

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 851**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61K 35/35** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2007 PCT/EP2007/008660**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2017 WO08040557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 07818736 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2086507**

54 Título: **Un implante del núcleo pulposo espinal**

30 Prioridad:

**06.10.2006 EP 06021093**

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

**11.04.2019**

73 Titular/es:

**BIONET PHARMA GMBH (100.0%)  
Platzl 3  
80331 München, DE**

72 Inventor/es:

**DONY, CAROLA;  
HELLERBRAND, KLAUS;  
HUSTERT, ELISABETH;  
PIPPIG, SUSANNE y  
SIGL, RAINER**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 708 851 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

Un implante del núcleo pulposo espinal

5 La presente invención se refiere a un implante para el núcleo pulposo espinal para el tratamiento de disco intervertebral y, en particular, al uso de una proteína CD-RAP, por tanto.

10 La degeneración del disco intervertebral (IVD) es un proceso multifactorial que implica factores mecánicos, genéticos y biológicos. Aunque el mecanismo patofisiológico sigue sin estar claro, los cambios resultantes en la estructura y la función del disco están bien descritos. A diferencia del cartílago articular, el IVD está compuesto por diferentes tejidos. El IVD sano es un órgano avascularizado bien encapsulado que contiene un núcleo pulposo (NP) de consistencia gelatinosa rodeado de un anillo fibroso (AF), que proporciona movilidad y un cojín entre las vértebras. El núcleo pulposo está situado en el centro de cada disco, y se compone de condrocitos que producen una matriz extracelular que contiene un elevado porcentaje de proteoglicanos (PG) y colágeno de tipo II en el adulto. El núcleo pulposo está rodeado por el anillo fibroso que consiste en fibras de colágeno muy organizadas orientadas direccionalmente en laminillas concéntricas, y matriz extracelular. El anillo fibroso interior es más espeso que el exterior, y tiene una matriz fibrocartilaginosa que carece de la estructura lamelar. Una delgada región diferenciada, la zona de transición (TZ), divide el anillo interior del núcleo pulposo.

20 Durante el proceso de envejecimiento, la reducción del contenido de proteoglicanos en el núcleo lleva a una menor hidratación y a evidencias de degeneración, incluida una reducción en la altura de disco y un aumento en la carga de las estructuras circundante de la médula espinal. A nivel biológico, esto refleja un desequilibrio entre la función anabólica y catabólica normal de las células de núcleo pulposo. En algunos casos de enfermedad degenerativa del disco (DDD), la degeneración gradual del IVD está producida por inestabilidades mecánicas. Un aumento en la carga y presión del núcleo pulposo hace que las células o macrófagos invasores produzcan grandes cantidades de citoquinas o cantidades tóxicas de metaloproteinas (MMP). A medida que la DDD evoluciona, los niveles tóxicos de citoquinas y MMP degradan la matriz extracelular y conducen a una destrucción de los proteoglicanos, reduciendo de esta forma las capacidades de retención de agua con la consiguiente deshidratación del núcleo pulposo. En lo sucesivo, la flexibilidad del núcleo pulposo se reduce, y la deslaminación del anillo fibroso podría ser la consecuencia, eventualmente con el desarrollo de fisuras internas que se diseminan hacia la periferia. Estas alteraciones producen aún más inestabilidad mecánica e inducción de la producción de citoquinas, que hace progresar la DDD y el disco empieza a sobresalir (enfermedad de la hernia de disco) y finalmente se rompe, con irritación de los nervios y dolor en la parte inferior de la espalda.

35 Desafortunadamente, las terapias más habituales para el dolor en la parte inferior de la espalda relacionadas con el disco están dirigidas a conseguir un alivio sintomático en lugar de reparar el proceso degenerativo subyacente. El tratamiento conservativo consiste en medidas físicas, el uso de analgésicos, relajantes musculares, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, corticoesteroides sistémicos, inyecciones epidurales e inyecciones de antagonistas de citoquinas. En las últimas etapas de la terapia, el tratamiento de un disco degenerado es bien la retirada del disco degenerado y la fusión de las vértebras adyacentes a ambos lados del disco o una sustitución del disco con material de disco sintético.

45 La sustitución o fusión del disco no restaura la altura normal del disco, ni la fisiología ni las propiedades mecánicas, y puede producir síntomas adicionales bien en el sitio de la cirugía o en los discos adyacentes. Por lo tanto, se necesitan métodos de tratamiento futuros que inhiban o reviertan las perturbaciones celulares que subyacen en la degeneración, y restauren la función biológica del discos vertebral. Muchos investigadores de todos el mundo están buscando formas biológicas para reparar discos intervertebrales degenerados.

50 Los agentes quimionucleolíticos, como la quimopapaína, se han usado en el pasado como método de tratar IVD herniados. El alivio del dolor estaba vinculado a la capacidad de degradar los PG, disminuyendo de esta forma la presión intradiscal y aliviando la compresión de la raíces nerviosas. Sin embargo, complicaciones asociadas tales como anafilaxia, lesión neurológica e infección han disminuido el uso de quimopapaína. Más recientemente, se ha sugerido la condroitinasa ABC (C-ABC) se ha sugerido como alternativa para la quimionucleolisis porque carece de actividad proteasa y tiene un espectro de sustrato más estrecho. Aunque la regeneración de la matriz cartilaginosa se produce más pronto después del tratamiento con C-ABC que con quimopapaína, la altura del disco y el contenido en PG no se recuperan suficientemente, y el IVD se deja con propiedades bioquímicas subóptimas alteradas, acelerando por tanto la cascada degenerativa de eventos (Takegami et al., 2005; Masuda et al., 2004; Masuda y An, 2004).

60 El documento WO2005/000283 y las referencias citadas en dicho documento describen métodos para tratar la enfermedad degenerativa del disco que incluye inyectar un antagonista tal como antagonistas de alta afinidad del MMP, antagonistas muy específicos de citoquinas, un inhibidos muy específico de la quinasa p38, fármacos antiinflamatorios, un compuesto de ciclina, agentes antiproliferativos o antiapoptóticos en un disco intervertebral enfermo. Se cree que estos compuestos inhiben los procesos catabólicos de la DDD mediante la inhibición de las citoquinas proinflamatorias, las MMP, la regulación de prostaglandinas o la reducción en los efectos proinflamatorios o la inhibición de la proliferación de condrocitos o la apoptosis, pero no se ha descrito ninguna actividad anabólica.

El documento WO2006/086105 describe métodos para tratar y/o revertir trastornos del disco intervertebral usando inhibidores de los factores de transcripción que se dirigen a factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B, E2F, GATA-3 y STATs.

5 El documento WO2006/031376 describe un método para tratar la enfermedad de disco degenerativa que comprende administrar un antioxidante al disco intervertebral bien solo o bien junto con un agente terapéutico adicional tal como fibrina, ácido hialurónico, citoblastos, médula ósea, o un factor de crecimiento.

10 En otros estudios se han administrado factores de crecimiento exógenos tales como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), el factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5) y la proteína osteogénica (OP-1) a células intradiscales o se han inyectado por vía intradiscal para estimular la síntesis de proteoglicanos y colágeno para ralentizar o revertir la degeneración del IVD (Levicoff et al., 2005; Sobajima et al., 2004; Takegami et al., 2005; Kawakami et al., 2005). Sin embargo, estos factores de crecimiento son bastante inespecíficos, y tienen el riesgo de inducir genes osteogénicos y, por tanto, pueden inducir la formación no deseada de hueso. Otra limitación de la aplicación de esta tecnología de factores de crecimiento es la semivida biológica relativamente corta de los factores de crecimiento exógenos que permitiría solamente efectos biológicos transitorios después de su administración.

