contenido de agua entre la concentración de equilibrio y el 92 % del peso después de la terminación de la absorción de agua.

C. PTH

- 15 El término "PTH" como se usa en este documento incluye la secuencia humana PTH₁₋₈₄ de todos y versiones truncadas, modificados y alélicas de PTH que exhiben propiedades de formación de hueso cuando se une covalentemente a matrices naturales o sintéticos biodegradables. Versiones truncadas preferidas del PTH son PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁, PTH₁₋₂₈ o PTH₁₋₂₅. El más preferido es PTH₁₋₃₄. Preferiblemente, el PTH es PTH humano, aunque el PTH de otras fuentes, tales como PTH bovino, puede ser adecuado. El PTH en un intervalo entre 0.01 a 2 mg de PTH/ml de matriz, es adecuado para la reparación y la curación de fracturas óseas con la condición de que una concentración de 0.4 mg de matriz PTH/ml no está incluida. Preferiblemente, la concentración de PTH está en un intervalo entre 0.1 a 1,7 mg/ml de matriz, incluso más preferiblemente el intervalo de concentración está en un intervalo entre 0.3 a 1.5 mg/ml de matriz y más preferiblemente en un intervalo de concentración entre 0.4 a 1.1 mg/ml de matriz con la condición de que una concentración de PTH 0.4 mg/ml de matriz no está incluido. En una realización preferida la matriz es una matriz de fibrina.

D. Los péptidos de fusión de PTH

- 25 En una realización preferida, el PTH es un péptido de fusión PTH, que comprende al menos dos dominios en los que el primer dominio comprende PTH y el segundo dominio comprende un dominio de sustrato reticulable a la matriz durante o después de su formación. El dominio del sustrato es un dominio de una enzima, preferiblemente un dominio de sustrato para una transglutaminasa ("dominio de sustrato transglutaminasa"), más preferiblemente por una transglutaminasa tisular ("dominio de sustrato transglutaminasa tisular") y el más preferido es un dominio de sustrato para el Factor XIIIa ("dominio de sustrato de factor XIIIa"). Las transglutaminasas catalizan reacciones de acilo de transferencia entre el grupo gamma-carboxamida de los residuos de glutaminil unidos a proteína y el grupo amino épsilon de residuos de lisina, lo que resulta en la formación de puentes de cadenas laterales N-epsilon (gamaglutamil) lisina isopeptide. La secuencia de aminoácidos del péptido de fusión PTH puede ser diseñado para contener además un sitio de escisión enzimático o hidrolítico, así que el PTH puede ser liberado con poca o ninguna modificación a la estructura primaria.

- 35 Los dominios de sustrato de transglutaminasa y, en particular, los dominios de sustrato de factor XIIIa, son adecuados para unir el péptido de fusión de matrices naturales, tales como las matrices de fibrina. Cuando se usa con una matriz de fibrina en el sitio de la degradación del péptido de fusión es de preferible que sea enzimáticamente degradable, por lo que la liberación del PTH es controlada por procesos celulares específicos, tales como proteólisis localizada.

- 40 El dominio de sustrato reticulable puede incluir GAKDV (SEQ ID NO: 7), KKKK (SEQ ID NO: 8), YRGDTIGEGQQHHLGG (SEQ ID NO: 9), o NQEQYSPL (SEQ ID NO: 2).

El dominio de sustrato del factor XIIIa más preferido tiene una secuencia de aminoácidos de NQEQVSPL (SEQ ID NO: 2) y está en el presente documento referido como "TG" y TG-PTH.

El péptido de fusión PTH puede ser producido de manera recombinante o por síntesis química. El péptido de fusión PTH 1-34 se produce preferiblemente mediante síntesis química.

- 45 Dominios de sustrato transglutaminasa adecuados para los fines de la presente invención se han descrito en detalle, incluyendo sus secuencias de aminoácidos en WO 03/052091.

- 50 Como se describe en este documento como una realización preferida, el dominio de sustrato del Factor XIIIa está ya sea directamente relacionado con el PTH₁₋₃₄ o puede incluir un sitio de degradación entre el PTH (primer dominio) y la secuencia NQEQVSP (SEQ ID NO: 2) (segundo dominio). Como tal, el péptido de fusión PTH₁₋₃₄ puede incorporarse dentro de la fibrina durante la coagulación a través de un sustrato de factor XIIIa y liberado como PTH₁₋₃₄.

Los sitios de degradación permiten que el PTH que se libere con poca o ninguna modificación en la secuencia peptídica primaria, lo que puede dar lugar a una mayor actividad del factor. Además, permite la liberación del factor a ser controlada por procesos específicos celulares. Esto permite que los factores sean liberados a diferentes velocidades dentro del mismo material dependiendo de la localización de las células dentro del material. Esto también

5 reduce la cantidad de PTH₁₋₃₄ total necesario, ya que su liberación está controlada por procesos celulares. En una posible explicación para la gran curación de los defectos óseos mencionados anteriormente con PTH incorporado y preferiblemente unido a una matriz, se considera importante que el PTH se administre localmente durante un período prolongado de tiempo (es decir, no sólo una dosis única de impulsos), pero no de una forma continua. Esto se logra mediante una lenta degradación, ya sea a través de la escisión enzimática o escisión hidrolítica de la matriz. De esta manera, la molécula se entrega entonces a través de un efecto de pseudo-pulsado que se produce durante un período sostenido de tiempo. Cuando una célula preosteoblástica se infiltra en la matriz, se encontrará con una molécula de PTH que inducirá una mayor proliferación de los preosteoblastos así como la síntesis de múltiples factores de crecimiento cruciales para formación de hueso nuevo. Sin embargo, si esa célula en particular no continúa liberando PTH enlazado desde la matriz, no va a comenzar a producir interleucina-6, evitando de ese modo los efectos catabólicos de la etapa posterior sobre la formación de osteoclastos. El resultado neto es entonces una mayor densidad mineral ósea y la formación neta de la matriz ósea. Por último, los efectos terapéuticos del péptido se localizan en la región de defecto y se magnifican posteriormente.

Sitios de degradación del péptido de fusión

15 Un sitio de degradación enzimática o hidrolítica pueden estar presentes entre el primero y el segundo dominios del péptido de fusión. Los sitios de degradación pueden ser degradables por la degradación enzimática específica. Esto permite la liberación del PTH sea controlada por procesos celulares específicos, tales como proteólisis localizada. Esto permite que el PTH sea liberado a velocidades diferentes dentro de la matriz dependiendo de la localización de las células dentro del material. Preferiblemente, el sitio de degradación es escindible por una enzima seleccionada del grupo que consiste en plasmina y metalo-proteinasa de matriz. Mediante la selección cuidadosa de Km y k_{cat} de este sitio de degradación enzimática, la degradación se podría controlar para que ocurra ya sea antes o después que la de la matriz de fibrina y/o mediante la utilización de enzimas similares o diferentes para degradar la matriz. Estos sitios degradables permiten una ingeniería de liberación más específica del PTH a partir de matrices de fibrina. El sitio degradable puede ser escindido por enzimas liberadas a partir de células que invadieron la matriz. El sitio de degradación permite que la velocidad de suministro pueda ser variada en diferentes lugares dentro de la matriz dependiendo de la actividad celular en esa localización y/o dentro de la matriz. Los beneficios adicionales incluyen una menor dosis total del fármaco dentro del sistema de suministro, y la regulación espacial de la liberación que permite que un mayor porcentaje de la droga se libere en el momento de mayor actividad celular. El sitio de degradación se abrevia como "pl" en el contexto de la presente invención.

