

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 307**

51 Int. Cl.:

A61H 1/00 (2006.01)

A61F 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2003 PCT/US2003/031793**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2004 WO04033644**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2003 E 03770683 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 1575475**

54 Título: **Regulación de expresión del gen de colágeno tipo II usando señales eléctricas y electromagnéticas específicas y selectivas**

30 Prioridad:

09.10.2002 US 267708

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

07.12.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 191, US**

72 Inventor/es:

BRIGHTON, CARL, T.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 593 307 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

Regulación de expresión del gen de colágeno tipo II usando señales eléctricas y electromagnéticas específicas y selectivas**Campo de la invención**

5 La presente invención está dirigida a un método para regular la expresión del gen de colágeno tipo II en células de cartílago por medio de la aplicación de campos específicos y selectivos generados por señales eléctricas y electromagnéticas específicas y selectivas para el tratamiento de cartílago articular dañado o enfermo, así como un dispositivo para generar tales señales.

Antecedentes de la invención

10 Las interacciones y actividades bioeléctricas que se cree que están presentes en una variedad de tejidos y células biológicas son uno de los procesos fisiológicos menos entendidos. Sin embargo, recientemente se han realizado muchas investigaciones sobre estas interacciones y actividades en relación con el crecimiento y reparación de ciertos tejidos y células. En particular, se han realizado muchas investigaciones sobre la estimulación mediante campos eléctricos y electromagnéticos en su efecto en el crecimiento y reparación de huesos y cartílagos. Los investigadores creen que tal investigación podría ser útil en el desarrollo de nuevos tratamientos para una variedad de problemas médicos.

15 La osteoartritis, también conocida como enfermedad articular degenerativa, se caracteriza por la degeneración de cartílago articular así como proliferación y remodelación de hueso subcondral. Los síntomas habituales son rigidez, limitación de movimiento y dolor. La osteoartritis es la forma más común de artritis, y sus índices de prevalencia aumentan notablemente con la edad. Se ha demostrado que los pacientes de edad avanzada con osteoartritis auto-evaluable visitan los médicos con el doble de frecuencia que sus iguales no afectados. Tales pacientes también experimentan más días de actividad restringida y reclutamiento en la cama en comparación con otros en su grupo de edad. En un estudio, la mayoría de los pacientes sintomáticos se vuelven significativamente inválidos durante un periodo de consultas de 8 años. Massardo et al., Ann Rheum Dis 48:893-7 (1989).

20 Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) siguen siendo la modalidad principal de tratamiento para osteoartritis. No se sabe si la eficacia de AINEs depende de sus propiedades analgésicas o antiinflamatorias o a la desaceleración de los procesos degenerativos en el cartílago. También hay una preocupación sobre los AINEs que pueden ser perjudiciales para los pacientes. Por ejemplo, los AINEs tienen efectos tóxicos bien conocidos en el estómago, tracto gastrointestinal, hígado y riñón. Sin embargo, la aspirina inhibe la síntesis de proteoglicano y los procesos de reparación cartilaginosa normal en animales. Un estudio en humanos sugirió que la indometacina podría acelerar la rotura del cartílago de la cadera. Todos los efectos adversos parecen más comunes en los ancianos, la población más susceptible de osteoartritis.

25 En la enfermedad comúnmente conocida como osteoporosis, el hueso se desmineraliza y se convierte en anormalmente rarificado. El hueso comprende componentes orgánicos de células y matriz así como un componente inorgánico o mineral. Las células y matriz comprenden una estructura de fibras de colágeno que se impregna con el componente mineral de fosfato de calcio (85%) y carbonato de calcio (10%) que imparte rigidez al hueso. Mientras se cree que la osteoporosis generalmente afecta a los ancianos, ciertos tipos de osteoporosis pueden afectar a personas de todas las edades cuyos huesos no están sometidos a tensión funcional. En tales casos, los pacientes pueden experimentar una pérdida significativa de hueso cortical y esponjoso durante periodos prolongados de inmovilización. Se sabe que los pacientes de edad avanzada experimentan pérdida ósea debido al desuso cuando se inmovilizan después de una fractura de un hueso, que puede por último llevar a una fractura secundaria en un esqueleto ya osteoporótico. La menor densidad ósea puede llevar a un colapso de vértebras, fracturas de cadera, brazos inferiores, muñecas, tobillos así como dolores que incapacitan. Se necesitan terapias no quirúrgicas alternativas para tales enfermedades.

30 Los campos electromagnéticos pulsados (CEMP) y acoplamiento capacitivos (AC) se han usado en gran medida para fracturas que no cicatrizan y problemas relacionados en la curación de huesos desde que lo aprobó la Administración de Alimentos y Fármacos en 1979. La base orgánica para el ensayo de esta forma de terapia fue la observación de que la tensión física en huesos provoca la aparición de pequeñas corrientes eléctricas que, junto con la presión mecánica, se cree que son los mecanismos que subyacen la transducción de las tensiones físicas en una señal que promueve la formación de huesos. Junto con la estimulación directa de campo eléctrico que fue exitosa en el tratamiento de falta de unión, las tecnologías no invasivas que usan CEMP y acoplamiento capacitivo (donde los electrodos se colocan en la piel en la zona del tratamiento) también resultaron ser efectivos. Los campos electromagnéticos pulsados generan pequeñas corrientes inducidas (corrientes Faraday) en el fluido extracelular altamente conductor., mientras que el acoplamiento capacitivo provoca directamente corrientes en los tejidos; por consiguiente, tanto CEMP como AC imitan las corrientes eléctricas endógenas.

35 Las corrientes eléctricas endógenas, que originalmente se pensaba que se debían a fenómenos que ocurren en la superficie de cristales en el hueso, se ha demostrado que se deben principalmente al movimiento de fluido que contienen electrolitos en canales del hueso que contienen constituyentes orgánicos con cargas negativas

fijas, generando lo que se llama "potenciales continuos". Los estudios de fenómenos eléctricos en cartílagos han demostrado un mecanismo de transducción mecánica-eléctrica que se parece al descrito en los huesos, que aparece cuando el cartílago se comprime mecánicamente, causando movimiento de fluido y electrolitos sobre la superficie de cargas negativas fijas en los proteoglicanos y colágeno en la matriz de cartílago. Esos potenciales continuos tienen aparentemente un fin en los cartílagos similar al de los huesos y, junto con la presión mecánica, llevan a una transducción de señal que es capaz de estimular síntesis de condrocitos de los componentes de matriz.

La principal aplicación de corriente directa, acoplamiento capacitivo y CEMPs ha sido en ortopedia en la curación de fracturas óseas sin unión (Brighton et al, J. Bone and Joint Surgery, 63: 2-13, 1981; Brighton y Pollack, J. Bone and Joint Surgery, 67: 577-585, 1985; Bassett et al., Crit. Rev. Biomed. Eng., 17: 451-529 (1989); Bassett et al., JAMA 247: 623-8 (1982). Se han presentado respuestas clínicas en necrosis avascular de caderas en adultos y enfermedad de Perthes en niños. Bassett et al. Clin Orthop 246: 172-6 (1989); Aaron et al., Clin Orthop 249: 209-18 (1989); Harrison et al, J Pediatr Orthop 4: 579-84 (1984). También se ha demostrado que CEMPs (Mooney, Spine, 15: 708-712, 1990) y el acoplamiento capacitivo (Goodwin, Brighton et al., Spine, 24: 1349-1356, 1999) pueden aumentar de manera significativa el índice de éxito en fusiones lumbares. También hay informes sobre el aumento de regeneración nerviosa periférica y función y promoción de angiogénesis. Bassett, Bioassays 6: 36-42 (1987). Los pacientes con tendinitis de manguito rotador persistente que son resistentes a la inyección de esteroides y otras medidas convencionales, mostraron un beneficio significativo en comparación con pacientes tratados con placebo. Binder et al., Lancet 695-8 (1984). Finalmente, Brighton et al. han demostrado en ratas la habilidad de un campo eléctrico apropiado de acoplamiento capacitivo tanto para prevenir como para invertir la osteoporosis vertebral en la espina lumbar (Brighton et al. J. Orthop. Res. 6: 676-684; Brighton et al. J. Bone and Joint Surgery, 71: 228-236, 1989).

Más recientemente, la investigación en esta área se ha centrado en los efectos que la estimulación tiene en tejidos y células. Por ejemplo, se ha conjeturado que las corrientes directas no penetran en las membranas celulares y que se consigue el control a través de diferenciación de matriz extracelular. Grodzinsky, Crit. Rev. Biomed. Engng 9: 133 (1983). A diferencia de las corrientes directas, se ha presentado que CEMPs pueden penetrar en membranas celulares y estimularlas o afectar directamente a orgánulos intracelulares. Un examen en el efecto de CEMPs en matrices extracelulares y osificación endocondral *in vivo* dio como resultado una mayor síntesis de moléculas de cartílago y maduración de trabéculas óseas. Aaron et al., J. Bone Miner. Res. 4: 227-233 (1989). Más recientemente, Lorch, Brighton et al. presentaron (Clin Orthop and Related Research 350: 246-256, 1998), que la transducción de señal de una señal eléctrica acoplada capacitivamente es por medio de canales de calcio cerrados con voltaje, lo que lleva a un aumento en calcio citosólico con un posterior aumento en calmodulina activada (citoesquelética).

