

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 117**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/54** (2006.01)

**A61L 27/24** (2006.01)

**A61L 27/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015 PCT/EP2015/053645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124739**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015 E 15706011 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3107592**

54 Título: **Implante que comprende FGF-18**

30 Prioridad:

**20.02.2014 EP 14000598**

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

**31.01.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LADEL, CHRISTOPH H. y  
GUEHRING, HANS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 698 117 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

Implante que comprende FGF-18

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere al ámbito de las composiciones farmacéuticas. Más particularmente se refiere a un sistema de liberación de sustancias (o implante), tal como armazones y membranas, que comprenden el fármaco anabólico Factor de Crecimiento de Fibroblastos 18 (FGF-18), a los métodos de producción de dicho sistema de liberación, así como al uso del mismo, según se definen en las reivindicaciones. Los implantes según la invención son para uso en el tratamiento de trastornos de cartílagos, tales como osteoartritis, lesiones en cartílagos o defectos osteocondriales.

**Antecedentes de la invención.**

10 El Factor de Crecimiento de Fibroblastos 18 (FGF-18) es un miembro de la familia de proteínas denominadas Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), estrechamente relacionado con FGF-8 y FGF-17. Los miembros de la familia FGF se caracterizan por los dominios de unión a heparina. Dicho supuesto dominio de unión a heparina ha sido identificado para FGF-18. Se postula que la señalización mediada por receptor se inicia tras la unión del ligando de FGF complejo con proteoglicanos de sulfato de heparina de la superficie celular. Se ha mostrado que FGF-18 es un agente proliferativo para condrocitos y osteoblastos (Ellsworth et al., 2002, Shimoaka et al., 2002). Se ha propuesto el FGF-18 para el tratamiento de trastornos de cartílago, tal como la osteoartritis (OA) y la lesión del cartílago (CI), en solitario (WO2008/023063) o en combinación con ácido hialurónico (WO2004/032849).

20 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de FGF son conocidas en la técnica. El documento WO2012172072 describe una formulación liofilizada que contiene FGF-18, en la que dicha composición comprende FGF-18, un tampón, un tensioactivo poloxámero y un azúcar como agente estabilizante. Dicha formulación liofilizada de FGF18 está presentando resultados prometedores en el tratamiento de OA o CI.

El régimen de dosificación actual, empleando dicha formulación liofilizada, es un ciclo de tratamiento de una inyección por semana durante 3 semanas. El ciclo de tratamiento puede repetirse.

25 El principal inconveniente de la formulación actual de FGF-18 es que, una vez inyectada intraarticularmente (i.a.), la presencia de FGF18 en el líquido sinovial puede inducir un crecimiento incontrolado del cartílago también en áreas sanas. Esto puede producir, por supuesto, efectos no deseados tal como movilidad articular reducida. La liberación selectiva de FGF18 a nivel del sitio objetivo podría promover el crecimiento del cartílago en el área dañada solamente. En particular, la liberación de FGF18 a nivel del área dañada podría ser muy beneficiosa para el tratamiento de OA o CI, especialmente cuando se combina con microfractura. La microfractura es una técnica quirúrgica de reparación del cartílago articular que funciona mediante la creación de pequeñas fracturas en el hueso subyacente. Esto causa la liberación de células madre mesenquimales pluripotentes de médula ósea (Ringe J. et al., 2012). Al llenar el orificio del cartílago con un armazón o una membrana que contiene FGF18, las células serían dirigidas dentro de dicha matriz que, entonces, actuarían como soporte mecánico para el crecimiento de las células y el depósito del fármaco al mismo tiempo. Por esta razón, sería preferible que el FGF18 se libere lentamente del armazón/la membrana al tejido circundante y/o que permanezca atrapado en el armazón/la membrana.

35 Un enfoque típico en la ingeniería tisular es el confinamiento de factores de crecimiento en una matriz 3D, es decir, un armazón o en una membrana, que se pueda implantar o inyectar, dependiendo de las propiedades mecánicas, para asumir la forma del sitio aceptor (Yun et al., 2010). Las características obligatorias de los armazones/las membranas son la biocompatibilidad y la capacidad de reabsorción. Además, los armazones/ las membranas deben ser capaces de proporcionar a las células el entorno ideal para crecer, multiplicarse y reformar el tejido dañado. Idealmente, la matriz debería poseer las mismas propiedades mecánicas del tejido original y debería presentar una microporosidad capaz de albergar células (poros interconectados con un tamaño suficiente) (Tessmar y Gopferich, 2007).

45 Algunas matrices útiles para la ingeniería tisular ya están comercializadas. Por ejemplo, la membrana Chondro-Gide™ (Geistlich Biomaterials) consiste en colágenos tipos I y III, dispuestos en una estructura bicapa. Esta membrana ha sido aprobada en algunos países, por ejemplo en Francia, en combinación con la implantación de condrocitos autólogos (preferiblemente en combinación con el producto aprobado ChondroCelect™). Un producto similar, Maci (Genzyme), ha sido recientemente aprobado en el mercado europeo. Este consiste en condrocitos autólogos expandidos ex vivo que expresan genes marcadores específicos de condrocitos, sembrados en una membrana de colágeno tipo I/III (Maix). Chondromimetic™ (Orthomimetics Ltd) es un armazón compuesto por colágeno bovino de tipo I y glicosaminoglicano condroitín-6-sulfato (armazón de colágeno/GAG). Este implante también ha sido aprobado para el mercado europeo.

55 Por ejemplo, el documento WO2012113812 describe armazones nanofibrosos funcionalizados por recubrimiento con multicapas de polielectrolitos, es decir, al menos una capa de polianiones y una capa de policationes. Las moléculas terapéuticas, tales como FGF18, se pueden incluir en las multicapas de polielectrolitos. En particular, la molécula terapéutica puede formar la capa de polianiones. Dicho armazón puede además comprender opcionalmente osteoblastos dentro de un hidrogel de colágeno y condrocitos dentro de un hidrogel de alginato, en donde cada hidrogel se deposita sobre el armazón recubierto. Dicho armazón está destinado a implantación in situ, mediante cirugía.

5 Cuando se prepara una composición farmacéutica que comprende una proteína bioactiva, dicha composición se debe formular de manera tal que la actividad de la proteína se mantenga durante un tiempo apropiado. Una pérdida en la actividad/ estabilidad de la proteína puede ser el resultado de inestabilidades químicas o físicas de la proteína, especialmente debido a desnaturalización, agregación u oxidación. Los productos resultantes pueden ser farmacéuticamente inaceptables. Aunque se sabe que el uso de excipiente (s) y/o matriz aumenta la estabilidad de una proteína dada, los efectos estabilizadores de estos excipientes dependen en gran medida del polímero en la matriz, la naturaleza de los excipientes, si los hubiera, y la proteína bioactiva en sí misma.

10 Si bien los procedimientos de ingeniería tisular son prometedores, es necesario mejorar la tasa de integración o la calidad del cartílago producido. Por lo tanto, existe la necesidad de una composición mejorada, que permita una buena integración y la buena calidad del cartílago producido (es decir, principalmente cartílago hialino); también existe la necesidad de un sistema alternativo para proporcionar un compuesto terapéutico en el sitio del defecto. De hecho, la generación de dicho cartílago hialino es valiosa como componente terapéutico y como componente para matrices biológicas (Power et al., 2012). Dichas composiciones pueden ser útiles en el marco de los procedimientos de ingeniería para el tratamiento de trastornos de cartílago en un paciente, tal como la osteoartritis, la lesión del cartílago o los defectos osteocondrales.

### 15 **Compendio de la invención**

La invención proporciona un sistema de liberación de sustancias que comprende al menos un material polimérico que forma una matriz y un fármaco anabólico, en el que dicho fármaco anabólico está incluido en al menos un material polimérico que forma la matriz. Dicha matriz es un armazón bifásico o la membrana es una membrana bicapa.

20 Al menos un material polimérico es colágeno. Alternativamente, al menos un material polimérico es una combinación de colágeno y glicosaminoglicano (GAG). El fármaco anabólico, contenido en el sistema de liberación, es preferiblemente un compuesto de FGF-18. El compuesto de FGF-18 está presente en una dosis de 5 a 100 microgramos/sistema. En una realización particular de la invención, el compuesto de FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en: a) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura de FGF-18 humano que comprende los restos 28-207 de la SEQ ID NO: 1, o b) un polipéptido que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 2.

30 El sistema de liberación de sustancias según la presente invención puede comprender además células condrogénicas, incluyendo células madre mesenquimales. Preferiblemente, tales células condrogénicas son condrocitos. En particular, las células condrogénicas, tales como condrocitos o células madre mesenquimales, se recolectan o aíslan del paciente que necesita un tratamiento o de un donante diferente (preferiblemente perteneciente a la misma especie).

