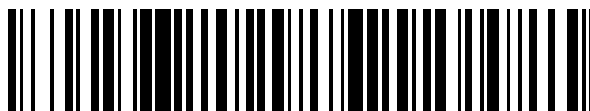


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 076**

51 Int. Cl.:

**A61N 1/32** (2006.01)

**A61N 1/40** (2006.01)

**C12N 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2003 PCT/US2003/030333**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2004 WO04029210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2003 E 03798741 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 1560553**

54 Título: **Regulación de la expresión de genes Aggrecaan usando señales eléctricas y electromagnéticas específicas y selectivas**

30 Prioridad:

**26.09.2002 US 255241**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)  
3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200  
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**BRIGHTON, CARL, T.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 622 076 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).

## Regulación de la expresión de genes Aggreca usando señales eléctricas y electromagnéticas específicas y selectivas

### Descripción

#### Campo de la invención

[0001] La presente invención está dirigida a un dispositivo de regulación de la expresión de genes de Aggreca en las células del cartílago mediante la aplicación de campos generados por señales eléctricas y electromagnéticas específicas y selectivas para el tratamiento de cartílago articular lesionado o enfermo.

#### Antecedentes de la invención

[0002] Las interacciones bioeléctricas y actividad que se cree que está presente en una variedad de células y tejidos biológicos son uno de los procesos menos entendidos de los procesos fisiológicos. Sin embargo, recientemente ha habido mucha investigación en estas interacciones y actividades relacionadas con el crecimiento y la reparación de ciertos tejidos y células. En particular, ha habido mucha investigación sobre la estimulación por campos eléctricos y electromagnéticos y su efecto sobre el crecimiento y reparación de hueso y cartílago. Los investigadores creen que tal investigación podría ser útil en el desarrollo de nuevos tratamientos para una variedad de problemas médicos.

[0003] La osteoartritis, también conocida como enfermedad degenerativa de las articulaciones, se caracteriza por la degeneración del cartílago articular, así como la proliferación y remodelación del hueso subcondral. Los síntomas habituales son rigidez, limitación del movimiento y dolor. La osteoartritis es la forma más común de artritis, y las tasas de prevalencia aumentan notablemente con la edad. Se ha demostrado que los pacientes ancianos con osteoartritis autoinformada visitan a los médicos dos veces más frecuentemente que los no afectados. Estos pacientes también experimentan más días de restricción de actividad y de confinamiento en la cama en comparación con otros de su grupo de edad. En un estudio, la mayoría de los pacientes sintomáticos quedaron significativamente discapacitados durante un período de 8 años de seguimiento. Massardo et al., Ann Rheum Dis. 48: 893-7 (1989).

[0004] Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) siguen siendo la modalidad de tratamiento primario para la osteoartritis. Se desconoce si la eficacia de los AINE depende de sus propiedades analgésicas o antiinflamatorias o de la ralentización de los procesos degenerativos en el cartílago. También existe la preocupación de que los AINE sean perjudiciales para los pacientes. Por ejemplo, los AINE tienen efectos tóxicos bien conocidos en el estómago, el tracto gastrointestinal, el hígado y el riñón. Sin embargo, la aspirina inhibe la síntesis de proteoglicanos y los procesos normales de reparación cartilaginosa en animales. Un estudio en seres humanos sugirió que la indometacina podría acelerar la descomposición del cartílago de la cadera. Todos los efectos adversos aparecen más comúnmente en los ancianos, la población más susceptible a la osteoartritis.

[0005] En la enfermedad conocida comúnmente como osteoporosis, un hueso se desmineraliza y se vuelve anormalmente enrarecido. El hueso comprende un componente orgánico de células y matriz así como un componente inorgánico o mineral. Las células y la matriz comprenden un almacén de fibras colágenas que está impregnado con el componente mineral de fosfato de calcio (85%) y carbonato de calcio (10%) que imparte rigidez al hueso. Mientras que se considera generalmente que la osteoporosis afecta a los ancianos, ciertos tipos de osteoporosis pueden afectar a personas de todas las edades cuyos huesos no están sujetos a estrés funcional. En estos casos, los pacientes pueden experimentar una pérdida significativa de hueso cortical y esponjoso durante periodos prolongados de inmovilización. Se sabe que los pacientes ancianos experimentan pérdida ósea debido al desuso cuando se inmovilizan después de la fractura de un hueso, lo que puede conducir en última instancia a una fractura secundaria en un esqueleto ya osteoporótico. La disminución de la densidad ósea puede conducir al colapso de las vértebras, fracturas de caderas, brazos, muñecas, tobillos, así como dolores incapacitantes. Se necesitan terapias alternativas no quirúrgicas para estas enfermedades.

[0006] Campos electromagnéticos pulsados (CEMP) y acoplamiento capacitivo (AC) se han utilizado ampliamente para el tratamiento de fracturas que no cicatrizan y los problemas relacionados con la curación del hueso desde la aprobación de la Administración de Alimentos y Fármacos en 1979. La base original para esta forma de terapia era la observación de que el estrés físico en el hueso causaba la aparición de pequeñas corrientes eléctricas que se pensaba que, junto con la deformación mecánica, eran los mecanismos subyacentes a la transducción de las tensiones físicas en una señal que promueve la formación ósea. Junto con la estimulación directa del campo eléctrico que tuvo éxito en el tratamiento de no unión, tecnologías no invasivas, utilizando PEMF y acoplamiento capacitivo (donde los electrodos se colocan sobre la piel en la zona de tratamiento) eran efectivas. Los campos electromagnéticos pulsados generan pequeñas corrientes inducidas (corrientes de Faraday) en el fluido extracelular altamente conductor, mientras que el acoplamiento capacitivo provoca directamente corrientes en los tejidos; Tanto PEMFs como AC imitan las corrientes eléctricas endógenas.

[0007] Se ha demostrado que las corrientes eléctricas endógenas, que originalmente se creía que se debían a fenómenos que ocurren en la superficie de los cristales en el hueso, se deben primordialmente al movimiento de electrolitos que contienen fluidos en los canales de los huesos que contienen constituyentes orgánicos con cargas

negativas fijas, generando lo que se llama "potenciales de transmisión". Los estudios de los fenómenos eléctricos en el cartílago han demostrado un mecanismo mecánico-eléctrico de transducción que se asemeja a los descritos en el hueso, que aparecen cuando el cartílago se comprime mecánicamente, provocando el movimiento de fluidos y electrolitos sobre la superficie de cargas negativas fijas en los proteoglicanos y colágeno en la matriz del cartílago. Estos potenciales de flujo, al parecer, cumplen una función en el cartílago similar a la del hueso y, junto con la deformación mecánica, conducen a la transducción de señales que es capaz de estimular la síntesis de condrocitos de los componentes de la matriz.

**[0008]** La principal aplicación de corriente directa, acoplamiento capacitivo, y PEMF 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., J AMA 247: 623 - 8 (1982). Se han notado respuestas clínicas en la necrosis avascular de caderas en adultos y en la enfermedad de Legg-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 Pediatrics Orthop 4: 579 - 84 (1984). También se ha demostrado que los PEMF (Mooney, Spine, 15: 708-712, 1990) y el acoplamiento capacitivo (Goodwin, Brighton et al., Spine, 24: 1349 - 1356, 1999) pueden aumentar significativamente la tasa de éxito de fusiones lumbares. También se ha notado un aumento de la regeneración y función de los nervios periféricos y promoción de la angiogénesis. Bassett, Bioensays 6: 36 - 42 (1987). Los pacientes con tendinitis persistente del manguito rotador frente a la inyección de esteroides y otras medidas convencionales, mostraron un beneficio significativo en comparación con los pacientes tratados con placebo. Binder et al., Lancet 695 - 8 (1984). Finalmente, Brighton et al. han demostrado en ratas la capacidad de un campo eléctrico de acoplamiento capacitivo apropiado para prevenir y revertir la osteoporosis vertebral en la columna lumbar (Brighton et al., J. Orthop Res. 6: 676-684, 1988; Brighton et al., J. Bone and Joint Surgery, 71: 228 - 236, 1989).