20

25

30 Sitios degradables proteolíticamente podrían incluir sustratos para activadores de collagenasa, plasmina, elastasa, estromelisinina o plasminógeno. Sustratos ejemplares se enumeran a continuación. N1-N5 indica posiciones de aminoácidos 1-5 hacia el extremo amino terminal de la proteína desde el sitio donde ocurrió la proteólisis. N1'-N4' indica posiciones de aminoácidos 1-4 hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína desde el sitio donde se produce la proteólisis.

35 Tabla 1: secuencias de sustrato de la muestra de la proteasa

Proteasa	N5	N4	N3	N2	N1	N1'	N2'	N3'	N4'	SEQ ID NO:
Plasmina ¹			L	I	K	M	K	P		SEQ ID NO: 10
Plasmina ¹			N	F	K	S	Q	L		SEQ ID NO: 11
Estromelicina ²	Ac	G	P	L	A	L	R	A	L	SEQ ID NO: 12
Estromelicina ²		Ac	P	F	E	L	A	A	NH ₂	SEQ ID NO: 13
Elastasa ³			Z-	A	A	F	A	NH ₂		SEQ ID NO: 14
Colagenasa ⁴		G	P	L	G	I	G	G	P	SEQ ID NO: 15
t-PA ⁵	P	H	Y	G	R	S	A	G		SEQ ID NO: 16
u-PA ⁵	P	G	S	G	R	S	A	S	G	SEQ ID NO: 17

Referencias:

1. Takagi and Doolittle, (1975) Biochem. 14:5149-5156.
 2. Smith et al., (1995). J. Biol. Chem. 270:6440-6449.

3. Besson et al., (1996) Analytical Biochemistry 237:216-223.

4. 4. Netzel-Arnett et al., (1991) J. Biol. Chem.. 266:6747-6755.

5. Coombs et al., 1998. J. Biol. Chem. 273:4323-4328.

5 Una realización preferida es la secuencia de YKNR (SEQ.NO. 18) entre el primer dominio y el segundo dominio hace degradable el enlace de plasmina

Un péptido de fusión PTH particular preferido es TGp1PTH:

NQEQVSPLYKNRSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 19)

Las proteínas de fusión preferidas incluyen:

10 TG-PTH₁₋₃₄: Esta es una forma modificada de PTH que comprende los aminoácidos 1-34 del PTH nativo, así como un dominio sustrato TG (transglutaminasa):

NQEQVSPLSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 20)

TG-pl-PTH₁₋₃₄: Esta forma corresponde a TG-PTH, excepto que contiene adicionalmente una secuencia de plasmina-degradable (pl) entre la secuencia de TG y el PTH₁₋₃₄:

NQEQVSPLYKNRSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 19)

15 Las enzimas que se podrían usar para degradación proteolítica son numerosas. Sitios degradables proteolíticamente podrían incluir sustratos para activadores de colagenasa, plasmina, elastasa, estromelina o plasminógeno.

En otra realización preferida un dominio de oligo-éster podría insertarse entre el primero y el segundo dominio. Esto se puede lograr utilizando un oligo-ésteres tales como oligómeros de ácido láctico.

Combinación de matrices o componentes precursores y PTH

20 El PTH o péptido de fusión PTH está preferiblemente en una gama de componentes entre 0.01 a 2 mg de PTH/ml de matriz o precursores que forman la matriz, que es apropiada para la reparación y la curación de fracturas óseas con la condición de que una concentración de 0.4 mg de PTH/ml de matriz de fibrina o componentes precursores que forman la matriz no está incluido. Preferiblemente, la concentración de PTH se encuentra en una gama de componentes entre 0.1 a 1,7 mg/mL de matriz de fibrina o precursores que forman la matriz, incluso más preferiblemente el intervalo de concentración está en un intervalo entre 0.3 a 1.5 mg/mL componentes de la matriz de fibrina o precursores formando la matriz y más preferiblemente en un intervalo de concentración de los componentes entre 0.4 a 1.1 mg/ml de matriz de fibrina o precursores que forman la matriz con la condición de que una concentración de PTH 0.4 mg/mL de matriz de fibrina o componentes precursores que forman la matriz no esté incluida. Dependiendo de la edad del paciente, se prefieren ciertas concentraciones del PTH o péptido de fusión PTH en las matrices. Si la formulación se aplica a fracturas de hueso en niños, la concentración de PTH o péptido de fusión PTH está preferiblemente por debajo de 0.4 mg de PTH o matriz de péptido/mL de fusión o componentes precursores que forman la matriz pero por encima de 0.01 mg de PTH o matriz de péptido/mL de fusión o componentes precursores que forman la matriz. En concreto la concentración de PTH o péptido de fusión PTH está en un intervalo entre 0.01 y 0.35 mg de PTH o matriz de péptido/mL de fusión PTH o componentes precursores que forman la matriz, más preferiblemente en un intervalo de concentración entre 0.1 a 0.3 mg/ml de matriz de fibrina o componentes precursores que forman la matriz y más preferiblemente en un intervalo de concentración entre 0.05 y 0.15 mg de PTH o matriz de péptidos/mL de fusión PTH o componentes precursores de la formación de la matriz. Mientras que si la formulación se aplica a los adultos, la concentración de PTH o péptido de fusión PTH está preferiblemente por encima de 0.4 mg de PTH o matriz de péptidos/mL de fusión de PTH o componentes precursores que forman la matriz pero no superior a 2 mg de PTH o matriz de péptidos/mL de fusión de PTH o precursores que forman la matriz. Específicamente, la concentración preferida de PTH o péptido de fusión PTH está en un intervalo entre 0.45 y 2 mg de PTH o matriz de pepetidos/mL de fusión de PTH o precursores que forman la matriz, más preferiblemente entre 0.7 y 1.5 mg de PTH o matriz de péptido/mL de fusión de PTH o componentes precursores y más preferiblemente entre 0.9 y 1.1 mg de PTH o matriz de péptido/mL de fusión del PTH o componentes precursores que forman la matriz. En una realización preferida la matriz es una matriz de fibrina.

