

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 318**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015 PCT/EP2015/053639**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124735**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015 E 15705823 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 3107591**

54 Título: **FGF-18 en procedimientos de trasplante de injertos y de ingeniería tisular**

30 Prioridad:

**20.02.2014 EP 14000599**

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

**18.07.2018**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**LADEL, CHRISTOPH H.;  
GUEHRING, HANS y  
GIGOUT, ANNE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 676 318 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

FGF-18 en procedimientos de trasplante de injertos y de ingeniería tisular

**Campo de la invención**

5 La presente invención versa sobre medicina regenerativa, en particular para el tratamiento de trastornos de cartílago, tales como osteoartritis, lesión de cartílago y defectos osteocondrales. Más en particular, versa sobre procesos relacionados con la ingeniería tisular y procedimientos de injerto, tales como trasplante osteocondral o de cartílago o implantación condrocítica autóloga (ACI).

**Antecedentes de la invención**

10 “Trastornos de cartílago” se refiere, a grandes rasgos, a enfermedades caracterizadas por la degeneración de anomalías metabólicas en los tejidos conjuntivos que se manifiestan por dolor, rigidez y limitación del movimiento de las partes corporales afectadas. Estos trastornos pueden ser debidos a una patología -por ejemplo, osteoartritis (OA)- o puede ser consecuencia de un trauma o una lesión. Los defectos osteocondrales (OCD) -es decir, un defecto del cartílago que cubre el extremo de un hueso en una articulación- son debidos más a menudo a un trauma o a una lesión, pero también pueden ser debidos a una patología. Un OCD puede conducir a OA. El cartílago maduro tiene una capacidad limitada de repararse por sí mismo, especialmente porque los condrocitos maduros tienen poco potencial de proliferación y debido a la ausencia de vasos sanguíneos. La sustitución del cartílago dañado, en particular del cartílago articular, por daños causados ya sea por lesión o enfermedad, es un gran desafío para los médicos, y se considera que los procedimientos de tratamiento quirúrgico disponibles son imprevisibles y eficaces solo durante un tiempo limitado. Por lo tanto, la mayoría de los pacientes más jóvenes no buscan tratamiento, o bien se les aconseja que pospongan el tratamiento todo el tiempo que sea posible. Cuando se requiere tratamiento, el procedimiento estándar depende de la edad y varía entre la sustitución total de la articulación, el trasplante de trozos de cartílago o la técnica de estimulación de la médula ósea (tal como la microfractura). La microfractura es un procedimiento barato y común que implica la penetración del hueso subcondral para estimular la deposición de cartílago por las células madre derivadas de la médula ósea. Sin embargo, se ha demostrado que esta técnica no repara suficientemente el defecto condral y que el nuevo cartílago formado es principalmente fibrocartílago, dando como resultado una función inadecuada o alterada. De hecho, el fibrocartílago no tiene la misma durabilidad y puede no adherirse correctamente al cartílago hialino circundante. Por esta razón, el fibrocartílago recién sintetizado puede romperse más fácilmente (marco temporal previsto: 5-10 años).

30 Para pacientes con osteoartritis, el tratamiento no quirúrgico consiste, especialmente, en fisioterapia, modificación del estilo de vida (por ejemplo, reduciendo la actividad), dispositivos de apoyo, fármacos orales e inyectados (por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos), y gestión médica (aunque no hay todavía ningún tratamiento disponible comercialmente que restaure lesiones de cartílago (véase Lotz, 2010)). Una vez que estos tratamientos fallan, la cirugía, tal como la sustitución articular (en parte o totalmente) es la principal opción para los pacientes. Tal opción puede proporcionar una reducción en los síntomas, pero lo más habitual es que dé como resultado una función articular disminuida. Las osteotomías tibiales o femorales (cortar el hueso para reequilibrar el desgaste articular) pueden reducir los síntomas, contribuir a mantener un estilo de vida activo y retardar la necesidad de una sustitución total de la articulación. La sustitución total de la articulación puede proporcionar alivio para el síntoma de la osteoartritis avanzada, pero generalmente requiere un cambio en el estilo de vida y/o del nivel de actividad del paciente.

40 Los actuales procedimientos restauradores del cartílago incluyen la sustitución total de la articulación, la técnica de estimulación de la médula ósea (por ejemplo, microfracturas), aloinjertos o autoinjertos osteocondrales e implantación de cartílago cultivado (tal como la implantación condrocítica autóloga (ACI)). Estos procedimientos proporcionan opciones de tratamiento, en particular para pacientes con una lesión condral sintomática.

45 Los trasplantes de aloinjerto o autoinjerto osteocondral son procedimientos comunes para el tratamiento de defectos articulares focales. Múltiples factores influyen probablemente en la efectividad de este procedimiento, incluyendo la fuente del cartílago donante, la salud del cartílago que rodea el sitio del defecto y la calidad de integración. Desgraciadamente, en muchos casos, los procedimientos de trasplante osteocondral dan como resultado una integración deficiente. Generalmente, para un planteamiento de ingeniería tisular, las células son cultivadas en una matriz tridimensional (3D), desempeñando cada uno de los elementos de dicha matriz un papel clave en la regeneración tisular. El principal tipo de células madre usadas para la formación de cartílago es MSC humana (hMSC) (Zhang et al., 2013). Sin embargo, el tipo de MSC, el andamiaje y otros factores son importantes en la ingeniería tisular. Además, garantizar la regeneración de una estructura homogénea de tipo de cartílago hialino es importante para una integración de calidad elevada en el defecto. Establecer y mantener dicho fenotipo durante una ingeniería tisular de cartílago articular es complejo y puede optimizarse usando factores que inhiben la hipertrofia (Tang et al., 2012). Por ejemplo, a pesar de la adición de agregado mejorado con TGF-beta1, colágeno tipo II y la expresión del gen Sox-9 de las hMSC, el cartílago recién sintetizado consiste fundamentalmente en tejido fibroso de corta duración, no en tejido hialino (Zhang et al., 2013).

Otro tipo de procedimiento de ingeniería tisular es el procedimiento de implantación de cartílago cultivado, tal como

la implantación condrocítica autóloga (ACI), para la cual se toma cartílago de una zona de soporte para poco peso de la superficie articular del paciente que ha de ser tratado; a continuación, los condrocitos son aislados y cultivados *in vitro*, ya sea en cultivos monocapa o cultivos 3D; después de cierto tiempo en cultivo, los condrocitos o constructos 3D resultantes son implantados en el defecto para rellenar el defecto. Desgraciadamente, se sabe que la expansión de condrocitos, especialmente en cultivos monocapa, induce condrocitos de tipo fibroblasto (Magill et al., 2011).

El factor 18 de crecimiento de fibroblastos (FGF-18) es un agente proliferativo para condrocitos y osteoblastos (Ellsworth et al., 2002; Shimoaka et al., 2002). Ha sido propuesto para el tratamiento de trastornos del cartílago tales como osteoartritis y lesión de cartílago, ya sea solo (WO2008023063) o en combinación con ácido hialurónico (WO2004032849). Formulaciones liofilizadas que contienen FGF-18 han demostrado resultados prometedores en el tratamiento de OA o CI, cuando son inyectadas intraarticularmente.

Aunque los procedimientos restauradores del cartílago tales como injertos osteocondrales y la implantación de cartílago cultivado (por ejemplo, ACI) son prometedores, la velocidad de integración o la calidad del cartílago producido tienen que mejorar. Por lo tanto, existe la necesidad de un método para un procedimiento mejorado que permita buena integración y buena calidad del cartílago producido (es decir, fundamentalmente cartílago hialino). De hecho, la generación de dicho cartílago hialino es valiosa a la vez como terapéutica y como componente para matrices biológicas (Getgood et al., 2010).

### **Compendio de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir un material cartilaginoso para ingeniería tisular o injerto osteocondral/de cartílago, comprendiendo o consistiendo dicho procedimiento en las etapas de: cultivar células condrogénicas, en cultivo 3D, o cultivar uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, en un caldo de cultivo que comprende un compuesto FGF-18 durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un material osteocondral/de cartílago trasplantable, añadiéndose el compuesto FGF-18 intermitentemente al caldo de cultivo, durante aproximadamente uno, dos o tres días por semana, repitiéndose dicha adición de aproximadamente un día, dos días o tres días cada semana durante al menos 2 semanas de cultivo, al menos 3 semanas de cultivo o al menos 4 semanas de cultivo.

En una alternativa, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir un material cartilaginoso para ingeniería tisular o injerto osteocondral/de cartílago, comprendiendo o consistiendo dicho procedimiento en las etapas de: cultivar células condrogénicas, en cultivo 3D, o cultivar uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, en un caldo de cultivo que comprende un compuesto FGF-18 durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un material osteocondral/de cartílago trasplantable, añadiéndose el compuesto FGF-18 intermitentemente al caldo de cultivo, durante aproximadamente uno, dos o tres días por mes, repitiéndose dicha adición de aproximadamente un día, dos días o tres días cada mes durante al menos 2 meses de cultivo, al menos 3 meses de cultivo o al menos 4 meses de cultivo.

Opcionalmente, además, el compuesto FGF-18 puede ser inyectado en el sitio del trasplante del material osteocondral/de cartílago resultante, ya sea antes, en el momento del trasplante, o después.

En el contexto de la presente invención en su conjunto, es preferible que las células condrogénicas o el o los explantes osteocondrales/de cartílago sean recogidos o aislados de un mamífero antes de la etapa de expansión o cultivo.

En una realización, para un cultivo 3D de condrocitos o células condrogénicas o para uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, el compuesto FGF-18 es añadido intermitentemente al caldo de cultivo, durante aproximadamente un día, 2 o 3 días por semana, repitiéndose la adición de aproximadamente un día, 2 o 3 días cada semana durante al menos 2 semanas de cultivo, al menos 3 semanas de cultivo o al menos 4 semanas de cultivo. Preferentemente, dicho compuesto de FGF-18 es añadido intermitentemente al caldo de cultivo, durante uno, dos o tres días por semana, repitiéndose dicha adición de un día, 2 o 3 días cada semana durante al menos 2 semanas de cultivo, al menos 3 semanas de cultivo o al menos 4 semanas de cultivo.

Según una cualquiera de las realizaciones de la presente invención, el trastorno de cartílago es, preferentemente, osteoartritis, una lesión de cartílago o un defecto osteocondral.

En el contexto de la presente invención, en su conjunto, el compuesto FGF-18 es seleccionado entre el grupo constituido por: a) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura del FGF-18 humano que comprende los residuos 28-207 de la SEQ ID NO:1, b) un polipéptido que comprende o consiste en los residuos 28-196 de la SEQ ID NO:1, o c) un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO:2.

Además, en el contexto de la presente invención, en su conjunto, el explante es, preferentemente, un explante de cartílago y las células condrogénicas son, preferentemente, condrocitos o células madre mesenquimales derivados de tejidos maduros. Dependiendo de la necesidad, las células condrogénicas o los explantes osteocondrales/de cartílago son recogidos del mamífero que ha de ser tratado o de un mamífero diferente, preferentemente de la misma especie que el mamífero que ha de ser tratado. El mamífero que ha de ser tratado es, preferentemente, un

ser humano, pero, alternativamente, y sin ninguna limitación, también puede ser un caballo, un camello, una oveja, un perro o mamíferos más pequeños, tales como gatos, conejos, ratas o ratones.

### Definiciones

5 – La expresión “compuesto de FGF-18” o “FGF-18”, usada en la presente memoria, está previsto que sea una proteína que mantiene al menos una actividad biológica de la proteína FGF-18 humana. El FGF-18 puede ser nativo, en su forma madura, una forma recombinante o una forma truncada del mismo. Las actividades biológicas de la proteína FGF-18 humana incluyen especialmente el aumento en la proliferación de condrocitos u osteoblastos (véase WO98/16644) o en la formación de cartílago (véase WO2008/023063). El FGF-18 humano nativo, o de forma natural, es una proteína expresada por condrocitos de cartílago articular. El FGF-18 humano recibió inicialmente la designación zFGF-5 y es descrito completamente en el documento WO98/16644. La SEQ ID NO:1 corresponde a la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo, con un péptido señal consistente en los residuos de aminoácido 1 (Met) a 27 (Ala). La forma madura del FGF-18 humano corresponde a la secuencia de aminoácidos del residuo 28 (Glu) al residuo 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1 (180 aminoácidos).