**[0009]** Más recientemente, la investigación en esta área se ha centrado en los efectos que ha tenido la estimulación en tejidos y células. Por ejemplo, se ha conjeturado que las corrientes directas no penetran las membranas celulares y que el control se logra a través de la diferenciación de la matriz extracelular. Grodzinsky, Crit. Rev. Biomed. Engng 9: 133 (1983). A diferencia de las corrientes directas, se ha notado que los PEMF pueden penetrar en las membranas celulares y estimularlas o afectar directamente a los organelos intracelulares. Un examen del efecto de la PEMF sobre matrices extracelulares y osificación endocondral *in vivo* encontró un aumento de la síntesis de moléculas de cartílago y la maduración de las trabéculas del hueso. Aaron et al., J. Bone Miner. Res. 4: 227 - 233 (1989). Más recientemente, Lorch, Brighton et al. notaron (Clin Orthop and Related Research 350: 246-256, 1998) que la transmisión de señales de una señal eléctrica acoplada capacitivamente se realiza a través de canales de calcio bloqueados por voltaje, lo que conduce a un aumento en el calcio citosólico con un aumento subsiguiente en calmodulina activada (citoesqueleto).

**[0010]** Muchas investigaciones se han dirigido al estudio del cultivo de tejidos con el fin de comprender los mecanismos de respuesta. En un estudio, se encontró que los campos eléctricos aumentaron la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en el ADN de los condrocitos, apoyando la noción de que flujos de Na y de Ca<sup>2+</sup> generados por la síntesis de ADN gatillo de estimulación eléctrica. Rodan et al., Science 199: 690 - 692 (1978). Los estudios han encontrado cambios en el segundo mensajero, AMPc y reordenamientos citoesqueléticos debido a perturbaciones eléctricas. Ryaby et al., Trans. BRAGS 6: (1986); Jones et al., Trans. BRAGS 6: 51 (1986); Brighton y Townsend, J. Orthop. Res. 6: 552-558, 1988. Otros estudios han encontrado efectos sobre glicosaminoglicano, sulfatación, ácido hialurónico, actividad de lisozima y secuencias de polipéptidos. Norton et al., J. Orthop. Res. 6: 685 - 689 (1988); Goodman et al., Proc. Natn. Acad. Sci. USA 85: 3928 - 3932 (1988).

**[0011]** Se informó en 1996 por los presentes inventores que una cepa mecánica cíclica biaxial del 0,17% produce un aumento significativo de ARNm TGF- $\beta_1$  en células óseas MC3T3-E1 cultivadas. Brighton et al., Biochem. Biophys. Res. Común. 229: 449 - 453 (1996). Varios estudios significativos siguieron en 1997. En un estudio se informó de que la misma cepa mecánica cíclica biaxial del 0,17% produce un aumento significativo de PDGF A-ARNm en células óseas similares. Brighton et al., Biochem. Biophys. Res. Comun. 43: 339 - 346 (1997). También se informó de que un campo eléctrico de 60 kHz capacitivamente acoplado de 20 mV/cm produjo un aumento significativo de TGF- $\beta_1$  en células óseas similares. Brighton et al., Biochem. Biophys. Res. Comun. 237: 225 - 229 (1997). Sin embargo, el efecto que tal campo tendría sobre otros genes no ha sido reportado en la literatura.

**[0012]** En el documento WO 01/62336 titulado "regulación de genes por aplicación de señales electromagnéticas y eléctricas específicas y selectivas," métodos se describieron para la determinación de las señales electromagnéticas y eléctricas específicas y selectivas para su uso en la creación de campos para regular genes diana de tejidos enfermos o lesionados. La presente invención se basa en la técnica descrita en la misma mediante la regulación de una expresión génica dirigida, a saber, la expresión génica de agregano, mediante la aplicación de un campo generado por una señal eléctrica y electromagnética específica y selectiva, para el tratamiento de la enfermedad del cartílago (artritis), y defectos del cartílago. **[0013]** El documento WO 01/62336 muestra un dispositivo según el preámbulo de la reivindicación 1.

**Resumen de la invención**

[0014] La presente invención proporciona un dispositivo como se define en la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes definen realizaciones preferidas. Aspectos, realizaciones y ejemplos de la presente descripción que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención. Una señal "específica y selectiva" es una señal que tiene características predeterminadas de amplitud, duración, ciclo obligatorio, frecuencia y forma de onda que regula positivamente la expresión del gen *agrecano* (especificidad). Esto permite elegir diferentes señales para aumentar la regulación de las expresiones génicas *Aggrecan* con el fin de lograr una determinada respuesta biológica o terapéutica (selectividad).

[0015] También se describe la metodología para determinar la señal "específica y selectiva" para el gen *Aggrecan* variando metódicamente la duración de una señal de partida conocida para aumentar o susceptible de aumentar la producción celular de *agrecano*. Después de seleccionar la duración óptima, la amplitud de la señal se varía durante la duración óptima del tiempo determinada por la expresión génica del *agrecano*. El ciclo de trabajo, la frecuencia y la forma de onda varían metódicamente manteniendo constantes las otras características de la señal. Este proceso se repite hasta que se determina la señal óptima que produce el mayor incremento en la expresión de *agrecano*.

[0016] Estos y otros aspectos de la presente invención se detallarán en la siguiente descripción detallada de la invención.

**Breve descripción de los dibujos**

[0017] La presente invención será evidente a partir de la siguiente descripción detallada de la invención tomada en conjunción con los dibujos adjuntos, de los cuales:

La **Figura 1** es una representación gráfica de la expresión de ARNm de *agrecano* cuando los condrocitos de cartílago articular están expuestos a un campo eléctrico de 20 mV/cm capacitivamente acoplado por varias duraciones de tiempo. Como se indica, la producción óptima de ARNm de *agrecano* se produjo con una señal de 30 minutos de duración.

La **Figura 2** es una representación gráfica de la expresión de ARNm de *agrecano* cuando los condrocitos de cartílago articular están expuestos a diversas amplitudes de un campo capacitivamente acoplado de una duración de 30 minutos. Como se indica, la producción óptima de ARNm de *agrecano* se produjo con una señal que produjo una amplitud de campo eléctrico de 10-20 mV/cm.

La **Figura 3** es una representación gráfica de la expresión de ARNm de *agrecano* cuando condrocitos de cartílago articular se exponen a un campo eléctrico capacitivamente acoplado de varios ciclos de trabajo con una duración de 30 minutos (en tiempo) a una amplitud de campo eléctrico de 20 mV/cm. Como se indica, el ciclo de trabajo óptimo es del 50%.

La **Figura 4** es una representación gráfica de los condrocitos de cartílago articular expuestos a un campo eléctrico capacitivamente acoplado de varias frecuencias de duración de 30 minutos (en tiempo) a una amplitud de campo eléctrico de 20 mV/cm con un ciclo de trabajo del 50%. Como se indica, la frecuencia óptima es de 60 kHz.

La **Figura 5** es una representación gráfica de los condrocitos de cartílago articular cultivados durante 7 días en cultivo y después expuestos al campo eléctrico óptimo acoplado capacitivamente de 20 mV/cm, ciclo de trabajo 50% (duración de 30 minutos en tiempo), a una frecuencia de 60 kHz, y una configuración de onda sinusoidal. Interleuquina no estaba presente en los medios de los cultivos y, como se ha indicado, la hexosamina mostró un aumento de 3,5 veces.

La **Figura 6** es una representación gráfica de los condrocitos de cartílago articular cultivados durante 7 días y expuestos al campo eléctrico óptimo acoplado capacitivamente de 20/cm, ciclo de trabajo mV 50% (30 minutos de duración en el tiempo), a una frecuencia de 60 kHz, y una configuración de onda sinusoidal. Interleucina (10 ug/ml) o se añadió IL-1 a los medios en el día 7. Como se indica, hexosamina mostró un aumento de 3,5 veces a pesar de la presencia de interleuquina en los medios de los cultivos.

La **Figura 7** es un diagrama que ilustra un dispositivo para el tratamiento de osteoartritis de la rodilla, de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención.

**Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención**

[0018] La invención se describirá en detalle a continuación con referencia a las **Figuras 1-7**. Los expertos en la técnica apreciarán que la descripción que se da en la presente memoria con respecto a esas figuras es sólo a título de ejemplo y no pretende en modo alguno limitar el alcance de la invención. Todas las preguntas relacionadas con el alcance de la invención pueden resolverse haciendo referencia a las reivindicaciones adjuntas.

[0019] La presente invención se basa en el descubrimiento de que la expresión de ciertos genes puede regularse mediante la aplicación de campos generados por señales eléctricas y/o electromagnéticas específicas y selectivas. En otras palabras, se ha descubierto por los presentes inventores que existe una señal eléctrica y/o electromagnética específica que genera un campo para regular cada gen en células de hueso, cartílago y otros tejidos y que estas señales específicas son capaces de regular específicamente y selectivamente los genes en

dichas células. En particular, la expresión génica que controla el crecimiento, el mantenimiento, la reparación y la degeneración o deterioro de tejidos o células puede regularse de acuerdo con la invención mediante la aplicación de campos generados por señales eléctricas y/o electromagnéticas específicas y selectivas para producir un efecto clínico saludable. Tales descubrimientos son útiles en el desarrollo de métodos de tratamiento que se dirigen a ciertas afecciones médicas incluyendo fracturas y defectos óseos, osteoartritis, osteoporosis, cáncer y otras enfermedades, así como para el desarrollo de dispositivos que emplean tales métodos.

**[0020]** Como se usa en el presente documento, la frase "señal" se utiliza para referirse a una variedad de señales incluyendo señales mecánicas, señales de ultrasonido, señales electromagnéticas y las señales de salida eléctrica por un dispositivo. Debe entenderse que el término "campo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un campo eléctrico dentro del tejido diana, ya sea un campo combinado o un campo electromagnético pulsado o generado por corriente directa, acoplamiento capacitivo o acoplamiento inductivo.

**[0021]** La frase "a distancia" se usa para significar actuar, actuado o controlado a distancia. La regulación "remota" se refiere al control de la expresión de un gen a distancia. Proporcionar "remotamente" se refiere a 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 a una distancia del tejido o de una célula o desde una fuente externa o externa al cuerpo.

**[0022]** La frase señal "específica y selectiva" significa una señal que produce un campo eléctrico que tiene características de amplitud predeterminadas, duración, ciclo de trabajo, frecuencia y forma de onda que aumentan o disminuyen un gen diana o se dirigió a genes funcionalmente complementarios (especificidad). Esto permite elegir diferentes señales "específicas y selectivas" para regular o regular negativamente diversas expresiones génicas con el fin de lograr una determinada respuesta biológica o terapéutica (selectividad).

**[0023]** El término "regular" significa controlar la expresión génica. Por regular se entiende la inclusión tanto de la regulación hacia arriba como la regulación hacia abajo. Regular hacia arriba significa aumentar la expresión de un gen, mientras que regular hacia abajo significa inhibir o prevenir la expresión de un gen.

**[0024]** "Funcionalmente complementario" se refiere a dos o más genes cuyas expresiones son complementarios o sinérgicos en una célula o tejido dado.

**[0025]** "Tejido" se refiere a un agregado de células junto con sus sustancias extracelulares que forman uno de los materiales estructurales de un paciente. Como se usa en la presente memoria, el término "tejido" pretende incluir tejido de músculo y órgano así como tejido de hueso o cartílago. Además, el término "tejido" tal como se utiliza en la presente memoria también puede referirse a una célula individual.

**[0026]** "Paciente" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

**[0027]** La presente invención proporciona dispositivos que se dirigen a ciertos tejidos, células o enfermedades. En particular, la expresión génica asociada con el proceso de reparación en tejidos o células dañadas o enfermas puede regularse por la aplicación de campos generados por señales eléctricas que son específicas y selectivas para que los genes se regulen en los tejidos o células diana. La expresión génica puede regularse hacia arriba o regularse hacia abajo mediante la aplicación de señales que son específicas y selectivas para cada gen o cada conjunto de genes complementarios con el fin de producir un efecto clínico beneficioso. Por ejemplo, una señal particular y selectiva particular puede crear un campo eléctrico que regule una determinada expresión génica deseable, mientras que la misma u otra señal específica y selectiva particular puede crear un campo eléctrico que regule hacia abajo una cierta expresión génica deseable. Un cierto gen puede regularse hacia arriba por un campo generado por una señal específica y selectiva y regularse hacia abajo por un campo generado por otra señal específica y selectiva. Los expertos en la técnica entenderán que ciertos tejidos enfermos o lesionados pueden ser objeto de tratamiento mediante la regulación de los genes que gobiernan el crecimiento, el mantenimiento, la reparación y la degeneración o deterioro de los tejidos.

**[0028]** Los dispositivos de la presente invención se basan en la identificación de aquellas señales que generen campos que son específicos y selectivos para la expresión de genes asociados con cierto tejido enfermo o lesionado específico. Por ejemplo, la electricidad en sus diversas formas (por ejemplo, acoplamiento capacitivo, acoplamiento inductivo, campos combinados) puede regular específicamente y selectivamente la expresión de genes en tejidos o células diana en el cuerpo de un paciente variando la frecuencia, la amplitud, la forma de onda o ciclo de trabajo del campo aplicado para cada gen seleccionado. La duración del tiempo expuesto a la electricidad también puede influir en la capacidad de la electricidad para regular específicamente y selectivamente la expresión de genes en los tejidos o células diana en el cuerpo de un paciente. Las señales específicas y selectivas pueden generar campos eléctricos para la aplicación sistemática de cada gen hasta que se encuentre la combinación apropiada de frecuencia, amplitud, forma de onda, ciclo de trabajo y duración que proporcione el efecto deseado sobre la expresión génica.

**[0029]** Se ha de entender que una variedad de tejidos enfermos o lesionados o estados de enfermedad pueden ser objeto de tratamiento debido a que la especificidad y selectividad de un campo eléctrico para una determinada

expresión génica puede ser influenciada por varios factores. En particular, un campo eléctrico de frecuencia, amplitud, forma de onda y/o ciclo de trabajo apropiados puede ser específico y selectivo para la expresión de ciertos genes y proporcionar así tratamientos específicos. Los factores temporales (por ejemplo, la duración del tiempo expuesto al campo eléctrico) también pueden influir en la especificidad y selectividad de un campo eléctrico para una expresión génica particular. La regulación de la expresión génica puede ser más eficaz (o posible) a través de la aplicación de un campo eléctrico durante un tiempo determinado. Por lo tanto, los expertos en la técnica comprenderán que la presente invención se destina a variar la frecuencia, la amplitud, la forma de onda, el ciclo de trabajo y/o la duración de la aplicación de un campo eléctrico hasta que se compruebe que el campo eléctrico es específico y selectivo para ciertas expresiones génicas con el fin de proporcionar tratamientos dirigidos a una variedad de tejidos o enfermedades enfermas o lesionadas.

**[0030]** Así, la presente invención puede destinarse a tratamientos específicos porque es posible regular la expresión de ciertos genes asociados con un tejido enfermo o lesionado particular a través de la aplicación de campos generados por señales específicas y selectivas de frecuencia apropiada, amplitud, forma de onda y/o ciclo de trabajo durante un período de tiempo apropiado. La especificidad y la selectividad de una señal que genera un campo eléctrico pueden influenciarse así para regular la expresión de ciertos genes con el fin de dirigir ciertos tejidos o estados enfermos o lesionados para el tratamiento. En particular, la presente invención proporciona el tratamiento dirigido de la osteoartritis, la artritis reumatoide, las lesiones del cartílago y los defectos del cartílago.

**[0031]** La presente invención también proporciona un dispositivo que incluye una fuente de al menos una señal específica y selectiva para la expresión génica de agregano. Los dispositivos de la presente invención pueden proporcionar la producción de tales señales para su aplicación a células de cartílago mediante al menos un electrodo adaptado para aplicar el campo generado por la señal específica y selectiva.