20 Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un implante para el núcleo pulposo espinal que mejore o restaure las propiedades biomecánicas del disco vertebral y/o inhiba la evolución posterior de las enfermedades que afectan al disco vertebral.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un implante para el núcleo pulposo que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago capaz de revertir los procesos patológicos que afectan al disco vertebral, de restaurar las propiedades del disco vertebral o de inhibir una progresión adicional de la enfermedad.

30 Otro objeto de la presente invención es modificar la homeostasia del cartílago mediante el estímulo de los procesos anabólicos a expensas de los procesos catabólicos dentro del IVD para proporcionar un nuevo enfoque para tratar enfermedades crónicas tales como DDD.

35 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un implante para el núcleo pulposo que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago para el tratamiento de la degeneración localizada del disco vertebral, en el que el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago proporciona al paciente una mejor oportunidad de curación, ralentizar la evolución de la enfermedad, y/o mejorar de otra forma la salud del paciente.

Otro objeto es proporcionar un implante para el núcleo pulposo espinal para aumentar la altura del disco y el contenido en proteoglicanos del tejido del IVD.

40 Otro objeto de la invención es proporcionar un implante para el núcleo pulposo que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago para proporcionar la supresión e inhibición de la acción de citoquinas específicas en seres humanos para tratar dolencias crónicas tales como las DDD además del mantenimiento del cartílago.

45 Otro objeto de la invención es proporcionar un implante para el núcleo pulposo espinal que se pueda implantar o inyectar con procedimientos mínimamente invasivos o por vía endoscópica.

Otro objeto de la invención es proporcionar un sistema de administración de un implante para el núcleo pulposo capaz de proporcionar niveles más prolongados o una liberación controlada continua del agente terapéutico que garantice que el agente está disponible en el sitio del IVD degenerado durante un marco temporal más prolongado.

50 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un implante para el núcleo pulposo espinal que es un sistema de administración capaz de proporcionar niveles más prolongados de un agente terapéutico.

55 Para conseguir los objetos de la invención, se proporciona un implante o formulación para el núcleo pulposo espinal que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago que es una molécula que no es ni un anticuerpo ni un receptor. En particular, la presente invención proporciona un implante o formulación para el núcleo pulposo espinal que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago que comprende la secuencia madura de CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID NO. 1, para su uso en el tratamiento de un trastorno de la columna vertebral. El implante, en particular, es inyectable o se puede implantar por vía transdiscal. Por claridad, no anticuerpo significa que el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago no es un anticuerpo tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, policlonal o quimérico contra TNF alfa. Molécula receptora significa una molécula receptora con una elevada especificidad contra citoquinas proinflamatorias tales como TNF $\alpha$ , formas truncadas de la misma o equivalentes funcionales de la misma.

65 Los presentes inventores han desarrollado numerosos procedimientos para tratar trastornos patológicos de la columna vertebral tales como la enfermedad degenerativa del disco mediante la aplicación de una cantidad eficaz de una

molécula biofuncional en un trastorno patológico (por ejemplo, la DDD). De acuerdo con la presente invención, una realización abarca un implante o formulación para el núcleo pulposo espinal que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago, que se puede inyectar por vía transdiscal, preferentemente mediante una o varias inyecciones, o que se pueda implantar en un disco intervertebral. El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago se selecciona entre la proteína CD-RAP muy específica del cartílago o fragmentos activos de la misma, que sea capaz de estimular la diferenciación y el mantenimiento de las células del IVD a la vez que inhiben la formación indeseada de hueso.

El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago CD-RAP inhibe la actividad de citoquinas y MMP y/o reduce la expresión de dichas citoquinas y MMP al mismo tiempo que estimula los procesos anabólicos que dan como resultado la restauración parcial o completa del tejido degenerado, por ejemplo el fibrocartílago y, por tanto, es capaz de revertir o detener el proceso patológico. Por tanto, una inyección del factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago ayuda para detener el proceso de envejecimiento del disco en degeneración. En consecuencia, la presente invención permite tratar un disco degenerativo en una etapa anterior y previene por tanto la degradación de la matriz extracelular.

Además, el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago alivia o previene la degradación del cartílago y preserva o mejor la estructura y la función del IVD preferentemente sin formación indeseada de hueso.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de un factor de determinación y mantenimiento del cartílago para fabricar una composición farmacéutica, que es un implante o formulación para el núcleo pulposo espinal, para tratar un trastorno de la columna vertebral en un mamífero que necesita dicho tratamiento.

En una realización preferida, el trastorno de la columna vertebral preferido es el dolor de la parte inferior de la espalda idiopático, hernia de disco, rotura interna del disco o discos fisurados, radiculopatía, estenosis espinal, ciática inducida por un núcleo pulposo herniado, ciática, escoliosis o mielopatía idiopática.

Así, otro aspecto de la presente invención comprende el uso del implante o formulación para el núcleo pulposo espinal que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago que comprende la secuencia madura de CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID NO. 1, en el que el implante o la formulación se puede inyectar o se puede implantar por vía transdiscal, para fabricar una composición farmacéutica para tratar un trastorno de la columna vertebral en un mamífero que necesita dicho tratamiento.

Para el fin de la presente invención, la expresión "implante para el núcleo pulposo espinal" significa un dispositivo o una preparación que es para administrarse al disco intervertebral, en particular, dentro del núcleo pulposo (NP) del disco intervertebral. Preferentemente, el implante se puede administrar directamente dentro del disco intervertebral mediante el AF o depositarse directamente dentro del NP del disco. Se podría inyectar en el disco mediante una aguja u otro medio de aplicación mínimamente invasiva. Esto también significa que el implante para el núcleo pulposo espinal es una preparación farmacéutica que se puede inyectar dentro del núcleo pulposo, espacio intradiscal o espacio intervertebral. El implante puede ser un sólido, por ejemplo, una esponja o transportador sólido, que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago. Preferentemente, el implante es líquido lo que permite una aplicación sencilla del mismo. El implante, por ejemplo, puede ser un líquido que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago que comprende la secuencia madura de CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID NO. 1, opcionalmente junto con otros fármacos, auxiliares de formulación, o transportadores. En los ejemplos de aplicar un tamaño más grande de un material portador, podría preferirse la retirada total o parcial del disco.

Para el fin de la presente invención, la expresión "administración transdiscal" incluye, aunque no de forma limitativa, la inyección del implante para el núcleo pulposo espinal dentro de un disco intervertebral, en particular, dentro del NP de un disco intervertebral que incluye un disco intacto, un disco degenerado en diferentes etapas, un disco herniado, un disco roto, un disco deslaminado o un disco fisurado. Si el volumen a inyectar podría producir presión en el NP, al menos parte del NP se puede retirar antes de la inyección o aplicación del implante en la columna vertebral. En algunos casos, el volumen del material retirado es aproximadamente la cantidad de volumen  $\pm$  20% a aplicar. La expresión administración transdiscal también incluye una inyección del implante para el núcleo pulposo espinal dentro del AF de un disco intacto o en degeneración tal como se ha descrito anteriormente para el NP. En los ejemplos de aplicar un tamaño más grande de un material portador, la retirada total o parcial del disco podría ser necesaria antes de la aplicación del implante para el núcleo pulposo espinal. Esto incluye además proporcionar el implante en una ubicación externa pero muy cercana a la pared del AF o placa superior de un cuerpo vertebral adyacente, esto evitaría la punción del AF y, por tanto, una potencial carga en el disco.