Muchas investigaciones se han dirigido al estudio de cultivo de tejido con el fin de entender los mecanismos de respuesta. En un estudio, se descubrió que los campos eléctricos aumentaron la incorporación de [³H]-timidina en el ADN de condrocitos, lo que apoya la noción de que los flujos de Na y Ca²⁺ generados por estimulación eléctrica provocan síntesis de ADN. Rodan et al., Science 199: 690-692 (1978). Los estudios han encontrado cambios en el segundo mensajero, cAMP, y reorganizaciones citoesqueléticas debido a perturbaciones eléctricas. Ryaby et al, Trans, BRAGS 6: (1986); Jones et al., Trans. BRAGS 6: 51 (1986); Brighton y Townsed, J. Orthop. Res. 6:552-558, 1988. Otros estudios han encontrado efectos en glicosaminoglicano, sulfación, ácido hialurónico, actividad de lisozima y secuencias de polipéptido. Norton et al., J. Orthop. Res. 6: 685-689 (1988); Goodman et al., Proc. Natn. Acad. Sci. USA 85: 3928-3932 (1988).

En 1996 el presente inventor presentó que una presión mecánica biaxial cíclica de 0,17% producía un aumento significativo en TGF- β_1 mRNA en células de hueso MC3T3-E1 cultivadas. Brighton et al., Biomech. Biophys. Res. Commun. 229: 449-453 (1996). En 1997 siguieron varios estudios significativos. En un estudio se presentó que la misma presión mecánica biaxial cíclica de 0,17% producía un aumento significativo en PDGF-A mRNA en células óseas similares. Brighton et al., Biomech. Biophys. Res. Commun. 43:339-346 (1997). También se presentó que un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 60 kHz de 20 mV/cm producía un aumento significativo en TGF- β_1 en células óseas similares. Brighton et al., Biomech. Biophys. Res. Commun. 237:225-229 (1997). Sin embargo, los efectos que tal campo tendría en otros genes no se han presentado en la bibliografía.

En WO 01/62336, titulada "Regulación de genes por medio de aplicación de señales eléctricas y electromagnéticas específicas y selectivas", se desvelaron métodos para determinar las señales eléctricas y electromagnéticas selectivas para su uso en la creación de campos específicos y selectivos para regular genes dianas de tejidos enfermos o dañados. La presente invención se construye en base a la técnica aquí descrita al describir el método para regular una expresión genética diana, esto es, expresión del gen de colágeno tipo II, a través de la aplicación de un campo específico y selectivo generado mediante una señal eléctrica y electromagnética específica y selectiva, para el tratamiento de enfermedad de cartílago (artritis), lesión de cartílago y defectos del cartílago.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a la regulación de la expresión del gen de colágeno tipo II en células de cartílago por medio de la aplicación de campos específicos y selectivos generados mediante señales eléctricas y/o

electromagnéticas específicas y selectivas. Al realizar curvas en respuesta a las dosis en la duración, amplitud, frecuencia y ciclo de trabajo del campo eléctrico, se descubrió la señal óptima para aumentar el mRNA de colágeno tipo II en condrocitos de cartílago articular. La señal óptima generó un campo eléctrico acoplado capacitivamente con una amplitud de 20 mV/cm, una duración de 30 minutos, un ciclo de trabajo de 8,3% (1 minuto ENCENDIDO, 11 minutos APAGADO, 30 ciclos), una frecuencia de 60 kHz, y una configuración de onda senoidal. En particular, la presente invención se refiere al aumento de expresión del gen de colágeno tipo II en células de cartílago por medio de la aplicación de campos generados por tales señales.

En una realización preferente de la invención, se proporciona un dispositivo como el citado en las reivindicaciones. Se desvelan métodos para aumentar específicamente y selectivamente la expresión de gen de mRNA de colágeno tipo II con campos eléctricos acoplados capacitivamente, campos electromagnéticos o campos combinados. Osteoartritis, artritis reumatoide, lesión de cartílago, defectos del cartílago y similares se tratan con un campo eléctrico acoplado capacitivamente de aproximadamente 20 mV/cm con una duración de campo eléctrico de aproximadamente 30 minutos, una frecuencia de aproximadamente 60 kHz, un ciclo de trabajo de aproximadamente 8,3% y una configuración de onda senoidal que provoca que la expresión de mRNA de colágeno tipo II aumente. De acuerdo con la invención, una señal "específica y selectiva" es una señal que tiene características predeterminadas de amplitud, duración, ciclo de trabajo, frecuencia y forma de onda que aumenta la expresión de gen de colágeno tipo II (especificidad). Esto permite elegir diferentes señales para aumentar las expresiones del gen de colágeno tipo II con el fin de conseguir una respuesta biológica o terapéutica dada (selectividad).

También se desvelan métodos y dispositivos para el tratamiento de osteoartritis, artritis reumatoide, lesión de cartílago y defectos del cartílago. El método incluye la metodología para determinar la señal "específica y selectiva" para el gel de colágeno tipo II variando metódicamente la duración de una señal de inicio conocida por aumentar o que se sospecha que aumenta la producción celular de colágeno tipo II. Después de seleccionar la duración óptima, la amplitud de la señal varía para la duración óptima de tiempo como lo determina la expresión de gen de colágeno tipo II. El ciclo de trabajo, frecuencia y forma de onda varían metódicamente mientras se mantienen constantes las otras características de señal. Este proceso se repite hasta que se determina la señal óptima que produce el mayor aumento en la expresión de colágeno tipo II.

Aquellos expertos en la materia apreciarán que la expresión del gen de colágeno tipo II es funcionalmente complementaria o sinérgica a la expresión del gen de agregano en células de cartílago expuestas a varias señales eléctrica y electromagnéticas. Las señales específicas y selectivas para regular la expresión del gen de agregano se describe en la solicitud de patente en tramitación de Estados Unidos N^o, también del presente inventor. Estos y otros aspectos de la presente invención se elucidarán en la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención será aparente a partir de la siguiente descripción detallada de la invención tomada junto con los dibujos acompañantes, de los cuales:

La Figura 1 es una representación gráfica de expresión de mRNA de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm durante varias duraciones de tiempo. Como se indica, la producción óptima de mRNA de colágeno tipo II ocurrió con una señal de una duración de 30 minutos.

La Figura 2 es una representación gráfica de expresión de mRNA de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm durante 30 minutos. Se muestra la cantidad de mRNA de colágeno tipo II producido después de varios tiempos de respuesta, en comparación con los controles (sin electricidad). Como también se muestra, la producción óptima de mRNA de colágeno tipo II ocurrió 5,5 horas después de que la estimulación eléctrica cesara.

La Figura 3 es una representación gráfica de expresión de mRNA de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a varias amplitudes de un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm durante una duración de 30 minutos y se extraen 5,5 horas después de que la estimulación eléctrica haya cesado. Como se indica, la producción óptima de mRNA de colágeno tipo II ocurrió con una señal que producía una amplitud de campo eléctrica de 20 mV/cm.

La Figura 4 es una representación gráfica de un análisis de ensayo Northern de expresión de colágeno tipo II (barra blanca) y expresión de mRNA de colágeno tipo II (barra sombreada) cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm durante una duración de 30 minutos y se extraen 5,5 horas después del cese de la señal eléctrica. Como se indica, el análisis de ensayo Northern de mRNA de colágeno tipo II es 3,5 veces mayor que los controles no estimulados, y la cantidad de mRNA de colágeno tipo II como lo determina RT-PCR es 6,5 veces mayor que la de los controles no estimulados.

La Figura 5 es una representación gráfica de expresión de mRNA de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de varios ciclos de trabajo y una

duración de 30 minutos de tiempo ENCENDIDO en una amplitud de campo eléctrico de 20 mV/cm y se extraen 5,5 horas después del cese de la señal eléctrica. Como se indica, el ciclo óptimo de trabajo resultó ser 8,3% (1 minuto ENCENDIDO, 11 minutos APAGADO, 30 ciclos).

5 La Figura 6 es una representación gráfica de expresión de mRNA de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de varias frecuencias de una duración de 30 minutos (tiempo ENCENDIDO) en una amplitud de campo eléctrico de 20 mV/cm con un ciclo de trabajo de 8,3% (1 minuto ENCENDIDO, 11 minutos APAGADO, 30 ciclos) y se extraen 5,5 horas después del cese de la señal eléctrica. Como se indica, la frecuencia óptima resultó ser 60 kHz.

10 La Figura 7 es una representación gráfica de condrocitos de cartílago articular que crecieron durante 7 días en cultivo y después se expusieron a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm, ciclo de trabajo 50% (1 minuto ENCENDIDO, 1 minutos APAGADO, 30 ciclos), a una frecuencia de 60 kHz, y que tiene una configuración de onda senoidal. Los condrocitos se expusieron a este campo durante 1 hora al día durante 7 días. Los condrocitos de control crecieron bajo las mismas condiciones pero no se expusieron a ninguna estimulación eléctrica. En el medio de estos cultivos no estuvo presente ninguna interleuquina-1 β (IL-1 β), una citoquina que estimula la degradación de cartílago articular. Como se indica, hidroxiprolina, un aminoácido que es un constituyente característico de colágeno, aumento 1,7 veces cuando los condrocitos se expusieron al campo eléctrico en comparación con los condrocitos de control que no se expusieron al campo eléctrico.