35 En otra realización, la invención proporciona un proceso para producir el sistema de liberación de sustancias según la presente invención, que comprende las etapas de: a) preparar una matriz que comprende al menos un material polimérico, y b) añadir el fármaco anabólico a la matriz preparada en la etapa a), en donde dicho fármaco anabólico es incluido en al menos un material polimérico que forma la matriz. Alternativamente, dicho proceso comprende adicionalmente c) agregar células condrogénicas a la matriz preparada en la etapa a).

En una realización adicional, el sistema de liberación de sustancias aquí descrito es para uso en el tratamiento de un trastorno de cartílago. El trastorno del cartílago se selecciona preferiblemente entre osteoartritis, lesión del cartílago y defectos osteocondrales.

40 El sistema de liberación de sustancias según la invención se administra preferiblemente a un paciente que necesita dicho tratamiento mediante un procedimiento de trasplante.

En una realización adicional, se describe aquí un artículo de fabricación que comprende el sistema de liberación de sustancias según la invención. Preferiblemente, los componentes de dicho artículo de fabricación se combinan extemporáneamente. En forma alternativa, los componentes de dicho artículo de fabricación se combinan antes o después de la implantación.

### 45 **Definiciones**

50 El término "compuesto anabólico" o "fármaco anabólico" debe entenderse como un compuesto o un fármaco que tiene efectos anabólicos sobre el cartílago, que preferiblemente lleva a la reparación del cartílago. En el contexto de la presente invención, un "compuesto anabólico" o "fármaco anabólico" es preferiblemente una proteína terapéutica que tiene un efecto anabólico sobre el cartílago. Entre tales compuestos, o proteínas terapéuticas, el compuesto preferido es un compuesto de FGF-18 (como se define aquí).

55 - El término "compuesto de FGF-18" o "FGF-18", como se emplea aquí, se refiere a 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 notablemente 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 salvaje es una proteína expresada por condrocitos del cartílago articular. El FGF-18 humano se denominó primero zFGF-5 y se describe completamente en

WO98/16644. La SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo, con un péptido señal que consiste en los restos de aminoácidos 1 (Met) a 27 (Ala). La forma madura del FGF-18 humano corresponde a la secuencia de aminoácidos del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1 (180 aminoácidos).

5 El FGF-18, en la presente invención, se puede producir mediante un método recombinante, tal como se describe en la solicitud WO2006/063362. Dependiendo de los sistemas y las condiciones de expresión, el FGF-18 en la presente invención se expresa en una célula huésped recombinante con un resto de metionina (Met) de partida o con una secuencia señal para la secreción. Cuando se expresa en un huésped procarionota, tal como en *E. coli*, el FGF-18 contiene un resto de Met adicional en el N-terminal de su secuencia. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano, cuando se expresa en *E. coli*, comienza con un resto Met en N-term (posición 1) seguido de los  
10 restos 28 (Glu) hasta el resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1.

- El término "forma truncada" de FGF18, como se emplea aquí, se refiere a una proteína que comprende o consiste en los restos 28 (Glu) a 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la forma truncada de la proteína FGF18 es el polipéptido designado "trFGF-18" (170 aminoácidos, también conocido como rhFGF18 o esprifermina), que comienza con un resto Met (en N-terminal) seguido por restos de aminoácidos 28 (Glu) -196 (Lys) del FGF-18 humano tipo salvaje. La secuencia de aminoácidos de trFGF-18 se muestra en la SEQ ID NO: 2 (los restos de aminoácidos 2 a 170 de la SEQ ID NO: 2 corresponden a los restos de aminoácidos 28 a 196 de SEQ ID NO: 1). El trFGF-18 es una forma truncada recombinante del FGF18 humano, producido en *E. coli* (véase WO2006/063362). Se ha mostrado que el trFGF-18 muestra actividades similares a las del FGF-18 humano maduro, por ejemplo, aumenta la proliferación de condrocitos y la deposición de cartílago que conduce a la reparación y la reconstrucción de una variedad de tejidos cartilagosos (véase WO2008/ 023063).  
15  
20

- El término "homogéneo" significa que los diversos componentes de la formulación se mezclan, se combinan, se agitan o se funden juntos, es decir, no forman capas separadas de componentes.

- El término "trastorno de cartílago", como se emplea aquí, abarca trastornos que son el resultado de daños debidos a una lesión, tal como lesión traumática, condropatía o artritis. Los ejemplos de trastornos de cartílagos que se pueden tratar mediante la liberación de la formulación de FGF-18 aquí descrita incluyen, pero no se limitan a, artritis, tal como osteoartritis, lesión de cartílago y defectos osteocondrales. Las enfermedades/trastornos degenerativos del cartílago o de la articulación, como la condrocalcinosis, la policondritis, la policondritis recidivante, la espondilitis anquilosante o la costocondritis, también se incluyen en esta descripción. La Sociedad Internacional de Reparación de Cartílago ha propuesto un sistema de clasificación artroscópica para evaluar la gravedad del defecto del cartílago: grado 0: cartílago sano (normal), grado 1: el cartílago tiene una parte blanda o ampollas, grado 2: fisuras menores visibles en el cartílago, grado 3: las lesiones tienen fisuras profundas (más del 50% de la capa de cartílago) y grado 4: la rotura del cartílago expone el hueso subyacente (subcrónico). (ver la publicación de ICRS: [http://www.cartilage.org/files/contentmanagement/ICRS\\_evaluation.pdf](http://www.cartilage.org/files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf), página 13).  
25  
30

-El término "artritis", tal como se emplea aquí, abarca trastornos tales como osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis infecciosa, artritis psoriásica, enfermedad de Still (aparición de artritis reumatoide juvenil) o osteocondritis disecante. Preferiblemente incluye enfermedades o trastornos en los cuales el cartílago está dañado.  
35

-El término "osteoartritis" se usa para designar la forma más común de artritis. El término "osteoartritis" se refiere a un trastorno del cartílago que abarca tanto la osteoartritis primaria como la osteoartritis secundaria (véase, por ejemplo, The Merck Manual, 17ª edición, página 449). La osteoartritis puede ser causada por la descomposición del cartílago. Los pedazos de cartílago pueden romperse o los fragmentos de degradación de los componentes del cartílago (como colágeno tipo II, Aggrecan) pueden filtrarse de la articulación y causar dolor e hinchazón en la unión entre los huesos en la articulación. Con el tiempo, el cartílago puede desgastarse por completo y los huesos se rozarán entre sí. La osteoartritis puede afectar cualquier articulación, pero generalmente afecta a las manos y a las articulaciones que soportan peso, como las caderas, las rodillas, los pies y la columna vertebral. En un ejemplo preferido, la osteoartritis puede ser osteoartritis de rodilla u osteoartritis de cadera. Esta descripción abarca en particular las formas de osteoartritis que se clasifican como estadio 1 a estadio 4 o grado 1 a grado 6 según el sistema de clasificación OARSI. El experto tendrá pleno conocimiento de las clasificaciones de la osteoartritis que se utilizan en la técnica, en particular dicho sistema de clasificación OARSI (también llamado OOHAS; véase, por ejemplo, Custers et al., 2007). La osteoartritis es uno de los trastornos de cartílago preferidos que pueden tratarse con la liberación de los compuestos de FGF-18 según la presente invención.  
40  
45  
50

-El término "lesión del cartílago" como se emplea aquí se refiere a un trastorno del cartílago o daño del cartílago que es principalmente el resultado de un traumatismo. Las lesiones del cartílago pueden ocurrir especialmente después de una destrucción mecánica traumática, particularmente después de un accidente o cirugía (por ejemplo, cirugía de microfractura). El término "lesión del cartílago" también incluye la fractura condral u osteocondral y el daño en el menisco. También se consideran dentro de esta definición las lesiones o el desgaste en los tejidos de la articulación que se relacionan con la práctica de deportes. El término también incluye microdaño o trauma cerrado, una fractura condral, una fractura osteocondral o daño en el menisco.  
55

-El término "defectos osteocondrales" (OCD) es un trastorno de cartílago en el que los defectos del cartílago cubren el extremo de un hueso en una articulación. Estos defectos son muy frecuentemente debidos a un traumatismo o lesión, pero también pueden ser debidos a una patología. Los OCD pueden conducir a OA.

5 -El término "matriz" se refiere a una estructura tridimensional (3D), tal como una membrana o un armazón. Dicha matriz se puede utilizar como un "implante" o como un "sistema de liberación de sustancias" o "sistema de liberación" cuando la matriz, o el implante, comprende además el fármaco anabólico (es decir, la proteína terapéutica a administrarse que tiene un efecto anabólico sobre el cartílago). Los términos "implante", "sistema de liberación de sustancias" o "sistema de liberación" son intercambiables en este documento.

10 -Los términos "implantación" o "trasplante" son intercambiables. De manera similar, los términos "implantar", "trasplantar" o "disponer el sistema" son intercambiables. El término "liberación lenta" según la presente invención significa que se liberan bajas cantidades de un compuesto dado, tal como el compuesto de FGF-18, durante un período de al menos 4 semanas y más.