25

30

35

40

45

E. Material granular

50 La matriz también puede contener un material granular, preferiblemente el material granular contiene un mineral de calcio. Este material granular soporta principalmente las propiedades mecánicas de la matriz de fibrina para adaptar la matriz a las necesidades específicas de la indicación. El material granular puede ser cualquier material biocompatible que proporciona el soporte mecánico necesario para la composición, por lo que el grado de soporte mecánico

5 depende de la indicación. Preferiblemente, el material granular es un compuesto cerámico. Los compuestos cerámicos biodegradables han demostrado propiedades favorables en la matriz. El compuesto de cerámica comprende preferiblemente un mineral de calcio, como hidroxiapatita, fosfato de calcio o sulfato de calcio. Los materiales adecuados incluyen mezclas porosas biodegradables de hidroxiapatita y fosfato tricálcico, como TRICOS® de Biomatlante (Francia) o CAM-CERAM® de CAM Implants, Leiden (Países Bajos). El más preferido es una mezcla degradable de hidroxiapatita y fosfato tricálcico. Un ejemplo es un producto comercializado bajo el nombre comercial TRICOS®, que contiene una mezcla de 60% de hidroxiapatita y fosfato tricálcico 40%. Otros gránulos de fosfato de hidroxiapatita/tricálcico poroso, es CAM-CERAM®,

10 También es posible utilizar gránulos porosos de hidroxiapatita/fosfato tricálcico, gránulos de hidroxiapatita pura (porosa o no porosa), gránulos de fosfato tricálcico (porosa o no porosa), gránulos de sulfato de calcio, virutas de hueso (ya sea de autoinjerto o aloinjerto) o astillas de hueso de xenoinjerto.

15 La cantidad de gránulos de la matriz suplementada está regulada por el espacio muerto de los gránulos. En una realización preferida, la relación es de 1: 1 de volumen de espacio muerto en los gránulos a volumen total de los líquidos en la matriz; esto constituiría el límite superior de gránulos en la matriz. Dependiendo de la clase de fractura cualquier cantidad de gránulos menor del que sea posible si el tipo de fractura ósea requiere sólo un soporte mecánico menor.

II. Métodos de aplicación

20 La matriz suplementada se puede formar in situ en el lugar de necesidad en o sobre el cuerpo o puede ser preformada y luego implantada en la ubicación deseada, es decir, en el sitio de la fractura. La gelificación/formación in situ se puede producir mediante la mezcla de soluciones precursoras de fibrina que contienen el PTH con los gránulos, si están presentes, y la aplicación de la matriz al sitio de la fractura. En otra realización, la matriz se puede formar fuera del cuerpo y luego se aplica en forma preformada. Cuando se está formando una matriz de fibrina los componentes precursores deben mantenerse separados antes de la aplicación para evitar la polimerización prematura. Para evitar el contacto prematuro antes de la administración, puede ser utilizado un kit que separa las

25 soluciones precursoras una de las otras. Tras la mezcla en condiciones que permitan la polimerización, las soluciones precursoras forman una red tridimensional PTH suplementada. Dependiendo de los componentes precursores y sus concentraciones, el tiempo de gelificación se puede adaptar a la necesidad.

30 En una realización, la matriz se forma a partir de fibrinógeno. El fibrinógeno, a través de una cascada de varios geles reacciona para formar una matriz, cuando se pone en contacto con la trombina y una fuente de calcio a temperatura y pH apropiados. Los tres componentes, fibrinógeno, trombina, y la fuente de calcio, se deben almacenar por separado. Sin embargo, siempre y cuando al menos uno de los tres componentes se mantenga separado, los otros dos componentes se pueden combinar antes de la administración.

35 La matriz suplementada debe ser diseñada de tal manera que la introducción de la matriz sea posible en forma líquida o en una consistencia similar a una pasta que impregne y llene el lugar de la fractura ósea. La solidificación permite el andamiaje, y por lo tanto que el agente activo sea retenido en el sitio de la fractura.

Las células también se pueden añadir a la matriz suplementada antes de o en el momento de la implantación, o incluso después de la implantación, ya sea en o después de la reticulación del polímero para formar la matriz. Esto puede ser además de o en lugar de la reticulación de la matriz para producir la separación intersticial diseñada para promover la proliferación celular o el crecimiento.

40 En una realización el fibrinógeno se disuelve (el cual puede contener adicionalmente aptotina para aumentar la estabilidad) en una solución reguladora a pH fisiológico (en un intervalo de pH 6.5 a 8.0, preferiblemente de pH 7.0 a 7.5) y se almacena por separado de una solución de trombina en una solución reguladora de cloruro de calcio. La solución reguladora para el fibrinógeno puede ser una solución reguladora de histidina incluyendo la solución salina reguladora de NaCl, además, o TRIS. Ambas soluciones típicamente son almacenadas congeladas y deben ser descongeladas antes de la aplicación.

45

50 En una realización preferida, se proporciona un kit, que contiene PTH, preferiblemente una proteína de fusión PTH, un material granular que contiene preferiblemente un mineral de calcio, fibrinógeno, trombina, y una fuente de calcio. Opcionalmente, el kit contiene una enzima de reticulación, tal como el factor XIIIa. El PTH, preferiblemente la proteína de fusión PTH, puede estar presente ya sea en el fibrinógeno o la solución de trombina. En una realización preferida, la solución de fibrinógeno contiene el PTH, preferiblemente un péptido de fusión de PTH.

Las soluciones de fibrinógeno y trombina se mezclan preferiblemente por un dispositivo de jeringa de dos vías, en donde la mezcla se produce al apretar el contenido de ambas jeringas a través de una cámara de mezcla y/o de la aguja y/o mezclador estático.

55 En una realización preferida tanto el fibrinógeno y la trombina se almacenan por separado en forma liofilizada. Cualquiera de los dos componentes precursores puede contener la proteína de fusión y el material granular. Antes de

su uso, se añade una solución reguladora Tris o histidina para el fibrinógeno, la solución reguladora puede contener adicionalmente aprotinina para formar una solución precursora de fibrinógeno. Antes del uso, la trombina liofilizada se disuelve en la solución de cloruro de calcio para formar una solución de precursor de la trombina. Posteriormente, el fibrinógeno y las soluciones precursoras de trombina se colocan en recipientes separados, frascos o cuerpos de jeringa y se mezcla utilizando un dispositivo de conexión de dos vías, tales como una jeringa de dos vías. Opcionalmente, los recipientes, frascos o cuerpos de jeringa son bipartidos, teniendo así dos cámaras separadas por una partición ajustable que es perpendicular al recipiente, frasco o una pared del cuerpo de la jeringa. Una de las cámaras contiene el fibrinógeno liofilizado o trombina, mientras que la otra cámara contiene una solución reguladora apropiada. Cuando el émbolo se presiona hacia abajo, la partición se mueve y libera el tampón en la cámara de fibrinógeno para disolver el fibrinógeno. Una vez que tanto el fibrinógeno y la trombina se disuelven, ambos cuerpos de jeringa bipartidos están unidos a un dispositivo de conexión de dos vías y los contenidos se mezclan comprimiéndose a través de la aguja de inyección unida al dispositivo de conexión. Opcionalmente, el dispositivo de conexión contiene un mezclador estático para mejorar la mezcla de los contenidos.