La expresión "enfermedad degenerativa del disco (DDD)" es un proceso crónico caracterizado en parte por una pérdida progresiva del contenido de proteoglicano y agua en el núcleo pulposo que se pone de manifiesto por múltiples trastornos tales como dolor de la parte inferior de la espalda idiopático, hernia de disco, rotura interna del disco o discos fisurados, radiculopatía, estenosis espinal, ciática inducida por un núcleo pulposo herniado, ciática, escoliosis y/o mielopatía idiopática. El grado de degeneración del disco puede determinarse mediante análisis de IRM prequirúrgica.

La expresión "factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago" significa uno o más factores de diferenciación del cartílago que podrían tener capacidad mitógena pero que se caracterizan por su capacidad de aumentar y/o mantener el fenotipo específico de condrocitos de la célula (por ejemplo, la actividad anabólica) sin una formación indeseada de hueso. Las características específicas de los condrocitos son, por ejemplo, la producción de agregano, colágeno de tipo II, SOX-9 y proteoglicanos. Los morfógenos condrogénicos puede revertir el fenotipo desdiferenciado o afibrótico comparable a las células del núcleo del disco de discos más jóvenes o adultos normales. También puede tener un efecto anabólico sobre las células del anillo o sobre las células de la placa superior del disco. Preferentemente, el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago es una molécula secretada y, por tanto, puede actuar potencialmente de forma autocrina, paracrina o endocrina.

Los "citoblastos mesenquimales (MSC)" de acuerdo con la presente invención son poblaciones de células primitivas o en reposo que residen en muchos tejidos esqueléticos maduros como células progenitoras mesenquimales no alteradas. Los MSC son flexibles y tienen la capacidad de diferenciarse para dar varios tipos de tejidos maduros, que incluyen cartílago, hueso, grasa y otro tejido, dependiendo del entorno y las señales biológicas proporcionadas a dichas células en reposo. Los MSC están disponibles de muchas fuentes autólogas, incluidos la médula ósea, sangre, tejido muscular y grasa que se puede recoger para aislar dichas células sin una morbilidad significativa del sitio donante o potencial inmunógeno.

Los MSC pueden ser células precursoras de las células del NP o de las células del AF, los condrocitos, u otras células vivas que podrían funcionar análogamente a las células del NP o AF o que podrían diferenciarse para dar células o construir un NP y/o AF funcional.

"Tratar o tratamiento" tal como se usa en el presente documento, significa un alivio de los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, detener una evolución o empeoramiento adicional de los síntomas, prevención o profilaxia de la enfermedad o trastorno.

La invención se basa en el hallazgo de que un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago tal como un miembro de la familia MIA (factor de actividad inhibidora del melanoma) como CD-RAP puede afectar o modificar un trastorno de la columna vertebral por sus efectos anabólicos (por ejemplo, regeneración o restauración del fibrocartílago dentro de la columna vertebral) a la vez que detiene o inhibe los procesos degenerativos catabólicos (por ejemplo, la degeneración de la matriz extracelular) dentro del disco espinal.

Dicho efecto de un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago sobre los trastornos de la columna vertebral es sorprendente, ya que el cartílago del disco intervertebral (IVD) es bastante diferente de otros cartílagos comunes.

A diferencia del cartílago articular, al que se denomina cartílago hialino, el cartílago de los IVD consiste en fibrocartílago, que es un tipo especial de cartílago. Especialmente, el AF del IVD se considera fibrocartilaginoso y consiste principalmente de laminillas compuestas por fibras de colágeno muy orientadas. El NP incluye un contenido mayor de colágeno de tipo II, que está orientado aleatoriamente, con una concentración mucho más alta de proteoglicanos. Se ha demostrado que las células del AF se orientan a lo largo de la dirección predominante de las fibras de colágeno de la laminilla. Las células de la región más interna en AF y NP son más redondeadas y acumulan más colágenos de tipos II y IV y proteoglicanos.

Existen diferencias físicas y químicas significativas entre el fibrocartílago y otros tipos de cartílagos, tales como el cartílago articular/hialino (documento WO2005/091960 y las referencias citadas en dicho documento). Por ejemplo, el fibrocartílago se diferencia por tener mucho colágeno de tipo I en su matriz, principalmente en el anillo. El colágeno de tipo II del fibrocartílago, tal como el cartílago del IVD, tiene un nivel sustancialmente mayor de hidroxilación y glicosilación que el colágeno de tipo II del cartílago articular, y al agregano está más fuertemente sustituido. Estas modificaciones posteriores a la traducción afectan a la estructura y función física del colágeno del fibrocartílago y del IVD. La diferenciación antenatal del IVD fibrocartilaginoso también se diferencia del que experimenta el cartílago articular en una articulación sinovial. El IVD tiene una historia de desarrollo compleja, y contiene células derivadas del notocordio que no tienen equivalentes en el cartílago articular.

Hasta la presente invención, los factores de diferenciación y mantenimiento del cartílago de la presente invención que comprenden la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID No. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID No. 1 no habían mostrado tener efectos biológicos para prevenir la degeneración del fibrocartílago o de los fibrocondrocitos *in vitro* o *in vivo*. Los factores de diferenciación y mantenimiento del cartílago de la presente invención que comprenden la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID No. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID No. 1 inducen y mantiene el anabolismo del cartílago en el IVD (por ejemplo, la síntesis de proteoglicano y agregano) mientras que la degeneración y el catabolismo del cartílago, que incluye la rotura de la matriz, la síntesis de proteoglicanos y colágenos anómalos se detiene parcial o completamente, se inhibe o incluso se invierte.

La degeneración anómala del disco, el aumento de la apoptosis y la disminución de la síntesis de las moléculas de la matriz están al menos parcialmente mediadas por citoquinas tales como IL-1, para la que se ha demostrado que cambian los condrocitos del anabolismo al catabolismo, induciendo la rotura del cartílago a nivel molecular y morfológico. La inhibición de la actividad de las citoquinas y los MMP, conocida por estar implicada en la degeneración

del disco y/o la reducción de la expresión de dichas citoquinas y MMP, mediada por la presente invención, ayuda a resintetizar la matriz normal del disco y altera la función de las células del disco. Por tanto, una inyección de los factores de diferenciación y mantenimiento del cartílago ayuda a detener o invertir el proceso de envejecimiento o degenerativo de disco en degeneración. En consecuencia, la presente invención permite tratar un disco degenerativo en una etapa anterior y previene por tanto la degradación de la matriz extracelular y conserva la estructura y la función del IVD.

El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago de la presente invención es un no anticuerpo y una molécula no receptora. Esto significa que el factor usarse de acuerdo con la invención no es un anticuerpo ni tampoco una molécula receptora. El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago no es un factores de transcripción (por ejemplo, no es SOX-9) ni es una proteína extracelular. El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago no se seleccionada entre el grupo de familias de proteínas de factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$  por ejemplo, TGF- $\beta$ 1), factor morfogenético óseo (BMP) y factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) (por ejemplo, IGF-1). Las proteínas BMP se describen en Wozney et al. (Wozney y Rosen, 1998) e incluyen por ejemplo BMP-2, BMP-7 y factores de diferenciación del crecimiento tales como GDF-5, GDF-6 y GDF-7.