### Descripción detallada de la invención

15 Aunque los procedimientos de restauración del cartílago que emplean matrices o implantes son prometedores, la calidad del cartílago producido debe mejorarse. Por lo tanto, existe la necesidad de un sistema de liberación mejorado, que permita una buena integración y una buena calidad del cartílago producido (es decir, principalmente cartílago hialino). Sorprendentemente se ha encontrado que el uso de FGF-18 en una matriz, como una membrana de colágeno o un armazón de colágeno/ glicosaminoglicano, produce un tejido de reparación superior que una matriz sola o que una matriz combinada con una proteína diferente.

20 El objeto principal de la presente invención es, por lo tanto, un sistema de liberación de sustancias que comprende al menos un material polimérico que forma una matriz y un fármaco anabólico, en donde dicho fármaco anabólico está incluido en al menos un material polimérico que forma la matriz. Dicha matriz es adecuada para la introducción a nivel del cartílago. El sistema de liberación de sustancias según la presente invención puede comprender además células condrogénicas. El sistema de liberación de sustancias también puede comprender otros excipientes u otros  
25 componentes. La ventaja del uso de dicho sistema de liberación es la posibilidad de introducir el implante, que ya contiene un compuesto anabólico, directamente en el cartílago o en el defecto osteocondral. Alternativamente, el medicamento anabólico y/o las células condrogénicas, si las hubiera, se pueden introducir en el implante una vez que éste se haya colocado en el defecto.

30 En otra realización, la invención proporciona un proceso para producir el sistema de liberación de sustancias, o implante, según la presente invención, que comprende las etapas de: a) preparar una matriz que comprende al menos un material polimérico, y b) añadir el fármaco anabólico a la matriz preparada en la etapa a) en donde dicho fármaco anabólico se incluye en al menos un material polimérico que forma la matriz. Alternativamente, dicho proceso comprende además la etapa c) añadir células condrogénicas a la matriz preparada en la etapa a). Cualquiera de las etapas b) y c) puede realizarse antes de la implantación o después de la implantación (es decir, *in situ*) en el defecto.

35 En una realización adicional, se describe aquí un artículo de fabricación que comprende el sistema de liberación de sustancias según la invención. Preferiblemente, los componentes de dicho artículo de fabricación se combinan extemporáneamente. En forma alternativa, los componentes de dicho artículo de fabricación se combinan antes o después de la implantación. También se describe un material de envasado que proporciona instrucciones para formar el sistema de liberación según la presente invención.

40 En el contexto de la presente invención como un todo, la matriz (o implante) es preferiblemente un armazón o una membrana. En una realización particular, el armazón es un armazón bifásico o la membrana es una membrana bicapa. Preferiblemente, al menos un material polimérico es colágeno. Alternativamente, al menos un material polimérico es una combinación de colágeno y glicosaminoglicano (GAG). La matriz puede ser una matriz ya disponible en el mercado, como la membrana Chondro-Gide™, un armazón Chondrommimetic™, o cualquier otra matriz  
45 comercialmente disponible (ya sea aprobada o no todavía por las agencias reguladoras). En forma alternativa, la matriz puede producirse internamente.

El fármaco anabólico (es decir, la proteína terapéutica que tiene efectos anabólicos sobre el cartílago), contenido en el sistema de liberación (es decir, incluido en al menos un material polimérico que forma la matriz), es un compuesto de FGF-18. En una realización particular de la invención, el compuesto de FGF-18 se selecciona del grupo que  
50 consiste en: a) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura de FGF-18 humano que comprende los restos 28-207 de SEQ ID NO: 1, o b) un polipéptido que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 2. Particularmente, este compuesto se selecciona de la forma natural del FGF-18 maduro humano o de trFGF-18. Más preferiblemente, el compuesto de FGF-18 es esprifermina.

55 En el contexto de la presente invención, el fármaco anabólico, tal como un compuesto de FGF-18, se agrega en el sistema de liberación a una dosis de 0,5 a 100 microgramo/sistema, más preferentemente de o de aproximadamente 1, 5, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 32, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 microgramos/sistema, incluso más preferiblemente de o de alrededor de 5, 6, 10, 20, 30, 32, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 microgramos/sistema.

5 Cuando se agregan células condrogénicas en el sistema de liberación, tales células condrogénicas son preferiblemente condrocitos. En particular, las células condrogénicas, tales como condrocitos, se extraen o aíslan de un mamífero, y se expanden en un medio de cultivo antes de implantarse junto con la matriz (adición de las células antes o después de la implantación). En una realización particular, el medio de cultivo en el que se expanden las células puede comprender un compuesto anabólico, tal como un compuesto de FGF-18. En tal caso, el compuesto anabólico preferiblemente se agrega en forma intermitente en el medio de cultivo o almacenamiento, durante aproximadamente un día por semana, en donde dicha adición de un día se repite cada semana durante al menos 2 semanas de cultivo, al menos 3 semanas de cultivo o al menos 4 semanas de cultivo. Preferiblemente, dicho compuesto anabólico se agrega intermitentemente en el medio de cultivo o almacenamiento, durante un día por semana, en donde dicha adición de un día se repite cada semana durante 2 semanas de cultivo, 3 semanas de cultivo o 4 semanas de cultivo. Alternativamente, el fármaco anabólico puede agregarse intermitentemente en el medio de cultivo o almacenamiento, durante aproximadamente un día por mes, en donde dicha adición de un día se repite cada mes durante al menos 2 meses de cultivo, al menos 3 meses de cultivo o al menos 4 meses de cultivo. Preferiblemente, el fármaco anabólico se agrega intermitentemente en el medio de cultivo o almacenamiento, durante un día por mes, en donde dicha adición de un día se repite cada mes durante 2 meses de cultivo, 3 meses de cultivo o 4 meses de cultivo.

10 El mamífero es preferiblemente el paciente que necesita un tratamiento o un donante diferente (preferiblemente perteneciente a la misma especie). Dicho mamífero es más particularmente un humano. Sin embargo, también puede ser un mamífero tal como, y sin ninguna limitación, un caballo, una oveja, un perro, un gato, un conejo, una rata o un ratón.

15 El sistema de suministro de sustancias descrito aquí es preferiblemente para uso en el tratamiento de un trastorno de cartílago. Alternativamente, se describe aquí un método para el tratamiento de un trastorno de cartílago que comprende la etapa de proporcionar el sistema de liberación de sustancias según la presente invención. Alternativamente, también se incluye un método para el tratamiento de un trastorno de cartílago que comprende la etapa de administrar un implante según la presente invención, en donde el fármaco anabólico, tal como un compuesto de FGF-18, y/o las células condrogénicas se agregan en dicho implante antes o después de la implantación. El trastorno de cartílago se selecciona preferiblemente entre osteoartritis, lesión del cartílago y defectos osteocondrales.

20 El sistema de liberación de sustancias según la invención se administra preferiblemente a un paciente que necesita dicho tratamiento mediante implante o trasplante o de otro modo la disposición del sistema en el efecto o en un sitio que necesita reparación, regeneración o crecimiento del cartílago articular.

25 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención. No se debe interpretar que el alcance de la invención consiste solo en los siguientes ejemplos.

### Descripción de las figuras

- 30 Figura 1a. Porcentaje de carga de peso de ovejas del grupo de control.
- 35 Figura 1b. Porcentaje de carga de peso del grupo tratado con FGF-18 intraarticular
- Figura 1c. Porcentaje de carga de peso del grupo tratado con 32µg de rhFGF-18 aplicado en una membrana Chondri-Gide en el punto de la cirugía.
- Figura 1d. Porcentaje de carga de peso del grupo tratado con 6,4 µg de rhFGF-18 aplicado en una membrana de Chondri-Gide en el punto de la cirugía
- 40 Figura 2. El efecto de rhFGF18 en la puntuación de ICRS total
- Figura 3. El efecto de rhFGF18 en la rigidez del cartílago de reparación
- Figura 4. Efecto de rhFGF-18 en la puntuación de O'Driscoll modificada
- Figura 5. Cambio degenerativo en MFC y LTS ( $p = 0,0381$ ) en la necropsia
- 45 Figura 6. Puntuación de reparación macroscópica de la Sociedad Internacional de Reparación de Cartílago en MFC ( $p = 0,0015$ ) y LTS ( $p > 0,05$ ).
- Figura 7. Mediciones de rigidez de los defectos en MFC ( $p > 0,05$ ) y LTS ( $p = 0,0033$ ) expresados como medidas porcentuales de la extremidad contralateral.
- Figura 8. Mediciones de rigidez de los defectos en el MFC ( $p > 0,05$ ) y LTS ( $p = 0,0002$ ) expresados como medidas porcentuales del cartílago perilesional.
- 50 Figura 9. La puntuación modificada de O'Driscoll para MFC ( $p = 0,0390$ ) y LTS ( $p > 0,05$ ) que muestra la comparación entre los grupos

## Descripción de las secuencias

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

SEQ ID NO.2: Secuencia de aminoácidos de FGF-18 truncado (esprifermina).