El material granular puede ser proporcionado en una jeringa separada. Según una realización preferida, el material granular se humedece mediante la inyección de agua estéril en la jeringa. Posteriormente, la jeringa anterior de dos vías que contienen tanto la solución precursora de fibrina y el PTH está unida a la jeringa que contiene el material granular húmedo. La totalidad del contenido de la jeringa de dos vías es transferida en la jeringa que contiene el material granular. Todo el contenido se inyecta posteriormente al sitio de la fractura ósea y es moldeable durante varios minutos. Además, otros componentes al lado de los ingredientes mencionados anteriormente se pueden incorporar en las soluciones precursoras y/o matrices resultantes. Por ejemplo, un material que contiene un mineral de calcio, es decir, una sustancia homogénea de origen natural que contiene iones de calcio tales como hidroxapatita, puede ser utilizado.

Ejemplos

Ejemplo 1: La bioactividad de PTH₁₋₃₄ y TGpPTH₁₋₃₄

El péptido PTH₁₋₃₄⁻ que muestra actividad similar a el PTH₁₋₈₄ de longitud completa, y proteínas de esta longitud pueden ser sintetizadas por métodos de síntesis de péptidos convencionales de estado sólido.

Todos los péptidos se sintetizaron sobre resina sólida utilizando un sintetizador de péptidos automatizado usando el estándar químico 9-fluorenilmetiloxycarbonilo. Los péptidos se purificaron por cromatografía c18 y se analizaron usando cromatografía de fase inversa a través de HPLC para determinar la pureza así como espectroscopia de masas (MALDI) para identificar el peso molecular de cada producto. Usando este método, PTH₁₋₃₄ al igual que, TGp1-PTH₁₋₃₄ NQEQVPLYKNRSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWL-RKKLQDVHNF (SEQ ID NO. 19) y TGPTH₁₋₃₄ NQEQVPLS-VSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO. 20) se sintetizaron. TGpPTH₁₋₃₄ y TGPTH₁₋₃₄ difiere de PTH₁₋₃₄ porque adicionalmente comprende el dominio de sustrato del Factor XIIIa que está vinculado a través de la plasmina PTH₁₋₃₄ secuencia degradable pl YKNR (SEQ ID NO. 18) en caso de TGp1PTH₁₋₃₄ y directamente en el caso de TGPTH₁₋₃₄.

Para estudiar la bioactividad de los péptidos de fusión PTH, se estableció un ensayo de gen informador. En este ensayo, un plásmido que contiene el gen indicador de luciferasa está unido al promotor para el receptor de la hormona paratiroidea se transfecta en células. Entonces, si la célula se expone al PTH y el PTH se une posteriormente a su receptor en la célula, una cascada de señales, dirigidas a través de los niveles de cAMP elevados, se inicia. A través de una regulación de la retroalimentación natural, esto conduce a una reducción de los niveles del receptor de PTH. A medida que la reducción se dirige a través del promotor, que también conduce a una disminución de la producción del gen indicador unido. Utilizando este ensayo, la actividad tanto del PTH₁₋₃₄ nativo, así como del TGp1-PTH₁₋₃₄ fueron estudiadas y se compararon con un estándar internacional. Se observó que ambas moléculas mostraron un nivel similar de actividad, como la reducción en la expresión del gen indicador para ambos era el mismo, y este nivel de actividad era 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

Una matriz de fibrina se hizo de Kit TISSEEL® (Baxter AG, CH-8604 Volketswil/ZH) componentes precursores de fibrina. La composición aparece en la Tabla 2. En presencia de 0.1 µg/ml de PTH₁₋₃₄ o TGPTH₁₋₃₄ a continuación, se añadió a la trombina, y se mezcló para formar una concentración homogénea. TGPTH₁₋₃₄ solamente tiene una secuencia de la transglutaminasa en el amino terminal, sin un sitio de degradación. Por lo tanto, TGPTH₁₋₃₄ sólo puede ser liberado por la degradación de la matriz de fibrina en sí. Este péptido se sintetizó como se describe anteriormente en el ejemplo 1.

Para el primero ensayo de liberación de una matriz de fibrina de 50 µl con 0.1 mg de PTH o TGPTH por ml de matriz de fibrina se incubó a 37°C en 10 ml de solución reguladora. Por lo tanto, la concentración de PTH o TGPTH en la solución maortiguadora en caso de una liberación total sería de 0.5 µg de PTH o matriz de fibrina TGPTH/mL. Con el fin de comparar la estabilidad del PTH o TGPTH durante el ensayo, las muestras de PTH o TGPTH se diluyeron

directamente en la solución reguladora en una concentración de 0.5 µg de PTH o matriz de fibrina TGPTH/mL. Diferentes soluciones reguladoras se probaron: agua destilada, solución salina reguladora de fosfato, solución salina reguladora tris.

5 Se tomaron alícuotas en los días 0, 1, 2, 4 y 6 y se analizaron por ELISA directo. Los resultados mostraron que el PTH no era estable durante más de 2 días en cualquiera de las soluciones reguladoras. Por lo tanto, no se pudieron establecer conclusiones sobre los datos de liberación. La estabilidad del PTH fue sin duda afectada por su baja concentración y los tampones que no eran óptimos.

10 El experimento de liberación se repitió mediante el uso de una solución reguladora estabilizante que contiene manitol 50 mM en una solución reguladora de acetato de sodio 10 mM. Además, la solución reguladora se intercambiaba cada 2 días con el fin de evitar cualquier degradación de péptidos. La concentración de PTH o TGPTH se aumentó a 1 mg de PTH o matriz de fibrina TGPTH/mL en una matriz de 100 µl de fibrina y la incubación se logró en 1 ml de tampón. La concentración de PTH o TGPTH en la solución reguladora en caso de una liberación total sería de 100 µg/ml de la matriz de fibrina (200 veces más que antes). Como en el primer experimento, ajustando muestras (misma cantidad de PTH o TGPTH disueltos en el tampón como control) se prepararon para evaluar la estabilidad del PTH o TGPTH durante el experimento (100 µg/ml). Se recogieron muestras cada 2 a 4 días (con un cambio de solución reguladora) durante 2 semanas y se analizaron por ELISA directo. Las muestras contaminadas, también se recogieron cada 2 días. Los resultados mostraron que en estas condiciones el PTH y TGPTH son estables durante 2 semanas.

20 Como puede verse en la figura 2, la mayor liberación de la matriz de fibrina se logra dentro de los 3 días. Casi 60% de PTH y 13% de TGPTH fueron liberados después de día 3. Estos datos demuestran la retención de PTH en la matriz de fibrina es altamente mejorada mediante la adición de la secuencia de TG.

Ejemplo 3: Modelo de Defecto Tibial Ovino

Se formó la matriz de fibrina a partir del kit de TISSEEL® (Baxter AG, CH-8604 Volketswil/ZH) de matriz de fibrina dando 4 ml. TISSEEL® se produce a partir de plasma agrupado humano derivado y el contenido de ingredientes activos puede variar de un lote a otro dentro de los rangos predefinidos.

25 Matriz: La matriz se preparó usando 3 jeringas separadas, una solución precursora de fibrina de dos vías y jeringa que contiene péptido de fusión PTH (jeringas 1 y 2) y dos jeringas de un solo sentido que contienen gránulos (jeringas 3 y 4). La Tabla 2 enumera la composición final utilizada.