15 El FGF-18, en la presente invención, puede ser producido por un método recombinante, según enseña la solicitud WO2006/063362. Dependiendo de los sistemas y las condiciones de expresión, el FGF-18 en la presente invención es expresado en una célula anfitriona recombinante con un residuo inicial de metionina (Met) o con una secuencia de señales para la secreción. Cuando es expresado en una anfitriona procarionota, tal como en *E. coli*, el FGF-18 contiene un residuo Met adicional en el N-terminal de su secuencia. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano, cuando es expresada en *E. coli*, comienza con un residuo Met en el N-terminal (posición 1) seguido por los residuos 28 (Glu) a 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1.

25 – La expresión “forma truncada” de FGF18, usada en la presente memoria, se refiere a una proteína que comprende o consiste en los residuos 28 (Glu) a 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, la forma truncada de la proteína FGF-18 es el polipéptido designado “trFGF-18” (170 aminoácidos; también denominado rhFGF18 o esprifermina), que comienza con un residuo Met (en el N-terminal) seguido por los residuos de aminoácido 28 (Glu) - 196 (Lys) del FGF-18 humano de la forma natural. Se muestra la secuencia de aminoácidos del trFGF-18 en la SEQ ID NO:2 (los residuos de aminoácido 2 a 170 de la SEQ ID NO:2 corresponden a los residuos de aminoácido 28 a 196 de la SEQ ID NO:1). El trFGF-18 es una recombinante forma truncada del FGF-18 humano, producida en *E. coli* (véase WO2006/063362). Se ha demostrado que el trFGF-18 presenta actividades similares a las del FGF-18 humano maduro; por ejemplo, aumenta la proliferación de condrocitos y la deposición de cartílago, que lleva a la reparación y la reconstrucción de diversos tejidos cartilaginosos (véase el documento WO2008/023063).

35 – La expresión “trastorno de cartílago”, usada en la presente memoria, abarca trastornos resultantes de daños debidos a una lesión, tal como una lesión traumática, condropatía o artritis. Tales trastornos dan lugar a un defecto, más preferentemente a un defecto de cartílago. Ejemplos de trastornos de cartílago que pueden ser tratados por la administración de la formulación de FGF-18 descrita en la presente memoria incluyen, sin restricción, artritis -tal como osteoartritis-, lesión de cartílago y defectos osteocondrales. También están abarcados por esta expresión los trastornos/enfermedades degenerativas del cartílago o de la articulación, tales como condrocalcinosis, policondritis, policondritis recidivante, espondilitis o costocondritis anquilosante. La International Cartilage Repair Society ha propuesto un sistema de calificación artroscópica para evaluar la gravedad del defecto de cartílago: grado 0: (normal) cartílago sano; grado 1: el cartílago tiene un punto blando o ampollas; grado 2: desgarramientos menores visibles en el cartílago; grado 3: las lesiones tienen grietas profundas (más del 50% de la capa de cartílago); y grado 4: el desgarramiento del cartílago deja al descubierto el hueso (subcromal) subyacente (véase la publicación de la ICRS: [http://www.cartilage.org/\\_files/contentmanagement/ICRS\\_evaluation.pdf](http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf), página 13).

45 – El término “artritis”, usado en la presente memoria, abarca trastornos tales como osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis infecciosa, artritis psoriásica, enfermedad de Still (el comienzo de la artritis reumatoide juvenil) u osteocondritis disecante. Preferentemente, incluye enfermedades o trastornos en los cuales el cartílago está dañado o desprendido del hueso subyacente.

50 – El término “osteoartritis” es usado para referirse a la forma más común de artritis. Se considera que el término “osteoartritis” se refiere a un trastorno de cartílago que abarca tanto la osteoartritis primaria como la osteoartritis secundaria (véase, por ejemplo, *The Merck Manual*, 17ª edición, página 449). La osteoartritis puede estar causada por la ruptura del cartílago. Pueden romperse trozos de cartílago y causar dolor e hinchazón en la articulación entre huesos. Con el tiempo, el cartílago puede desgastarse por completo, y los huesos rozarse mutuamente. La osteoartritis puede afectar a cualquier articulación, pero suele afligir a manos, hombros y articulaciones que soportan peso, tales como cadera, rodillas, pies y columna. En un ejemplo preferente, la osteoartritis puede ser osteoartritis de rodilla u osteoartritis de cadera. Este término abarca especialmente las formas de osteoartritis que son clasificadas como etapa 1 a etapa 4 o grado 1 a grado 6 según el sistema de clasificación OARSI. La persona experta es plenamente consciente de las clasificaciones de la osteoartritis que se usan en la técnica, en particular dicho sistema de evaluación OARSI (también denominado OCHAS; véase, por ejemplo, Custers et al., 2007). La osteoartritis es uno de los trastornos de cartílago preferidos que puede ser tratado administrando los compuestos de FGF-18 según la presente invención.

- 5 – La expresión “lesión de cartílago”, usada en la presente memoria, es un trastorno de cartílago o un daño del cartílago resultante especialmente de un trauma. Las lesiones de cartílago pueden ocurrir especialmente después de una destrucción mecánica traumática, especialmente después de un accidente o una cirugía (por ejemplo, cirugía de microfracturas). Esta expresión “lesión de cartílago” también incluye fracturas condrales u osteocondrales y daños en el menisco. También se consideran dentro de esta definición la lesión relacionada el deporte o el desgaste relacionado con el deporte de tejidos de la articulación. La expresión también incluye microdaños o trauma por golpe contundente, una fractura condral, una fractura osteocondral o un daño en el menisco.
- 10 – La expresión “defectos osteocondrales” (OCD) se refiere a un trastorno de cartílago en el que los defectos del cartílago cubren el extremo de un hueso en una articulación. Estos defectos son debidos más a menudo a un trauma o lesión, pero también pueden ser debidos a una patología. Un OCD puede llevar a la OA. El OCD generalmente implica que también hay implicadas partes del hueso, no solo el cartílago. Si solo está implicado el cartílago, se preferirá la expresión “lesión de cartílago” (véase más arriba).
- 15 – La expresión “ingeniería tisular” también abarca la implantación condrocítica autóloga (ACI). También es denominada medicina regenerativa. Las células o tejidos pueden ser cultivadas ya sea en cultivos monocapa o en cultivos 3D. El propósito de tales procedimientos es reparar o sustituir partes o la totalidad de tejidos.
- 20 – El término “injerto” está relacionado con el trasplante o la implantación. Este procedimiento es también parte de la medicina regenerativa. Incluye el trasplante/implantación osteocondral o de cartílago (también denominada en la presente memoria osteocondral/de cartílago), tal como el autoinjerto osteocondral/de cartílago o el trasplante/implantación de aloinjerto osteocondral/de cartílago. En el marco de un injerto, se recoge un explante de un mamífero, ya sea del mamífero que ha de ser tratado (es decir, un autoinjerto) o de otro mamífero, preferentemente de la misma especie (aloinjerto). Habitualmente, se toma de una sección de cartílago sana o de un tejido osteocondral sano. Tal injerto se lleva a cabo, preferentemente, al nivel del defecto o de los defectos del cartílago.
- 25 – La expresión “material cartilaginoso trasplantable” o “material trasplantable” son usadas de manera intercambiable. Se refieren a células condrogénicas, tales como condrocitos, o a explantes osteocondrales/de cartílago que son preparados para ser trasplantados (o implantados) en un mamífero necesitado de los mismos. preferentemente, tal material trasplantable trasplantado/implantado al nivel del defecto o de los defectos del cartílago.
- 30 – En el contexto de la presente invención, la “eficacia” de un tratamiento puede ser medida en función de cambios en el grosor del cartílago; por ejemplo, el grosor del cartílago articular de la articulación. Este grosor puede ser evaluado, por ejemplo, a través de tomografía computarizada de rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) o mediciones ultrasónicas.
- 35 – El término “aproximadamente”, en “aproximadamente 24, 48 o 72 horas” o en “aproximadamente un día, 2 días o 3 días” abarca cambios en el caldo de cultivo 24, 48 o 72 horas después de la suplementación en el compuesto de FGF-18, así como cambios en el caldo de cultivo 24, 48 o 72 horas +/- pocas horas después de la suplementación en el compuesto de FGF-18 (por ejemplo, +/- 1, 2, 3 o 4 horas). De modo similar, el término “aproximadamente”, en “aproximadamente 7 días”, “aproximadamente una semana”, “aproximadamente 4 semanas” o “aproximadamente un mes” abarca, respectivamente, 7 días, 1 semana, 4 semanas (es decir, 28 días) o un mes, así como una administrada separada, respectivamente, por 7 días +/- 1 o 2 días, una semana +/- 1 o 2 días, 4 semanas +/- pocas días (por ejemplo, +/- 1, 2, 3, 4 días) o un mes +/- pocos días (por ejemplo, +/- 1, 2, 3, 4 días). Ciertamente, debería entenderse que, fundamentalmente desde un punto de vista práctico, los cambios del caldo de cultivo o la siguiente suplementación con un compuesto de FGF-18 no siempre se pueden llevar a cabo a intervalos exactos; por ejemplo, la renovación del caldo de cultivo exactamente 24, 48 o 72 horas después de la suplementación con el compuesto FGF-18, 4 semanas (28 días), día a día, después de la suplementación previa.
- 45 – Por lo tanto, en el contexto de la invención, por ejemplo, 4 semanas significa 28 días, pero también puede ser 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 días después de la administración previa. En el contexto de la presente invención, la expresión “4 semanas” es similar a la expresión “1 mes” y pueden ser usadas de manera intercambiable. Preferentemente, se usará “4 semanas” cuando se haga referencia a “días” (por ejemplo, 1<sup>a</sup> suplementación un lunes, siguiente suplementación un lunes 4 semanas después) y, preferentemente, se usará “mes” cuando se haga referencia a una “fecha” (por ejemplo, 1<sup>a</sup> suplementación el 1 de agosto, siguiente suplementación el 1 de septiembre).
- 50 – El término “ciclo” significa un ciclo de suplementación. En el contexto de la presente invención un ciclo semanal (o un ciclo de 7 días) significa que un caldo de cultivo será suplementado durante un día aproximadamente cada semana (o aproximadamente cada 7 días) con un compuesto de FGF-18. Así, dicho ciclo incluirá un día de cultivo en un caldo suplementado y aproximadamente 6 días de cultivo en un caldo no suplementado (es decir, sin FGF-18). De modo similar, un ciclo de 4 semanas significa que un caldo de cultivo será suplementado durante un día aproximadamente cada 4 semanas con un compuesto de FGF-18. Así, dicho ciclo incluirá un día de cultivo en un caldo suplementado y aproximadamente 4 semanas de cultivo en un caldo no suplementado (es decir, sin FGF-18). Pasa lo mismo con un ciclo mensual: un ciclo mensual significa que un caldo de cultivo será suplementado durante un día aproximadamente cada mes con un compuesto de FGF-18. Así, dicho ciclo incluirá un día de cultivo en un

caldo suplementado y aproximadamente un mes de cultivo en un caldo no suplementado (es decir, sin FGF-18). A ciclo se puede repetir.

### Descripción detallada de la invención

5 Aunque los procedimientos de restauración de cartílago, tales como injertos osteocondrales/de cartílago, y la implantación de cartílago cultivado (por ejemplo, ACI) son prometedores, la velocidad de integración o la calidad del cartílago producido tienen que mejorar. Por lo tanto, existe la necesidad de un método para un procedimiento mejorado que permita buena integración y buena calidad del cartílago producido (es decir, fundamentalmente cartílago hialino). Se ha descubierto con sorpresa que, cuando se usa FGF-18 en medicina regenerativa (tal como procedimientos de ingeniería tisular o en procedimientos de injerto), la calidad del cartílago producido mejora y hay mejor integración de las células o los explantes en los defectos.