SEQ ID NO.3: Secuencia de aminoácidos de BMP-7 recombinante (también conocida como eptotermina alfa)

## 5 Ejemplos

### Material

El FGF-18 truncado recombinante (rhFGF-18) de los presentes ejemplos se ha preparado por expresión en *E. coli*, según la técnica descrita en la solicitud WO2006/063362. En los siguientes ejemplos, se utiliza rhFGF-18, FGF-18 o esprifermina indistintamente.

## 10 Métodos

Análisis de la marcha: se empleó una placa de fuerza (Accusway, AMTI, EE. UU.) para cuantificar la carga de peso de la extremidad operada. Se midió la carga de peso al caminar antes de la cirugía, 2 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses y 5 meses después de la cirugía. En cada punto de tiempo, cada animal tenía un total de 10 registros adquiridos al caminar para permitir que se calculara una carga de peso media. Cada medición se convirtió en una fuerza de N/kg y se calculó como un porcentaje de carga de peso medido antes de la cirugía para cada animal. Los datos sobre la carga de peso se agruparon en grupos de tratamiento para el análisis final.

Morfología macroscópica: se abrieron las articulaciones, se fotografiaron y la superficie de los sitios de defectos osteocondrales se clasificó a ciegas utilizando la puntuación de la Sociedad Internacional de Reparación de Cartílagos (ICRS) (Tabla 3).

20 Pruebas mecánicas: después de realizar las observaciones morfológicas generales, cada sitio de implante se sometió a pruebas mecánicas no destructivas para determinar los cambios en la superficie del cartílago que rodea el implante a defecto vacío. Las mediciones de rigidez se tomaron por duplicado desde el centro del defecto osteocondral, y a una distancia de 1 mm del borde original del defecto osteocondral creado en las posiciones 12, 3, 6 y 9 en punto, y 1 mm desde el borde en el cartílago perilesional, utilizando un durómetro digital de mano (Shore S1, escala M, Instron Ltd, Reino Unido). Se obtendría un número de entre 0-100 con un error calibrado incorporado de +/- 5. Estas mediciones se repitieron en la extremidad contralateral en los mismos sitios anatómicos.

30 Histología: Después de las mediciones de rigidez, las muestras se descalcificaron en ácido fórmico/citrato de sodio durante dos semanas. Después de la descalcificación completa, las muestras se deshidrataron a través de una serie de intercambios de etanol de concentraciones crecientes, y luego se incrustaron en cera de parafina. Se hicieron secciones de 10 µm de espesor a través de la porción central del defecto. Las secciones se tiñeron con Azul de Toluidina y Safranina O/ Verde Rápido. Las secciones de histología fueron calificadas a ciegas por un investigador, utilizando una puntuación modificada de O'Driscoll (Tabla 4). Se identificó después a los animales que obtuvieron las mejores puntuaciones O'Driscoll modificadas totales y medianas dentro de su grupo experimental y se realizó el estudio inmunohistoquímico en estas secciones. Además de la calificación total modificada de O'Driscoll, los componentes individuales del sistema de puntuación se analizaron por separado.

40 Inmunohistoquímica: se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios en este estudio; colágeno monoclonal de ratón antihumano tipo I (MP Biomedicals, EE. UU.), colágeno monoclonal de ratón antihumano tipo II (MP Biomedicals, EE. UU.) y colágeno monoclonal de ratón anti-conejo tipo VI (Abeam, Reino Unido). Se utilizaron inmunoglobulinas de ratón y anti-conejo secundarias conjugadas con peroxidasa de rábano, según fuera conveniente, y la reacción de color se desarrolló con 0,1% de 3',3'-diaminobenzidina tetracloruro (DAB)/0,01% de peróxido de hidrógeno. Se usó suero normal específico de especie como un control en todos los experimentos.

45 Análisis estadístico: se utilizó el paquete de software estadístico GraphPad Prism 5 (Graphpad Software Inc, La Jolla, CA) para el análisis de datos. La significación estadística entre los grupos y dentro de los grupos para cada criterio de valoración se determinó principalmente utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con una prueba de comparación múltiple post hoc de Dunns. En un caso, se utilizó una prueba de ANOVA de una vía con prueba de comparación múltiple post hoc de Tukey. Se aceptó un nivel de  $p < 0,05$  como significativo en todos los análisis.

Ejemplo 1: Armazón de colágeno que comprende rhFGF-18

### Método

50 En el estudio se incluyeron treinta y cinco ovejas de montaña galesas esqueléticamente maduras de entre 3 y 5 años de edad. Los animales se enviaron en 7 grupos de tratamiento, dos de los cuales actuaron como controles (Tabla 1). Antes de la cirugía, todos los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano, óxido nitroso y oxígeno. El animal fue colocado en decúbito dorsal y, después de la preparación quirúrgica, se abrió la articulación de la rodilla izquierda a través de un abordaje parapatelar lateral. Después de la subluxación de la rótula, se produjo un defecto

5 condral de espesor total de 8 mm de diámetro en la superficie con carga de peso del cóndilo femoral medial mediante una biopsia con sacabocados y una cureta. Se tuvo cuidado de asegurar que el cartílago calcificado se eliminara del hueso subcondral y que el borde del defecto fuera perpendicular al hueso subcondral. Después de la creación del defecto, se realizaron 6 agujeros de microfractura en el defecto con un micropico. Estos orificios de microfractura pasaron a través de la placa ósea subcondral. Después de la creación de la microfractura, en aquellos grupos que recibieron el tratamiento, una membrana Chondro-Gide™ cargada con la cantidad adecuada de rhFGF-18 se pegó al defecto condral usando pegamento Tisseal Fibrin, y se cerró la articulación de forma estándar.

10 Para los animales tratados, intraarticularmente (i.a.), se inyectaron 30 ng/ml de rhFGF-18 en la articulación femorotibial medial una vez a la semana durante 3 semanas. Los animales que recibieron un ciclo de rhFGF-18 tuvieron inyecciones a las 4, 5 y 6 semanas postoperatorias, los animales que recibieron dos ciclos de rhFGF-18 tuvieron inyecciones a las 4, 5 y 6 semanas y 16, 17 y 18 semanas después de la operación. Todos los animales fueron sacrificados 6 meses después de la cirugía.

Tabla 1- Grupos experimentales

Grupo	Tratamiento
A	Control, inyección intra-articular de portador
B	Inyección intra-articular (i.a.) de rhFGF-18- 2 ciclos
C	Control
D	Membrana solamente
E	Membrana + 0,064 µg de dosis total de rhFGF-18
F	Membrana + 0,64 µg de dosis total de rhFGF-18
G	Membrana + 6,4 µg de dosis total de rhFGF-18
F	Membrana + 32 µg de dosis total de rhFGF-18

15 Resultados –Análisis de la marcha

En el grupo de control (Figura 1a) hubo una marcada disminución en la carga de peso después de la cirugía y luego gradualmente un lento aumento en la carga de peso en la extremidad operada. La carga de peso en los niveles previos a la cirugía se logró a los 2 meses, es decir, no existe una diferencia estadística entre los valores registrados antes de la cirugía y a 2, 3, 4 y 5 meses.

20 En el grupo B (Figura 1b) hubo un aumento significativo en la carga de peso después de la cirugía en comparación con el control (media de control de 46,3 +/- 23,63 en comparación con la media del grupo B de 73,4 +/- 13,7) (p<0,0001 en prueba t) y después se produjo gradualmente un aumento lento de la carga de peso en la extremidad. Hubo una diferencia estadísticamente significativa (p <0,05) en la carga de peso después de la cirugía en comparación con el detectada a 1 m. No se pudo detectar ningún otro dato relevante. La carga de peso en los niveles previos a la cirugía se logró a los 2 meses, es decir, no existe una diferencia estadística entre los valores registrados antes de la cirugía y a 2, 3, 4 y 5 meses.

30 En contraste con los grupos de control y de rhFGF-18 intra-articular, en el grupo H no se detectaron diferencias significativas entre la carga de peso antes de la cirugía y en la etapa postoperatoria (Figura 1c), es decir, no fue posible detectar que los animales habían recibido alguna intervención quirúrgica durante este marco de tiempo. Esto fue significativamente diferente a la reducción en la carga de peso que se detectó a las 2 semanas posteriores a la cirugía en todos los otros grupos medidos.

En el grupo G, la carga de peso con posterioridad a la cirugía volvió a niveles que no fueron significativamente diferentes a los niveles previos a la cirugía en 2 meses. (Figura 1d), aunque se observó una tendencia similar a la observada en la dosis más alta de rhFGF-18/membrana.