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

Ingredientes	Dosis por 2 mL de gel
Jeringa 1 (1mL)	
Componente activo:	0.4-10 mg
Peptide de fusion PTH ₁₋₃₄ (TGpIPTH1-34)	
Agentes de coagulación	66-100 mg
Fibrinógeno (humano)	
Otras proteínas	
Aprotinina (bovina)	2046-3409 UIC
Albúmina humana	9.1 - 18.2 mg
Componentes de amortiguación	
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

Ingredientes	Dosis por 2 mL de gel
Jeringa 2 (1mL)	
Agentes de coagulación	
Trombina (humana)	2.5-6.5 UI
Componentes reguladores	5,88 ± 0,6 mg
Cloruro de Calcio	3.5 a 5.5 mg
Cloruro de sodio	45 - 55 mg
Seroalbúmina humana	hasta 1 ml
Agua para inyección	
Jeringa 3 (1mL)	
Agua para inyección	1 ml
Jeringa 4 (1mL)	
gránulos de hidroxiapatita/fosfato de calcio componentes de amortiguamiento (gránulos TCP)	1.75 - 2 g

5 En primer lugar los gránulos de hidroxiapatita/fosfato de calcio en la jeringa 4 se humedecieron por inyección del agua de la jeringuilla 3. La solución precursora de fibrina de la jeringa 1 (fibrinógeno y PTH suspendido en una solución con la aprotinina, un inhibidor de la proteinasa de la serina que ayuda a reducir la fibrólisis para retener la integridad de la matriz de fibrina) se mezcló con la solución precursor de fibrina de la jeringa 2 (trombina en una solución de cloruro calcio). TGpPTH₁₋₃₄ se formuló en el componente de fibrinógeno para dar una concentración final en la matriz que varía desde 0.1 mg/ml a 10 mg/ml de la matriz de fibrina y durante el proceso de gelificación TGpPTH₁₋₃₄ convirtió en reticulada la matriz. Las soluciones precursoras de fibrina también contenían otros componentes de la matriz de fibrina, tales como la fibronectina de plasma, Factor XIIIa, el plasminógeno, y la albúmina humana. Cuando las soluciones precursoras son en volúmenes iguales, un proceso de coagulación se produce para formar fibrina. El proceso de coagulación se lleva a cabo durante varios minutos lo que permite la inyección simultánea de las soluciones mixtas en la jeringa 4, que contienen los gránulos humedecidos. La matriz puede entonces ser introducido en el lugar donde se necesita, donde se solidifica. Se colocó suficiente matriz en el defecto para llenarlo por completo.

15 Animales: Un total de 42 ovejas hembras Suizas Alpinas, que oscilan entre 44-83 kg (media: 62,8 kg) y 2,25 - 4,75 años de edad fueron elegidos como animales de experimentación. Siete grupos se formaron con autoinjertos como matriz positiva y la fibrina más gránulos de TCP como controles negativos. Los otros grupos consistieron en la misma matriz de fibrina y gránulos de TCP, pero diferían sólo en la dosis de la TGpPTH₁₋₃₄. Los grupos fueron seguidos durante 12 semanas, cuando los animales se sacrificaron en una planta de sacrificio propiedad de la universidad. 20 Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las leyes suizas de protección y bienestar animal y fueron autorizados por el comité de ética local y las autoridades veterinarias.

25 Cirugía: Un enfoque medial al eje de la tibia se realizó directamente sobre el hueso y que se extiende desde la cara distal de la rodilla a la articulación del corvejón, se realizó una incisión de la fascia medial de la tibia y la cara medial de la tibia expuesta sin perturbar el periostio. 11 agujeros de 3.5 mm de amplitud en la placa de compresión dinámica (Synthes) fueron contorneados para el eje con el extremo distal de la placa que termina encima de la articulación tibiotarsal. La placa se fija al hueso utilizando once tornillos de 3.5 mm en una posición neutral y la distribución de cinco agujeros de tornillo distales y seis proximalmente con el defecto previsto. Se retiraron los tornillos y la placa. A partir de entonces, el defecto fue marcado en el hueso con una hoja de bisturí utilizando un medidor asegurando un defecto normalizado de 1 cm entre el agujero del quinto y sexto tornillo. Con una sierra oscilante, el defecto se cortó 30 bajo riego constante y la preservación de los tejidos blandos. El segmento de 1 cm incluyendo el periostio circunferencial se retiró cuidadosamente y sangrado local de la médula ósea o de los tejidos blandos se detuvo con la aplicación de presión con una gasa. La placa se vuelve a colocar y todos los tornillos fueron reinsertados antes de introducir la matriz en el hueco del hueso como se describe anteriormente. Se tuvo cuidado en distribuir la matriz igualmente debajo de la placa, en el lateral y, así como la transcórtex.