**[0032]** El dispositivo de la presente invención es capaz de aplicar un campo generado por señales específicas y selectivas directamente al tejido enfermo o lesionado 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 de tejido enfermo o lesionado), aunque se apreciará que los dispositivos acoplados capacitivamente deben tocar la piel. El dispositivo de la presente invención puede incluir medios para unir los electrodos al cuerpo de un paciente en las proximidades de tejido lesionado o enfermo. Por ejemplo, electrodos conductores de auto-adherente pueden estar unidos a la piel del paciente en ambos lados de una articulación de rodilla que padece osteoartritis, como se muestra en la **Figura 7**. Como también se muestra en la **Figura 7**, el dispositivo 10 de la presente invención puede incluir electrodos de auto-adherente 12 para unir el dispositivo 10 en el 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 VELCRO® 16 en el lado inverso de tal manera que la unidad de potencia 14 se pueda unir a una correa VELCRO® (no mostrada) ajustada alrededor de la pantorrilla, el muslo o la cintura del paciente.

**[0033]** El dispositivo 10 de la presente invención se pueden emplear en una variedad de maneras. El dispositivo 10 puede ser portátil o puede estar temporalmente o permanentemente unido al cuerpo de un paciente. El dispositivo 10 de la presente invención es preferiblemente 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 el contacto con la piel de un paciente para la aplicación de campos generados por las señales específicas y selectivas predeterminadas. Tales señales pueden aplicarse también a través de bobinas en las que fluyen corrientes variables en el tiempo, produciendo campos electromagnéticos específicos y selectivos que penetran en el tejido. El dispositivo 10 de la presente invención también puede ser capaz de implantación en un paciente, incluyendo la implantación bajo la piel de un paciente.

**[0034]** El siguiente ejemplo ilustrará que la presente invención puede destinarse al crecimiento y reparación del cartílago. El crecimiento y reparación del cartílago puede estimularse mediante señales específicas y selectivas para la regulación de la expresión de agregano en las células del cartílago para estimular la reparación del cartílago en pacientes con osteoartritis. En particular, la presente invención puede proporcionar la regulación ascendente de genes de agregano que reparan el cartílago. Una variedad de células de cartílago puede ser atacada por los métodos de la presente invención incluyendo condrocitos articulares e incluyendo cartílago articular, cartílago hialino y cartílago de placa de crecimiento.

**[0035]** El ejemplo siguiente ilustra además que la presente invención prevé la regulación de la expresión génica en condrocitos articulares. Por ejemplo, en el ejemplo siguiente, 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. Una incorporación estadísticamente significativa de <sup>35</sup>SO<sub>4</sub>/ug de ADN (lo que indica una síntesis de proteoglicanos significativa) se encontró después de sólo 0,5 horas de estimulación. Se repitió un experimento idéntico y se monitorizaron los niveles de ARNm de agregano, el mensajero para el proteoglicano del cartílago principal. Después de sólo 0,5 horas de estimulación eléctrica, hubo un aumento significativo (casi 100%) en ARNm de agregano. En consecuencia, los factores temporales pueden influir en la especificidad y selectividad de una señal que genera campos eléctricos para regular la expresión génica en condrocitos articulares.

[0036] Los expertos en la técnica entenderán que una variedad de otras enfermedades de cartílago y lesiones pueden ser objeto de tratamiento a través de la presente invención.

5 [0037] Los expertos en la técnica entenderán además que los dispositivos de la presente invención pueden proporcionarse en una variedad de formas, incluyendo una unidad de potencia acoplada capacitivamente con múltiples señales específicas y selectivas conmutables programadas para aplicación a un par o a múltiples pares de electrodos, bobinas electromagnéticas unidas a una unidad de potencia con señales conmutables múltiples y selectivas. En términos generales, la preferencia del dispositivo se basa en la aceptación del paciente y la conformidad del paciente. La unidad más pequeña y más portátil disponible en la técnica en la actualidad es una  
10 unidad de acoplamiento capacitiva; Sin embargo, los pacientes con piel extremadamente sensible pueden preferir el uso de unidades de acoplamiento inductivo.

### **Ejemplo**

15 [0038] La invención se demuestra en el siguiente ejemplo, el cual es para fines de ilustración y no se pretende limitar el alcance de la presente invención.

### **Materiales y métodos**

20 [0039] Cultivos de condrocitos se prepararon a partir de cartílago articular fetal bovino. Los condrocitos ( $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) se sembraron en placas de Cooper especialmente modificadas. Las células se hicieron crecer hasta siete días con el medio cambiado justo antes del comienzo de la condición experimental. Los cultivos celulares experimentales a lo largo de estos estudios se sometieron a un campo eléctrico de señal de onda sinusoidal de 60 kHz acoplado capacitivamente con una salida de 44,81 voltios pico a pico. Esto produjo una intensidad de campo  
25 calculada en el medio de cultivo en las placas de 20 mV/cm con una densidad de corriente de 300  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>. Las cápsulas de cultivo de células de control eran idénticas a las de las placas estimuladas excepto que los electrodos no estaban conectados a un generador de funciones.

30 [0040] El ARN total se aisló utilizando TRIzol, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se realizó transcripción inversa usando transcriptasa inversa de SuperScript II. Los cebadores de oligonucleótidos que se utilizarán en la técnica de PCR competitiva se seleccionaron de las secuencias de ADNc publicadas. El análisis cuantitativo de los productos de PCR se realizó con el software ScionImage.

35 [0041] La señal óptima para la regulación génica deseada se encontró sistemáticamente de la siguiente manera. Se toma como señal de partida para determinar la señal específica para generar el campo para la expresión génica (ARNm) de esa proteína una señal eléctrica que se sabe que aumenta (o incluso se sospecha que aumenta) la producción celular de una proteína dada. Una curva de dosis-respuesta se realiza primero mediante la variación de la duración de la señal mientras que se mantienen constantes todas las características de la señal (amplitud, ciclo de servicio, frecuencia y forma de onda) (Figura 1). Esto determina la duración óptima de la señal de partida para la  
40 expresión génica de esa proteína. Se realiza una segunda curva de dosis-respuesta variando la amplitud del campo para la duración óptima del tiempo (Figura 2). Esto determina la amplitud óptima del campo para la duración óptima del tiempo determinada por la expresión génica de la proteína de interés. Se realiza una tercera curva de dosis-respuesta, variando esta vez el ciclo de servicio del 100% (constante) al 1% o menos mientras que se mantiene constante la amplitud óptima y otras características de la señal (Figura 3). Una respuesta a la dosis se repite una  
45 cuarta vez (frecuencia variable) (Figura 4) y una quinta vez (forma de onda variable) manteniendo constante la otra característica de la señal. Mediante este método se determina una señal óptima para producir el mayor incremento en la expresión génica de la proteína de interés.

50 [0042] La expresión de proteínas se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica, tal como la PCR de transcriptasa inversa, análisis de Northern, inmunoensayos, y similares.

### **Producción de agrecano por condrocitos articulares**

55 [0043] Condrocitos articulares fueron expuestos a un campo eléctrico capacitivamente acoplado de 20 mV/cm a 60 kHz. Los resultados se ilustran en las Figuras 1-4.

La Figura 1 es una representación gráfica de la expresión de ARNm de agrecano cuando los condrocitos de cartílago articular (attomol por  $\mu$ l) se exponen a un campo eléctrico 20 mV/cm acoplado capacitivamente para el  
60 varias duraciones de tiempo (0,5, 2, 6, y 24 horas). Tal como se indica, la producción óptima de ARNm de agrecano (un aumento de casi dos veces) se produjo con una señal de duración de 30 minutos.

La Figura 2 es una representación gráfica de la expresión de ARNm de agrecano cuando condrocitos de cartílago articular (attomol por  $\mu$ l) están expuestos a diversas amplitudes (1, 5, 10, 20, y 40 mV/cm) de un campo acoplado capacitivamente de 30 minutos de duración. Tal como se indica, la producción óptima de ARNm de  
65 agrecano ocurrió con una señal que produce una amplitud de campo eléctrico de 10-20 mV/cm.