Preferentemente, el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago de acuerdo con la invención que comprende la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID No. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID No. 1, es un morfógeno condrogénico, más preferentemente un morfógeno condrogénico que es una proteína, preferentemente una proteína específica de cartílago, con actividad anabólica para la regeneración del cartílago (factor anabólico) y su mantenimiento. El factor anabólico, a diferencia de los factores catabólicos tales como las metaloproteasas, factores apoptóticos, interleuquinas, prostaglandinas, enzimas proteolíticas y degradativas, radicales libres de oxígeno, óxido nítrico y fragmentos de fibronectina, que inducen la degradación de la región del núcleo pulposo, aumentan el fenotipo específico de condrocitos de las células dentro del disco vertebral. Preferentemente, el morfógeno condrogénico es un factor de determinación del cartílago preferentemente específico del tejido del cartílago que controla la formación y el mantenimiento del cartílago, evitando o inhibición a la vez la formación de hueso.

En una realización, el factor de diferenciación del cartílago tiene un peso molecular menor de 80 kDa, preferentemente de < 30 kDa, más preferentemente de < 15 kDa, los más preferentemente entre 10 y 15 kDa.

El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago usado de acuerdo con la invención que comprende la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID No. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID No. 1, es un factor que induce la síntesis de proteínas de la matriz extracelular tales como proteoglicano, agregano y/o colágeno. Además, preferentemente, el factor da como resultado una reducción en la cantidad de citoquinas y MMP.

El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago de acuerdo con la invención que comprende la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID No. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID No. 1, es una proteína con un dominio SH3 o con un dominio que adopta un plegamiento análogo al del dominio SH3. El dominio SH3 o el dominio análogo a SH3 se describe en, por ejemplo, Stoll et al. (Stoll et al., 2001b) y se puede determinar mediante la predicción de un plegamiento SH3 con un servidor web 3D-PSSM publicado en Kelley et al. (Kelley et al., 2000). Los dominios SH3, también denominados dominios de homología Scr, son moléculas proteicas que se encuentran en muchas proteínas intracelulares. De este modo, no se han descrito proteínas con dominio SH3 que puedan ser útiles en el tratamiento de trastornos de la columna vertebral.

En otra realización, el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago de acuerdo con la invención que comprende la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID No. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID No. 1, es una proteína que se puede unir específicamente a la fibronectina, fragmentos de fibronectina, y/o secuencias ricas en prolina tal como se describe, por ejemplo, en la bibliografía (Stoll et al., 2001a; Homandberg y Hui, 1996; Homandberg et al., 1997).

El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago de acuerdo con la invención que comprende la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID No. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID No. 1, comprende un dominio de unión a fibronectina o integrina. La unión del factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago a proteínas extracelulares tales como fibronectina o fragmentos de fibronectina, así como a integrinas, se puede determinar mediante, por ejemplo, ELISA. La fibronectina, fragmentos o integrinas de la misma, se puede revestir sobre superficies de plástico y exponerse al factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago. La cantidad de unión se puede determinar mediante un anticuerpo monoclonal unido a peroxidasa contra el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago. La unión a integrina también se puede determinar cómo se describe en Bauer et al. que se ha incorporado como referencia al presente documento.

Secuencia madura de CD-RAP (SEQ ID No. 1)

**GPMPKLADRKLCADQECSHPI SMAVALQDYMAPDCRFLTIHRGQVVYVFS  
 KLGGRGLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKT  
 DWDFYCQ**

Secuencia genérica 1 (SEQ ID No. 02)

5 C X<sub>4</sub> C X<sub>17</sub> C X<sub>12</sub> V X<sub>11-13</sub>WX<sub>7-18</sub>FX<sub>4</sub>VX<sub>21</sub>CX

Secuencia genérica 2 (SEQ ID No. 03)

**K X C X D X E C X<sub>11</sub> D X<sub>3</sub> P D C X<sub>12</sub> V X<sub>2</sub> K L X<sub>7-9</sub> W X G S X<sub>5-13</sub> G Y F P X<sub>3</sub> V  
 X<sub>18</sub> D F X C X**

Secuencia genérica 3 (SEQ ID No. 04)

**K X C X D X<sub>2</sub> C X<sub>8</sub> A X<sub>2</sub> D X<sub>3</sub> P D C R F X<sub>5</sub> G X V X<sub>5</sub> K L X<sub>7</sub> W X G S V X<sub>12</sub> G  
 Y F P X<sub>22</sub> D F X C Q**

en la que "X" cada vez que aparece representa independientemente un aminoácido, y el número en subíndice es el número de cualquier aminoácido. Preferentemente, "X" representa independientemente un aminoácido de origen natural y, en particular, A, R, N, D, B, C, Q, E, Z, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V.

El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago es CD-RAP (proteína sensible a ácido retinoico derivada de cartílago), también denominada MIA (actividad inhibidora del melanoma), OTOR (proteína derivada de fibrocyto, FDP, tipo MIA, MIAL) y TANGO 130 que pertenece a una clase de proteínas secretadas (Bossertoff et al., 2004; Bossertoff y Buettner, 2003; Bossertoff et al., 1997; documento WO00/12762). CD-RAP o MIA es una proteína de 130 aminoácidos (documentos EP 0710248, EP 1146897) que es un marcador muy específico de la diferenciación condroidea. La expresión génica se activa al principio de la condrogénesis mediante el desarrollo del cartílago (Dietz y Sandell, 1996; Sakano et al., 1999). En el caso de daño en el cartílago debido a artrosis, CD-RAP se expresa en niveles crecientes al principio de la enfermedad en el momento en que se observa un fuerte efecto anabólico, y disminuirá una vez que la enfermedad empeora (Saito et al., 2002).

La proteína que se contempla en el presente documento se puede expresar a partir de ADN o ADNc intacto o truncado, o a partir de ADN sintéticos, en células hospedadoras procariontas o eucariotas. Las proteínas se pueden aislar de los medios de cultivo o los cuerpos de inclusión y/o replagarse para formar composiciones biológicamente activas. Véanse por ejemplo el documento EP 0710248 y Loughheed et al. (Loughheed et al., 2001) para revisar protocolos ilustrativos para la purificación recombinante de CD-RAP. La descripción detallada de cómo estudiar la actividad (por ejemplo, condrogénesis) de dichas proteínas aisladas se describe en Tscheudschilsuren et al. y Stoll et al. (Tscheudschilsuren et al., 2005; Stoll et al., 2003). En los Ejemplos 2 a 5 del documento EP1146897 se describe un bioensayo para la inducción de cartílago. El Ejemplo 5 describe un ensayo de implante ectópico en ratón para la inducción de cartílago. Como alternativa, la inducción y el mantenimiento del cartílago se pueden determinar en un modelo de reparación parcial o completa del espesor del cartílago articular.