- Para el grupo control positivo de autoinjerto, el hueso autógeno se recogió a través de una incisión local directamente encima de la cresta ilíaca. La médula ósea del íleon fue abierta usando múltiples agujeros de perforación de 3.5 mm. El hueso esponjoso se recogió con una cureta y se colocó inmediatamente en el defecto quirúrgico en la tibia. Tras el llenado de los defectos, la fascia medial se cerró de forma rutinaria y la piel con grapas (Signet 35W®, suturas Auto, Connecticut, EE.UU.). Mientras que los animales todavía estaban anestesiados, se tomaron radiografías usando vistas-medio-lateral y caudo-craneal de la tibia. Se aplicaron moldes completos (Scotch™ Plus moldeada, Laboratoires 3M Santé, Francia) que involucra la totalidad de las extremidades distales que se extienden hasta el centro de la articulación de la rodilla en el nivel de la rótula. La suela de las garras se dejó abierta para asegurar que se lleva en el lugar de la fractura, pero la prevención de las fuerzas de torsión o de corte a través de la inmovilización de la diáfisis tibial mediante el reparto del peso.
- Los animales fueron recuperados en un sistema de suspensión que impedía a los animales acostarse y levantarse a toda prisa causando re-fractura de la extremidad. Los animales se mantuvieron en el sistema de suspensión durante 4-5 semanas, donde podían dormir, comer, defecar y orinar sin interferencias. A partir de entonces, se les mantuvo en pequeños puestos en grupos de 2-3 animales por el resto del período de estudio.
- Cambios de enyesado se realizaron cada 7-10 días o antes, si los animales mostraban problemas con la carga de peso, y se dejaron en el lugar como mínimo 4 semanas, pero como máximo y 12 semanas. Las radiografías de seguimiento a través de los moldes fueron tomadas a las 4 y 8 semanas. En el momento del sacrificio (12 semanas), las radiografías se tomaron usando un Faxitron (HP Electronics) después de que el tejido blando, las placas y tornillos se retiraron.
- Evaluación macroscópica: Después del sacrificio, la reducción de la brecha se evaluó macroscópicamente centrada en la placa y la estabilidad de la fractura, los signos de inflamación y la formación de callo perióstico. Todos los huesos se documentaron con una cámara digital (Minolta, Dimage 7) La estabilidad mecánica fue probado sólo manualmente, pero con precaución para evitar daños en los tejidos para la futura preparación histológica.
- La evaluación radiológica: Un sistema de puntuación semicuantitativa fue desarrollado para evaluar las radiografías. Las puntuaciones altas fueron favorables para la unión ósea. Las radiografías fueron evaluadas por tres revisores independientes, que no estaban informados acerca de los grupos y los puntos de tiempo durante el estudio. Todas las radiografías fueron anotadas durante una sesión y si las puntuaciones diferían, se tomaron las puntuaciones medias para la evaluación estadística.
- Histología. Brevemente, las secciones de hueso fueron cortadas de tal manera que toda la brecha anterior estaba cerrada y el corte se hizo proximal y distal del primer agujero del tornillo. Después de la fijación en para-formaldehído al 4% durante 3-4 semanas, los bloques de hueso se lavaron, se deshidrataron en una serie ascendente de alcohol, desgrasada en xileno y, por último infiltrado en resina acrílica. Después de que la infiltración se completó, la polimerización se realizó en formas de teflón. Se cortaron secciones en el medio y paralelas al eje largo del hueso usando una sierra de banda exacta. Antes de que las secciones de corte se montaran en portaobjetos de plástico acropal, fueron tomadas microradiografías con la faxitron usando una película especial (Kodak PPL-2). A continuación, las secciones se molieron y se pulieron hasta un espesor de 30-40 µm. La tinción de la superficie con azul toluidine permitió diferenciar entre la matriz del hueso viejo y el nuevo y también los gránulos de TCP.
- Para las secciones finas (5µm), los bloques se cortaron en trozos más pequeños que contienen al menos una corteza y parte del callo perióstica y endóstica. Las secciones fueron montadas en carga positivamente, los portaobjetos de vidrio se cubrieron con cromalina, se desplastificaron y se tiñeron con azul de toluidina o bien von Kossa tinción de plata de contraste con McNeal. En este último, la matriz ósea mineralizada está teñida de negro, mientras que el osteoide no calcificados se tiñe de azul turquesa.
- La evaluación histológica cualitativa se realizó centrándose en tipos de células, signos de inflamación y los mecanismos de la degradación de las matrices.
- La evaluación semi-cuantitativa se concentró en la aparición de tipos de células utilizando un sistema de puntuación especialmente desarrollado, y las mediciones histomorfométricos sirvieron como base para la evaluación cuantitativa.
- La capacidad de regeneración de la matriz (que contiene diferentes concentraciones de TGpIPTH₁₋₃₄) se ensayó adicionalmente en un defecto segmental en las ovejas. Aquí, defectos unilaterales de 1 cm de espesor fueron creados en las tibias de oveja. Después de la osteotomía, el periostio se retiró cuidadosamente para asegurarse de que el defecto era una falta de unión por un período de tiempo para ser estudiado. Después de la creación del defecto, un material de gelificación in situ fue colocado en el defecto como se describió anteriormente en los métodos de la sección de aplicación.
- Con fines comparativos, se ensayaron diferentes dosis de TG-PTH: 0.4,1,2.5 y 10 mg/ml, se realizaron dos tratamientos de control, donde no se añadió TGpIPTH₁₋₃₄ a la matriz de fibrina granulada compuesta (0 mg/ml) o un autoinjerto (abreviado "AG" en las figuras 3 y 4) fue aplicado (control positivo).

Se realizaron fotografías de rayos X cada cuatro semanas y los animales fueron sacrificados después de doce semanas. En cada punto de tiempo, se analizaron las fotografías de rayos X y se determinó el grado de curación. Además, en el punto final, la tibia se extrajo para el análisis a través de tomografía computerizada (CT), así como histología. Por último, puesto que se llevó a cabo a continuación una osteotomía completa y luego chapado por un lado, el defecto fue sometido a estrés y fuerzas mecánicas significativos. Si el material empleado para tratar el defecto no añadía fuerza significativa, esto puede conducir a la flexión de la placa y la deformación del ángulo. A partir de las fotografías de rayos X y muestras finales, esto es otro parámetro que se ha medido.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 3:

Cuando la fibrina más el material TCP solo (control negativo) se puso a prueba en este modelo, se observó una respuesta de muy baja curación. De los cuatro animales tratados con este material de control, ninguno de ellos mostró una curación clínicamente relevante, con una que mostró una respuesta de curación moderada y los otros tres que mostraron signos clásicos de la no unión después de 12 semanas. Además, dentro de las primeras cuatro semanas, los cuatro animales mostraron flexión significativa de la placa y la subsiguiente distorsión del defecto.

En la siguiente serie de animales, la matriz suplementada se probó con 0.4, 1, 2, 5 o 10 mg/ml de TGpIPTH₁₋₃₄. Como primera medida, estos animales fueron observados con el análisis radiográfico para determinar la cantidad de sanación del periostio (formación de callo). A partir de las radiografías posteriores, se observó que el tratamiento de estos animales con diversas dosis de TGpIPTH₁₋₃₄ proporcionó una respuesta dependiente de la dosis en el rango tratado. Específicamente, cuando se examinaron las radiografías de estos animales, se observó una respuesta de curación perióstica mucho más fuerte en cada punto de tiempo para las dosis entre 0.4 y 2 mg/ml con 0.4 y 1 mg/ml para una estadísticamente curación perióstica más fuerte en comparación con los tratados con el material de control negativo y la curación que era equivalente al autoinjerto así a las 12 semanas. Además, con la dosis de 1 mg/ml, se observó que la mayoría de los animales alcanzaron una unión clínica estable dentro de las 12 semanas (véase la figura 4). En el grupo tratado con 1 mg/mL TG-pl-PTH₁₋₃₄, después de 4 semanas, pudo observarse ya la primera señal de curación. Esta curación fue significativamente mayor en el punto de tiempo de 8 semanas, donde ya un animal mostró la unión clínica, mientras que los otros cinco mostraron cicatrización avanzada. Esta situación entonces progresó de tal manera que después de 12 semanas, 5 animales mostraron uniones estables clínicas. Además, se observó una mejora significativa en la estabilidad, con sólo un animal que mostro flexión de la placa, que se produjo dentro de las primeras cuatro semanas.

En la figura 4, se muestra la estabilidad de los defectos tibiales segmentarios después de 12 semanas. Después de que las ovejas se sacrificaron en la semana duodécima, la placa se retiró y se determinó la ligera la estabilidad de la brecha inicial. El porcentaje de defectos que eran claramente inestable fue entonces determinado. Se pudo observar que ninguno de los animales que fueron tratados con autoinjerto tenía defectos inestables, la validando el modelo. Además, cuando los animales fueron tratados con 1 mg/mL TGpIPTH₁₋₃₄, sólo un animal tenía un defecto inestable proporcionando una fuerte respuesta de curación similar. Las dosis cerca de 1 mg/ml también mostraron cierta estabilidad, mientras que dosis más altas y la dosis cero mostraron una estabilidad mucho más baja en el punto final.