20 La Figura 8 es una representación gráfica de condrocitos de cartílago articular que crecieron durante 7 días en cultivo y después se expusieron a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm, ciclo de trabajo 50% (1 minuto ENCENDIDO, 1 minutos APAGADO, 30 ciclos), a una frecuencia de 60 kHz, y que tiene una configuración de onda senoidal. Se añadió interleuquina-1 β (10 ng/ml) al medio el día 7. Los condrocitos se expusieron después a este campo durante 1 hora por día durante 7 días. Los condrocitos de control crecieron bajo las mismas condiciones con interleuquina en el medio pero no se expusieron a ninguna estimulación eléctrica. Como se indica, hidroxiprolina aún mostró un aumento de 1,4 veces cuando se expuso al campo eléctrico, a pesar de la presencia de interleuquina en el medio de los cultivos, en comparación con los cultivos de control que no se expusieron a ningún campo eléctrico.

30 La Figura 9 ilustra un dispositivo 10 de acuerdo con la presente invención que se usa para tratar un paciente con osteoartritis de la rodilla.

35 Descripción detallada de realizaciones preferentes de la invención

La invención se describirá con detalle más abajo con referencia a las Figura 1-9. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la descripción aquí dada con respecto a aquellas figuras tiene únicamente fines ejemplares y no pretende de ninguna manera limitar el alcance de la invención. Todas las preguntas en relación con el alcance de la invención pueden resolverse haciendo referencia a las reivindicaciones adjuntas.

40 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la expresión de ciertos genes puede regularse mediante la aplicación de campos específicos y selectivos generados por señales eléctricas y/o electromagnéticas específicas y selectivas. En otras palabras, el presente inventor ha descubierto que hay una señal eléctrica y/o electromagnética específica y selectiva que genera un campo específico y selectivo para regular cada gen en células de hueso, cartílago y otras células de tejido y que esos campos son capaces de regular específicamente y selectivamente los genes en tales células. En particular, la expresión de gen que gobierna el crecimiento, mantenimiento, reparación, degeneración o deterioro de tejidos o células puede regularse de acuerdo con la invención por medio de la aplicación de campos específicos y selectivos generados por señales eléctricas y/o electromagnéticas específicas y selectivas para producir un efecto clínico beneficioso. Tales descubrimientos son útiles en el desarrollo de métodos de tratamiento que se dirigen a ciertas condiciones médicas incluyendo fracturas y defectos óseos, osteoartritis, osteoporosis, cáncer y otras enfermedades, así como para desarrollar dispositivos que emplean tales métodos.

55 En particular, la presente invención demuestra que la expresión de colágeno tipo II puede aumentarse significativamente para incrementar la producción de colágeno en cartílago articular. El colágeno tipo II, junto con agregano, son los principales constituyentes de cartílago articular que se comprometen y/o degradan pronto en el curso de artritis. La presente invención muestra claramente que el campo eléctrico óptimo aquí descrito puede aumentar significativamente mRNA de colágeno tipo II y, por ello, aumentar la síntesis de colágeno tipo II, incluso en presencia de IL-1 β . Aquellos expertos en la técnica también apreciarán que un campo eléctrico apropiado, como aquí se describe con acoplamiento capacitivo pero igualmente efectivo con cualquiera y todas las técnicas de aplicación de campo, pueden usarse para tratar artritis (también osteoartritis como artritis reumatoide), lesión de cartílago y defectos de cartílago.

65 Como aquí se usa, el término "señal" se usa para referirse a una variedad de señales que incluyen señales mecánicas, señales de ultrasonido, señales electromagnéticas y señales eléctricas producidas por un dispositivo. Se entenderá que el término "campo" como aquí se usa se refiere a un campo eléctrico den un tejido destinado, ya sea

un campo electromagnético combinado o pulsado o generado por corriente directa, acoplamiento capacitivo o acoplamiento inductivo.

5 El término "remoto/a" se usa para significar que está actuando o actúa en o se controla desde una distancia. La regulación "remota" se refiere a controlar la expresión de un gen desde una distancia. Proporcionar "remotamente" significa proporcionar desde una distancia. Por ejemplo, proporcionar una señal específica y selectiva desde una fuente remota puede referirse a proporcionar la señal desde una fuente en una distancia a un tejido o células o desde una fuente fuera de o externa al cuerpo.

10 La expresión señal "específica y selectiva" significa una señal que produce un campo eléctrico específico y selectivo que tiene características predeterminadas de amplitud, duración, ciclo de trabajo, frecuencia y forma de onda que aumenta o reduce un gen destino o genes complementarios dirigidos complementariamente (especificidad). Esto permite elegir diferentes señales "específicas y selectivas" para aumentar o reducir varias expresiones de gen con el fin de conseguir una respuesta biológica o terapéutica dada (selectividad).

15 El término "regular" significa controlar una expresión de gen. Se entiende que regular incluye tanto aumentar como reducir. Aumentar significa incrementar la expresión de un gen, mientras que reducir significa inhibir o prevenir la expresión de un gen.

20 "Funcionalmente complementario" se refiere a dos o más genes cuyas expresiones son complementarias o sinérgicas en una célula o tejido dado.

25 "Tejido" se refiere a un agregado de células junto con sus sustancias extracelulares que forman uno de los materiales estructurales de un paciente. Como aquí se usa, el término "tejido" pretende incluir tejido de músculo u órgano así como tejido de hueso o cartílago. También, el término "tejido" como aquí se usa puede también referirse a una célula individual.

"Paciente" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano.

30 La presente invención proporciona métodos de tratamiento y dispositivos que se dirigen a ciertos tejidos, células o enfermedades. En particular, la expresión de gen asociada con el proceso de reparación en tejidos o células dañadas o enfermas puede regularse mediante la aplicación de campos específicos y selectivos mediante señales eléctricas que son específicas y selectivas para los genes que se regularán en los tejidos o células dianas. La expresión de gen puede aumentar o reducir mediante la aplicación de señales que son específicas y selectivas para cada gen o para cada conjunto de genes complementarios para producir un efecto clínico beneficioso. Por ejemplo, una señal específica y selectiva particular puede crear un campo eléctrico específico y selectivo que aumenta una cierta expresión de gen deseable, mientras la misma u otra señal específica y selectiva particular pueden crear un campo eléctrico específico y selectivo que reduce una cierta expresión de gen no deseable. Un gen determinado puede aumentar mediante un campo específico y selectivo generado por una señal específica y selectiva particular y reducirse mediante un campo específico y selectivo generado por otra señal específica y selectiva particular. Aquellos expertos en la técnica entenderán que ciertos tejidos enfermos o dañados pueden ser el objetivo del tratamiento al regular aquellos genes que gobiernan el crecimiento, mantenimiento, reparación y degeneración o deterioro de los tejidos.

45 Los métodos y dispositivos de la presente invención están basados en la identificación de aquellas señales que generan campos que son específicos y selectivos para la expresión de gen asociadas con ciertos tejidos dianas enfermos o dañados. Por ejemplo, la electricidad en sus varias formas (por ejemplo, acoplamiento capacitivo, acoplamiento inductivo, campos combinados) puede regular específicamente y selectivamente la expresión de gen en tejidos o células dianas en el cuerpo de un paciente variando la frecuencia, amplitud, forma de onda o ciclo de trabajo del campo específico y selectivo aplicado para cada gen seleccionado. La duración de tiempo que se expone a electricidad también puede influenciar en la capacidad de la electricidad para regular específicamente y selectivamente la expresión de gen en tejidos o células dianas en el cuerpo de un paciente. Las señales específicas y selectivas pueden generar campos eléctricos específicos y selectivos para su aplicación a cada gen sistemáticamente hasta que se encuentra la combinación apropiada de frecuencia, amplitud, forma de onda, ciclo de trabajo y duración que proporcione el efecto deseado de expresión de gen.

50 Se entenderá que una variedad de tejidos enfermos o dañados o estados enfermos pueden ser el objetivo del tratamiento porque la especificidad y selectividad de un campo eléctrico para una cierta expresión de gen pueden estar influenciadas por varios factores. En particular, un campo eléctrico de una frecuencia, amplitud, forma de onda y/o ciclo de trabajo adecuado pueden ser específico y selectivo para la expresión de ciertos genes y por lo tanto proporcionar tratamientos dirigidos. Los factores temporales (por ejemplo, la duración de tiempo que se expone al campo eléctrico) también puede influenciar en la especificidad y selectividad de un campo eléctrico para una expresión de gen particular. La regulación de expresión de gen puede ser más efectiva (o hacerse posible) por medio de la aplicación de un campo eléctrico específico y selectivo durante una duración particular de tiempo. Por lo tanto, aquellos expertos en la técnica entenderán que la presente invención proporciona la variación de frecuencia, amplitud, forma de onda, ciclo de trabajo y/o duración de aplicación de un campo eléctrico hasta que se encuentra el

campo eléctrico que sea específico y selectivo para cierta expresión de gen con el fin de proporcionar tratamientos dirigidos a una variedad de tejido enfermo o dañado o enfermedades.

5 Así, la presente invención puede proporcionar tratamientos dirigidos porque es posible regular la expresión de ciertos genes asociados con un tejido particular enfermo o dañado por medio de la aplicación de campos específicos y selectivos generados por señales específicas y selectivas de frecuencia, amplitud, forma de onda y/o ciclo de trabajo apropiados durante una duración apropiada de tiempo. La especificidad y selectividad de una señal que genera un campo eléctrico específico y selectivo puede así influenciarse para regular la expresión de ciertos genes con el fin de dirigirse a cierto tejido enfermo o dañado o estados enfermos para su tratamiento. En particular, 10 la presente invención proporciona el tratamiento dirigido a osteoartritis, artritis reumatoide, lesión de cartílago y defectos de cartílago.