En una realización de la presente invención, el implante para el núcleo pulposo espinal comprende además uno o más principios activos adicionales, preferentemente anticatabólicos (por ejemplo, TIMP-1 y TIMP-2), mitógenos (por ejemplo, IGF-1, PDGF, EGF, FGF), proteínas morfogenéticas óseas tales como GDF-5, antagonistas de BMP tales como nogina o cordina y/o reguladores intracelulares (por ejemplo, LMP-1, SOX-9) o combinaciones de los mismos. La adición de anticatabólicos aumenta adicionalmente la síntesis de la matriz mediada por el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago o el morfógeno condrogénico, por ejemplo, mediante la inhibición de las enzimas degradativas. Las moléculas mitógenas son factores de crecimiento que aumentan la velocidad de la mitosis de las células y también podrían aumentar la síntesis de PG en diferentes grados, dependiendo de la región del disco de la que se derivan las células y, por tanto, respaldan adicionalmente el efecto del factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago o del morfógeno condrogénico. Al combinar un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago con un regulador intracelular, se puede conseguir la regulación positiva del factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago y/o la síntesis de PG en experimentos *in vitro*.

En otra realización, el implante para el núcleo pulposo espinal comprende además una o más antimetaloproteinasas, compuestos de ciclina, antagonistas de citoquinas, inhibidores del TNF, inhibidores de IL, sustancias antiangiogénicas, inhibidores de enzimas proteolíticas, fármacos antiinflamatorios incluidos infliximab, etanercept, adalimumab, nerelimonmab, lenercept y similares, o combinaciones de los mismos.

En otra realización, el implante para el núcleo pulposo espinal se administra simultáneamente o se administra después de una inyección o aplicación de agentes quimionucleolíticos tales como C-ABC o los descritos en el documento US 2005/0031666 para prevenir un daño estructural a largo plazo del disco. Preferentemente, el implante del núcleo espinal se puede inyectar o se puede implantar por vía transdiscal. Preferentemente, la inyección es una inyección local o no sistémica. Una ventaja de la inyección o implante transdiscal es que se pueden utilizar concentraciones más elevadas del factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago produciendo mínima toxicidad sistémica.

El factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago que comprende la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID NO. 1, se puede implantar o inyectar directamente en un disolvente o vehículo aceptable, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, solución salina fisiológica, agua estéril, solución de Ringer. Preferentemente, se administra al espacio intradiscal o NP. La administración se puede conseguir mediante una sola inyección o con inyecciones repetidas, preferentemente con una inyección percutánea o de forma percutánea mediante un catéter. La inyección intradiscal de la proteína condrogénica CD-RAP aumentará la altura del disco intervertebral estimulando las células del disco intervertebral para regular en exceso la síntesis de proteoglicano, agrecano y/o colágeno. Por tanto, la aplicación clínica se puede conseguir con técnicas mínimamente invasivas, lo que significa ahorro de costes y la posibilidad de complicaciones relativas a otros procedimientos tales como la disectomía parcial o la fusión vertebral.

Aunque es posible agregar el implante para el núcleo pulposo espinal de la invención al el disco intervertebral, es también posible retirar parte del disco intervertebral y sustituirlo por el implante de la invención.

La presente invención, por lo tanto, también proporciona la sustitución de una parte del NP retirado, por ejemplo, en un procedimiento de nucleotomía o nucleotomía parcial, o para suplementar una NP que se ha degenerado debido a la edad, lesión o similar, con un implante para el núcleo pulposo de la presente invención. El disco degenerado o en degeneración o parte del mismo se puede retirar con técnicas convencionales, tales como láser, afeitadora, u otro instrumento quirúrgico.

El disco en degeneración puede ser un disco intacto o un disco roto. El disco en degeneración puede estar deslaminado, puede tener fisuras o puede estar herniado.

El implante para el núcleo pulposo espinal se puede combinar con un procedimiento de estabilización mínimamente invasivo. En casos graves de degeneración del disco avanzada, donde la estimulación continua da como resultado la producción de factores no deseados tales como factores catabólicos, un procedimiento de estabilización mínimamente invasivo puede respaldar adicionalmente la regeneración o inhibir la progresión del disco degenerado.

En una realización de la invención, el implante o formulación comprende además un transportador o dispositivo de administración de fármaco. El transportador o dispositivo de administración de fármaco usado en la invención es biocompatible porque no es tóxico y no desencadena reacciones inflamatorias en el organismo. El transportador puede incluir una matriz o estructura de armazón. El transportador puede ser sólido, un líquido, un gel, una pasta u otra forma inyectable. Preferentemente, el transportador comprende un hidrogel tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO2005/113032, en particular hidrogeles inyectables, ácido hialurónico sulfatado, una carboximetilcelulosa altamente sustituida, y sales de los mismos, alginato, hidroxipropilalginato, quitosano, hidroxietilalmidón, colágeno, geles térmicos invertidos (por ejemplo, Pluronic F128), un polímero termosensible de tipo quitosano (por ejemplo, hidrogel quitosano-Pluronic®), una estructura de seda porosa, una pluralidad de microesferas, una formulación liposómica y una malla de fibra de hidroxiapatito. El transportador es un sustrato apropiado para células adecuado para el crecimiento hacia dentro, proliferación y residencia de las células del IVD.

El transportador puede comprender un polímero tal como Pluronic por ejemplo pluronic 168, un copolímero en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno tal como los descritos en el documento WO2005/034800.

Preferentemente, el transportador comprende sulfato de condroitina, gelatina, hialuronano y/o hialuronato de sodio o una mezcla de los anteriores, incluidos tricopolímeros tales como un tricopolímero de gelatina/condroitina-6-sulfato/hialuronano. Las preparaciones de tricopolímero se describen en Yang et al. (Yang et al., 2005).

El transportador puede comprender un gel de fibrina compuesto de plasma rico en plaquetas, plasma enriquecido con plaquetas con un gel de gelatina biodegradable, compuestos de fibrina/ácido hialurónico, microesferas de hidrogel de gelatina con el factor encapsulado, materiales compuestos de hidrogel biodegradable inyectable que comprenden por ejemplo polímeros tales como oligofumarato{poli{etilenglicol)}, polilactida (PLA)/ácido poliglicólico (PGA) y poli-épsilon-caprolactona.

Preferentemente, el transportador comprende un fosfato de quitosano-glicerol o un coágulo sanguíneo *in situ* o coágulo sanguíneo estabilizado con una solución de fosfato de quitosano-glicerol.

En una realización de la invención, el implante para el núcleo pulposo espinal comprende además un dispositivo de

liberación sostenida, por ejemplo, un dispositivo de liberación sostenida que comprende un hidrogel, hidrogel polianiónico, una pluralidad de microesferas, una formulación liposómica y una malla de fibra de hidroxiapatito. El dispositivo de liberación sostenida, en particular, permite la liberación controlada.

- 5 En una realización, el dispositivo de liberación sostenida proporciona la liberación continua, en otra realización, el dispositivo de liberación sostenida proporciona la liberación intermitente.

10 En una realización, el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago está encapsulado en liposomas. Los liposomas tienen la ventaja, en comparación con una solución cristalina, que se puede evitar la irritación del disco intervertebral y, por tanto, se puede evitar la terapia de la inflamación inducida además de una duración más prolongada del agente terapéutico y un aclaramiento más lento en el sitio de aplicación.