35 Resultados – Morfología macroscópica

40 El efecto de rhFGF18 sobre la morfología macroscópica del tejido cicatrizado se cuantificó utilizando la clasificación de ICRS (Tabla 3). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la histología macroscópica de las lesiones según se midió por el sistema de puntuación de morfología macroscópica de ICRS. El análisis individual de los componentes de la puntuación morfológica de ICRS no identificó un componente que tuviera resultados estadísticamente significativos. Estos resultados indican que la adición de 32µg de rhFGF-18 aplicado en una membrana Chondri-Gide en el punto de la cirugía conduce a una reducción significativa del dolor postoperatorio a las

2 semanas posteriores a la cirugía, según se evaluó usando una placa de fuerza. No se detectaron otras diferencias significativas.

#### Resultados - Rigidez

- 5 Se tomaron medidas de rigidez del defecto condral y el sitio correspondiente en la otra extremidad no operada usando un durómetro digital portátil (Shore S1, escala M, Instron Ltd, Reino Unido) (Figura 3). No hubo diferencias significativas entre los grupos. (En este experimento se pretende restablecer la rigidez mecánica del cartílago operado para que coincida con el cartílago de control). Por lo tanto, el resultado deseado no es una diferencia significativa entre la extremidad operada y la no operada.

#### Resultados -histología

- 10 La calidad de la reparación histológica dentro de la lesión y el tejido adyacente se cuantificó utilizando la puntuación modificada de O'Driscoll (Figura 4). No se detectaron diferencias significativas con una prueba de Kriskall-Wallis. Para evaluar los datos de manera diferente, se realizó un ANOVA de una vía con una prueba de Tukey post hoc. Ambos grupos de control (Grupos A y C) tenían medios que no eran estadística ni significativamente diferentes, como era de esperar. Como se ha demostrado en estudios previos, la liberación de dos ciclos de rhFGF-18 i.a. mejoró significativamente la puntuación modificada de O'Driscoll. Además, hubo un aumento estadísticamente significativo en la puntuación modificada de O'Driscoll cuando se cargaron 6,4 µg y 32 µg de rhFGF-18 en la membrana Chondro-Gide™. No hubo diferencia entre el FGF-18 inyectado en forma intra-articular y el rhFGF-18 de 32 µg cargado en la membrana en el momento de la cirugía.
- 15

#### Resultados – Sub-análisis de la puntuación modificada de O'Driscoll

- 20 El subanálisis de los componentes de la puntuación modificada de O'Driscoll se realizó con el fin de identificar específicamente qué parámetros histológicos fueron afectados por la inclusión de rhFGF-18 y cuáles no lo fueron. Cuando se incluyeron todos los datos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los componentes individuales del sistema de puntuación.

#### Resultados - Inmunohistoquímica (IHC)

- 25 Se realizó IHC para los tipos de colágeno I, II y VI. Esto demostró que el tejido de reparación producido en las muestras de control era predominantemente hialino/fibrocartílago mixto (IHC de colágeno tipo I y II, con poca tinción de colágeno de tipo VI organizado). Por el contrario, en presencia de rhFGF-18, el tejido de reparación fue positivo para colágeno de tipo II con clara tinción de colágeno pericelular de tipo VI que indicó una reparación de cartílago hialino maduro cuando estuvo presente. Estos resultados indican que la adición de dos ciclos de rhFGF-18 intraarticularmente después de la cirugía o 32µg de rhFGF-18 administrados en una membrana Chondri-Gide™ en el punto de la cirugía conduce a una mejora significativa en la puntuación modificada de O'Driscoll. La histología demuestra que el tejido de reparación producido en presencia de estos sistemas de liberación de rhFGF-18 es positivo para colágeno de tipo II y VI, es decir, es cartílago hialino, en comparación con un tejido mixto de hialino/ fibrocartílago producido en los controles y en animales tratados con dosis más bajas de rhFGF-18 administrado en la membrana en el punto de la cirugía
- 30

#### 35 Conclusiones:

- En este estudio, hemos demostrado que la inclusión de 32µg de rhFGF-18 en una membrana ChondroGide™ en el punto de la cirugía redujo significativamente el dolor postoperatorio 2 semanas después de la cirugía (en comparación con los controles, dosis más bajas de rhFGF-18 aplicadas en la membrana y rhFGF-18 intraarticular) y mejoraron significativamente la puntuación modificada de O'Driscoll en comparación con los controles y las dosis más bajas de rhFGF-18 aplicadas en la membrana, y tuvieron una puntuación modificada de O'Driscoll equivalente en comparación con la rhFGF-18 intraarticular. Estos resultados, aunque con un número muy pequeño de animales, indican que la aplicación de rhFGF-18 en una membrana Chondro-Gide™ es un tratamiento efectivo de los defectos condrales tratados por microfractura.
- 40

#### Ejemplo 2: Almacén de colágeno/GAG que comprende rhFGF-18

#### 45 Método:

- Se crearon defectos osteocondrales (5,8x6 mm) en el cóndilo femoral medial (MFC) y en el surco troclear lateral (LTS) de la articulación de la rodilla derecha de 24 ovejas galesas esqueléticamente maduras. Los defectos se dejaron vacíos (Control, grupo A) o se rellenaron con un almacén de colágeno/GAG de 6x6 mm (un almacén Chondromimetic™), ya sea solo (solamente almacenes, control, grupo B) o en combinación con rhFGF-18 (30 µg, grupo C) o BMP-7 (100 µg, grupo D) (n = 6 para cada grupo) (ver Tabla 2). A los 6 meses, las ovejas se sacrificaron humanitariamente, y en ese momento el tejido de reparación se sometió a pruebas mecánicas no destructivas, a evaluación general con la puntuación de reparación de ICRS, y se evaluó la presencia de cambios degenerativos. A continuación, se realizó un análisis histológico e inmunohistoquímico que observaba los marcadores específicos de cartílago de los proteoglicanos (Safranina O/verde rápido) y los colágenos de los tipos I, II y VI. Las secciones se
- 50

calificaron con la puntuación semicuantitativa de O'Driscoll modificada. El análisis estadístico incluyó ANOVA de una vía y pruebas post hoc con corrección de Bonferroni en donde se estableció  $p < 0,05$  como el nivel de significación.

Chondromimetic™ (Orthomimetics Ltd) es un armazón compuesto por colágeno bovino de tipo I y glicosaminoglicano condroitín-6-sulfato (armazón de colágeno/GAG).

5 Tabla 2 - Grupos experimentales

Grupo	Tratamiento
A	Defectos que se dejaron vacíos
B	Control, armazón solamente
C	Armazón + 30 $\mu\text{g}$ de rhFGF18
D	Armazón + 100 $\mu\text{g}$ de BMP-7

#### Resultados – Morfología macroscópica:

10 Ninguno de los animales mostró algún signo de infección después de la cirugía. Se observó un cambio degenerativo en muchos animales en el LTS, particularmente en los grupos de control (Figura 5). Esto probablemente fue resultado del abordaje parapetelar lateral, con la consiguiente alteración en la biomecánica patelofemoral. El análisis no paramétrico mostró una diferencia estadísticamente significativa entre la degeneración en el grupo BMP-7 en comparación con el armazón solamente ( $p = 0,0381$ ).

#### Resultados - Puntuación de reparación de cartílago:

15 Todos los animales fueron calificados por un observador, que estaba a ciegas con respecto al grupo de tratamiento. La Figura 6 muestra la distribución de puntuaciones entre los grupos. Tanto FGF-18 como BMP-7 mejoraron significativamente las puntuaciones de reparación de ICRS en el MFC en comparación con los defectos vacíos ( $p < 0,05$ ). Se observó una tendencia hacia una reparación mejorada con ambos factores de crecimiento en comparación con el armazón solamente, pero no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $p > 0,05$ ). Se observa una variabilidad mucho mayor entre los controles que en los factores de crecimiento en MFC; sin embargo, lo contrario es correcto en LTS.

#### Resultados - Pruebas mecánicas:

25 Repetidas mediciones fueron tomadas por un observador mediante el durómetro digital Shore S1 (Instron). En el MFC (Figura 78) no hubo diferencias entre los grupos de tratamiento en la rigidez porcentual media de la extremidad contralateral ( $p = 0,31$ ) ni del cartílago perilesional ( $p = 0,573$ ). En el LTS (Figura 8), BMP-7 fue significativamente menos rígido que rhFGF-18 y que el defecto vacío en comparación con el cartílago de la extremidad contralateral ( $p = 0,0033$ ), y menos rígido que el armazón solo y rhFGF-18 cuando se compara con su cartílago perilesional ( $p = 0,0002$ ) ( $p < 0,05$  para todos los análisis *post hoc*).

#### Resultados - Histología e inmunohistoquímica:

30 Grupo de control A = defectos vacíos (no se muestran imágenes): En general se observó relleno de tejido bueno en los defectos vacíos en todos los animales. En la mayoría de los defectos, se observó un avance de la marca de la línea de flujo con una delgada capa de cartílago. Se observó tinción positiva con Safranina O en todos los defectos de MFC, con tinción relativamente pobre en LTS. Todos los defectos mostraron una tinción de colágeno tipo I positiva con algo de tinción positiva para el colágeno tipo II. No se observaron defectos con tinción positiva para el colágeno pericelular del tipo VI. Estas observaciones indican que hubo una reparación de fibrocartílago en el defecto, en donde muchas muestran un tejido de reparación fibroso.