10 El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir un material cartilaginoso para ingeniería tisular o un injerto osteocondral/de cartílago, comprendiendo o consistiendo dicho procedimiento en las etapas de cultivar células condrogénicas, en cultivo 3D, o cultivar uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, en un caldo de cultivo que comprende un compuesto FGF-18 durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un material cartilaginoso trasplantable. Dicho material cartilaginoso trasplantable puede ser útil para tratar un trastorno de cartílago, tal como osteoartritis, una lesión de cartílago (incluyendo un defecto de cartílago) o un defecto osteocondral. Preferentemente, las células condrogénicas o los uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago son recogidos o aislados de un mamífero antes de la etapa de expansión o de cultivo. Por lo tanto, alternativamente, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir un material cartilaginoso para ingeniería tisular o injerto osteocondral/de cartílago, comprendiendo o consistiendo dicho procedimiento en las etapas de: (a) recoger o aislar de un mamífero células condrogénicas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, y (b) cultivar las células condrogénicas, en cultivo 3D, o cultivar los uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, en un caldo de cultivo que comprende un compuesto FGF-18 durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un material cartilaginoso trasplantable. Dicho material cartilaginoso trasplantable puede ser útil para tratar un trastorno de cartílago, tal como osteoartritis, una lesión de cartílago o un defecto osteocondral. Opcionalmente, el compuesto FGF-18 puede ser inyectado, además, en el sitio de trasplante del material cartilaginoso resultante o de un explante osteocondral/de cartílago, ya sea antes del trasplante, en el momento del mismo o después del mismo. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para ser usados en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

15 En la presente memoria también se divulga (pero no es parte de la invención) un procedimiento para regenerar cartílago en un mamífero en una zona de defecto de cartílago articular debido a un trastorno de cartílago, comprendiendo o consistiendo dicho procedimiento en las etapas de: (a) cultivar células condrogénicas, en cultivo 3D, o cultivar uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, en un caldo de cultivo que comprende un compuesto FGF-18, y (b) administrar al mamífero necesitado de ello las células condrogénicas cultivadas o el o los explantes osteocondrales/de cartílago obtenidos de la etapa (a). Dicho procedimiento de regeneración de cartílago puede ser útil para tratar un trastorno de cartílago, tal como osteoartritis, una lesión de cartílago o un defecto osteocondral. Preferentemente, las células condrogénicas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago son recogidos o aislados de un mamífero antes de la etapa de cultivo. Opcionalmente, el compuesto FGF-18 puede ser inyectado, además, en el sitio al que se han administrado las células condrogénicas cultivadas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, ya sea antes de la administración de las células o los explantes, en el momento de la misma o después de la misma. En la presente memoria también se divulga (pero no es parte de la invención) un procedimiento para regenerar cartílago en un mamífero en una zona de defecto de cartílago articular debido a un trastorno de cartílago, comprendiendo o consistiendo dicho procedimiento en las etapas de: (a) cultivar células condrogénicas, en cultivo 3D, o cultivar uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, en un caldo de cultivo, (b) administrar al mamífero necesitado de ello las células condrogénicas cultivadas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago obtenidos de la etapa (a), y (c) inyectar un compuesto de FGF-18 en el sitio al que se han administrado las células condrogénicas cultivadas o el explante osteocondral/de cartílago. La etapa (c) se puede llevar a cabo ya sea antes de la administración de las células o los explantes, en el momento de la misma o después de la misma. También se divulga un procedimiento de regeneración de cartílago en un mamífero en una zona de defecto de cartílago articular debido a un trastorno de cartílago, comprendiendo o consistiendo dicho procedimiento en las etapas de: (a) recoger o aislar de un mamífero células condrogénicas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, (b) cultivar las células condrogénicas, en cultivo 3D, o cultivar uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, en un caldo de cultivo, (c) administrar al mamífero necesitado de ello las células condrogénicas cultivadas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago obtenidos de la etapa (b), y (d) inyectar un compuesto de FGF-18 en el sitio al que se han administrado las células condrogénicas cultivadas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago. La etapa (d) se puede llevar a cabo ya sea antes de la administración de las células o los explantes, en el momento de la misma o después de la misma. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para ser usados en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico). En la presente memoria también se divulga (pero no es parte de la invención) un método para tratar un defecto en un

tejido cartilaginoso de un mamífero, debiéndose dicho defecto de cartílago a un trastorno de cartílago, comprendiendo o consistiendo el método en las siguientes etapas: (a) aislar células condrogénicas o un explante osteocondral/de cartílago de un mamífero, (b) someter a dichas células condrogénicas o a uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago a un cultivo *in vitro* o *ex vivo*, llevándose a cabo dicho cultivo en un caldo de cultivo celular que comprende un compuesto de FGF-18 (c) repetir opcionalmente las etapas (a) y (b) para obtener un material de trasplante que comprende las células condrogénicas cultivadas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago, y (d) trasplantar el material de trasplante de la etapa (c) al defecto del mamífero necesitado de dicho tratamiento, en el que, durante las etapas (b) y (c), las células condrogénicas son cultivadas en un cultivo 3D. Opcionalmente, el compuesto FGF-18 puede ser inyectado, además, en el sitio del trasplante, ya sea antes del trasplante, en el momento del mismo o después del mismo. En la presente memoria también se divulga (pero no es parte de la invención) un método para tratar un defecto en un tejido cartilaginoso de un mamífero, debiéndose dicho defecto de cartílago a un trastorno de cartílago, comprendiendo o consistiendo el método en las siguientes etapas: (a) aislar células condrogénicas o un explante osteocondral/de cartílago de un mamífero, (b) someter a dichas células condrogénicas o a uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago a un cultivo *in vitro* o *ex vivo*, llevándose a cabo dicho cultivo en un caldo de cultivo celular, (c) repetir opcionalmente las etapas (a) y (b) para obtener un material de trasplante que comprende las células condrogénicas cultivadas o el injerto osteocondral/de cartílago, (d) trasplantar el material de trasplante de la etapa (c) al defecto del mamífero necesitado de dicho tratamiento, en el que, durante las etapas (b) y (c), las células condrogénicas pueden ser cultivadas en un cultivo 3D y (e) inyectar un compuesto de FGF-18 en el sitio del trasplante. La etapa (e) se puede llevar a cabo ya sea antes del trasplante, en el momento del mismo o después del mismo.

En la presente memoria también se divulga una composición que comprende uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago de mamífero cultivados o células condrogénicas de mamífero cultivadas, en un caldo que comprende un compuesto de FGF-18 para ser usada en medicina regenerativa, tal como en la ingeniería tisular o un injerto osteocondral/de cartílago en un mamífero necesitado de ello. Preferentemente, el mamífero necesitado de dicha composición tiene un trastorno de cartílago. Preferentemente, las células condrogénicas o los explantes osteocondrales/de cartílago son recogidos o aislados de un mamífero antes de la etapa de expansión o cultivo.

Debe entenderse que el material cartilaginoso trasplantable obtenido según la invención es para ser usado en el tratamiento de un trastorno de cartílago.

En el contexto de la presente invención en su conjunto, el compuesto FGF-18 se selecciona, preferentemente, entre el grupo constituido por: a) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura del FGF-18 humano que comprende los residuos 28-207 de la SEQ ID NO:1, b) un polipéptido que comprende o consiste en los residuos 28-196 de la SEQ ID NO:1, o c) un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO:2. En particular, este compuesto se selecciona de la forma natural del FGF-18 maduro humano o de trFGF-18.

En la presente memoria se describe un compuesto de FGF-18 que se añade al caldo de cultivo (es decir, la suplementación del caldo) a una concentración de 1 nanogramo (ng) a 50 microgramos ( $\mu\text{g}$  o mcg), preferentemente de 5 ng a 5  $\mu\text{g}$ , o preferentemente de 5 ng a 1  $\mu\text{g}$ , o más preferentemente de 10 ng a 500  $\mu\text{g}$ , o aún más preferentemente de 10 ng a 100 ng por mililitro (mL) de caldo de cultivo. En una realización preferente, el caldo es suplementado con el compuesto FGF-18 a una concentración de aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o 1000 ng por mL de caldo de cultivo. Concentraciones preferentes incluyen 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 o 200 ng por mL de caldo de cultivo.

En el contexto de la presente invención en su conjunto, el FGF-18 se añade al caldo en el que se cultivan las células condrogénicas o uno o varios explantes osteocondrales/de cartílago. Preferentemente, dicho compuesto de FGF-18 es añadido intermitentemente al caldo de cultivo, durante aproximadamente un día, 2 días o 3 días por semana (aproximadamente una semana), repitiéndose dicha adición de un día, 2 o 3 días cada semana durante al menos 2 semanas de cultivo, al menos 3 semanas de cultivo o al menos 4 semanas de cultivo. Preferentemente, dicho compuesto de FGF-18 es añadido intermitentemente al caldo de cultivo, durante uno, 2 o 3 días por semana, repitiéndose dicha adición de un día, 2 o 3 días cada semana durante 2 semanas de cultivo, 3 semanas de cultivo o 4 semanas de cultivo. Preferentemente, un día ha de ser entendido como aproximadamente 24 horas (es decir, 24 horas +/- 4 horas); preferentemente, dos días han de ser entendidos como aproximadamente 48 horas (es decir, 48 horas +/- 4 horas) y, preferentemente, tres días han de ser entendidos como aproximadamente 72 horas (es decir, 72 horas +/- 4 horas). Después de un cultivo de un día con un caldo suplementado, el cultivo es seguido entonces otros 6 días sin el compuesto FGF-18; después de un cultivo de 2 días con un caldo suplementado, el cultivo es seguido entonces otros 5 días sin el compuesto FGF-18; y, después de un cultivo de 3 días con un caldo suplementado, el cultivo es seguido entonces otros 4 días sin el compuesto FGF-18. Dicho esquema corresponde a un ciclo semanal. Por ejemplo, para un cultivo de 1 día, en el supuesto caso de que el compuesto FGF-18 se añada al caldo de cultivo un martes, es retirado de dicho caldo de cultivo un día después de dicha suplementación, es decir, el miércoles. Luego, la suplementación siguiente se hará el martes tras la adición de FGF-18. La suplementación del cultivo puede repetirse cada semana (por ejemplo, cada martes), según el mismo esquema (es decir, una semana después de la suplementación previa). En el supuesto caso de que sea más conveniente, la suplementación con el compuesto FGF-18 se puede llevar a cabo aproximadamente una semana después de la suplementación previa, es decir, una semana (o 7 días) +/- 1 o 2 días. Por ejemplo, se puede realizar una suplementación un lunes o un miércoles, si la suplementación previa se realizó el martes anterior.

Alternativamente, el compuesto FGF-18 puede ser añadido intermitentemente al caldo de cultivo, durante uno, 2 o 2 días por mes, repitiéndose dicha adición de 1 día, 2 o 3 días cada mes durante al menos 2 meses de cultivo, al menos 3 meses de cultivo o al menos 4 meses de cultivo. Para un cultivo 3D de células condrogénicas, preferentemente, el compuesto FGF-18 es añadido intermitentemente al caldo de cultivo, durante uno, dos o tres días por mes, repitiéndose dicha adición de un día, 2 o 3 días cada mes durante 2 meses de cultivo, 3 meses de cultivo o 4 meses de cultivo. Preferentemente, un día ha de ser entendido como aproximadamente 24 horas (es decir, 24 horas +/- 4 horas). Después del cultivo de un día, 2 o 3 días con un caldo suplementado, el cultivo es seguido entonces durante 1 mes sin el compuesto FGF-18. Dicho esquema corresponde a un ciclo mensual. Por ejemplo, en el supuesto caso de que el compuesto FGF-18 se añada en una adición de un día al caldo de cultivo el 1 de agosto, es retirado de dicho caldo de cultivo un día después de dicha suplementación, es decir, el 2 de agosto. La siguiente suplementación se efectuará el 1 de septiembre. La suplementación del cultivo puede repetirse cada mes, según el mismo esquema (es decir, un mes después de la suplementación previa). En el supuesto caso de que sea más conveniente, la suplementación con el compuesto FGF-18 se puede llevar a cabo aproximadamente un mes después de la suplementación previa, es decir, un mes +/- 1, 2, 3 o 4 días. Por ejemplo, puede efectuarse una suplementación el 31 de agosto o el 3 de septiembre si la suplementación previa se llevó a cabo el 1 de agosto.