Como medida final de la curación, la tasa de formación de hueso del endostio (formación de hueso en la capa interior de los huesos largos, es decir, en el interior del hueso) y la resorción de gránulos fue medida a través de la morfometría. Se observó que con la dosis de 1 mg/mL de TGpIPTH₁₋₃₄, la cantidad de formación de hueso endosteal fue mayor que con las otras concentraciones de TGpIPTH₁₋₃₄, con dosis más altas que proporcionan menores cantidades de formación de hueso nuevo. Además, se observó que la tasa de resorción de gránulos era directamente proporcional a la tasa de formación de hueso endosteal, una vez más, la dosis de 1 mg/mL TGpIPTH₁₋₃₄ proporcionó la mejor respuesta (es decir, tasa de reabsorción más alta). Cuando se observó toda la gama de dosis, podría observarse que dosis más altas proveían tasas más bajas tanto de formación endosteal de hueso como de resorción de gránulos, con las dosis alrededor de 1 mg/mL TGpIPTH₁₋₃₄ se proporcionó la mejor respuesta.

Los resultados mejorados en el grupo tratado con TGpIPTH₁₋₃₄ en comparación con los grupos de control demostraron que la presencia de dosis clínicamente relevantes de TGpIPTH₁₋₃₄ en las matrices suplementadas puede conducir a una fuerte mejora en la curación. La curación más rápida, una mejor formación de los huesos, así como la mejora de la estabilidad en este modelo altamente estresado mecánicamente son características relevantes para justificar la aplicación de la matriz suplementada en las fracturas por compresión radial distal. Además, en vista de los resultados de la formación del periostio del hueso, la formación de hueso y la resorción endosteal de gránulos y la estabilidad general, se pudo ver que las dosis entre 0.4 mg/mL a 1.1 mg/mL matriz de fibrina TGpIPTH₁₋₃₄ es el intervalo preferido de concentración.

Listado de secuencias

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

<120> Matrices suplementadas respecto a la reparación de fracturas óseas

<130> Kuros 131

<150> US 60/641,715

<151> 2005-01-06

<150> US 60/642,644

<151> 2005-01-10

5 <160> 20

<170> version 3.3 PatentIn

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 2

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro
1 5

<210> 3

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Arg Gly Asp Asn
1 5

25 <210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Asp Gly Ser Arg
1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

Ile Lys Val Ala Val
1 5

<210> 6

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Ala Lys Asp Val
1 5

20 <210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Lys Lys Lys
1

25

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

5 <210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Ile Lys Met Lys Pro
1 5

10

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 11

Asn Phe Lys Ser Gln Leu

1

5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<220>

<221> acetilado

<222> (1)..(1)

<400> 12

Gly Pro Leu Ala Leu Thr Ala Leu
1 5

25

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> acetilado

5 <222> (1)..(1)

<400> 13

Pro Phe Glu Leu Arg Ala
1 5

<210> 14

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Glx Ala Ala Phe Ala
1 5

<210> 15

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Pro
1 5

20 <210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Pro His Tyr Gly Arg Ser Gly Gly
1 5

25

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

ES 2 593 051 T3

<213> Homo sapiens

<400> 17

Pro Gly Ser Gly Arg Ser Ala Ser Gly
1 5

<210> 18

5 <211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Lys Asn Arg
1

10 <210> 19

<211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> hormona Paratiroidea Modificada (PTH), que comprende los aminoácidos 1-34 del PTH nativa, así como un dominio de sustrato de transglutaminasa y una secuencia de plasmina-degradable

<400> 19

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

<210> 20

20 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> hormona Paratiroidea Modificada (PTH), que comprende los aminoácidos 1-34 del PTH nativa, así como un dominio de sustrato de transglutaminasa

<400> 20

ES 2 593 051 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una formulación apropiada para la reparación de fracturas óseas, que comprende
 - (i) un péptido seleccionado del grupo que consiste de PTH y un péptido de fusión PTH;
 - (ii) un material granular que comprende un mineral de calcio y
- 5 (iii) una composición capaz de formar una matriz de fibrina bajo condiciones fisiológicas que comprende un componente precursor fibrinógeno y el componente precursor de la trombina,
en donde PTH o péptido de fusión PTH está presente en un intervalo de concentración entre 0.01 a 2 mg/mL de matriz de fibrina o precursor de componente formando la matriz, con la condición de que una concentración de 0.4 mg/mL de matriz de fibrina o precursor componente de formación de la matriz no esté incluido.
- 10 2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el componente precursor de fibrinógeno o el componente precursor de la trombina comprende además una fuente de calcio.
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido de fusión PTH comprende al menos dos dominios en donde el primer dominio comprende PTH y el segundo dominio comprende un dominio de sustrato reticulable
- 15 4. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde PTH se selecciona del grupo que consiste en PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ y PTH₁₋₂₅.
5. La formulación de acuerdo con la reivindicación 4, en donde PTH es PTH₁₋₃₄.
6. La formulación de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el segundo dominio comprende un dominio de sustrato de transglutaminasa.
- 20 7. La formulación de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el dominio de transglutaminasa comprende un dominio de sustrato del Factor XIIIa.
8. La formulación de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el péptido de fusión PTH comprende además un sitio de degradación entre el primero y el segundo dominios.
9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el material granular es una mezcla de fosfato tricálcico e hidroxiapatita.
- 25 10. Un kit que comprende la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. El kit de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el componente precursor del fibrinógeno y el componente precursor de la trombina se separan unos de otros.
12. El kit de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde el péptido de fusión PTH comprende además un sitio de degradación entre el primero y el segundo dominios, siendo dicho sitio de degradación un sitio de degradación enzimático o hidrolítico.
- 30 13. Una matriz suplementada apropiada para la reparación de fracturas óseas que comprende
 - (i) PTH o un péptido de fusión PTH;
 - (ii) un material granular que comprende un mineral de calcio y
- 35 (iii) fibrina;
en donde dichos PTH o péptido de fusión PTH está presentes en un intervalo de concentración entre 0.01 a 2 mg/mL de matriz de fibrina, con la condición de que una concentración de matriz de fibrina 0.4 mg/mL no se incluya.
14. La matriz suplementada de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el PTH se selecciona del grupo que consiste en PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ y PTH₁₋₂₅.
- 40 15. La matriz suplementada de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el PTH es PTH₁₋₃₄.

16. La matriz suplementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde la matriz suplementada se forma a partir de una composición capaz de formar una matriz de fibrina y un péptido de fusión, que comprenden el PTH en un primer dominio, y un dominio de sustrato reticulable covalentemente en un segundo dominio.
- 5 17. La matriz suplementada de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el segundo dominio comprende un dominio de sustrato del Factor XIIIa.
18. La matriz suplementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en donde el péptido de fusión PTH comprende además un sitio de degradación entre el primero y el segundo dominios
19. La matriz suplementada de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el sitio de degradación es un sitio de degradación enzimático.
- 10 20. La matriz suplementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, en donde el material granular es una mezcla de fosfato tricálcico e hidroxiapatita.
21. Una matriz suplementada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20 para uso en la reparación de fracturas óseas locales.
- 15 22. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en la reparación de fracturas óseas locales.
23. Una matriz suplementada de acuerdo con la reivindicación 21 o una formulación de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la fractura ósea es una fractura distal del radio o de la tibia.