40 Grupo de control B = Solo armazón (no se muestran imágenes): Se observó una buena integración lateral en todos los defectos. Los intentos de regeneración del cartílago articular se observaron particularmente en el MFC, con condrocitos en lagunas dispuestas en columnas en la zona profunda, y con condrocitos más aplanados en la zona superficial. Esto se observó principalmente en los márgenes laterales, con tejido desorganizado a menudo localizado en el centro. Una tendencia recurrente fue la presencia de una hendidura o fisura localizada centralmente en la capa condral en cuatro de seis defectos de MFC, y un armazón residual en el aspecto profundo de todos los defectos. Sin embargo, este armazón residual mostró nuevo tejido conectivo dentro de la estructura porosa y nuevo material sobre las mallas. Las secciones muestran una tinción de Safranina O moderada con una imagen mixta de tinción de colágeno tipo I y II. Se observó un grado de tinción pericelular de tipo VI, nuevamente en los márgenes laterales, con tinción de matriz principalmente interterritorial en el centro. Estos hallazgos sugieren una reparación de fibrocartílago con algunas áreas de características similares al cartílago hialino, particularmente en los márgenes laterales.

Grupo C tratado con FGF-18 (no se muestran imágenes) = Todos los defectos mostraron una buena regeneración ósea subcondral, y se observó que muchos tenían el armazón restante in situ. Ningún defecto tuvo formación quística. Se observó comúnmente una hendidura en el centro del defecto que se extendía hacia abajo en el medio del defecto a menudo en comunicación con el armazón. El grosor de la capa de cartílago se había recreado en cinco de seis defectos de MFC y dos de seis defectos de LTS, especialmente en forma lateral, donde existía una excelente integración con el cartílago huésped y el tejido se asemejaba mayormente a la arquitectura del cartílago hialino. A menudo se observó una reparación más fibrocartilagenosa del tejido central. Generalmente, hubo una tinción excelente con Safranina O en todos los defectos, que indicó una buena producción de proteoglicanos. En los mejores casos hubo tinción de colágeno de tipo I negativa con tinción positiva de colágeno pericelular de tipo VI y tipo II indicativas de tejido de reparación muy parecido al cartílago hialino. En general, se observó que la reparación del tejido con áreas altamente sugestivas de cartílago hialino se mezcló con fibrocartílago de buena calidad.

Grupo D tratado con BMP-7 (no se muestran imágenes): Se observó un escaso relleno de defectos en cuatro de los seis defectos de LTS con una tinción muy pobre de Safranina O en los otros dos defectos. La integración lateral fue moderada en el mejor de los casos con una escasa integridad del tejido de fibrocartílago y en tejido nativo adyacente. En la MFC, la deposición de proteoglicanos se mejoró como se ve mediante el aumento de la tinción de Safranina O; sin embargo, el grosor de la capa de cartílago principalmente se reduce en comparación con el cartílago nativo. Dos de los seis defectos de MFC se asociaron con grandes quistes subcondrales. Se descubrió que eran quistes encapsulados, aparentemente sin comunicación con la superficie de la articulación, y recubiertos de células inflamatorias crónicas. Solo una pequeña cantidad de armazón se asoció con los quistes. En el mejor de los casos, se observó fibrocartílago con tinción positiva para los colágenos de tipo I y II. Ninguna sección exhibió tinción de colágeno de tipo VI pericelular normal. Se observó armazón residual en la mayoría de los defectos en el MFC en comparación con el LTS. Se encontró un mayor número de quistes en el MFC asociado con BMP-7 que en cualquiera de los otros grupos de tratamiento, y en ambos casos eran grandes.

Resultados - Análisis semi-cuantitativo de las secciones de histología:

Todas las secciones de Safranina O/verde rápido fueron calificadas con la puntuación de histología de O'Driscoll modificada por un observador a ciegas que era un experto en el análisis de la reparación del cartílago articular. Se observó una mejora significativa en el grupo de rhFGF-18 en el MFC en comparación con el defecto vacío ( $p = 0,0390$ ) (Figura 9). Se observó una tendencia similar en LTS; sin embargo, no se alcanzó una significación estadística. De modo interesante, el grupo BMP-7 mostró los peores resultados en LTS con una amplia variabilidad.

Conclusiones

En base a los resultados de este estudio, podemos concluir que el rhFGF18, cuando se combina con el armazón Chondromimetic™ en un modelo de defecto osteocondral ovino, produce un tejido de reparación superior que el armazón solo o el BMP-7 combinado con el armazón Chondromimetic™.

Tablas

Tabla 3. Criterios de puntuación utilizando la clasificación de ICRS para evaluar la curación del defecto condral.

Característica	Grados	Puntuación
Grado de reparación de defecto	Nivel con cartílago circundante	4
	75% de reparación de la profundidad del defecto	3
	50% de reparación de la profundidad del defecto	2
	25% de reparación de la profundidad del defecto	1
	0% de reparación de la profundidad del defecto	0
Integración con zona de borde	Integración completa con zona de borde	4
	Demarcación de borde < 1 mm	3
	¾ de injerto integrado, ¼ con borde marcado > 1mm	2
	½ de injerto integrado con cartílago circundante, ½ con un borde marcado > 1 mm	1
	Desde ningún contacto hasta ¼ de injerto integrado con cartílago circundante	0

ES 2 698 117 T3

Apariencia macroscópica	Superficie lisa intacta	4
	Superficie fibrilada	3
	Fisuras o grietas pequeñas o esparcidas	2
	Varias fisuras pequeñas o pocas pero grandes	1
	Degeneración total del área injertada	0
	Total	12

Tabla 4. Puntuación de histología de O'Driscoll modificada

	Característica	Grados	Puntuación
I	% de cartílago hialino	80-100	8
		60-80	6
		40-60	4
		20-40	2
		0-20	0
II	Características estructurales: A. Irregularidad de superficie:	Lisa e intacta	2
		Fisuras	1
		Rotura severa, fibrilación	0
	B Integridad estructural:	Normal	2
		Rotura leve, incluyendo quistes	1
		Falta de integración severa	0
	Grosor:	100% de cartílago adyacente normal	2
		50-100% o más grueso de lo normal	1
		0-50%	0
	D Unión a cartílago adyacente:	Unión en ambos extremos del injerto	2
		Unión en un extremo/parcialmente en ambos extremos	1
		Sin unión	0
III	Libre de cambios celulares por degeneración:	Celularidad normal, sin agregaciones	2
		Leve hipocelularidad, <25% de agregación de condrocitos	1
		Hipocelularidad moderada, >25% de agregación	0
IV	Libre de cambios degenerativos en cartílago adyacente:	Celularidad normal, sin agregaciones, tinción normal	3

		Celularidad normal, agregaciones moderadas, tinción moderada	2
		Hipocelularidad leve o moderada, tinción leve	1
		Hipocelularidad severa, tinción leve	0
V	Reconstitución del hueso subcondral	Reconstitución completa	2
		Mayor al 50% de reconstitución	1
		50% o menos de reconstitución	0
VI	Unión de cartilago de reparación al hueso subcondral <i>de novo</i>	Completa e ininterrumpida	2
		< 100% y > 50 de reconstitución	1
		<50% completa	0
VII	Tinción con Safinina O	>80% de tinción homogénea positiva	2
		40-80% de tinción homogénea positiva	1
		<40% de tinción homogénea positiva	0
		PUNTUACIÓN TOTAL	Max 27

**Referencias**

1. Ellsworth et al., 2002, Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320
2. Shimoaka et al., 2002, JBC 277(9):7493-7500
- 5 3. WO2008023063
4. WO2004032849
5. WO2012172072
6. Ringe J. Et al., 2012, Nature Reviews Rheumatology 8(8): 493-498
7. J.K. Tessmar, A.M. Gopferich, 2007, Adv. Drug Delivery Rev. 59:274-291
- 10 8. Power J. et al., 2014, Journal of Orthopaedic Research, epublication on January 16, 2014
9. Yun Y-R et al., 2010, J. Tissue Eng. 1 :1-18
10. WO98/16644
11. WO2006/063362
12. Custers et al., 2007, Osteoarthritis and Cartilage, 15:1241-1248

15

**Lista de secuencias**

- <110> Merck Patent GmbH
- <120> Implante que comprende FGF-18
- 20 <130> P14/016
- <150> EP14000598 .4
- <151> 20 .02.2014

25

ES 2 698 117 T3

<160> 3  
 <170> Patentin versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 207  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <223> FGF-18 humano

<400> 1

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		

15 <210> 2  
 <211> 170  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> FGF-18 truncado recombinante (esprifermina)