Según se ha definido anteriormente, "4 semanas" y "mensual" o "un mes" son intercambiables. Por lo tanto, según la presente invención, el compuesto FGF-18 puede ser añadido intermitentemente al cultivo, o al caldo, durante uno, 2 o 3 días aproximadamente cada 4 semanas, repitiéndose dicha adición de un día, 2 o 3 días cada 4 semanas durante al menos 2 ciclos de suplementaciones, al menos 3 ciclos de suplementaciones o al menos 4 ciclos de suplementaciones. Preferentemente, el compuesto FGF-18 es añadido intermitentemente en el cultivo, o el caldo, durante uno, 2 o 3 días por mes, repitiéndose dicha adición de un día, 2 o 3 días cada mes durante 2 meses de cultivo, 3 meses de cultivo o 4 meses de cultivo. Preferentemente, un día ha de ser entendido como aproximadamente 24 horas (es decir, 24 horas +/- 4 horas). Después del cultivo de un día, 2 o 3 días con un caldo suplementado, el cultivo es seguido entonces durante 4 semanas sin el compuesto FGF-18. Dicho esquema corresponde a un ciclo de 4 semanas. Por ejemplo, en el supuesto caso de que el compuesto FGF-18 sea añadido en una adición de un día al caldo de cultivo un martes, es retirado de dicho caldo de cultivo un día después de dicha suplementación, es decir, el miércoles. La siguiente suplementación se realizará el martes 4 semanas después de la 1ª adición. La suplementación del cultivo puede repetirse cada 4 semanas, según el mismo esquema (es decir, un mes después de la suplementación previa). En el supuesto caso de que sea más conveniente, la suplementación con el compuesto FGF-18 se puede llevar a cabo aproximadamente 4 semanas después de la suplementación previa, es decir, 4 semanas +/- 1, 2, 3 o 4 días. Por ejemplo, puede realizarse una suplementación el lunes 28 de octubre o el jueves 31 de octubre si la suplementación previa tuvo lugar el martes 1 de octubre.

Los procedimientos y métodos descritos en la presente memoria serán útiles para tratar trastornos de cartílago. En particular, pueden ser útiles para tratar defectos de cartílago articular en articulaciones sinoviales que son debidos, por ejemplo, a una fibrilación superficial relacionada con la edad, a una degeneración del cartílago debida a osteoartritis, y a defectos condrales u osteocondrales debidos a lesión o enfermedad. También pueden ser útiles para tratar una enfermedad articular causada por osteocondritis disecante y enfermedades articulares degenerativas. En el campo de la cirugía reconstructiva y plástica, los compuestos, las composiciones, los procedimientos y los métodos de FGF-18 según la presente invención serán útiles para la expansión y la transferencia autógena o alógena del cartílago para la reconstrucción de defectos tisulares importantes. Las composiciones de FGF-18 pueden ser usadas para reparar daños en el cartílago junto con un lavado de la articulación, la estimulación de la médula ósea, la artroplastia por abrasión, la perforación subcondral o la microfractura del hueso subcondral.

En una realización preferente, el trastorno de cartílago que ha de ser tratado según la invención es la osteoartritis, tal como la osteoartritis de rodilla o la osteoartritis de cadera. La osteoartritis que ha de ser tratada puede ser, por ejemplo, osteoartritis primaria u osteoartritis secundaria, así como osteoartritis que sea clasificada como etapa 1 a etapa 4 o grado 1 a grado 6 según el sistema de clasificación OARSI. En otra realización preferente, el trastorno de cartílago que ha de ser tratado según la invención es una lesión de cartílago, incluyendo microfracturas o defecto de cartílago, o un defecto osteocondral.

En el contexto de la presente invención en su conjunto, el explante es, preferentemente, un explante de cartílago y las células condrogénicas son, preferentemente, condrocitos, condrocitos o células madre mesenquimales derivados de tejidos maduros. Dependiendo de las necesidades, las células condrogénicas o los explantes osteocondrales/de cartílago son recogidos del mamífero que ha de ser tratado (es decir, necesitado de tratamiento) o de un mamífero diferente (preferentemente de la misma especie). Dicho mamífero es, preferentemente, un ser humano, pero, alternativamente, también puede ser, sin ninguna limitación, un caballo, un camello, un perro o mamíferos más pequeños tales como gatos, conejos, ratas o ratones.

### Descripción de las figuras

Figura 1: Preparación del modelo de reparación de defectos de cartílago: (A) tapón de cartílago de 8 mm cartílago, (B) creación de un defecto central de 4 mm, (C) inserción de cartílago en el defecto, y (D) cultivo a largo plazo del constructo de reparación. DE significa diámetro externo y DI significa diámetro interno.

Figura 2: (A-C) Secciones transversales de reconstrucción por  $\mu$ CT 3D con diferentes tratamientos. (D) Fuerza de integración del defecto reparado mostrando la fuerza creciente desde el control, pasando por el tratamiento 1+30, hasta el tratamiento 1+6. (E) Configuración experimental de la plataforma de ensayo de osteointegración. Las barras de error son SEM.

- 5 Figura 3: Exploraciones de  $\mu$ CT de constructos de reparación cartílago-cartílago. Izquierda: corte único de una exploración de  $\mu$ CT representativo de la muestra. Centro: reconstrucción tridimensional. Derecha: sección transversal de la reconstrucción. Las exploraciones de  $\mu$ CT demuestran una integración creciente desde el control, pasando por el tratamiento 1+30, hasta el 1+6.

Figura 4: Tratamiento de los ATC con rhFGF18.

- 10 Figura 5: Contenido celular/ATC estimado a partir del contenido de ADN/ATC después de 4 semanas de tratamiento sin rhFGF18 (CTR), en presencia permanente de rhFGF18 (perm), con rhFGF18 la primera semana únicamente (1 s) o 1 día por semana (1 d/s). El rhFGF18 fue usado a 10 o 100 ng/mL. N=4. \*/\*\*/\* significan significativamente diferente del control, con  $p < 0,05$  y 0,001, respectivamente

- 15 Figura 6: Contenido de GAG y HPro/ATC después de 4 semanas de tratamiento sin rhFGF18 (CTR), en presencia permanente de rhFGF18 (perm), con rhFGF18 la primera semana únicamente (1 s) o 1 día por semana (1 d/s). El rhFGF18 fue usado a 10 o 100 ng/mL. N=4. \*/\*\*/\* significan significativamente diferente del control, con  $p < 0,05$ , 0,01 y 0,001, respectivamente

- 20 Figura 7: La expresión de colágeno de tipos I, II y de Sox9, así como la proporción de colágeno III/I fueron evaluadas en los ATC después de 4 semanas de cultivo sin rhFGF18 (CTR), en presencia permanente de rhFGF18 (perm), con rhFGF18 la primera semana únicamente (1 s) o 1 día por semana (1 d/s). El rhFGF18 fue usado a 10 o 100 ng/mL. N=4. \*/\*\*/\* significan significativamente diferente del control, con  $p < 0,05$ , 0,01 y 0,001, respectivamente

Figura 8: Se cultivaron condrocitos primarios bovinos una o dos semanas en monocapa en ausencia (CTR) o en presencia permanente de rhFGF18 100ng/mL. Se determinó la concentración celular N=6.

La expresión de colágeno tipos I, II y de Sox9 a N=4 fue medida por PCR cuantitativa en tiempo real.

- 25 Figura 9: Contenido celular/ATC estimado a partir del contenido de ADN/ATC después de 4 semanas de tratamiento sin rhFGF18 (CTR), en presencia permanente de rhFGF18 (perm), con rhFGF18 1 día por semana (1 d/s). \* significa significativamente diferente del control, con  $p < 0,05$ .

- 30 Figura 10: Contenido de GAG después de 4 semanas de tratamiento sin rhFGF18 (CTR), en presencia permanente de rhFGF18 (perm), con rhFGF18 1 día por semana (1 d/s). \* significa significativamente diferente del control, con  $p < 0,05$ .

Figura 11: La expresión de colágeno de tipos I, II y de Sox9, así como la proporción de colágeno III/I fueron evaluadas en los ATC después de 4 semanas de cultivo sin rhFGF18 (CTR), en presencia permanente de rhFGF18 (perm), con rhFGF18 1 día por semana (1 d/s). \* significa significativamente diferente del control, con  $p < 0,05$ .

### Descripción de las secuencias

- 35 SEQ ID NO.1: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo.

SEQ ID NO.2: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 recombinante truncado (trFGF-18).

### Ejemplos

#### Material

- 40 El FGF-18 recombinante truncado (rhFGF18) de los presentes ejemplos fue preparado por expresión en *E. coli*, según la técnica descrita en la solicitud WO2006/063362. En los siguientes ejemplos, rhFGF18, FGF-18 y esprifermina son usados de manera intercambiable.

#### Ejemplo 1

#### Métodos

- 45 Se recogió cartílago hialino nuevo del surco troclear de rodillas bovinas juveniles (de 3-6 meses de edad). Se extrajeron explantes cilíndricos de 8 mm (Figura 1A) con un punzón de biopsia y fueron cultivados de un día para otro en caldo completo (DMEM 4,5g/L D-Glucosa and L-Glutamina, 10% FBS, 1% PSF, 1% Fungizone, 1% Vitaminas MEM, 25mM HEPES y 50 $\mu$ g/ml de vitamina C). Las muestras fueron expurgadas de hueso y se crearon defectos (de 4 mm de diámetro) para formar un constructo de reparación de alma y anillo (Figura 1B). Tanto el alma interna como el anillo externo fueron cultivados por separado durante 24 horas antes de que el defecto se rellenara con el alma original. Las muestras fueron cultivadas entonces en caldo completo, o tratadas con esprifermina
- 50

(rhFGF18, 100 ng/ml). Los tratamientos consistieron en una dosis de rhFGF18 durante 24 horas, aplicada una vez por semana (y repetida semanalmente) (1+6) o un tratamiento de 24 horas seguido por 1 mes de cultivo en caldo completo (1+30 días). Las muestras fueron recogidas después de 4 semanas de cultivo. Se llevó a cabo un ensayo de osteointegración (n=4-6) (Instron 5848, Instron, Norwood, Massachusetts) usando una plataforma de ensayo a medida (Figura 2E, [3]). La fuerza de integración se calculó dividiendo la fuerza máxima por el área de integración. Para una visualización 3D, las muestras (n=6) fueron empapadas en una solución modificada de Lugol (2,5% I<sub>2</sub> y 5% KI en dH<sub>2</sub>O) durante 24 horas [4] y exploradas mediante  $\mu$ CT con un nivel de energía de 55kV y una intensidad de 145 $\mu$ A con un tamaño de vóxel de 6 $\mu$ m y 10,5 $\mu$ m ( $\mu$ CT 35 y vivaCT 40, SCANCO Medical, Wayne, Pensilvania). Los escáneres fueron analizados y reconstruidos usando el soporte lógico de los fabricantes, y se usaron secciones transversales para evaluar la integración de los defectos. Se fijaron muestras adicionales (n=3) de un día para otro en 4% PFA y fueron analizadas histológicamente en busca de deposición celular y matricial en la superficie de contacto.

### Resultados

La fuerza de integración (Figura 2D) de las muestras de control fue la menor (2,5 $\pm$ 1,4 kPa), con propiedades progresivamente crecientes con los tratamientos 1+30 (ciclo mensual) (5,0 $\pm$ 2,4 kPa) y 1+6 (ciclo semanal) (10,2 $\pm$ 3,7 kPa). Aunque los resultados son llamativos cuando se comparan los grupos de control y tratados, con los números replicados posibles en este estudio, no se logró la significación estadística. El análisis por  $\mu$ CT de los constructos de control (Figura 3, arriba a la izquierda) mostró un círculo oscuro diferenciado, que indicaba una separación entre el anillo externo y el alma interna y, así, una integración deficiente. El tratamiento 1+30 (Figura 3, centro a la izquierda) mostró un círculo menos diferenciado, lo que sugería un menor hueco y mayor integración, y el tratamiento 1+6 (Figura 3, abajo a la izquierda) mostró una señal de  $\mu$ CT muy homogénea en la superficie de contacto, indicativa del mayor grado de integración. La evidencia de esta integración incrementada fue evidente en las secciones tanto verticales como transversales en todas las muestras.