La presente invención también proporciona un dispositivo que incluye una fuente de al menos una señal específica y selectiva para expresión de gen de colágeno tipo II. Los dispositivos de la presente invención pueden proporcionar la producción de tales señales para la aplicación a células de cartílago mediante al menos un electrodo adaptado para aplicar el campo específico y selectivo generado por la señal específica y selectiva. En particular, el campo óptimo aquí descrito puede aplicarse a cualquier articulación por medio de electrodos de superficie apropiados, dos o más, en parejas o en tiras, incorporados en prendas, rodilleras/coderas, envoltorios o escayolas, y administrados por medio de acoplamiento capacitivo, acoplamiento inductivo (campos electromagnéticos), o campos combinados. 15 20

El dispositivo de la presente invención es capaz de aplicar un campo específico y selectivo generado por señales específicas y selectivas directamente a tejido enfermo o dañado y/o a la piel de un paciente. El dispositivo de la presente invención también puede proporcionar la aplicación remota de campos específicos y selectivos (por ejemplo, aplicación de un campo a una distancia del tejido enfermo o dañado), aunque se apreciará que los dispositivos acoplados capacitivamente deben tocar la piel del sujeto. El dispositivo de la presente invención puede incluir medios para unir los electrodos al cuerpo de un paciente cerca del tejido dañado o enfermo. Por ejemplo, electrodos conductores auto-adherentes pueden unirse a la piel del paciente en varios lados de la articulación de la rodilla que sufre osteoartritis como se muestra en la Figura 9. Como también se muestra en la Figura 9, el dispositivo 10 de la presente invención puede incluir electrodos auto-adherentes 12 para unir el dispositivo 10 al cuerpo de un paciente. Por ejemplo, el dispositivo 10 de la presente invención puede incluir electrodos 12 unidos a una unidad de potencia 14 que tiene un parche de VELCRO® 16 en el lado opuesto de tal manera que la unidad de potencia 14 pueda unirse a una tira de VELCRO® (no mostrada) ajustada alrededor de la pantorrilla, muslo o cintura del paciente. 25 30 35

El dispositivo 10 de la presente invención puede emplearse en una variedad de maneras. El dispositivo 10 puede ser portátil o puede unirse temporalmente o permanentemente al cuerpo de un paciente. El dispositivo 10 de la presente invención es preferentemente no invasivo. Por ejemplo, el dispositivo 10 de la presente invención puede aplicarse a la piel de un paciente mediante la aplicación de electrodos adaptados para contactar con la piel de un paciente para la aplicación de campos específicos y selectivos generados por las señales específicas y selectivas predeterminadas. Tales señales también pueden aplicarse por medio de bobinas en la que varias corrientes fluyen, produciendo así campos electromagnéticos específicos y selectivos que penetran en el tejido. El dispositivo 10 de la presente invención puede también ser capaz de implantarse en un paciente, incluyendo su implante bajo la piel de un paciente. 40 45

El ejemplo más abajo ilustrará que el método de la presente invención puede proporcionar crecimiento y reparación de cartílago. El crecimiento y reparación de cartílago pueden estimularse por medio de señales específicas y selectivas para la regulación de expresión de colágeno tipo II en células de cartílago para estimular la reparación de cartílago articular en pacientes con osteoartritis. En particular, los métodos de la presente invención pueden proporcionar el aumento de genes de colágeno tipo II que reparan el cartílago. Los métodos de la presente invención pueden dirigirse a una variedad de células de cartílago incluyendo condrocitos articulares e incluyendo cartílago articular, cartílago hialino y crecimiento de cartílago de placa. 50

El ejemplo más abajo ilustra además que el método de la presente invención proporciona la regulación de expresión de gen en condrocitos articulares. Por ejemplo, en el ejemplo más abajo, los condrocitos articulares fetales se han expuesto a un campo eléctrico de 60 kHz acoplado capacitivamente de 20 mV/cm durante 0,5, 2,0, 6,0 y 24,0 horas. Se descubrió una incorporación estadísticamente significativa de ³⁵SO₄/ug ADN (lo que indica una síntesis significativa de proteoglicano) después de solamente 0,5 horas de estimulación. Se repitió un experimento idéntico y se controlaron los niveles de mRNA de colágeno tipo II, el mensajero para el principal proteoglicano de cartílago. Después de solamente 0,5 horas de estimulación eléctrica hubo un aumento significativo de mRNA de colágeno tipo II. Por consiguiente, los factores temporales pueden influenciar en la especificidad y selectividad de una señal que genera campos eléctricos específicos y selectivos para regular la expresión de gen en condrocitos articulares. 55 60

Aquellos expertos en la técnica entenderán que el tratamiento puede estar dirigido a una variedad de otras enfermedades y daños del cartílago por medio del método de la presente invención. 65

5 Aquellos expertos en la técnica entenderán además que los dispositivos de la presente invención pueden proporcionarse en una variedad de formas incluyendo unidad de potencia capacitivamente acoplado con múltiples señales específicas y selectivas programados y controlados por interruptores para aplicación a un par o a múltiples pares de electrodos, bobinas electromagnéticas unidas a una unidad de potencia con múltiples señales específicas y selectivas controladas por interruptores y un estimulador de ultrasonido con un suministro de potencia para generar señales específicas y selectivas. Hablando en términos generales, la preferencia del dispositivo se basa en la aceptación del paciente y en la conformidad del paciente. La unidad más pequeña y más portátil disponible en la técnica ahora mismo es una unidad de acoplamiento capacitivo; sin embargo, los pacientes con piel extremadamente sensible pueden preferir usar unidades de acoplamiento inductivo. Por otro lado, las unidades de ultrasonido requieren la máxima cooperación por parte del paciente pero ciertos pacientes pueden desear su uso.

Ejemplo

15 La invención se demuestra en el siguiente ejemplo, que tiene fines ilustrativos y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

Materiales y métodos

20 Los cultivos de condrocito se prepararon a partir de cartílago articular bovino fetal. Los condrocitos (5×10^5 células/cm²) se colocaron en platos Cooper especialmente modificados. Las células crecieron hasta siete días con el medio cambiado justo antes del inicio de la condición experimental. Los cultivos celulares experimentales en estos estudios se sometieron a campo eléctrico con señal de onda senoidal de 60 kHz acoplada capacitivamente con una potencia de salida de 44,81 voltios pico a pico. Esto produjo una fuerza de campo calculada en el medio de cultivo en los platos de 20 mV/cm con una densidad de corriente de 300 μ A/cm². Los platos de cultivo de la célula de control fueron idénticos a los de los platos estimulados excepto que los electrodos no se conectaron a un generador de función.

30 El ARN total se aisló usando TRIzol, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se realizó transcriptasa inversa usando transcriptasa inversa SuperScript II. Los cebadores de oligonucleótido que se usaron en la técnica de PCR competitivo se seleccionaron de secuencias de cADN publicadas. El análisis cuantitativo de productos PCR se realizó usando software ScionImage.

35 La señal óptima para la regulación de gen deseada se descubrió sistemáticamente de la siguiente manera. Se toma una señal eléctrica conocida para aumentar (o incluso que sólo se sospeche que aumenta) la producción celular de una proteína dada como señal de inicio para determinar la señal específica para generar el campo específicos y selectivo para la expresión de gen (mARN) de esa proteína. Primero se realiza una curva de dosis-respuesta variando la duración de la señal mientras se mantienen constantes todas las características de señal (amplitud, ciclo de trabajo, frecuencia y forma de onda) (Figura 1). Esto determina la duración óptima de la señal de inicio para la expresión de gen de esa proteína. Se realiza una segunda curva de dosis-respuesta variando la amplitud de campo (Figura 3) para la duración óptima de tiempo (Figura 2). Esto determina la amplitud óptima de campo para la duración óptima de tiempo como lo determina la expresión de gen de la proteína de interés. Después se realiza una tercera curva de dosis-respuesta, esta vez variando el ciclo de trabajo de 100% (constante) a 5% o menos mientras se mantienen constantes la amplitud óptima y otras características de señal (Figura 5). Se repite una respuesta-dosis una cuarta vez (variando la frecuencia) (Figura 6) manteniendo constantes las otras características de señal. Aunque no se muestra, la dosis-respuesta puede repetirse una quinta vez (variando la forma de onda) manteniendo cada vez constantes las características de señal. Mediante este método se determina una señal óptima para producir el mayor aumento en la expresión de gen de la proteína de interés.

50 La expresión de gen puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, como transcripción inversa PCR y análisis Northern, y la expresión de proteína puede determinarse mediante análisis espectrofotométrico, fluorométrico, etc., inmunoensayos y similares.

Producción de colágeno tipo II mediante condrocitos articulares

55 Los condrocitos articulares se expusieron a un campo eléctrico capacitivamente acoplado de 20 mV/cm a 60 kHz. Los resultados se ilustran en las Figuras 1-8.

60 La Figura 1 es una representación gráfica de expresión de mARN de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular (atomol por μ l) se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm durante varias duraciones de tiempo (0,5, 2, 6 y 24 horas). Como se indica, la producción óptima de mARN de colágeno tipo II ocurrió con una señal de una duración de 30 minutos.

65 La Figura 2 es una representación gráfica de expresión de mARN de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm (atomol por μ l) durante 30 minutos. Se muestra la cantidad de mARN de colágeno tipo II producido después de varios tiempos de respuesta,

en comparación con los controles (sin electricidad). Como también se muestra, la producción óptima de mARN de colágeno tipo II ocurrió 5,5 horas después de que la estimulación eléctrica cesara.