La Figura 3 es una representación gráfica de la expresión de ARNm de agrecano cuando condrocitos de cartílago articular (attomol por  $\mu$ l) se exponen a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de diversos ciclos

de trabajo (6,7%, 12,5%, 50%, 75% y 100%) con una duración de 30 minutos (a tiempo) a una amplitud de campo eléctrico de 20 mV/cm. Como se indica, el ciclo de trabajo óptimo es 50%.

La **Figura 4** es una representación gráfica de los condrocitos de cartílago articular (attomol por  $\mu\text{l}$ ) expuestos a un campo eléctrico acoplado capacitivamente de varias frecuencias (30 kHz, 60 kHz, y 120 kHz) de una duración de 30 minutos (en el tiempo) en una amplitud de campo eléctrico de 20 mV/cm con un ciclo de trabajo del 50%. Tal como se ha indicado, la frecuencia óptica es 60 kHz.

La **Figura 5** es una representación gráfica de condrocitos de cartílago articular cultivados durante 7 días en cultivo y a continuación se exponen al campo eléctrico óptimo acoplado capacitivamente de 20 mV/cm, ciclo de trabajo del 50% (duración de 30 minutos en el tiempo), a una frecuencia de 60 kHz, y una configuración de onda senoidal. Los condrocitos fueron expuestos a este campo durante 1 hora al día durante 7 días. Los condrocitos de control se cultivaron en las mismas condiciones pero no se expusieron a ninguna estimulación eléctrica. Ninguna interleuquina, una citoquina que degrada el cartílago articular, estaba presente en los medios de los cultivos. Como se indica en la Figura 5, hexosamina, una proteína cuya síntesis es estimulada y regulada por ARNm de agregano y es el principal constituyente de proteoglicano, mostró un aumento de 3,5 veces cuando se expone al campo eléctrico aplicado en comparación con los condrocitos de control que no fueron expuestos al campo eléctrico.

La **Figura 6** es una representación gráfica de los condrocitos de cartílago articular cultivados durante 7 días, después se expuso al campo eléctrico óptimo acoplado capacitivamente de 20 mV/cm, ciclo de trabajo de 50% (duración de 30 minutos en el tiempo), a una frecuencia de 60 kHz, y una configuración de onda senoidal. Interleucina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) o IL- $\gamma$  se añadió a los medios en el día 7. Los condrocitos fueron expuestos a este campo durante 1 hora por día durante 7 días. Condrocitos de control se cultivaron bajo las mismas condiciones con interleucina en los medios, pero no se expusieron a ninguna estimulación eléctrica. Como se indica en la **Figura 6**, a pesar de la presencia de interleuquina en los medios de los cultivos, hexosamina, una proteína cuya síntesis es estimulada y regulada por ARNm de agregano y es el principal constituyente de proteoglicano, todavía mostraron un aumento de 3,5 veces cuando se expusieron al campo eléctrico aplicado en comparación con los cultivos de control que no se expusieron al campo eléctrico.

La **Figura 7** ilustra un dispositivo 10 de acuerdo con la presente invención que se utiliza para tratar a un paciente con osteoartritis de la rodilla. Tal como se ilustra, dos electrodos circulares, auto-adherentes, conductivos blandos 12 se colocan sobre la piel a 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® 16 en el lado inverso de tal manera que la unidad de potencia 14 pueda estar unida a una correa de VELCRO® (no mostrada) montada alrededor de la pantorrilla, el muslo o la cintura. Los electrodos 12 pueden colocarse sobre la piel antes de que el paciente vaya a la cama cada noche o en cualquier otro momento conveniente. Por supuesto, también se pueden utilizar otros tipos adecuados de electrodos 12.

**[0044]** La unidad de potencia 14 es preferiblemente pequeña (por ejemplo, 6-8 onzas) y alimentada por una batería estándar de 9 voltios para emitir un pico a pico de 5 voltios, 6-10 mAmp, 20 mV/cm, señal de onda sinusoidal de 60 kHz a los electrodos 12 colocados en la piel. Cuando se proporciona esta señal de aproximadamente 30 minutos por día con el ciclo de trabajo adecuado (50%), se ha demostrado que regula significativamente hacia arriba los genes que codifican agregano. Este tratamiento debe evitar o minimizar el deterioro adicional del cartílago articular, así como sanar el cartílago articular que ya está dañado o degenerado.

**[0045]** El ejemplo descrito anteriormente demuestra que la expresión del gen de agregano puede regularse significativamente hacia arriba para aumentar la producción de proteoglicano en el cartílago articular así como para tratar la artritis (tanto la osteoartritis como la artritis reumatoide), lesiones del cartílago, y los defectos del cartílago. Proteoglicano, junto con colágeno de tipo II, es el principal constituyente del cartílago articular y se degrada y se destruye en las etapas iniciales del desarrollo de la artritis. La presente invención muestra claramente que el campo eléctrico óptimo descrito en el ejemplo puede regular el ARNm de agregano muy significativamente hacia arriba y, por lo tanto, incrementar la síntesis de proteoglicanos, incluso en presencia de IL- $\gamma$ . Los expertos en la técnica apreciarán que un campo eléctrico adecuado, como se describe aquí con acoplamiento capacitivo, también es igualmente eficaz con cualquier y todos los sistemas electromagnéticos que producen características de campo eléctrico equivalentes, o casi equivalentes. Los expertos en la técnica también apreciarán que características de señal más particularizadas pueden descubrirse a través de más experimentación con más datos (por ejemplo, un ciclo de trabajo de  $50\pm 3\%$  durante  $30\pm 3$  minutos), pero se cree que tales variaciones relativamente menores en cada una de las características de la señal están dentro del nivel de los expertos en la técnica, dada la información aquí descrita.

**[0046]** Los expertos en la técnica también apreciarán que otras numerosas modificaciones a la invención son posibles dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, el campo óptimo descrito en este documento puede ser aplicado a cualquier articulación a través de dos o más electrodos de superficie apropiados, en parejas o en tiras, incorporados en prendas de vestir, tirantes, envolturas, o moldes, y administrados por medio de acoplamiento capacitivo, acoplamiento inductivo (campos electromagnéticos), o campos combinados. De acuerdo con ello, no se pretende que el alcance de la invención esté limitado a la realización preferida descrita anteriormente, sino solamente por las reivindicaciones adjuntas.



**Reivindicaciones**

1. Un dispositivo para el tratamiento de la osteoartritis, la artritis reumatoide, lesión de cartílago y/o defectos de cartílago que comprenden:

5 una fuente de señal que genera al menos una señal específica y selectiva que tiene una configuración de onda sinusoidal y electrodos o bobinas conectadas a la fuente de señal para recibir al menos una señal específica y selectiva y que están operativamente dispuestos con respecto al tejido de cartílago diana, causando dichos electrodos o bobinas, tras la recepción de dicha al menos una señal específica y selectiva, la generación de un campo que tiene una amplitud de aproximadamente 10-20 mV/cm en el tejido de cartílago diana a 60 kHz, siendo dicho campo específico y selectivo para regular hacia arriba la expresión génica de ARNm en agregano en dicho tejido de cartílago diana, **caracterizándose porque:**

15 dicha fuente de señal está configurada para aplicar dicha al menos una señal específica y selectiva aplicada a dichos electrodos o bobinas con aproximadamente un ciclo de trabajo del 50% durante 30 ciclos de un minuto de encendido y un minuto de apagado, a fin de regular selectivamente hacia arriba la expresión génica de ARNm de agregano en dicho tejido de cartílago diana como resultado de la aplicación del campo específico y selectivo.

20 **2.** El dispositivo de la reivindicación 1 que comprende además una unidad de energía portátil que impulsa dicha fuente de señal.

25 **3.** El dispositivo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende además medios para la fijación de los electrodos o bobinas a un cuerpo de un paciente en la proximidad del tejido de cartílago.

**4.** El dispositivo de cualquier reivindicación precedente que comprende además medios para unir la fuente de señal a un cuerpo de un paciente.

30 **5.** El dispositivo de cualquier reivindicación precedente en el que el campo eléctrico generado por dichos electrodos o bobinas como respuesta a la aplicación de dicha al menos una señal específica y selectiva a dicho tejido de cartílago diana a través de uno de acoplamiento capacitivo y el acoplamiento inductivo.