Una reparación de cartílago con éxito requiere que el material de reparación (de ingeniería tisular o nativo) se integre bien en el cartílago circundante para garantizar una transferencia continua de cargas (y ausencia de concentraciones de tensión) en la superficie de contacto. En este estudio, los inventores estudiaron el potencial de la esprifermina de potenciar la integración de cartílago en un modelo de reparación de cartílago *ex vivo* (explante) bien definido. La esprifermina tiene un efecto pro proliferativo establecido sobre los condrocitos (Elthworth et al., 2002), provocando una exposición transitoria (24 horas) a este agente biológico la respuesta más llamativa. Los hallazgos de los inventores demuestran claramente que la esprifermina mejora la fuerza de integración y la deposición matricial en la superficie de contacto (según pone de manifiesto la  $\mu$ CT mejorada en contraste, que muestra una atenuación más uniforme por el aumento en proteoglicanos portadores de GAG). En este estudio, una administración semanal de 24 horas durante 4 semanas conduce a un mejor resultado general que un tratamiento de 24 horas a lo largo de un mes. Este último régimen también es útil, aunque no tan bueno como el régimen de ciclo semanal, ya que proporciona una mejora sorprendente en comparación con el constructo de control (es decir, en ausencia de tratamiento con esprifermina). Este estudio demuestra por vez primera que un compuesto biológico (y en particular una esprifermina) ha mejorado la integración de superficies de cartílago en un modelo de reparación clínicamente relevante.

### Conclusiones

Este estudio demuestra que la esprifermina es capaz de mejorar la integración de superficies de cartílago en un modelo de reparación de cartílago. Los hallazgos implican su utilidad potencial en procedimientos quirúrgicos tales como OATS y en planteamientos de ingeniería tisular en los que se requerirán biomateriales de tipo cartilaginoso para integrarse con éxito con cartílago nativo para lograr el éxito clínico.

### Ejemplo 2

#### Método

Se aislaron condrocitos osteoartríticos primarios del cartílago de pacientes sometidos a su sustitución total de la rodilla. Las células fueron cultivadas en primer lugar durante algunos días en cultivo monocapa y luego durante una semana en un cultivo 3D libre de andamiaje antes de iniciar el tratamiento. Este consistió en la incubación con rhFGF18 [100 ng/mL] permanentemente o un día/semana durante un periodo total de cuatro semanas. Los resultados se compararon con un cultivo de control culture sin esprifermina. Para clasificar los constructos 3D se usaron ensayos bioquímicos, PRC cuantitativa e histología.

#### Resultados (no se muestran los datos)

Para garantizar el mantenimiento del fenotipo, se usó un cultivo 3D libre de andamiaje para someter a ensayo el efecto de la esprifermina en condrocitos hOA. Se ha descubierto que, en este contexto, el rhFGF18 [1 día/semana] tiene un efecto beneficioso sobre el contenido celular y aumenta enormemente el tamaño y el contenido matricial (contenido de GAG y HPro) de los constructos 3D. También se descubrió que el rhFGF18 disminuye la expresión de colágeno I en comparación con células no tratadas.

### Conclusión

Según se ha observado en estudios previos con condrocitos bovinos y porcinos, se descubrió que la esprifermina tiene actividad anabólica en condrocitos hOA. Los hallazgos implican su utilidad potencial en planteamientos de ingeniería tisular en los que se requerirán biomateriales de tipo cartilaginosa para integrarse con éxito con cartílago nativo para lograr el éxito clínico.

### Ejemplo 3

#### Métodos

Se aislaron condrocitos porcinos del cartílago de una cabeza femoral de la cadera de un cerdo. Tras la disección de las articulaciones, el cartílago fue recogido y digerido durante 45 minutos con colagenasa al 0,25%. Las células desprendidas fueron descartadas y el cartílago fue digerido adicionalmente durante la noche con colagenasa al 0,1% para extraer los condrocitos. Los condrocitos porcinos fueron cultivados en suspensión como ATC (análogos de tejido cartilaginosa) una primera semana sin ningún tratamiento, seguido por uno de los siguientes tratamientos: 1) cuatro semanas de cultivo en presencia permanente de rhFGF18 a 10 o 100 ng/mL, 2) una semana de cultivo en presencia de rhFGF18 a 10 o 100 ng/mL y, posteriormente, tres semanas sin rhFGF18, 3), tres semanas de cultivo con rhFGF18 a 10 o 100 ng/mL dado 1 día por semana (es decir, una exposición de 24 horas seguidas por 6 días sin rhFGF18) y, posteriormente, una semana sin rhFGF18 o 4) cuatro semanas en ausencia de rhFGF18, como control (Figura 4). Al final del periodo de cultivo, los ATC fueron recogidos y analizados en busca de su contenido de GAG, hidroxiprolina y celular. Se evaluó la expresión génica para colágeno I, II y Sox9 y también se llevó a cabo una histología con Safranina O y colágeno de tipos I y II.

*Resultados: Efecto de la exposición permanente o intermitente al rhFGF18 sobre el desarrollo celular en los ATC*

Para cada condición de cultivo, los ATC fueron lisados y el contenido de ADN evaluado para calcular el número de células/ATC (Figura 5). En el cultivo de control (sin rhFGF18) no se observó proliferación alguna, ya que el número de células (1,2 millones) fue similar a la densidad de inoculación (1 millón de células/ATC). Sin embargo, según se esperaba, la presencia permanente de rhFGF18 aumentó la proliferación de condrocitos (con 2,2 y 2,49 millones de células/ATC con rhFGF18 10 y 100 ng/mL, respectivamente). Cuando se dio rhFGF18 una semana únicamente y los condrocitos fueron cultivados otras 3 semanas sin rhFGF18 (1 s), no pudo observarse aumento alguno en la proliferación en comparación con el control. Por el contrario, cuando se dio rhFGF18 un día por semana (1 d/s), se observó la proliferación estimulada por rhFGF18 en comparación con el control, pero también en comparación con la exposición permanente. El contenido celular/ATC alcanzó 4 millones de células/ATC con rhFGF18 100 ng/mL, un día/semana, en comparación con 1,2 millones en ausencia de rhFGF18 o 2,49 millones en presencia permanente de rhFGF18 100 ng/mL.

*Resultados: Efecto de la exposición permanente o intermitente al rhFGF18 sobre la producción matricial en los ATC*

Para cada condición de cultivo, los ATC fueron digeridos con proteinasa K y se evaluaron los contenidos de GAG e hidroxiprolina (Figura 6). El GAG refleja el contenido de proteoglicano, mientras que la hidroxiprolina refleja el contenido de colágeno de los ATC. Según se ha observado anteriormente, la presencia permanente de rhFGF18 disminuyó el contenido de GAG/ATC (2,6 veces menos GAG en comparación con el control), pero también el contenido de hidroxiprolina/ATC (2,1 veces menos hidroxiprolina en comparación con el control). Por el contrario, cuando se dio rhFGF18 intermitentemente (1/semana o 1 día/semana) aumentaron los contenidos de GAG e hidroxiprolina. Por ejemplo, cuando se dio rhFGF18 100 ng/mL un día por semana, el contenido de GAG aumentó 2,67 veces y el contenido de hidroxiprolina 2,13 veces en comparación con el control.

*Resultados: Efecto de la exposición permanente o intermitente al rhFGF18 sobre el fenotipo de los condrocitos en los ATC*

Para cada condición de cultivo, se aisló ARN de los ATC y se analizó la expresión de colágeno de tipo I, tipo II, tipo X y Sox9 mediante PCR cuantitativa (Figura 7). Las altas expresiones de Sox9 y colágeno de tipo II son marcadores del fenotipo condrocítico, mientras que el colágeno de tipo I es un marcador de falta de diferenciación, y el colágeno de tipo X de hipertrofia de los condrocitos. También se calculó la proporción colágeno II / I. Esta proporción es usada comúnmente para ilustrar el mantenimiento del fenotipo (mayor proporción) o la pérdida de fenotipo (menor proporción) de los condrocitos en el cultivo. En todas las condiciones con rhFGF18, con exposición permanente o intermitente, a 10 o 100 ng/mL, la expresión de colágeno de tipo I disminuyó. Esta disminución fue máxima cuando se dio el rhFGF18 un día por semana a una concentración de 100 ng/mL. Como ejemplo, la expresión de colágeno de tipo I disminuyó 4 veces en comparación con el control con rhFGF18, 100 ng/mL, permanentemente, pero 123 veces con rhFGF18, 100 ng/mL, dado un día por semana. Se descubrió que el colágeno de tipo II disminuía en presencia permanente de rhFGF18, pero, en general, quedaba inalterado en presencia de rhFGF18 dado una semana (1 s) o un día por semana (1 d/s). No se observó ninguna variación importante en la expresión de Sox9. Esta aumentó significativamente ( $\times 2,2$ ) únicamente con rhFGF18 10 ng/mL dado una semana (1 s). Por último, se descubrió que el rhFGF18 permanente no tenía ningún efecto en la proporción colágeno II/I, pero que cuando el rhFGF18 era dado un día por semana esta proporción aumentó 19 veces y 138 veces en comparación con el control con rhFGF18 a 10 y 100 ng/mL respectivamente. También se evaluó el colágeno de tipo X como marcador de la

hipertrofia de los condrocitos, y se encontró que no se veía influido por el rhFGF18 en las presentes condiciones de cultivo.

*Resultados: Efecto de la exposición permanente o intermitente al rhFGF18 sobre la morfología y el contenido de colágeno II y I de los ATC (no se muestran los datos)*

5 El análisis histológico de los ATC después de 4 semanas de tratamiento con diferentes exposiciones al rhFGF18 reveló que, en presencia permanente de rhFGF18, los ATC eran más delgados y que la tinción con Safranina O era menos intensa en comparación con otras condiciones. Además, en presencia permanente de rhFGF18, puede observarse una zona proliferativa con mayor densidad celular y ausencia de matriz extracelular en la periferia de los constructos. Por otro lado, también puede observarse que la exposición intermitente al rhFGF18 dio lugar a constructos más gruesos en comparación con el control. En todas las condiciones, el colágeno de tipo I no fue detectable (no se muestra), mientras que todos los ATC estaban intensamente tincionados para el colágeno de tipo II.

#### *Conclusiones*

15 La exposición permanente a rhFGF18 estimuló la proliferación de condrocitos, pero disminuyó el contenido matricial de los ATC (menos GAG e hidroxiprolina). De manera similar, la expresión de colágeno, tanto de tipo I como de tipo II, disminuyó en comparación con el control. No se observó ningún efecto significativo de la exposición permanente al rhFGF18 a 10 o 100 ng/mL sobre Sox9 después de 4 semanas de tratamiento. Los análisis histológicos revelaron que los ATC eran menores y presentaban una zona proliferativa exenta de ECM en la periferia de los ATC. Juntos, todos estos resultados indican que, en presencia permanente de rhFGF18, la proliferación cobra ventaja con respecto a la producción matricial.

20 Cuando los ATC son cultivados una semana con rhFGF18, 10 o 100 ng/mL, y, subsiguientemente, 3 semanas sin rhFGF18, al contrario que con la exposición permanente, no se observó ninguna estimulación de la proliferación. Sin embargo, se descubrió que el contenido en GAG e hidroxiprolina era mayor que en el control. La expresión de colágeno I disminuyó, mientras que la expresión de colágeno de tipo II quedó inalterada o incluso aumentó ligeramente (para rhFGF18 a 10 ng/mL), en comparación con el control. En consecuencia, aumentó la proporción colágeno II/I, indicando un mejor mantenimiento del fenotipo. De manera similar, el Sox9 también aumentó ligeramente en comparación con el control (significación únicamente para el rhFGF18 a 10 ng/mL). La histología reveló que los ATC estaban compuestos de una matriz positiva a la Safranina O y al colágeno de tipo II, de modo similar a los ATC de control. En comparación con el control, estos ATC también eran más gruesos, según el mayor contenido en GAG e hidroxiprolina.