15 Un enfoque para mejorar la eficacia de administración de los compuestos terapéuticos y otros agentes ha sido la encapsulación en una estructura lipídica tal como los liposomas. Los liposomas generalmente comprenden una gotícula de lípido cerrada que tiene un núcleo que contiene, de forma típica, un compuesto en un medio acuoso. En determinadas realizaciones, el compuesto está químicamente unido a un componente lipídico o simplemente incluido dentro del compartimento acuoso interno del liposoma.

20 Una composición farmacéutica o un implante para el núcleo pulposo espinal proporcionados de acuerdo con la presente invención que comprende el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago se proporciona preferentemente en forma de composiciones liposómicas que se pueden reconstituir para producir liposomas que encapsulan el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago. Preferentemente, la preparación liposómica es de vesículas secas reconstituidas (DRV) que tras la reconstitución en una solución acuosa forman el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago encapsulado en liposomas. La composición liposómica usada en el  
25 presente documento es, por ejemplo, un producto granulado seco que, tras la adición de agua, se dispersa para constituir formulaciones liposómicas multilamelares que comprenden el componente biológicamente activo. Ventajosamente, los problemas de estabilidad tales como la agregación u oxidación del principio activo y/o de los liposomas se evitan usando liposomas secos.

30 Los lípidos adecuados para su uso en las formulaciones en las que están presentes de manera individual o en mezclas incluyen lípidos neutros o cargados positivamente tales como colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidilcolina hidrogenada, diesteoilfosfatidilcolina, esfingomielina, dioleilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilcolina, gangliósidos, ceramidas, fosfatidilinositol, ácidos fosfáticos, dicetilfosfato, dimiristoil fosfatidilcolina, estearilamina, dipalmitoil fosfatidilglicerol y otros lípidos similares. Preferentemente, la  
35 mezcla de lípidos está cargada. La formulación liposómica es, de forma típica, una mezcla de al menos dos lípidos tales como colesterol y fosfatidilcolina y más habitualmente una mezcla de tres o más lípidos.

40 En otra realización, el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago de la presente invención está pegilado. Este factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago modificado tiene una semivida biológica más prolongada que el agente sin modificar y, por tanto, puede mejorar la eficacia del agente para el tratamiento médico de los trastornos de la columna vertebral. La pegilación puede aumentar el tamaño de la proteína, mejorar la estabilidad, aumentar la solubilidad de la proteína, reducir la proteólisis y disminuir la frecuencia de dosificación. Además, se puede reducir la tendencia a la agregación de la proteína.

45 La pegilación se puede conseguir mediante enlaces covalentes estables entre un grupo amino o sulfhidrilo de la proteína y un grupo químicamente reactivo (carbonato, éster, aldehído, o tresilato) en el polietilenglicol (PEG). La estructura resultante puede ser lineal o ramificada. Los reactivos PEG, por ejemplo, se describen en Roberts et al. (Roberts et al., 2002). Otros agentes de pegilación son, aunque no de forma limitativa, metoxipoli(etilenglicol) (mPEG), metil PEO<sub>12</sub> maleimida PEG, agentes modificadores que contienen poli(óxido de etileno) (PEO) reactivos con aminas protegidos con metilo (ésteres de metil PEO<sub>n</sub>-NHS, n=4, 8, 12). En otra realización, el implante del núcleo espinal de la  
50 presente invención comprende demás tejido o células del núcleo pulposo, preferentemente células derivadas de citoblastos mesenquimales (MSC).

55 Los MSC o citoblastos autólogos aislados de tejido del donante (por ejemplo, estroma de la médula ósea) se puede cultivar en o sobre un material tridimensional biodegradable tal como ácido hialurónico, seda, colágeno, estructuras de colágeno/hialuronano, hidrogeles, quitosano, gel de quitosano, preparaciones poliméricas reticulables inyectables, geles o estructuras de polímeros degradables, poliláctido, estructura de gelatina/condroitina-6-sulfato/hialuronano, éster o derivados del ácido hialurónico tales como Hyaff 11, una malla de fibras de hidroxiapatito y cola de fibrina en presencia de un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago tanto solo como combinado con otros  
60 morfógenos o factores de crecimiento tales como los miembros IGF-1 o las BMP, que respaldan la diferenciación de dichas células en células análogas al núcleo pulposo y estimulan la síntesis de PG preferentemente bajo tensión de oxígeno. Los métodos de cultivo se describen, por ejemplo, en Honda et al., 2000, que se ha incorporado como referencia al presente documento (Honda et al., 2004). Las células así cultivadas, o neotejido, preferentemente, junto con el material de la estructura, posteriormente se trasplantarán o inyectarán dentro del disco afectado para conseguir  
65 la regeneración del NP.

Es también posible aislar y expandir las MSC en un cultivo monocapa, por ejemplo, en condiciones hipóxicas *in vitro*, como se produce en la región NP del disco intervertebral. Las MSC que evolucionan hasta el trasplante se pueden transfectar con uno o más factores de diferenciación y mantenimiento del cartílago necesarios para estimular la cicatrización del IVD o se pueden estimular con un medio de inducción condrogénico que contiene dicho factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago (por ejemplo CD-RAP o fragmentos activos de la misma). Preferentemente, la transfección se puede realizar mediante un vector de expresión que codifica dicho factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago como la proteína CD-RAP o fragmentos activos de la misma. Las MSC transfectadas y/o estimuladas o las MSC cultivadas preferentemente incluidas en un biomaterial tal como colágeno, gel de aterocolágeno, gelatina, alginato, hidroxipropilalginato, carboximetilcelulosa o hidroxietilalmidón se pueden trasplantar al disco degenerativo mediante inyección tal como un microinyector de insulina (Sakai et al., 2005) u otro dispositivo de aplicación. La densidad celular puede estar comprendida, por ejemplo, de  $1 \times 10^4$  células/ml a  $1 \times 10^7$  células/ml, preferentemente de  $1 \times 10^5$  células/ml a  $1 \times 10^6$  células/ml.

Las MSC también se pueden cultivar en alginato, aglomerado, micromasa, o cultivos celulares agregados en la presencia del factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago tanto solo como combinado con otros morfógenos o factores del crecimiento como los miembros TGF- $\beta$  y/o las BMP (por ejemplo BMP-2), que respaldan la diferenciación de estas células en células análogas a NP.

En una realización, el dispositivo de administración comprende además células MSC o AF junto con una estructura porosa tridimensional de seda. La estructura de seda porosa se puede derivar de fibroína de seda extraída de *Bombyx mori*. Las células se pueden expandir sin diferenciarse, y se inducirán a condrocitos mediante el cultivo con el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago. Las estructuras de seda bien directamente o cargadas con el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago se pueden sembrar con células MSF o AF y se pueden cultivar en medio suplementado con o sin el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago solo o combinado con otros factores, como se ha descrito anteriormente. Las estructuras de fibrina de seda de capullos de gusanos de seda *Bombyx mori* se pueden extraer como se describe, por ejemplo, en Sofia et al. y Karageorgiou et al. (Sofia et al., 2001; Karageorgiou y Kaplan, 2005).