35 **6.** El dispositivo de cualquier reivindicación precedente, en el que la fuente de señal está configurado para aplicar dicha al menos una señal específica y selectiva a dichos electrodos o bobinas una vez al día.

40

45

50

55

60

65

# DURACIÓN

ARNm AGRECANO

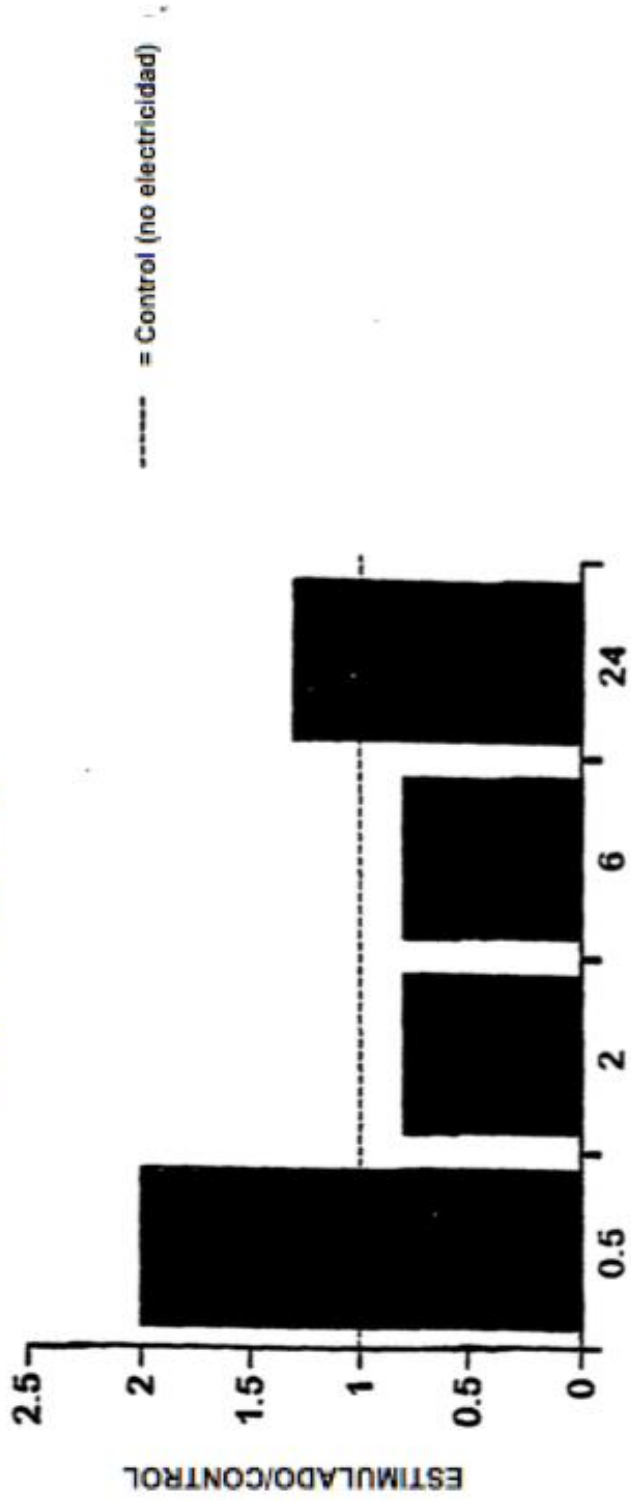


Figura 1

# AMPLITUD

ARNm AGRECANO

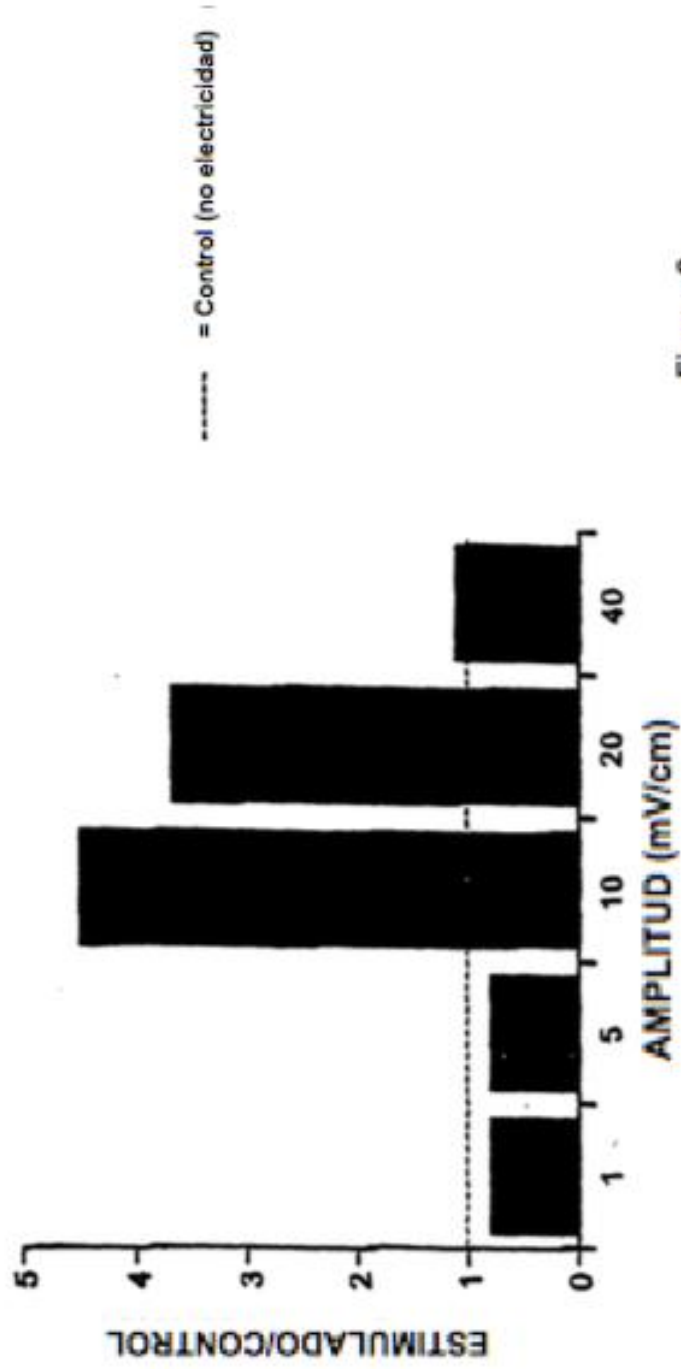
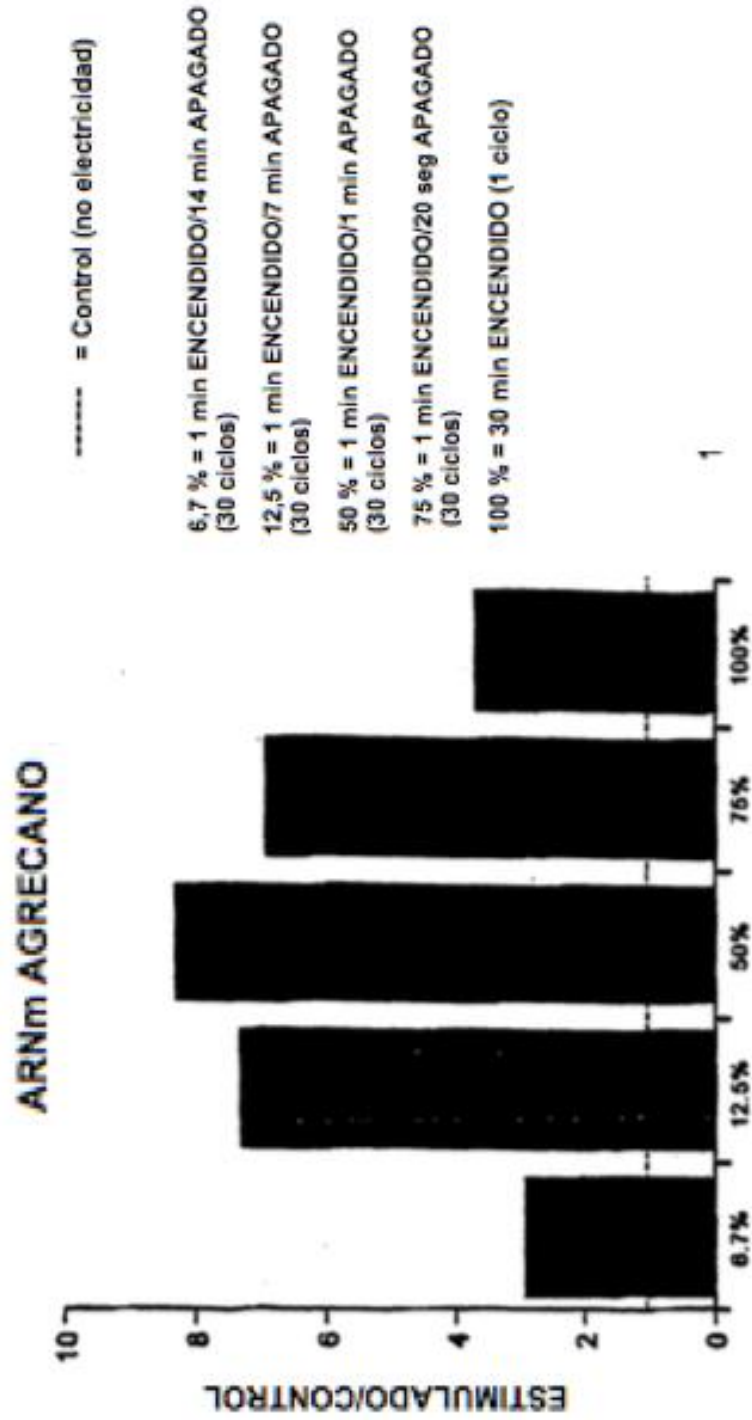