25 Los mejores resultados con respecto a la proliferación y el contenido matricial se obtuvieron cuando se daba rhFGF18 a 100 ng/mL 1 día por semana. Para esta condición, el colágeno de tipo I también era el menor y la proporción colágeno II / I la mayor. Sin embargo, la expresión de colágeno de tipo II y Sox 9 permaneció inalterada en comparación con el control. Los ATC fueron positivos a la Safranina O y al colágeno de tipo II. Así como para el tratamiento de una semana, con comparación con el control, estos ATC también eran más gruesos, lo que también está en consonancia con su mayor contenido en GAG e hidroxiprolina.

30 En conclusión, la exposición intermitente potencia los efectos del rhFGF18 y permite lograr una proliferación y una producción de ECM mayores y promueve el fenotipo condrocítico en el cultivo, siendo 1 día/semana > 1 semana > control > exposición permanente. Estos resultados apoyan una administración cíclica de rhFGF18 para el tratamiento de la OA.

#### **Ejemplo 4**

##### *Métodos*

35 Se obtuvieron condrocitos bovinos según se ha documentado en los ejemplos 2 y 3. Fueron cultivados 1 o 2 semanas con rhFGF18 a 100 ng/mL presente permanentemente (FGF18), o como control en ausencia de FGF18 (CTR). Al final del cultivo, las células fueron recogidas y contadas o lisadas en busca del aislamiento del ARN y de la expresión génica. La expresión de Sox9, colágeno I y II fue evaluada por PCR cuantitativa.

##### *Resultados*

40 Después de dos semanas de cultivo con FGF18 permanente, la concentración celular era mayor que la del grupo de control. La expresión de colágeno de tipo I estaba intensamente reprimida en presencia de rhFGF18, mientras que las expresiones de colágeno de tipo II y Sox9 aumentaron (Figura 8).

##### *Conclusión*

45 Cuando los condrocitos son cultivados en una monocapa, la exposición permanente al rhFGF18 a 100 ng/mL permite aumentar la proliferación celular a la vez que permite un mejor mantenimiento del fenotipo (aumento de la expresión de colágeno II y Sox9 y disminución de la expresión de colágeno I)

**Ejemplo 5***Métodos*

Se usó el cartílago de dos paciente de OA que se sometieron a una sustitución total de rodilla. Los condrocitos fueron aislados según se describió en el Ejemplo 3 y, en primer lugar, fueron cultivados 3-4 días con gran densidad en monocapa. Posteriormente, los condrocitos fueron recogidos e inoculados a razón de  $1 \times 10^6$  células/200mL en una placa de 96 pocillos y se dejó que se agregaran una semana sin ningún tratamiento para formar los ATC. A continuación, fueron cultivados 4 semanas en ausencia o presencia de rhFGF18 a 100 ng/mL según el siguiente tratamiento: 1) cuatro semanas de cultivo en ausencia de rhFGF18 (control) 2) cuatro semanas de cultivo en presencia permanente de rhFGF18 (perm) y 3) cuatro semanas de cultivo con rhFGF18 dado 1 día por semana (es decir, una exposición de 24 horas seguida por 6 días sin rhFGF18) (1 d/s) (véase la Figura 4). Al final del periodo de cultivo, los ATC fueron recogidos y analizados en busca de su contenido de GAG y celular. Con los ATC obtenidos del paciente 2, se evaluó la expresión génica para colágeno de tipo I, tipo II y Sox9 y también se realizó la histología para Safranina O y colágeno de tipos I y II.

## Resultados: Proliferación celular

El rhFGF18 a 100 ng/mL aumentó la proliferación de condrocitos osteoartíticos humanos en cultivo 3D (véase la Figura 9). Para los condrocitos procedentes del paciente 1, en el control, el número de células/ATC fue menor que el número inicial de células (la densidad de inoculación fue de 1 millón de células/ATC), indicando que muchas células murieron. Sin embargo, en presencia de rhFGF18 permanente o 1 día/semana, pudieron encontrarse 1,5 millones de células/ATC, lo que sugería que estas células no murieron, sino que proliferaron. Para los condrocitos procedentes del paciente 2, puede observarse un número de células ligeramente mayor (de 1 a 1,3 millones/ATC) en el ATC no tratado. Este aumentó adicionalmente en presencia de rhFGF18 permanente (de 1 a 1,9 millones de células/ATC)

## Resultados: Producción matricial

El rhFGF18 a 100 ng/mL aumentó la producción de GAG por parte de los condrocitos osteoartíticos humanos en cultivo 3D (véase la Figura 10). En el paciente 1 con rhFGF18 permanente y 1 día/semana y en el paciente 2 con FGF18, había presente en los ATC significativamente más GAG.

## Resultados: Expresión génica

El fenotipo condrocítico se caracteriza por la baja expresión o la ausencia de colágeno de tipo I y una mayor expresión de Sox9 y colágeno II. Este patrón de expresión se altera en los condrocitos osteoartíticos (véase la Figura 11). De hecho, en los ATC no tratados la expresión de colágeno de tipo I fue mayor que la expresión de colágeno de tipo II (abundancia relativa de 0,67 y 0,04, respectivamente). El rhFGF18 fue capaz de reducir la expresión de colágeno I a la vez que aumentó la expresión de colágeno II. En consecuencia, la proporción colágeno II/I aumentó de 11 a 13 veces en presencia de rhFGF18. Además, el rhFGF18 aumentó la expresión de Sox9, marcador del fenotipo condrocítico.

## Resultados: Histología (no se muestran los datos)

En comparación con el control, los ATC cultivados con rhFGF18 1 día/semana o permanente presentaron una mayor tinción con Safranina O, lo que indicaba que contenían más GAG. Esto está en consonancia con los resultados presentados en la Figura 10. La tinción con colágeno I disminuyó en las células tratadas con rhFGF18, lo que también se corresponde bien con los resultados de expresión génica de la Figura 11. No pudo verse tinción alguna con colágeno II en el cultivo de control, lo que indica que estos condrocitos osteoartíticos humanos (hOA) no eran capaces de producir una matriz de tipo cartilaginosa. Sin embargo, los rhFGF18 1 día/semana y permanente fueron ambos capaces de restaurar la capacidad de los condrocitos hOA de producir colágeno II.

## Conclusión

Los resultados obtenidos con condrocitos aislados de cartílago osteoartítico humano mostraron que el rhFGF18 era capaz de promover el crecimiento celular, aumentar la producción de matriz de tipo cartilaginosa hialino y favorecer el fenotipo condrocítico. En este experimento, los rhFGF18 permanente y de un día/semana tuvieron un rendimiento igual en cuanto a varios parámetros. Sin embargo, en cuanto a la producción matricial, el rhFGF18 de un día/semana tuvo un rendimiento ligeramente mejor (mayor acumulación de GAG en el paciente 1 y mayor expresión de colágeno II en el paciente 2).

**Referencias**

1. Magill et al., 2011, *J. orthopaedic Surg.* 19(1):93-98
2. Zhang et al., 2013, *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(4):527-540
3. Tang et al., 2012, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 12(10):1361-1382

4. Ellsworth et al., 2002, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10: 308-320
5. Shimoaka et al., 2002, *JBC* 277(9):7493-7500
6. WO2008023063
7. WO2004032849
- 5 8. WO9816644
9. WO2006063362
10. Custers et al., 2007, *Osteoarthritis and Cartilage*, 15:1241-1248
11. Lotz, 2010, *Arthritis research therapy*, 12:211
12. *The Merck manual*, 17ª edición, 1999
- 10 13. Getgood et al., 2010, P116, ICRS Meeting 2010, Barcelona.
14. Publicación de ICRS: [http://www.cartilage.org/\\_files/contentmanagement/ICRS\\_evaluation.pdf](http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf), página 13
15. Bian et al., 2010, *Am. J. Sports. Med*, 38(1):78-85.
16. Gennero et al., 2013, *Cell Biochem Funct* 31 (3) 214-227
17. Mauck et al., 2006, *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(2):179-189
- 15 18. Bian et al., 2008 *J. Biomech.*, 41(6):1153-1159

**Listado de secuencias**

- <110> Merck Patent GmbH
- 20 <120> FGF-18 en procedimientos de trasplante de injertos y de ingeniería tisular
- <130> P14/015
- <150> EP14000599.2
- <151> 20.02.2014
- 25 <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- 30 <210> 1  
<211> 207  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- 35 <220>  
<223> FGF-18 humano
- <400> 1

ES 2 676 318 T3

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp  
 20 25 30

Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser  
 35 40 45

Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys  
 50 55 60

His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly  
 65 70 75 80

Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln  
 85 90 95

Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg  
 100 105 110

Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val  
 115 120 125

Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala  
 130 135 140

Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg  
 145 150 155 160

Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys  
 165 170 175

Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr  
 180 185 190

Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala  
 195 200 205

<210> 2  
 <211> 170  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> FGF-18 recombinante truncado (trFGF-18)

10

<400> 2

ES 2 676 318 T3

Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg  
 1 5 10 15

Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr  
 20 25 30

Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser  
 35 40 45

Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr  
 50 55 60

Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe  
 65 70 75 80

Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly  
 85 90 95

Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr  
 100 105 110

Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr  
 115 120 125

Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln  
 130 135 140

Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln  
 145 150 155 160

Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys  
 165 170

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para producir un material cartilaginoso para ingeniería tisular, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar células condrogénicas, en cultivo 3D, en un caldo de cultivo que comprende un compuesto FGF-18 durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un material cartilaginoso trasplantable, siendo añadido el compuesto FGF-18 intermitentemente al caldo de cultivo, durante aproximadamente uno, dos o tres días por semana, repitiéndose dicha adición de aproximadamente un día, dos días o tres días cada semana durante al menos 2 semanas de cultivo, al menos 3 semanas de cultivo o al menos 4 semanas de cultivo.
2. Un procedimiento para producir un material cartilaginoso para ingeniería tisular, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de cultivar células condrogénicas, en cultivo 3D, en un caldo de cultivo que comprende un compuesto FGF-18 durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un material cartilaginoso trasplantable, siendo añadido el compuesto FGF-18 intermitentemente al caldo de cultivo, durante aproximadamente uno, dos o tres días por mes, repitiéndose dicha adición de aproximadamente un día, dos días o tres días cada mes durante al menos 2 meses de cultivo, al menos 3 meses de cultivo o al menos 4 meses de cultivo.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que el compuesto FGF-18 es añadido intermitentemente al caldo de cultivo durante uno, dos o tres días por semana, repitiéndose dicha adición de un día, dos días o tres días cada semana durante 2 semanas de cultivo, 3 semanas de cultivo o 4 semanas de cultivo.
4. El procedimiento según la reivindicación 2 en el que el compuesto FGF-18 es añadido intermitentemente al caldo de cultivo durante uno, dos o tres días por mes, repitiéndose dicha adición de un día, dos días o tres días cada mes durante 2 meses de cultivo, 3 meses de cultivo o 4 meses de cultivo.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que las células condrogénicas son condrocitos o células madre mesenquimales derivados de tejidos maduros.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el compuesto FGF-18 es seleccionado del grupo constituido por:
- a) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura del FGF-18 humano que comprende los residuos 28-207 de la SEQ ID NO:1,
  - b) un polipéptido que comprende o consiste en los residuos 28-196 de la SEQ ID NO:1, o
  - c) un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO:2.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que las células condrogénicas son recogidas o aisladas de un mamífero antes de su expansión o su cultivo.
8. El procedimiento según la reivindicación 7 en el que las células condrogénicas son recogidas o aisladas del mamífero que ha de ser tratado o de un mamífero diferente.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 en el que el mamífero es un ser humano.
10. Material cartilaginoso trasplantable obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para ser usado en el tratamiento de un trastorno de cartílago.
11. Material cartilaginoso trasplantable o cartílago regenerado, según la reivindicación 10, siendo el trastorno de cartílago osteoartritis, lesión de cartílago o defecto osteocondral.