En una realización, las células AF, NP o MSC se pueden transfectar *ex vivo* con al menos un gen de un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago para proporcionar tanto las células como la proteína o proteínas necesarias para estimular la cicatrización del IVD y se reimplantan con o sin cultivar en, por ejemplo, cultivos monocapa, las perlas de alginato o un material de estructura tridimensional biodegradable en el tejido hospedador diana. Como ejemplo, las células NP aisladas se siembran en forma de monocapa, seguido por transfección con el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago que comprende por ejemplo un vector de expresión o vector para terapia con un gen vírico tal como un adenovirus o un virus adenoasociado (AAV) usando un agente de transfección tal como el reactivo FuGene6. Después de varios días de cultivo (por ejemplo 7 días), las células se pasan y se encapsulan en alginato, por ejemplo preferentemente en alginato aproximadamente de 0,5 al 2%. La expresión del gen se puede analizar por métodos convencionales tales como RT-PCR o ELISA. Estas células del núcleo pulposo transfectadas en perlas de alginato se pueden usar para ingeniería tisular del IVD y el tratamiento de enfermedades degenerativas del disco. Otros métodos de terapia génica se describen, por ejemplo, en Wells, 2004; Paul et al., 2003 y Sobajima et al., 2004.

En una realización, células tales como células NF, MSC o condrocitos autólogos preferentemente de origen humano se immortalizan temporalmente usando, por ejemplo, un vector adenovírico del Virus simio 40 o un vector de baculovirus que codifica el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago necesario para estimular la cicatrización del IVD.

En otra realización, células del IVD degenerado humano (por ejemplo, células NP) se pueden transfectar con un vector adenovírico que transporta el factor exógeno tal como el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago. Una etapa posterior sería inyectar estas células modificadas de nuevo en el IVD enfermo.

También se ha divulgado el uso de un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago de la presente invención para cultivar citoblastos mesenquimales para fabricar una composición farmacéutica para tratar un trastorno de la columna vertebral en un mamífero, en particular, en un ser humano que necesita dicho tratamiento.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las Figuras y los Ejemplos.

La **FIGURA 1** ilustra la estabilidad de la formulación liposómica que comprende CD-RAP durante varios días (triángulos). La estabilidad de la formulación liposómica se determinó de acuerdo con el ejemplo 3. La curva superiores (cuadrados) muestra la estabilidad de la CD-RAP en tampón a 37°C para determinar la estabilidad de la proteína en estas condiciones.

La **FIGURA 2** muestra la inmovilización de 50  $\mu$ g de CD-RAP en el sistema de coágulo de fibrina tras 24 h a 37 °C. A: Tachotop®, 14 mm de diámetro, 4 mm de altura desde Nycomed; B: esponja de colágeno de tipo I porcino, BiomUp; C: Hyalofill-F rehidratado.

La **FIGURA 3** ilustra el porcentaje (%) de inducción de proteoglicano (GAG) en células de IVD de conejo cultivadas tras el estímulo con CD-RAP (100 ng/ml) con respecto al control negativo sin adición de CD-RAP y BMP-2 (n=3).

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1: Modelo de punción del anillo fibroso

En este ejemplo, una inyección de CD-RAP es eficaz en la restauración parcial de la altura del disco en un modelo de punción anular de conejo.

Se puede inducir la degeneración del disco en conejos blancos New Zealand adolescentes mediante punción del anillo fibroso del disco usando agujas de calibre definido (Singh et al., 2005). Tras proporcionar anestesia local mediante inyección de lidocaína a la región dorsal del plano lateral del disco se obtuvieron radiografías para determinar los valores iniciales de preinyección de las alturas del IVD. Posteriormente, los conejos se colocaron en una posición prona lateral y se usó un abordaje retroperitoneal posterolateral para exponer los IVD lumbares. En cada conejo se punzará el AF con una aguja de calibre 18G. Después de cuatro, ocho y 10 semanas, el animal recibe una inyección de solución salina tamponada (fosfato de arginina o PBS) o liposomas con vehículo como control o solución de proteína de 2,5 mg/ml a 10 mg/ml de CD-RAP (en PBS) o CD/RAP encapsulada en liposomas (2,5 mg/ml) en el núcleo pulposo. Se vigilan los animales durante 8 o 12 semanas (periodo de inducción y tratamiento). Se analizó el resultado preclínico mediante barridos de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) de la columna lumbar, se vigiló la altura del IVD mediante observación radiológica medida con un programa personalizado que utiliza software de formación de imágenes y se calculó el DHI porcentual (DHI posquirúrgico/DHI prequirúrgico x 100). Para el análisis histológico de los IVD, se tiñeron las secciones con hematoxilina eosina y safranina O. Se evaluaron las diferencias entre grupos para determinar la significancia estadística utilizando un análisis unilateral de la varianza (ANOVA). Un modelo animal alternativo de progresión lenta y reproducible de los tratamientos para la degeneración del disco es el clásico "modelo de puñalada" de Upson y Muir que se describe en Sobajima et al. (Sobajima et al., 2005). Para el método de puñalada, se realizará una incisión en un AF de los conejos blancos New Zealand. Un disco de cada conejo se tratará con CD-RAP, el otro con solución salina o vehículo.

El modelo de punción del anillo con aguja da como resultado un estrechamiento del disco en el periodo de observación de 12 semanas. Los discos tratados con solución salina presentan una extensa degeneración del disco. Sin embargo, el DHI porcentual desvela una tendencia de una altura de disco preservada en el grupo CD-RAP en comparación con los discos inyectados con solución salina o los discos inyectados con vehículo. El análisis histológico muestra un aumento de la síntesis de proteoglicano y protección contra los cambios degenerativos en comparación con el grupo del control.

### Ejemplo 2: Preparación de liposomas que contienen CD/RAP

Para la preparación de una preparación liposómica sostenida, se disolvieron 750 mg de fosfatidilcolina y 250 mg de colesterol en 20 ml de etanol en un matraz de fondo redondo. El disolvente se retiró cuantitativamente en un evaporador rotatorio. La película lipídica fina generada se rehidrató en 10 ml de agua para obtener liposomas (10 % (p/v) de lípidos) agitando suavemente a temperatura ambiente. Se prepararon vesículas unilamelares (SUV) con un diámetro de aproximadamente 100 nm mediante sonicación posterior. 300  $\mu$ l de SUV se mezclaron con 250  $\mu$ l de CD-RAP (3 mg/ml en 420 mM/l Arg/PO4 pH 7. 5) y posteriormente se liofilizaron. Se generaron liposomas multilamelares (MLV) encapsulantes de la proteína mediante reconstitución de la torta liofilizada con agua destilada poco antes de la aplicación de las vesículas reconstituidas secas. Esta rehidratación condujo a una eficacia de atrapamiento de aproximadamente el 50 % o más en los MLV con un diámetro promedio de aproximadamente 1,5  $\mu$ m o más sin alteración química del fármaco atrapado.

### Ejemplo 3: Estabilidad de la formulación liposómica que comprende CD-RAP

Este ejemplo ilustra la estabilidad de la formulación liposómica que comprende CD-RAP durante varios días. La estabilidad de la formulación liposómica se determinó de la siguiente forma:

120  $\mu$ g de CD-RAP se encapsularon en 300  $\mu$ l de suspensión liposómica como se ha descrito anteriormente. Una alícuota de 100  $\mu$ l se diluyó con 300  $\mu$ l de agua bidestilada y se separó mediante centrifugación durante 15 min a 16000 ref. Para determinar la eficacia de encapsulación, se cuantificó la CD-RAP no encapsulada mediante RP-HPLC usando una curva patrón. Una repetición de seis veces de una etapa de resuspensión y centrifugación no muestra aumento de la CD-RAP libre.