La Figura 3 es una representación gráfica de expresión de mARN de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a varias amplitudes de un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm durante una duración de 30 minutos y se extraen 5,5 horas después de que la estimulación eléctrica haya cesado. Como se indica, la producción óptima de mARN de colágeno tipo II ocurrió con una señal que producía una amplitud de campo eléctrica de 20 mV/cm. En comparación, el presente inventor ha descubierto que la amplitud óptima para agregano de mARN es 10-20 mV/cm.

La Figura 4 es una representación gráfica de un análisis de ensayo Northern de expresión de colágeno tipo II (barra blanca) y expresión de mARN de colágeno tipo II (barra sombreada) cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm durante una duración de 30 minutos y se extraen 5,5 horas después del cese de la señal eléctrica. Como se indica, el análisis de ensayo Northern de mARN de colágeno tipo II es 3,5 veces mayor que los controles no estimulados, y la cantidad de mARN de colágeno tipo II como lo determina RT-PCR es 6,5 veces mayor que la de los controles no estimulados.

La Figura 5 es una representación gráfica de expresión de mARN de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de varios ciclos de trabajo y una duración de 30 minutos de tiempo ENCENDIDO en una amplitud de campo eléctrico de 20 mV/cm y se extraen 5,5 horas después del cese de la señal eléctrica. Como se indica, el ciclo óptimo de trabajo resultó ser 8,3% (1 minuto ENCENDIDO, 11 minutos APAGADO, 30 ciclos). En comparación, el presente inventor ha descubierto el ciclo de trabajo óptimo para expresión de mARN de agregano es 50% (1 minuto ENCENDIDO, 1 minuto APAGADO, 30 ciclos).

La Figura 6 es una representación gráfica de expresión de mARN de colágeno tipo II cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de varias frecuencias de una duración de 30 minutos (tiempo ENCENDIDO) en una amplitud de campo eléctrico de 20 mV/cm con un ciclo de trabajo de 8,3% (1 minuto ENCENDIDO, 11 minutos APAGADO, 30 ciclos) y se extraen 5,5 horas después del cese de la señal eléctrica. Como se indica, la frecuencia óptima resultó ser 60 kHz.

La Figura 7 es una representación gráfica de condrocitos de cartílago articular que crecieron durante 7 días en cultivo y después se expusieron a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm, ciclo de trabajo 50% (1 minuto ENCENDIDO, 1 minutos APAGADO, 30 ciclos), a una frecuencia de 60 kHz, y que tiene una configuración de onda senoidal. Los condrocitos se expusieron a este campo durante 1 hora al día durante 7 días. Los condrocitos de control crecieron bajo las mismas condiciones pero no se expusieron a ninguna estimulación eléctrica. En el medio de estos cultivos no estuvo presente ninguna interleuquina-1 β (IL-1 β), una citoquina que estimula la degradación de cartílago articular. Como se indica, hidroxiprolina, un aminoácido que es un constituyente característico de colágeno, aumento 1,7 veces cuando los condrocitos se expusieron al campo eléctrico en comparación con los condrocitos de control que no se expusieron al campo eléctrico. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que ya que el ciclo de trabajo usado en este experimento (50%) no es el ciclo de trabajo óptimo para colágeno tipo II (véase Figura 5) se esperaría una respuesta incluso mayor si se usara un ciclo de trabajo óptimo (8,3%).

La Figura 8 es una representación gráfica de condrocitos de cartílago articular que crecieron durante 7 días en cultivo y después se expusieron a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de 20 mV/cm, ciclo de trabajo 50% (1 minuto ENCENDIDO, 1 minutos APAGADO, 30 ciclos), a una frecuencia de 60 kHz, y que tiene una configuración de onda senoidal. Se añadió interleuquina-1 β (10 ng/ml) al medio el día 7. Los condrocitos se expusieron después a este campo durante 1 horas por día durante 7 días. Los condrocitos de control crecieron bajo las mismas condiciones con interleuquina en el medio pero no se expusieron a ninguna estimulación eléctrica. Como se indica, hidroxiprolina aún mostró un aumento de 1,4 veces cuando se expuso al campo eléctrico, a pesar de la presencia de interleuquina en el medio de los cultivos, en comparación con los cultivos de control que no se expusieron a ningún campo eléctrico. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que ya que el ciclo de trabajo usado en este experimento (50%) no es el ciclo de trabajo óptimo para colágeno tipo II (véase Figura 5) se esperaría una respuesta incluso mayor si se usara un ciclo de trabajo óptimo (8,3%).

La Figura 9 ilustra un dispositivo 10 de acuerdo con la presente invención que se usa para tratar un paciente con osteoartritis de la rodilla. Como se ilustra, dos electrodos circulares auto-adherentes, suaves y conductores 12 están colocados en la piel en cada lado de la rodilla en el nivel de la línea de la articulación. Los electrodos 12 están unidos a una unidad de potencia 14 que tiene un parche VELCRO® en el lado opuesto de tal manera que la unidad de potencia 14 pueda unirse a una tira de VELCRO® (no mostrada) ajustada alrededor de la pantorrilla, muslo o cintura del paciente. Los electrodos pueden colocarse en la piel antes de que el paciente vaya a la cama cada noche o en cualquier otro momento conveniente. Por supuesto, también pueden usarse otros tipos adecuados de electrodos.

La unidad de potencia 14 es preferentemente pequeña (por ejemplo, 6-8 onzas) y funciona con una batería estándar de 9 voltios para emitir una señal de onda senoidal de 5 voltios pico a pico, 6-10 mA, 20 mV/cm, 60 kHz a los electrodos 12 colocados en la piel. Cuando la señal se proporciona aproximadamente 30 minutos por día con el ciclo de trabajo apropiado (8,3%), se ha demostrado que aumenta significativamente genes que codifican colágeno tipo II. Este tratamiento debería prevenir o minimizar un deterioro adicional de cartílago articular así como curar cartílago articular que ya se ha dañado o degenerado.

El ejemplo anteriormente descrito demuestra que la expresión de gen de colágeno tipo II puede aumentar significativamente para incrementar la producción de proteoglicano en cartílago articular para tratar artritis (tanto osteoartritis como artritis reumatoide), lesión de cartílago y defectos de cartílago. Proteoglicano, junto con colágeno tipo II, es el constituyente principal del cartílago articular y se degrada y destruye rápido en el desarrollo de artritis. La presente invención muestra claramente que el campo eléctrico óptimo descrito en el ejemplo puede aumentar de manera muy significativa mRNA de colágeno tipo II y, por ello, aumentar la síntesis de proteoglicano, incluso en presencia de IL-1 β . Aquellos expertos en la técnica también apreciarán que un campo eléctrico apropiado, como aquí se describe con acoplamiento capacitivo, es también igualmente efectivo con cualquiera y todos los sistemas electromagnéticos que producen características de campo eléctrico equivalentes o casi equivalentes. Aquellos expertos en la técnica también apreciarán que pueden descubrirse características más particularizadas por medio de más experimentación con más puntos de datos, pero se cree que hay relativamente menores variaciones en cada una de las características de señal en el nivel de aquellos expertos en la técnica dados los contenidos aquí expuestos.

Aquellos expertos en la técnica también apreciarán que otras numerosas modificaciones en la invención son posibles en el alcance de la invención. Por ejemplo, el campo óptimo aquí descrito puede aplicarse a cualquier articulación por medio de dos o más electrodos apropiados de superficie, en pares o tiras, incorporados en prendas, rodilleras/coderas, envoltorios o escayolas, y se administran por medio de acoplamiento capacitivo, acoplamiento inductivo (campos electromagnéticos) o campos combinados. Por consiguiente, el alcance de la invención no pretende limitarse a la realización preferente descrita anteriormente, sino solamente a las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (10) para el tratamiento de osteoartritis, artritis reumatoide, lesión de cartílago y/o defectos del cartílago, que comprende:
- 5 una fuente de señal diseñada para generar al menos una señal específica y selectiva que tiene una configuración de onda senoidal y un ciclo de trabajo de 1/12; y electrodos (12) o bobinas conectadas a la fuente de señal para recibir dicha al menos una señal específica y selectiva y que están diseñados para estar operativos y dispuestos con respecto al tejido de cartílago diana, por lo que dichos electrodos (12) o bobinas después de la recepción de dicha señal específica y selectiva provocan la generación de un campo que es específico y selectivo para aumentar la expresión de gen de mRNA de colágeno tipo II en dicho tejido de cartílago diana,
- 10 donde dicha fuente de señal es capaz de controlar y variar la duración de tiempo de aplicación de dicha al menos una señal específica y selectiva a dichos electrodos (12) o bobinas para provocar, después de la aplicación de dichos electrodos (12) o bobinas la generación de un campo específico y selectivo que tiene una amplitud de 20 mV/cm en el tejido de cartílago diana a 60 kHz, y dicho campo específico y selectivo aumenta de manera selectiva la expresión de gen de mRNA de colágeno tipo II cuando se aplica a dicho tejido de cartílago diana;
- 15 donde dicha fuente de señal está configurada para aplicar dicha al menos una señal específica y selectiva a dichos electrodos (12) o bobinas durante una duración de aproximadamente 30 minutos cada 24 horas, consistiendo dicha al menos una señal específica y selectiva en 30 ciclos de un minuto encendida y once minutos apagada.
- 20 2. El dispositivo de la reivindicación 1 que además comprende una unidad de potencia portátil (14) diseñada para activar dicha fuente de señal.
3. El dispositivo de la reivindicación 1 que además comprende medios para unir los electrodos (12) o bobinas al cuerpo de un paciente cerca del tejido de cartílago.
- 25 4. El dispositivo de la reivindicación 1 que además comprende medios (16) para unir la fuente de señal al cuerpo de un paciente.
5. El dispositivo de la reivindicación 1 donde los electrodos (12) o bobinas están diseñados para aplicar el campo eléctrico a dicho tejido de cartílago diana por medio de acoplamiento capacitivo o en acoplamiento conductor.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