Figura 2

CICLOS DE TRABAJO



TIPOS DE CICLOS DE TRABAJO DE ESTIMULACIÓN DE 30 MIN

Figura 3

# FRECUENCIA

## ARNm AGREGANO

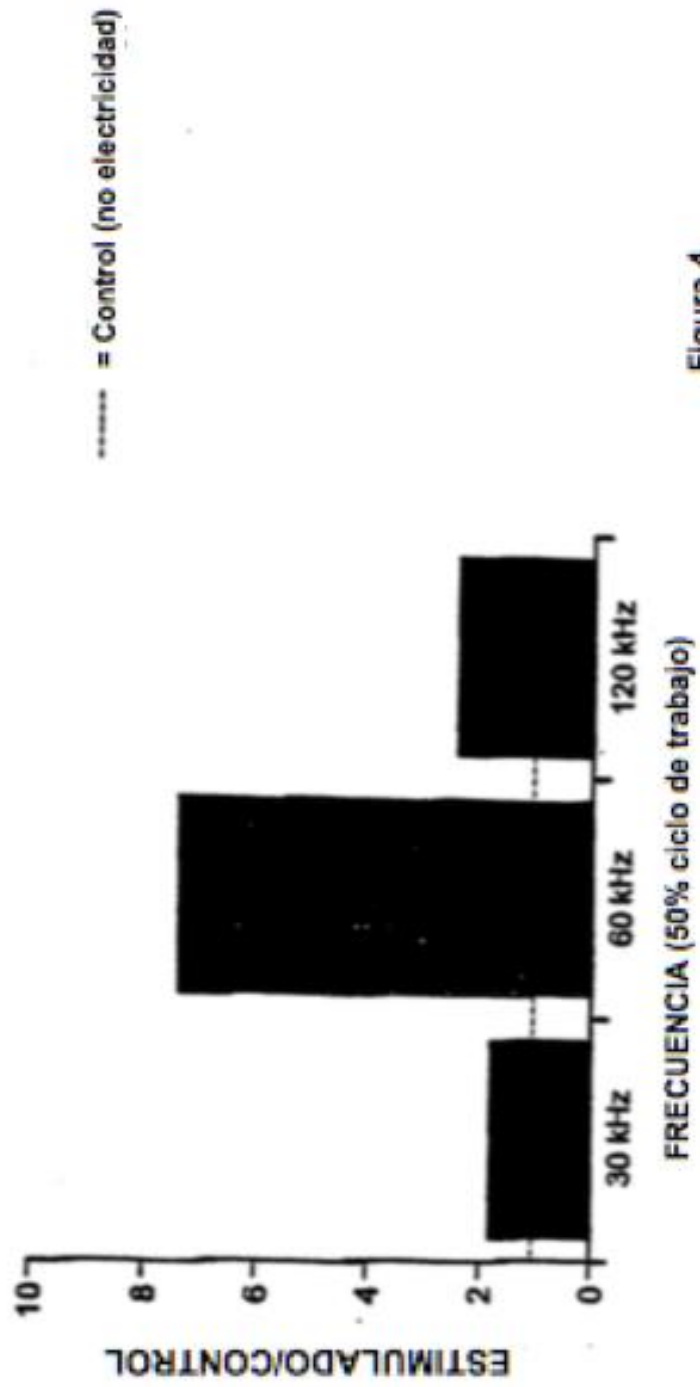


Figura 4

**PROTEOGLICANO (no Interleucina; 50% ciclo de trabajo; 