FIG. 1

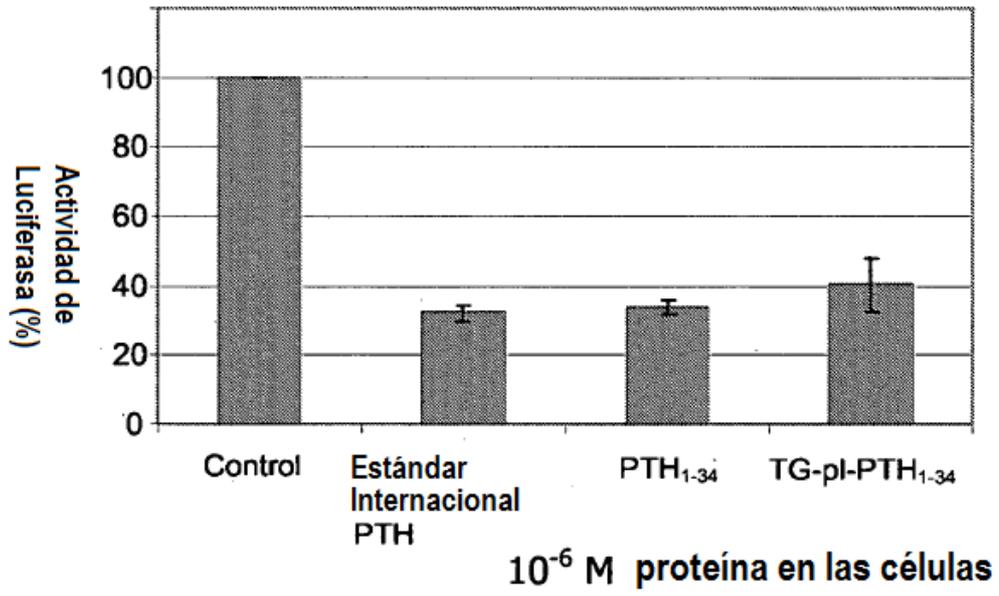


FIG. 2

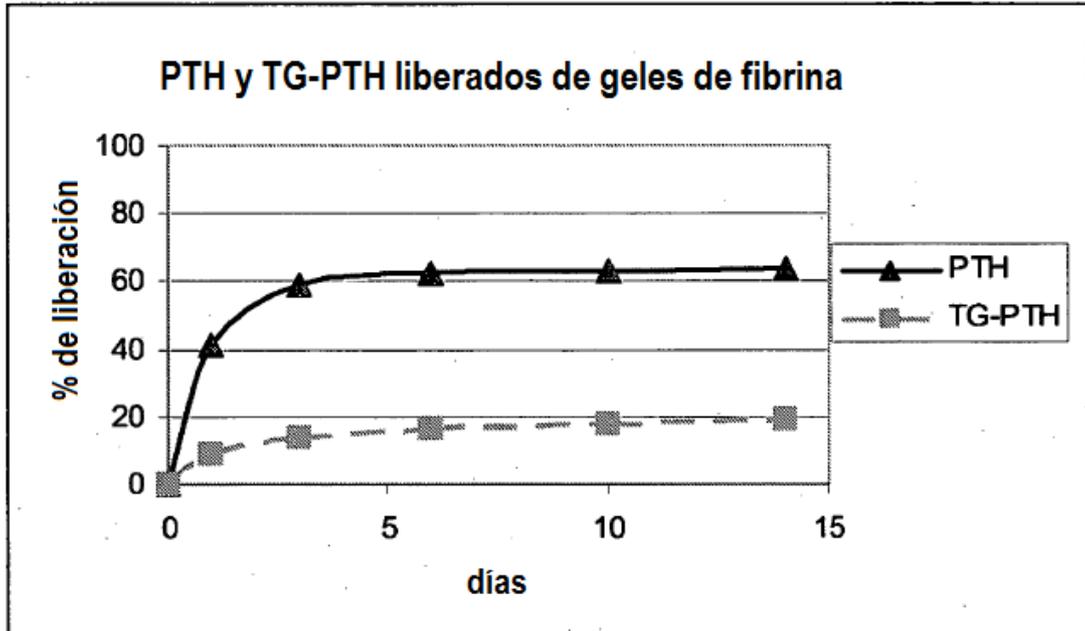


FIG. 3

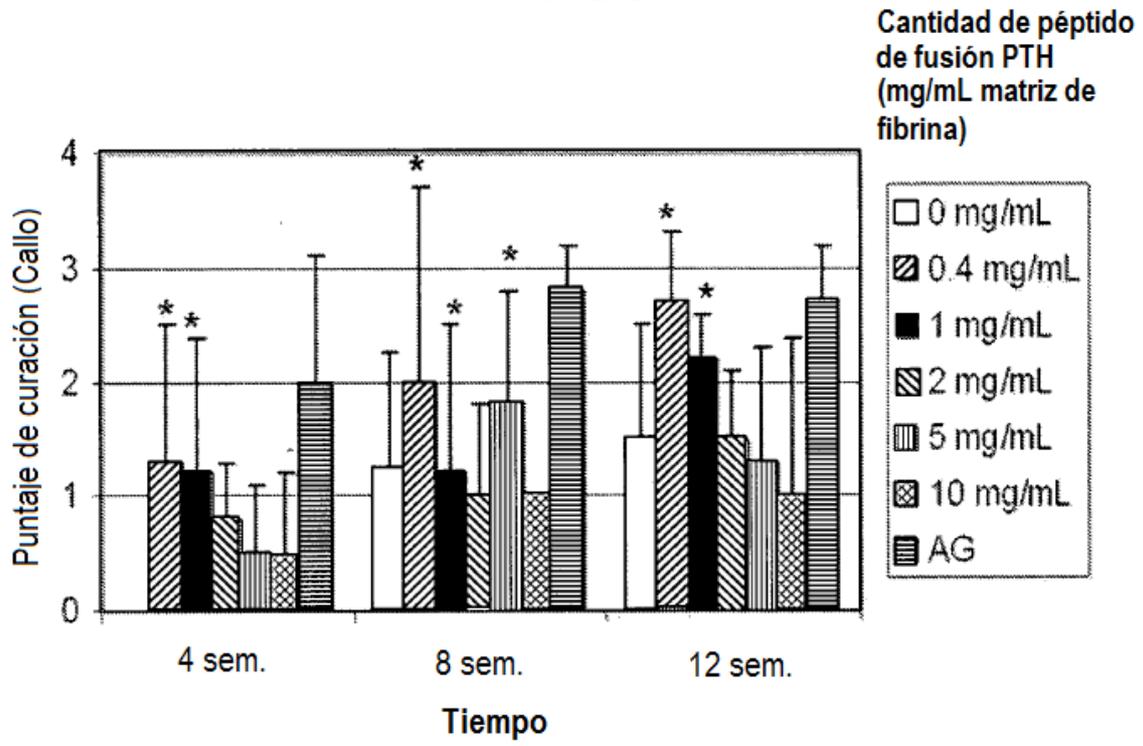


FIG. 4