ES 2 698 117 T3

<400> 2

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

<210> 3

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> BMP-7 recombinante (Eptotermina alfa)

<400> 1

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser  
20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg  
35 40 45

10

ES 2 698 117 T3

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn  
 65 70 75 80  
 Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro  
 85 90 95  
 Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile  
 100 105 110  
 Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr  
 115 120 125  
 Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His  
 130 135

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un sistema de liberación de sustancias que comprende al menos un material polimérico que forma una matriz y un fármaco anabólico, en donde el al menos un material polimérico es colágeno y en donde dicho fármaco anabólico está incluido en al menos un material polimérico que forma la matriz, donde la matriz es un armazón bifásico o una membrana bifásica, y en donde el fármaco anabólico es un compuesto de FGF-18 a una dosis de 5 a 100 microgramos/sistema.
2. El sistema de liberación de sustancias según la reivindicación 1, en el que al menos un material polimérico es una combinación de colágeno y glicosaminoglicano (GAG).
- 10 3. El sistema de liberación de sustancias según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende células condrogénicas.
4. El sistema de liberación de sustancias según la reivindicación 1, en donde el compuesto de FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en:
- a) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura de FGF-18 humano que comprende los restos 28-207 de la SEQ ID NO: 1, o
- 15 b) un polipéptido que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 2.
5. Un procedimiento para producir el sistema de liberación de sustancias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de: a) preparar una matriz que comprende al menos un material polimérico, y b) agregar el fármaco anabólico a la matriz preparada en la etapa a), en donde dicho fármaco anabólico se incluye en al menos un material polimérico que forma la matriz.
- 20 6. El procedimiento según la reivindicación 5, que comprende además la etapa de c) añadir células condrogénicas a la matriz preparada en la etapa a).
7. Un sistema de liberación de sustancias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de un trastorno de cartílago.
- 25 8. El sistema de liberación de sustancias para uso según la reivindicación 7, en donde el trastorno de cartílago se selecciona entre osteoartritis, lesión del cartílago y defectos osteocondrales.
9. El sistema de liberación de sustancias para uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el sistema de liberación de sustancias se suministra a un paciente que necesita dicho tratamiento mediante un procedimiento de trasplante.
- 30 10. Un artículo de fabricación que comprende el sistema de liberación de sustancias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
11. El artículo de fabricación según la reivindicación 10, en donde cada uno de los componentes se combina antes de la implantación o después de la implantación.