DURACIÓN

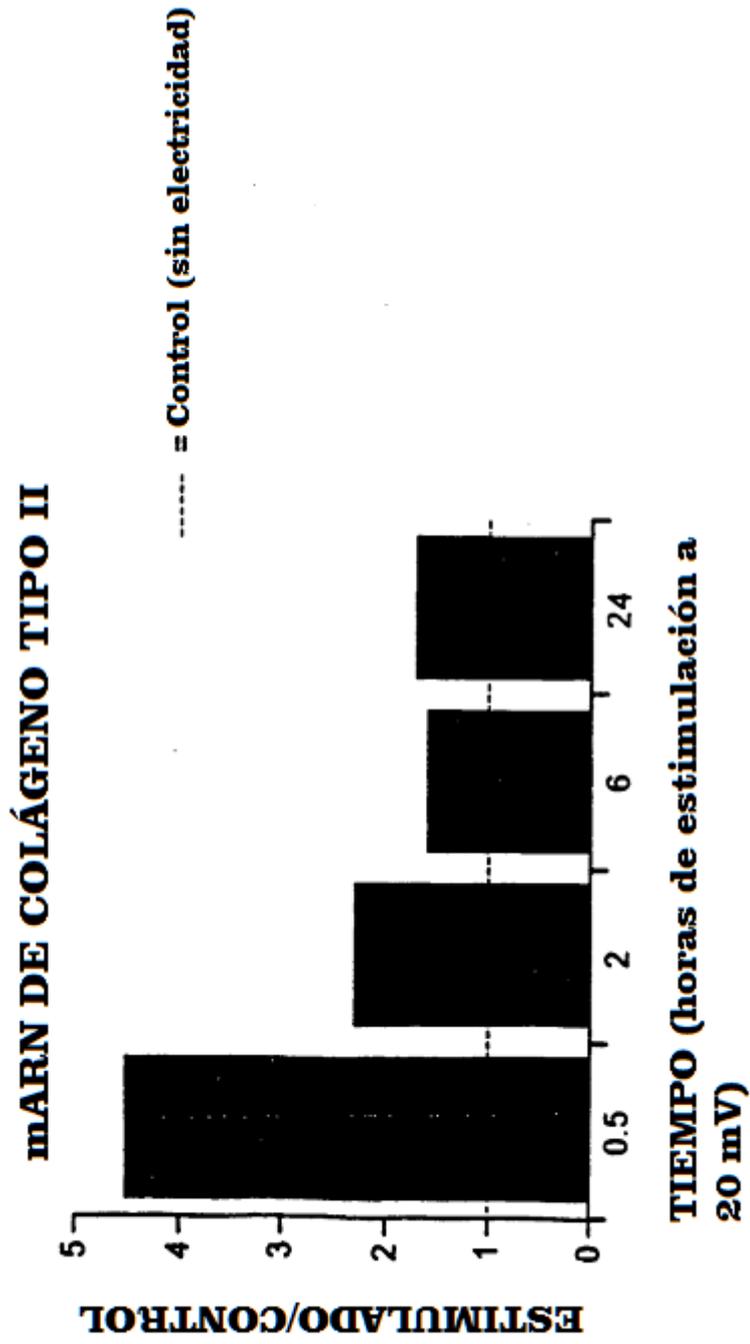


Figura 1

TIEMPO DE RESPUESTA

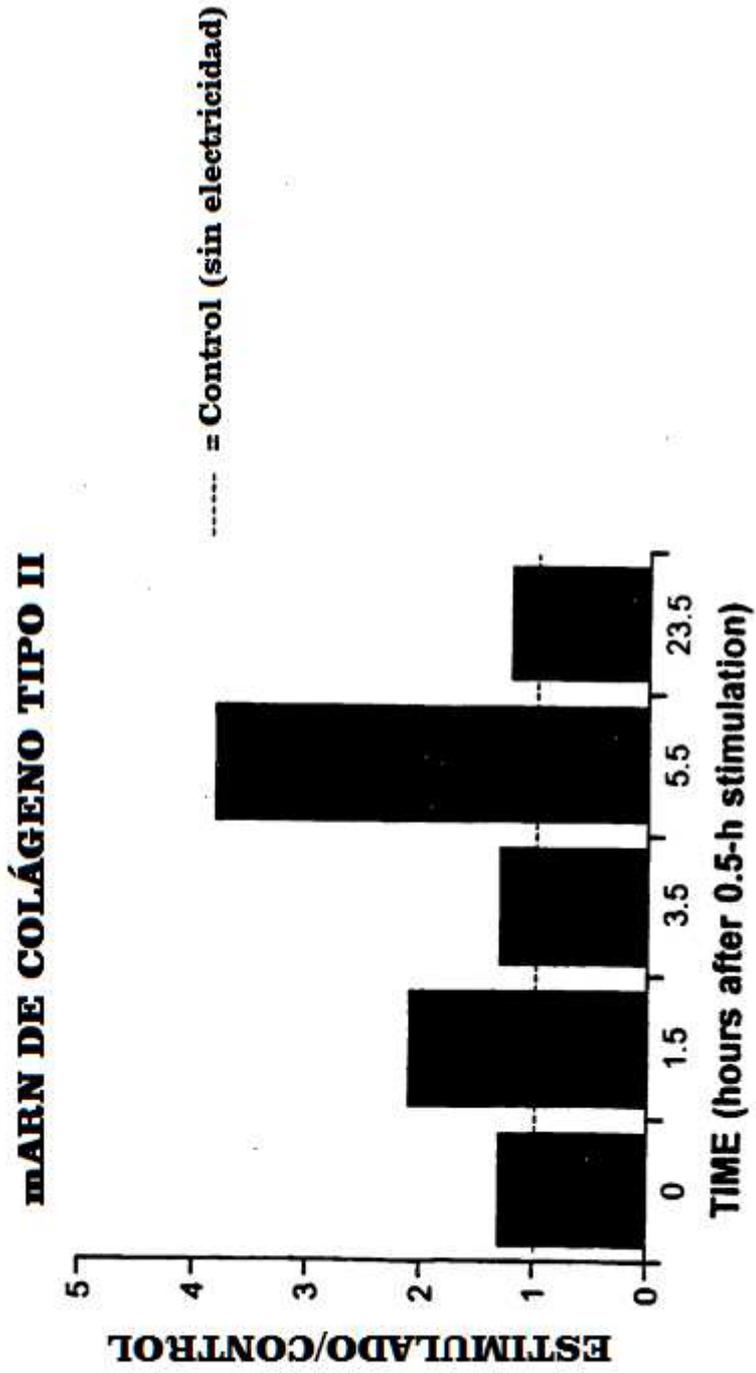


Figura: 2

AMPLITUD

mARN DE COLÁGENO TIPO II

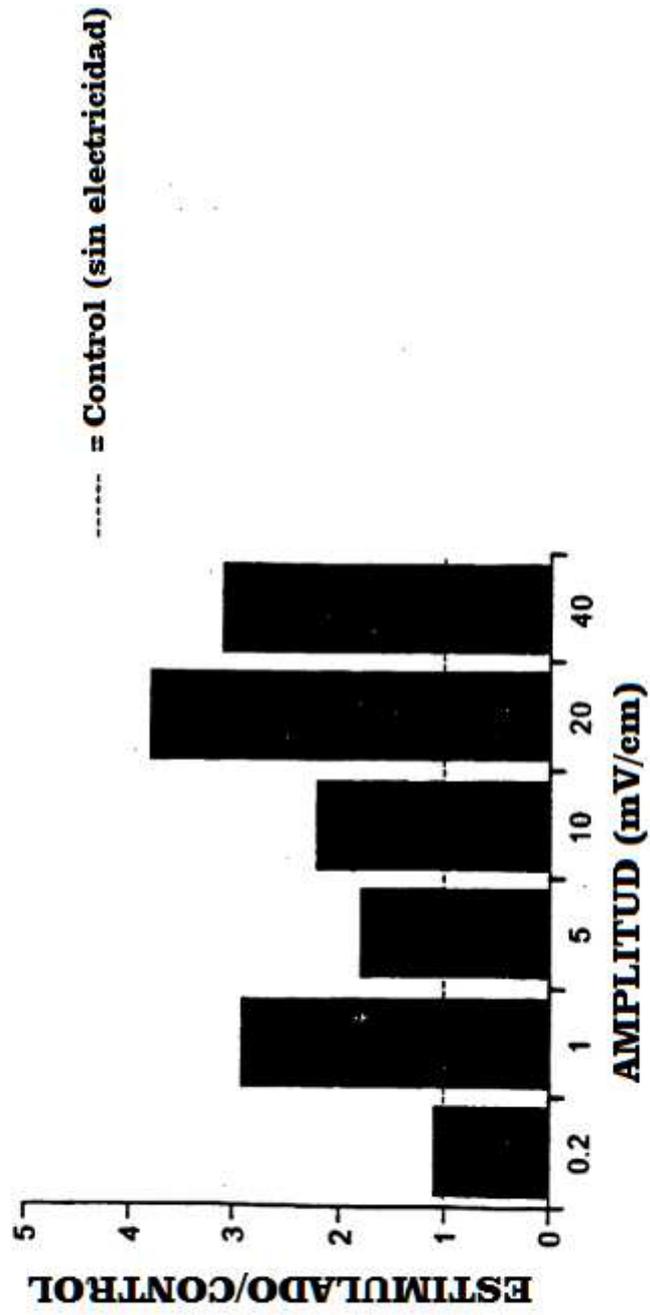


Figura 3

ANÁLISIS DE ENSAYO NORTHERN DE EXPRESIÓN DE COLÁGENO

----- = Control (sin electricidad)