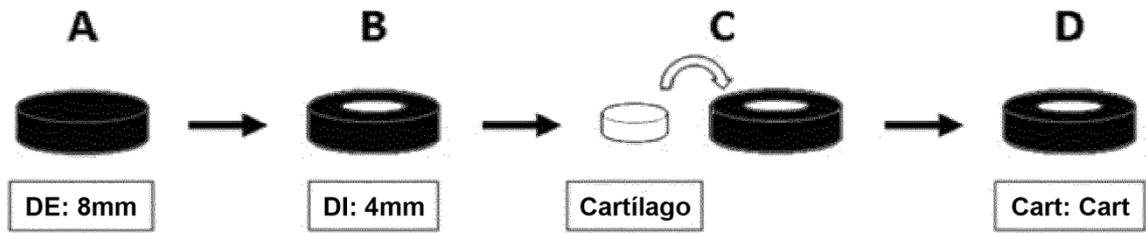


Figura 1

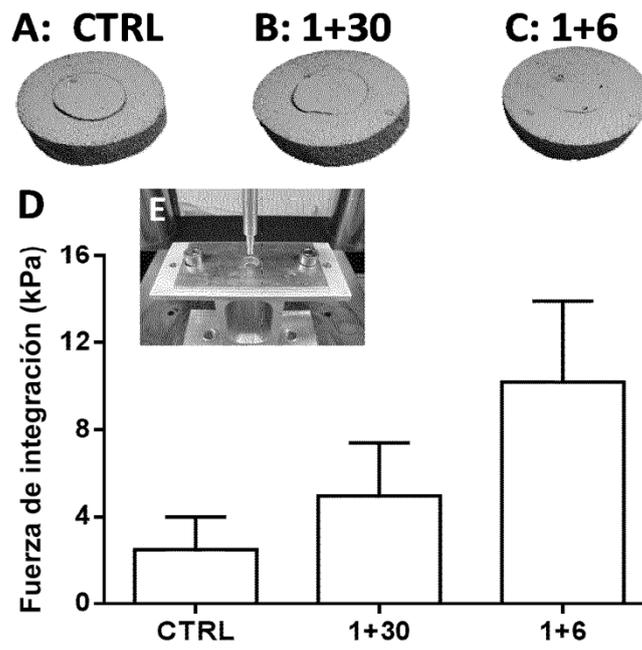


Figura 2

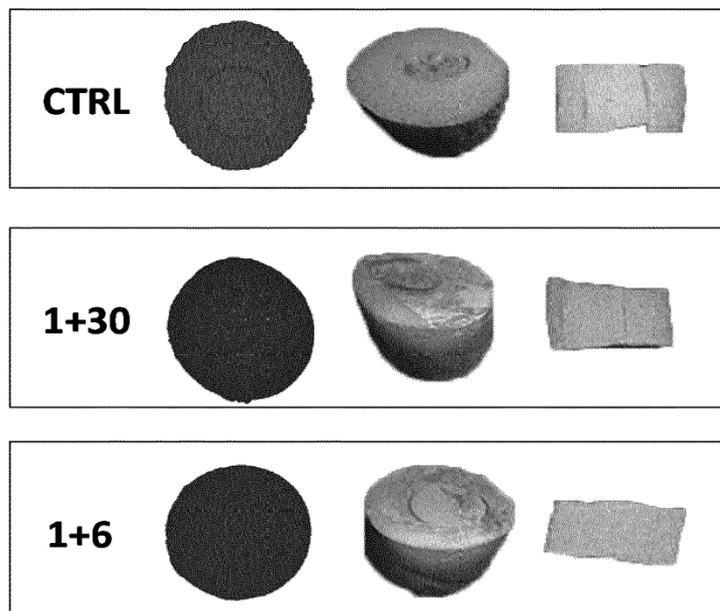


Figura 3

Precultivo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	
Sin rhFGF18	Sin rhFGF18				CTR
	rhFGF18				perm
	rhFGF18	Sin rhFGF18			1 s
	Sin rhFGF18	Sin rhFGF18	Sin rhFGF18		1 d/s