1 h/día)**

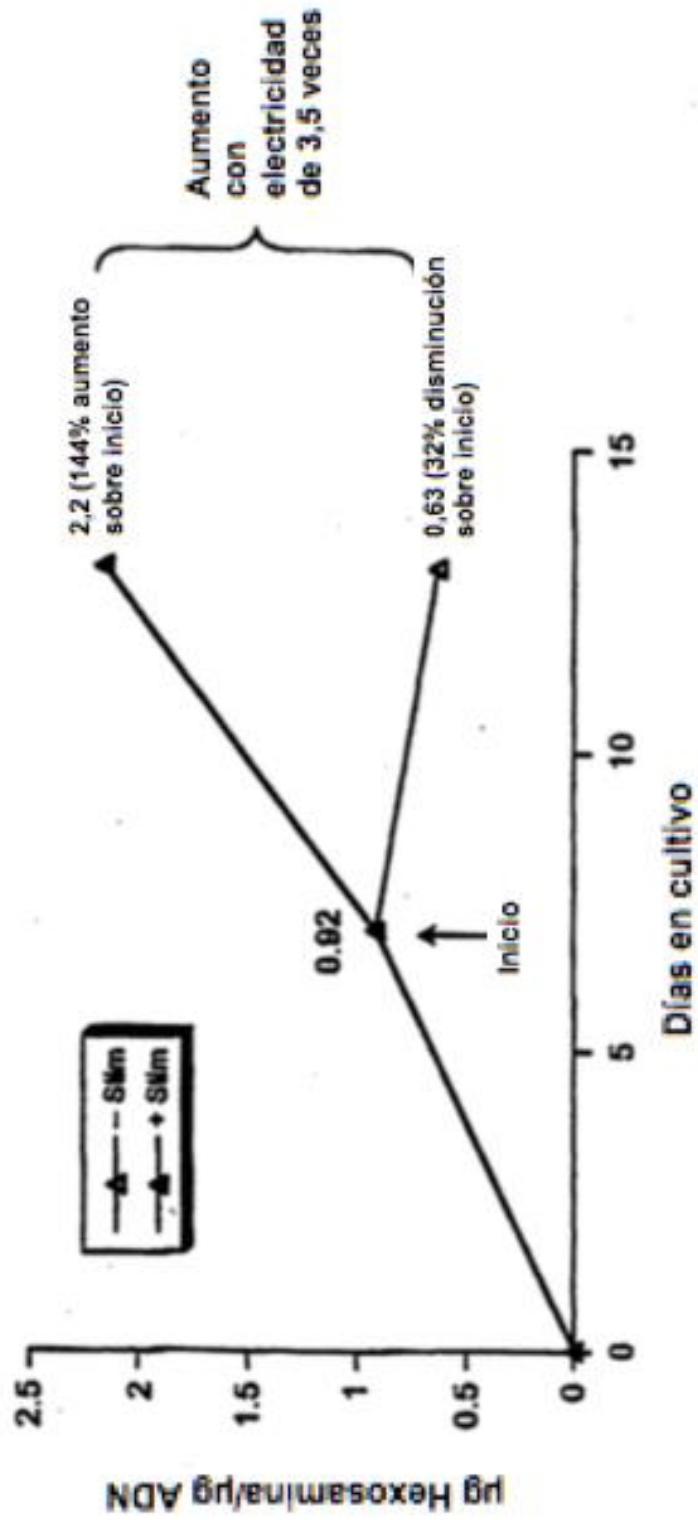


Figura 5

**PROTEOGLICANO (no Interleucina; 50% ciclo de trabajo; 1 h/día)**

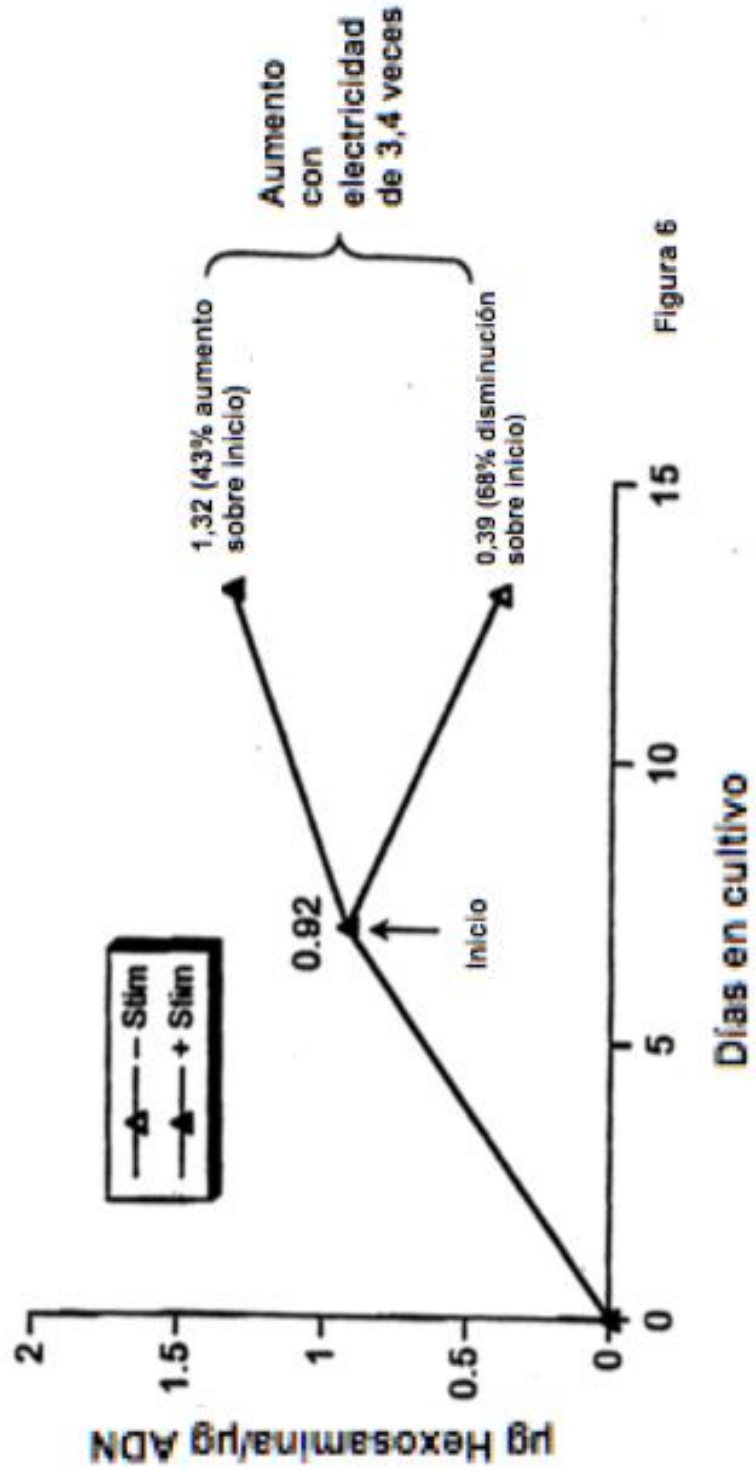


Figura 6

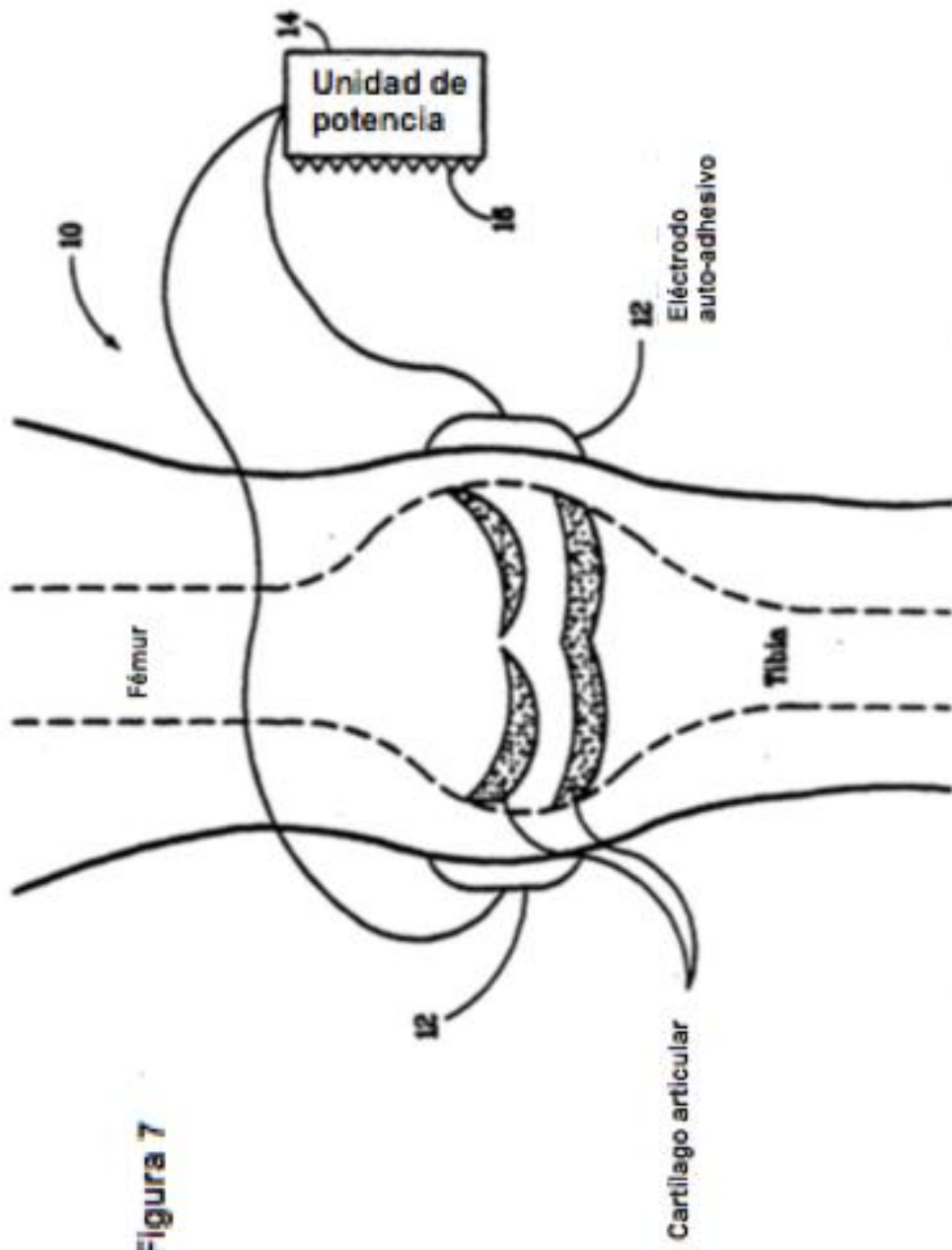


Figura 7