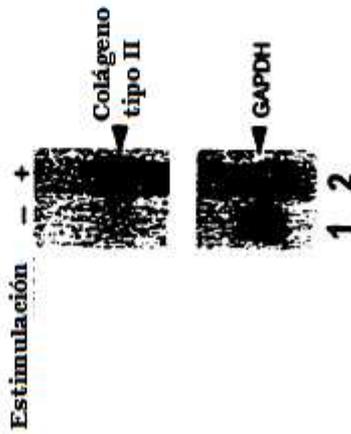
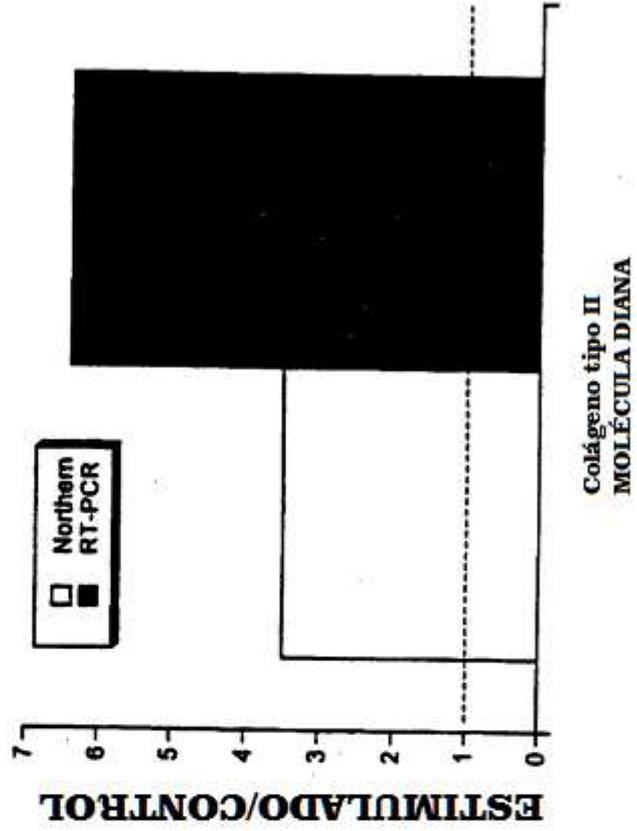
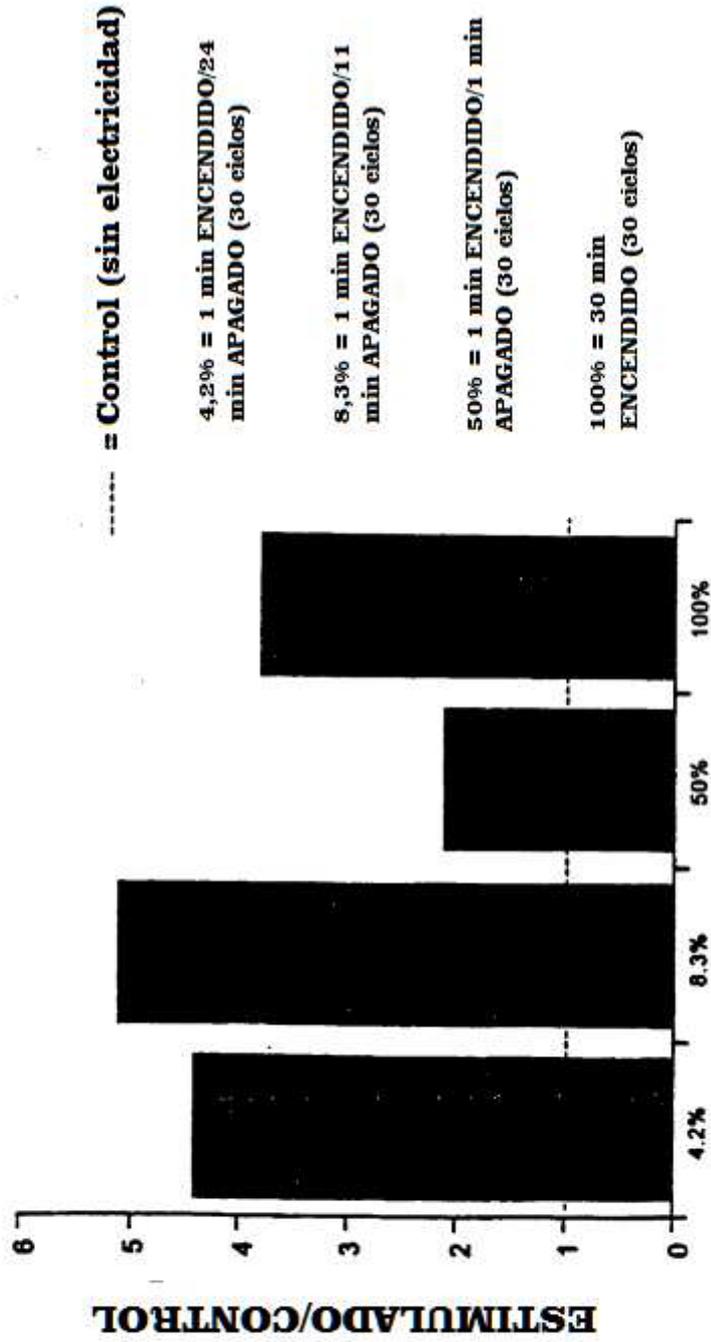


Figura: 4

CICLO DE TRABAJO

mARN DE COLÁGENO TIPO II



TIPOS DE CICLOS DE TRABAJO CON ESTIMULACIÓN DE 30 MIN.

Figura 5

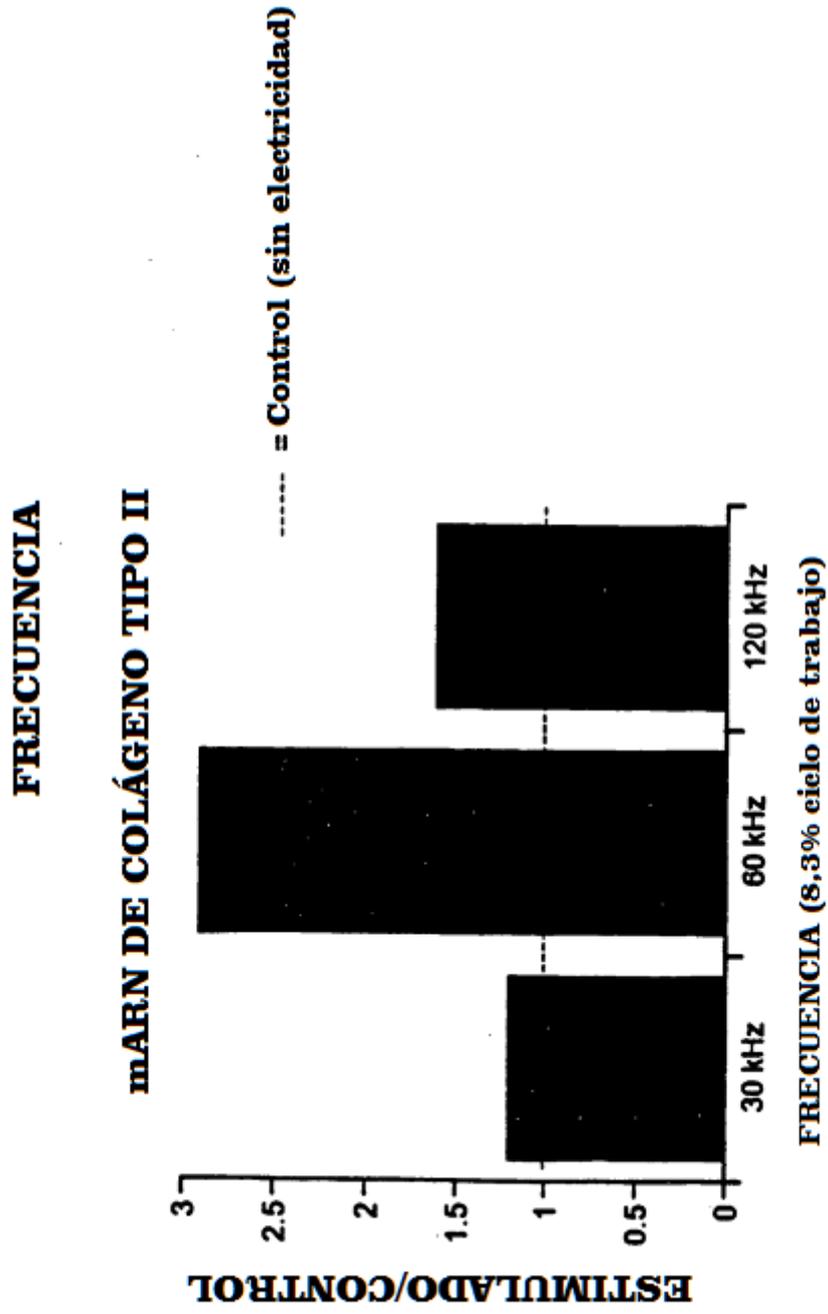


Figura 6

COLÁGENO (sin interleuquina; 50% ciclo de trabajo; 1h/día)