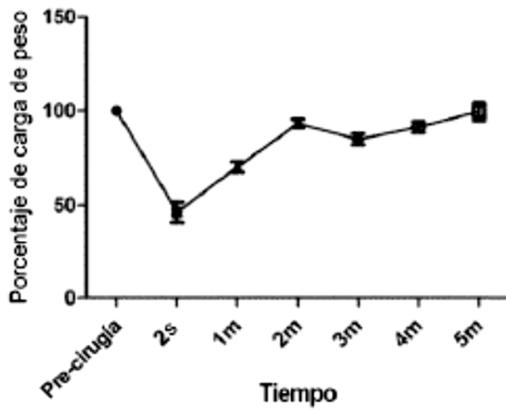


Figura 1a

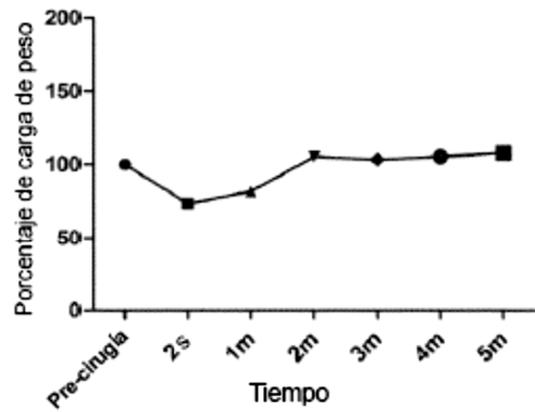


Figura 1b

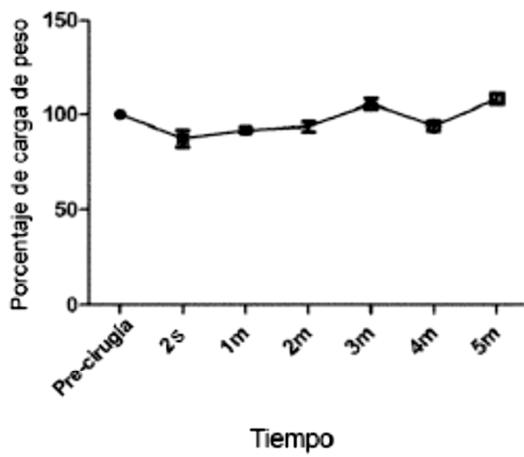


Figura 1c

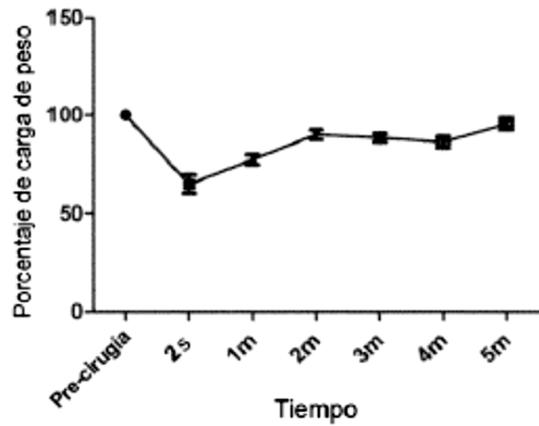


Figura 1d

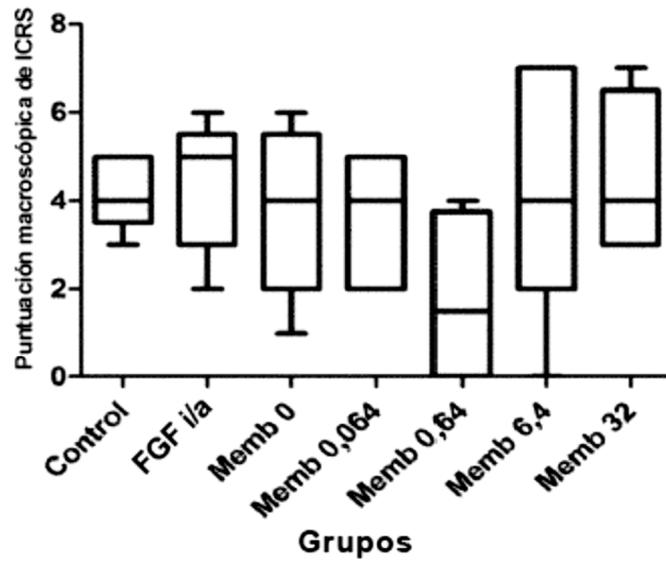


Figura 2

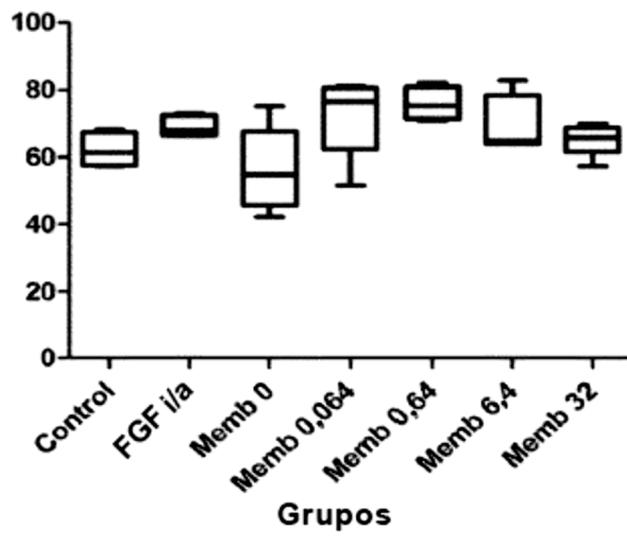


Figura 3

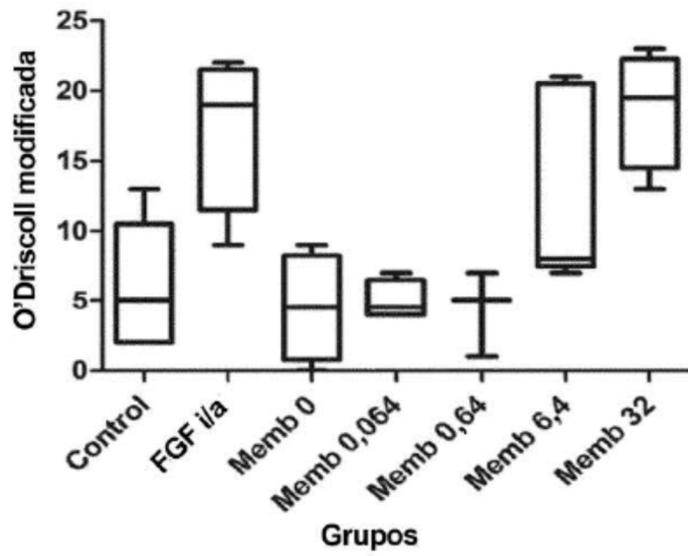


Figura 4

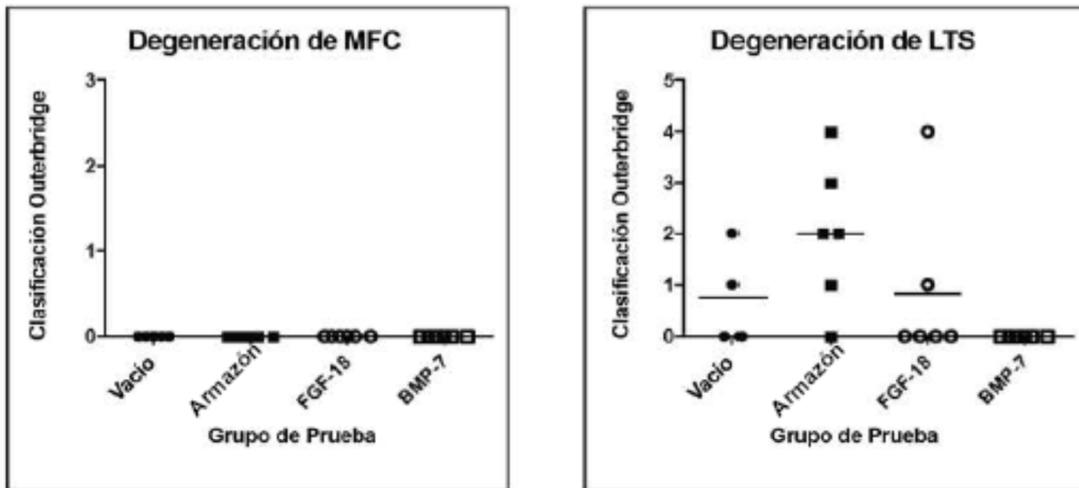


Figura 5

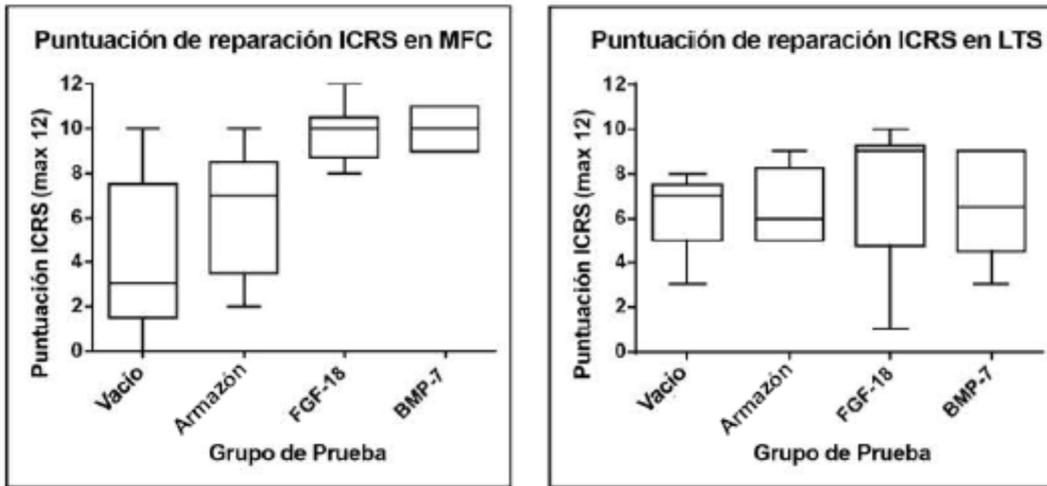


Figura 6

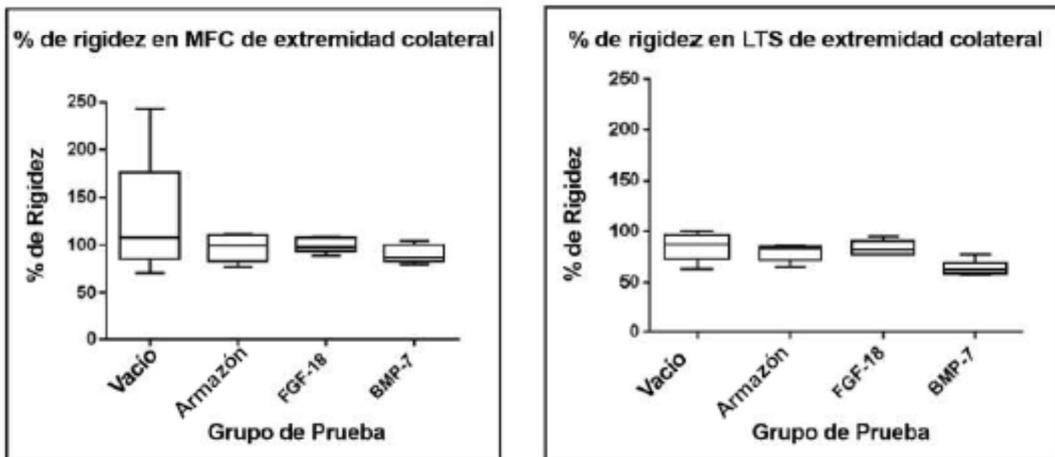


Figura 7

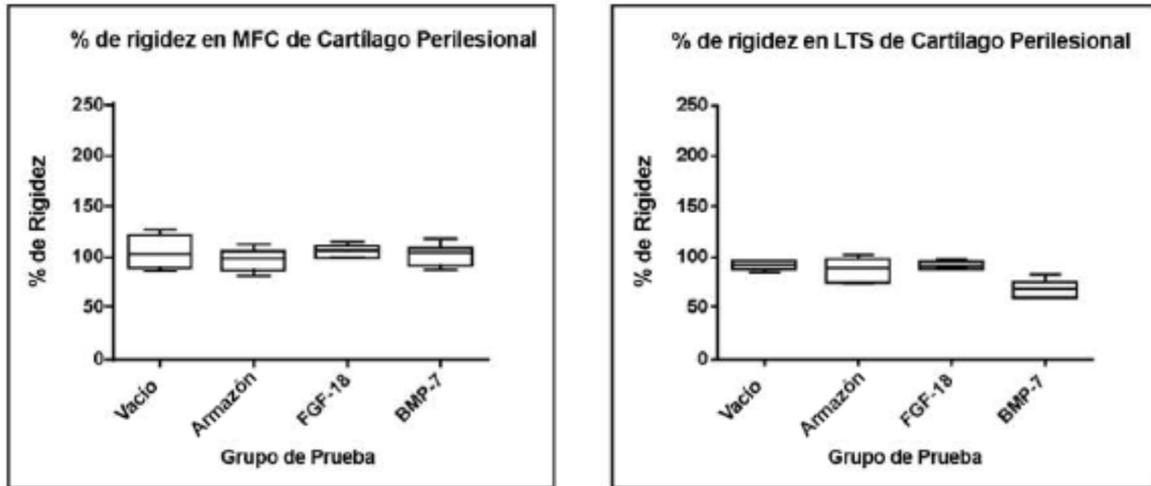


Figura 8

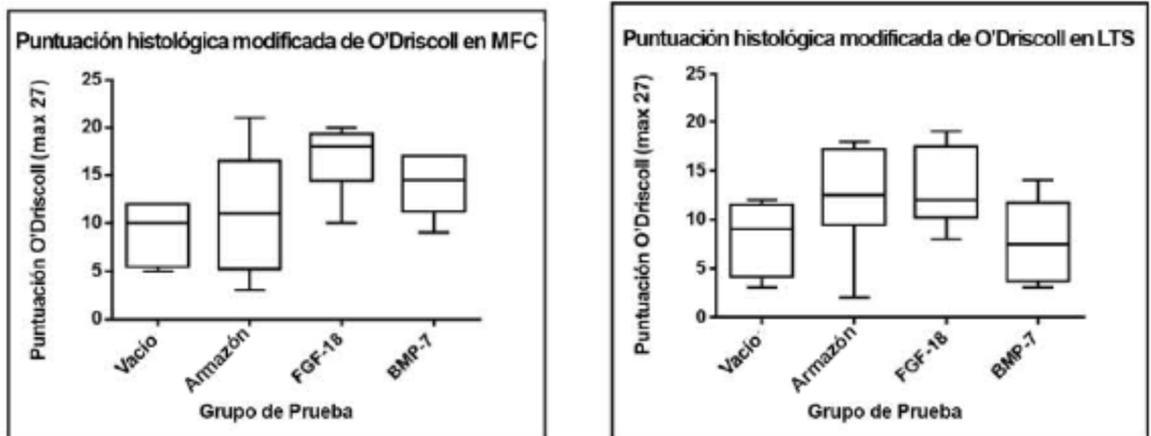


Figura 9