Figura 4

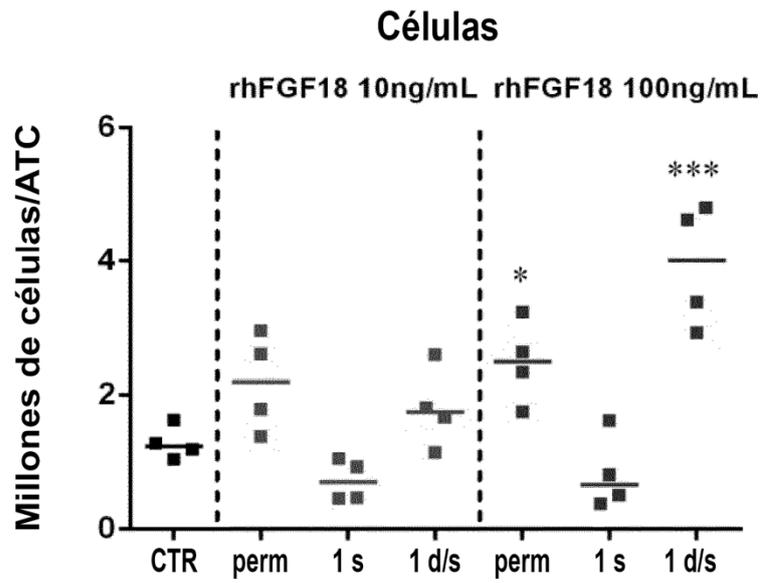


Figura 5

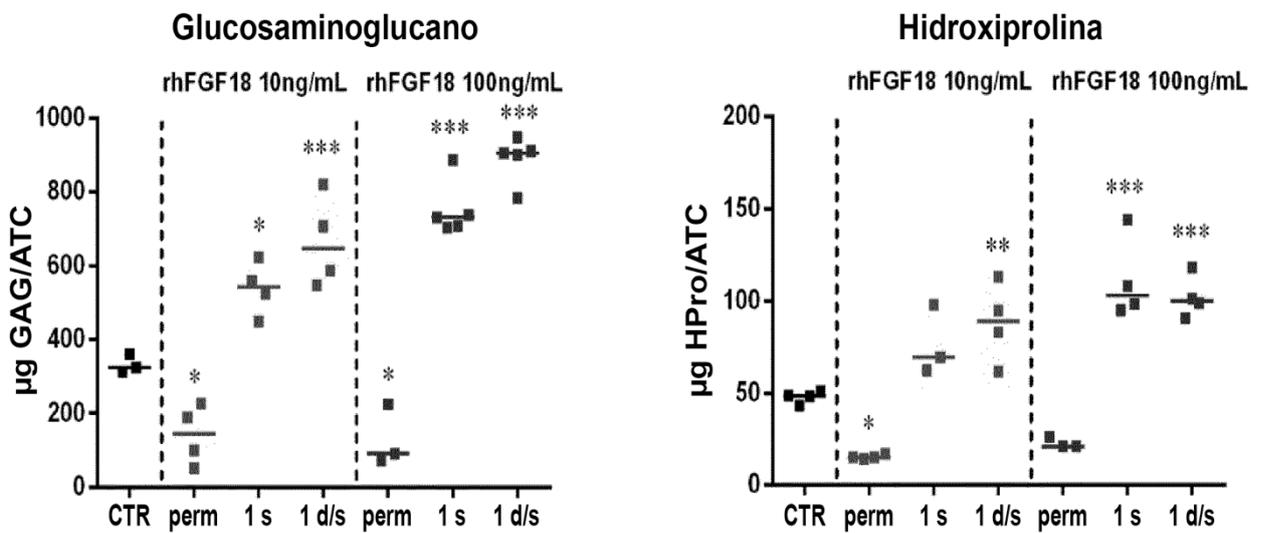


Figura 6

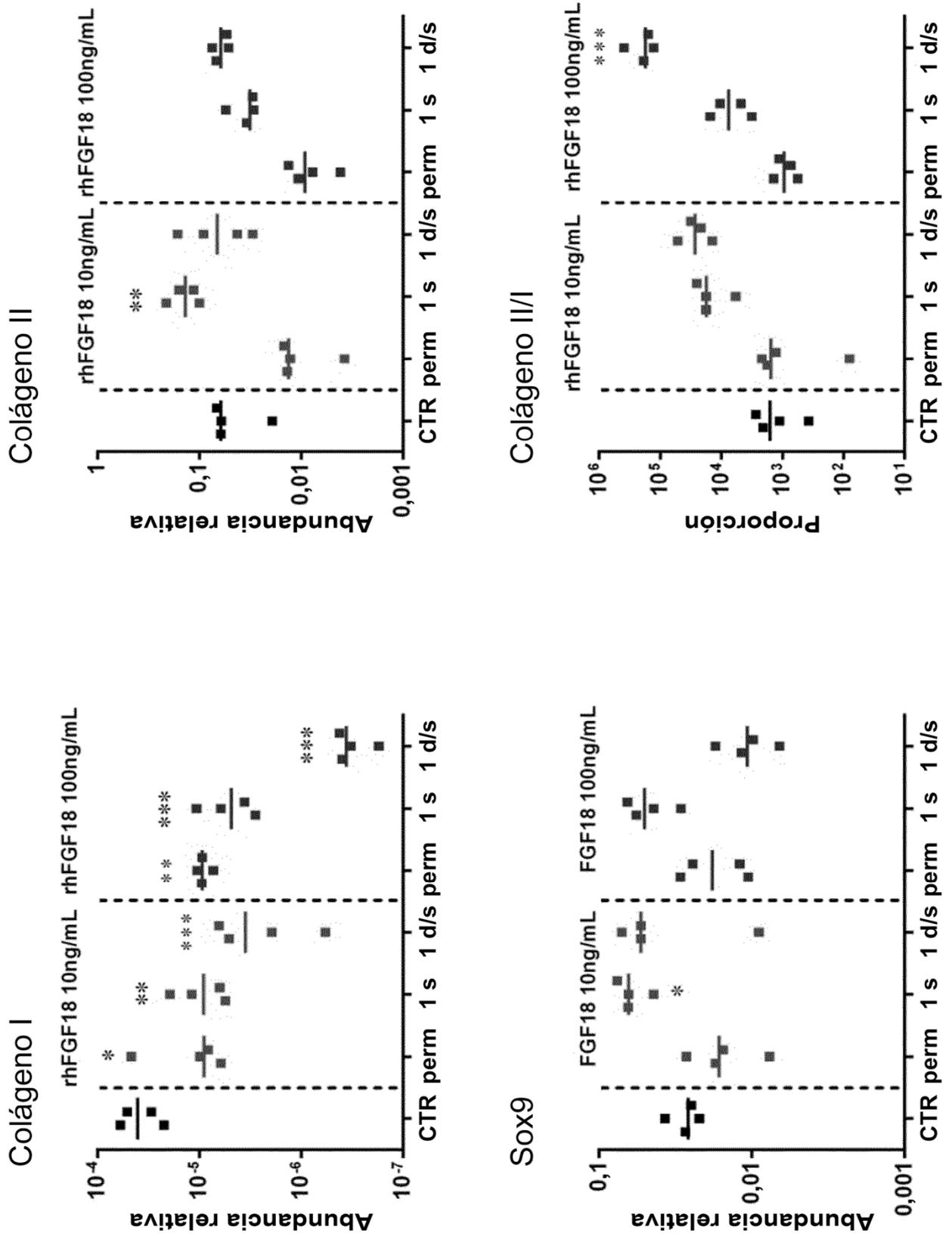


Figura 7

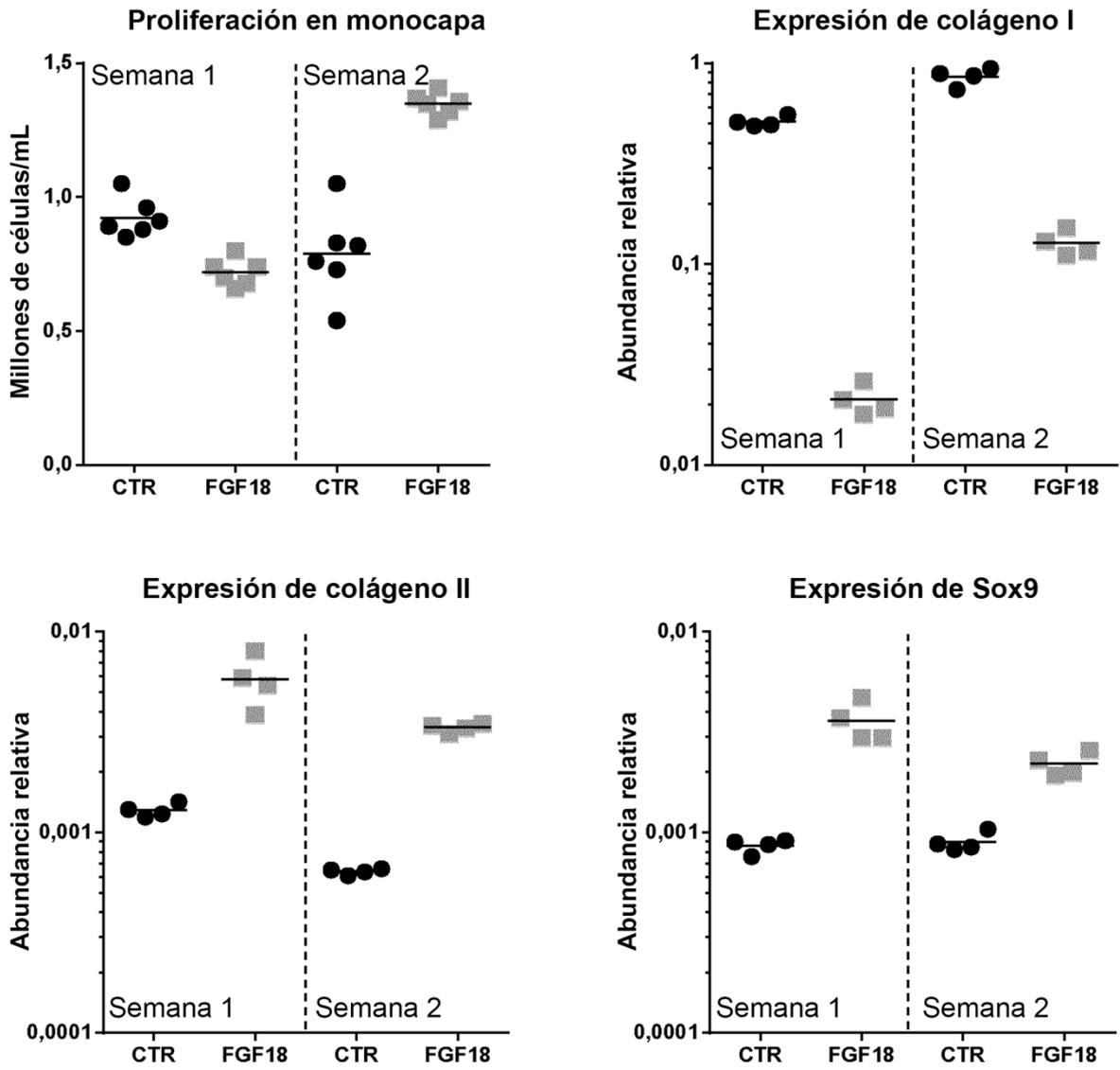


Figura 8

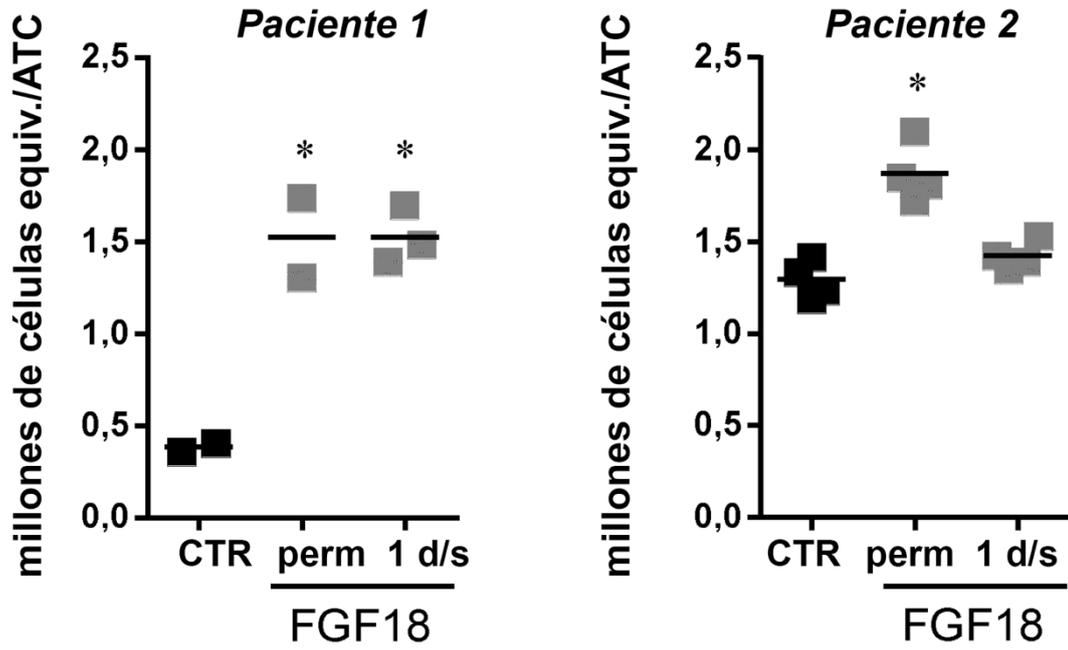


Figura 9

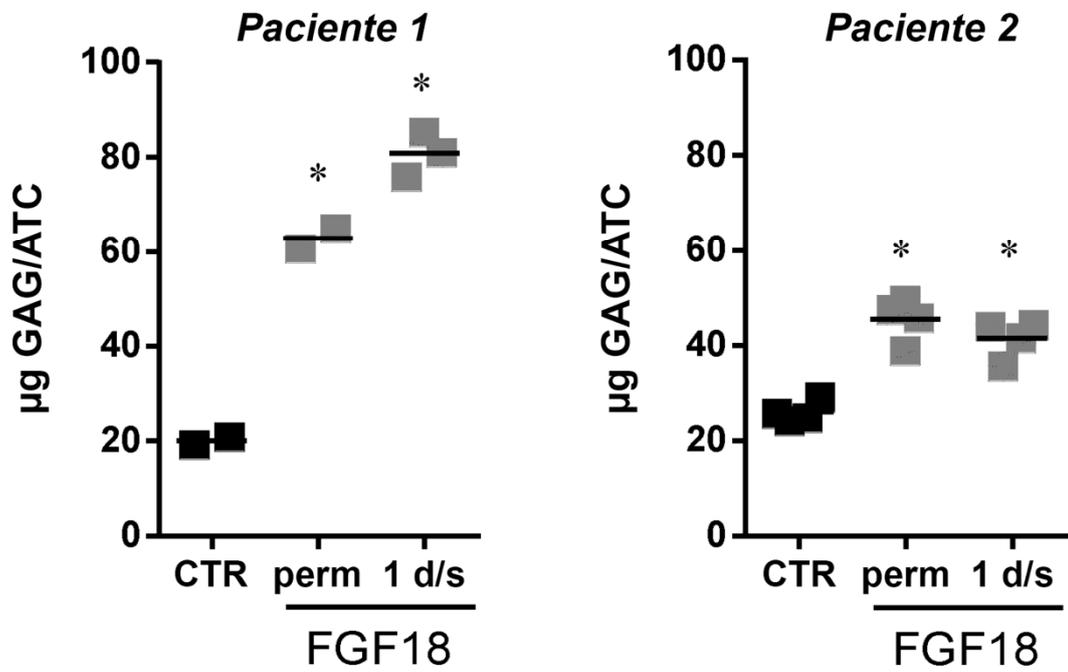


Figura 10

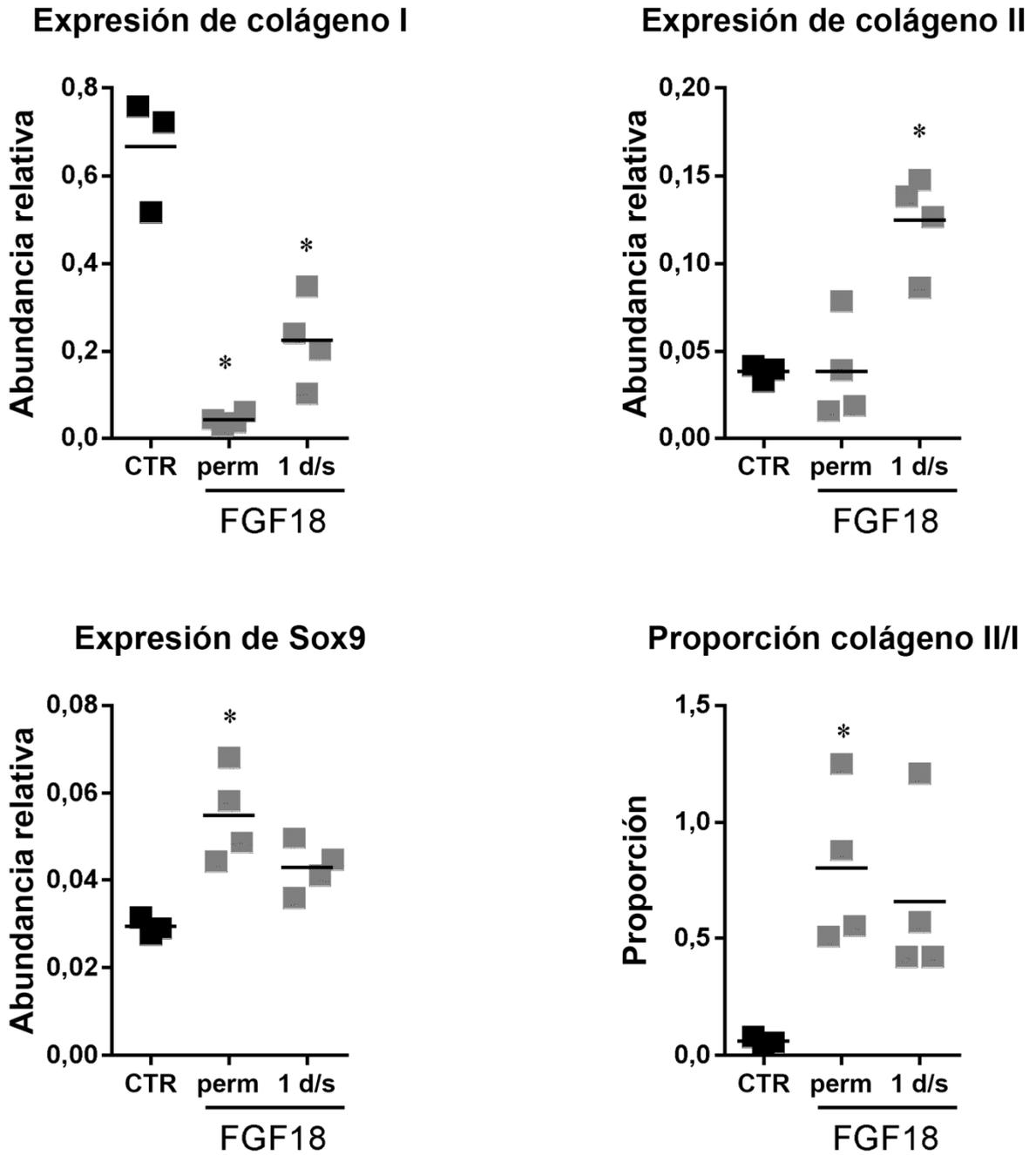


Figura 11