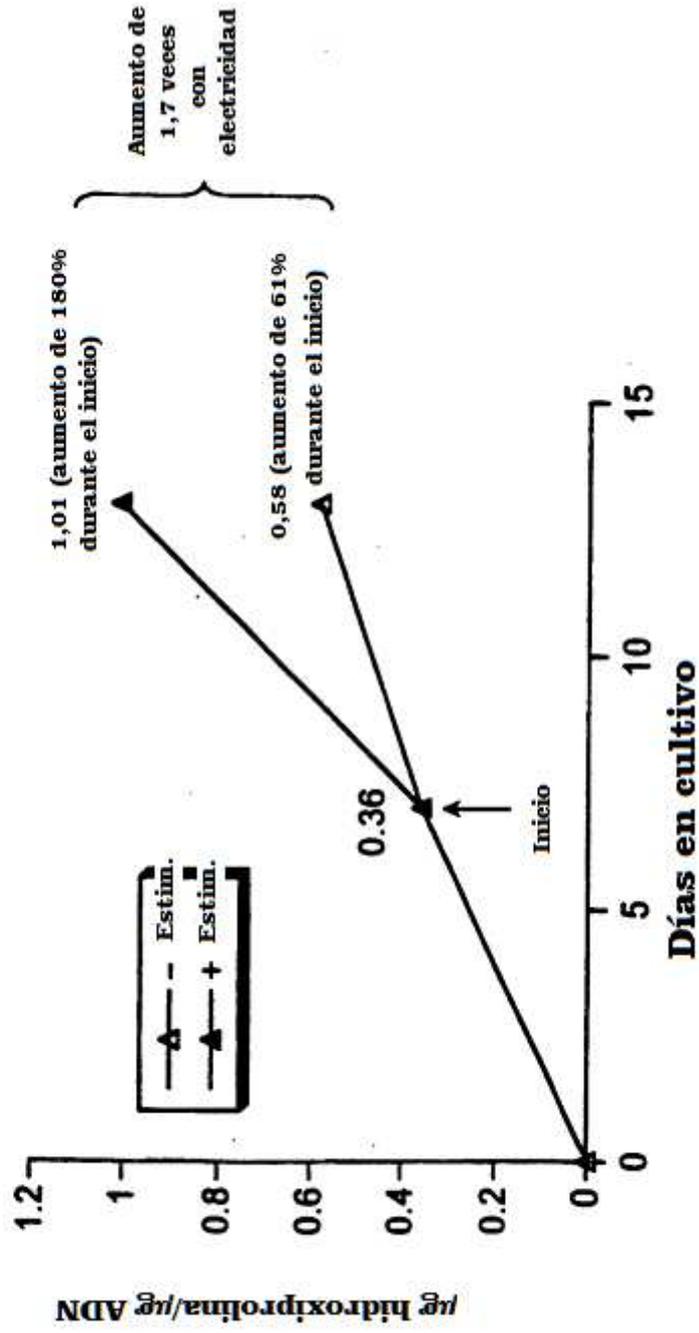


Figura 7

COLÁGENO (con interleuquina; 50% ciclo de trabajo; 1h/día)

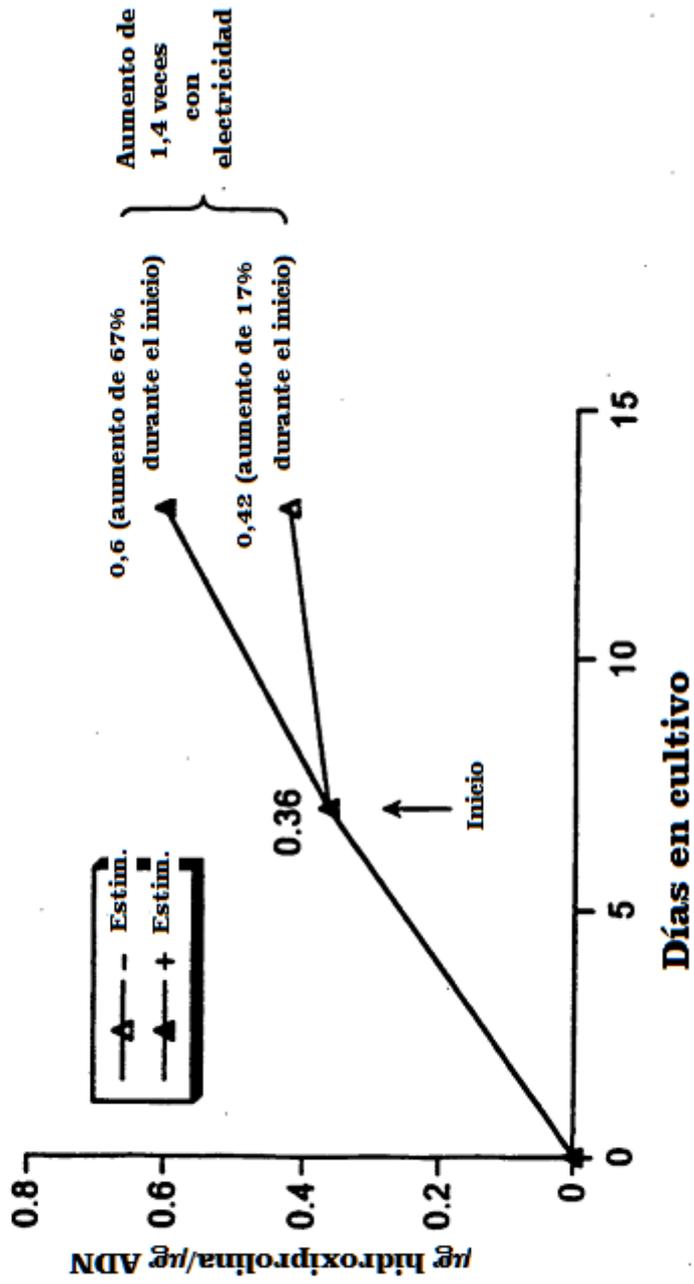


Figura 8

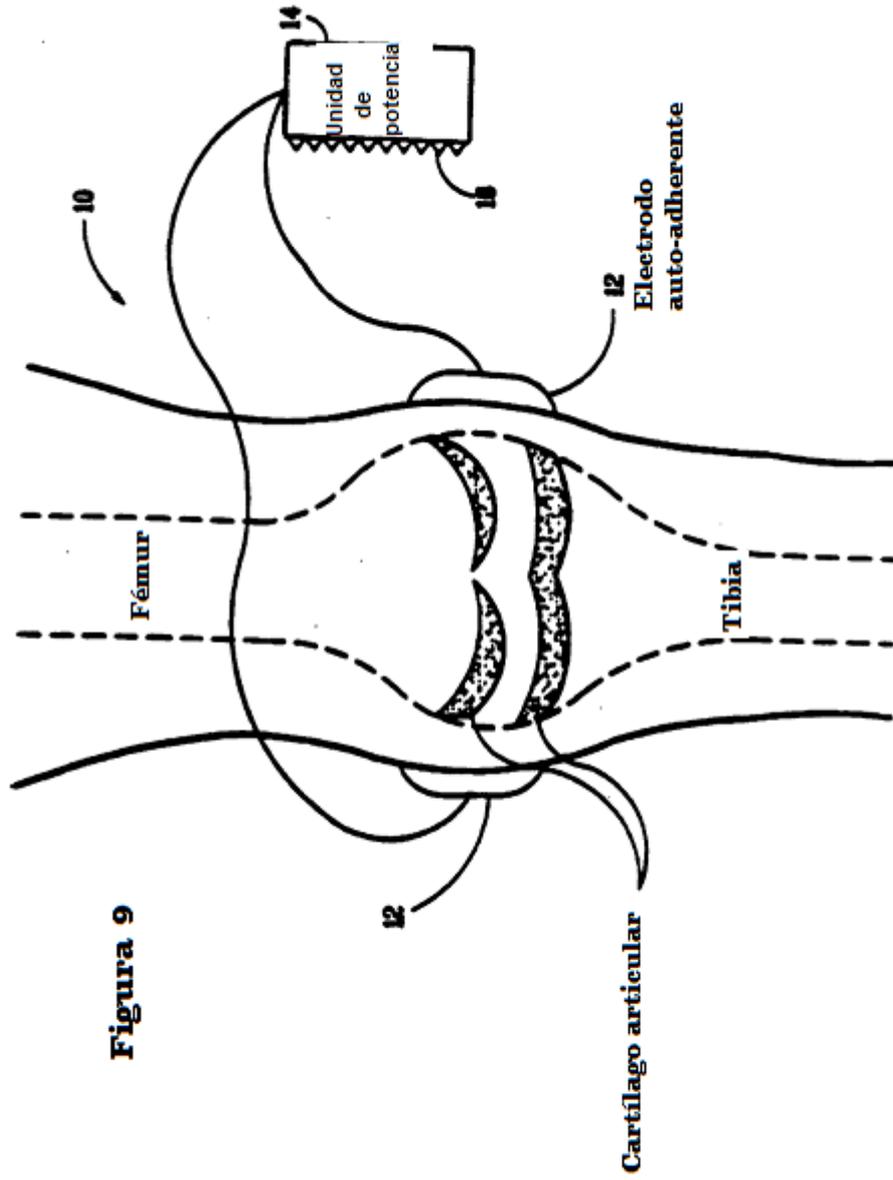


Figura 9