Se describió la liberación midiendo la concentración de CD-RAP libre en el sobrenadante en un periodo de tiempo de siete días, separada por centrifugación (15 min a 16000 ref). En cada punto temporal, se midió la cantidad de CD-RAP libre mediante RP-HPLC usando una curva patrón.

Los resultados que se muestran en la Fig. 1 indican una elevada eficacia de encapsulación superior al 50% (tiempo 0 [d]). Durante el siguiente periodo de tiempo de observación de hasta 7 días a 37°C se consiguió una meseta con el

mantenimiento de una encapsulación de aproximadamente el 45%, indicando por tanto la estabilidad de los liposomas que comprenden CD-RAP reconstituidos.

#### **Ejemplo 4: Implantes con CD-RAP inmovilizada**

Este ejemplo ilustra implantes con CD-RAP inmovilizada en estructuras basadas en colágeno o ácido hialurónico. 50  $\mu\text{g}$  de CD-RAP se formularon en 125  $\mu\text{l}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM, KCl 150 mM, KOH, pH 7,5, Tween 80 al 0,01 %. La solución se empapó en una esponja de colágeno (A: Tachotop® (A), 14 mm de diámetro, 4 mm de altura desde Nycomed; (B) esponja de colágeno de tipo I porcino, BiomUp; o se mezcló con 500  $\mu\text{l}$  de gel Hyaff g(Hyalofill-F rehidratado (C), 30 mg en 0,5 ml de agua bidestilada, 3 h, 5 °C) para adsorber CD-RAP. Posteriormente, el agua se eliminó mediante liofilización.

Para determinar la cinética de inmovilización de CD-RAP adsorbida sobre colágeno o Hyaff, el espécimen impregnado con CD-RAP se fijó en 500  $\mu\text{l}$  de coágulo de fibrina de bovino (4,9 mg de fibrinógeno, 0,3 U de trombina en citrato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 10 mM, pH 6. 4) como se describe en Meyenburg et al. (Meyenburg et al., 2000). A continuación, el coágulo se cubrió completamente por 2 ml de medio aceptor (solución salina tamponada con fosfato, Tween 80 al 0,02 %). Se cuantificó la CD-RAP libre después de 24 h mediante RP-HPLC usando una curva patrón.

Los resultados que se muestran en la Fig.2 indican diferencias en la eficacia de inmovilización de diversos biomateriales donde los materiales A y C muestran propiedades de unión fuerte para la proteína CD-RAP recombinante. Estas propiedades de unión pueden usarse para el direccionamiento y la retención local del factor de determinación y mantenimiento del cartílago en el sitio del defecto, por ejemplo, el disco degenerado, lo que evita un alto estallido inicial de CD-RAP y que proporciona un mantenimiento a largo plazo en el sitio de regeneración.

#### **Ejemplo 5: Aislamiento de células de discos intervertebrales humanos y animales**

Este ejemplo ilustra métodos para preparar células de IVD útiles para analizar el efecto de CD-RAP sobre la producción de componentes de la matriz extracelular específicos para la estimulación de células del cartílago y la actividad anabólica de CD-RAP.

Se pueden aislar células de discos humanos a partir de tejido de disco humano recuperado por disectomía llevada a cabo en el tratamiento de pacientes con enfermedad degenerativa del disco. Los especímenes (núcleo pulposo o anillo fibroso) se enjuagaron con PBS para eliminar la sangre residual o la matriz extracelular. Después de picar el tejido, las células se liberaron de la matriz extracelular con solución de colagenasa (0,5 mg/ml en PBS) a 37°C durante 45 min y las células se pueden aislar mediante centrifugación (véase Klagsburn, "Methods in Enzymology", Vol VII). Tras la eliminación del sobrenadante, las células recogidas se hacen crecer sobre seis placas con pocillos en medio esencial mínimo de Eagle con o sin suero de feto de ternera.

Las células IVD de bovino procedentes de tejido animal se aislaron mediante digestión enzimática secuencial. Se cultivaron las células con cambios diarios de medio de medio DMEM/F12 suplementado con suero de feto de bovino al 10%, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ascorbato, 360  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de L-glutamina y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de gentamicina en una atmósfera humidificada a 37°C con  $\text{CO}_2$  al 5% hasta que se alcanzó una confluencia de aproximadamente el 80%.

Células IVD de bovino procedentes de tejido animal se aislaron mediante digestión enzimática secuencial. Se cultivaron las células en medio DMEM suplementado con FCS al 10%, penicilina al 1% en estreptavidina y 50 ng/ml de ácido ascórbico en una atmósfera humidificada a 37°C con  $\text{CO}_2$  al 5% hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 90%. Posteriormente se pasaron y se cultivaron durante 7 días más.

#### **Ejemplo 6: Cultivo de células del disco intervertebral en perlas de alginato**

Se formaron perlas de alginato expresando 60  $\mu\text{l}$  de alginato al 1,2% en 0,15 NaCl con células IVD del ejemplo 5 en una solución de cloruro cálcico con 102 mmol/l, formando una perla semisólida. Las perlas se lavaron dos veces y se colocaron en placas con 12 pocillos con medio de 1 ml (Aota et al., 2005). Las perlas de alginato resultantes se pueden usar para analizar la influencia de fragmento de fibronectina (fragmento de 120 kDa (Chemicon, n.º de Cat. F1904), fragmento proteolítico de fibronectina de 70 kDa procedente de plasma humano (Sigma, n.º de Cat F0287) con o sin la adición de CD\_RAP para la síntesis de proteoglicano y la expresión de agrecano.

#### **Ejemplo 7: Inducción mediada por CD-RAP de agrecano y síntesis de proteoglicano en células de IVD**

Este ejemplo ilustra el uso del implante vertebral para demostrar que CD-RAP, cuando se añade a células de IVD, aumenta significativamente la síntesis de proteoglicano y la expresión de agrecano de las células de IVD durante el cultivo.

El día 7, células de IVD del ejemplo 5 se colocaron en placas de 24 pocillo para estudiar la síntesis de proteoglicano y la expresión de agrecano. Se cultivaron las células durante 7 días más en medio exento de suero con 0,5  $\mu\text{M}$  y 0,1  $\mu\text{M}$

de un fragmento de fibronectina de 70 kDa (F0297 Sigma). Para analizar la influencia de CD-RAP sobre la síntesis de proteoglicano y la expresión de agrecano, se añadieron concentraciones diferentes de CD-RAP (1,5, 10, 20 ug/ml) dos días después del cultivo con fibronectina. Después de 7 días, la expresión de agrecano se analizó mediante el análisis del Lightcycler (SybrGreen).

Para liberar las células desde las perlas, las perlas se solubilizaron en un tampón que contenía 55 mmol/l de citrato de sodio, 30 mmol/l de Na<sub>2</sub>EDTA, cloruro de sodio 0,15 M pH 6,8. Los aglomerados celulares se lavaron y resuspendieron en tampón de lisis para la extracción del ARN (Qiagen). Se llevó a cabo el aislamiento del ARN usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen). Se llevó a cabo la síntesis del ADNc de acuerdo con las instrucciones del kit Superscript II RT de Invitrogen. Se usó la β-actina como control. Los cebadores utilizados para la amplificación son los siguientes: a) cebadores de la β-actina de bovino 5' GGA AAT CGT CCG TGA CAT CAA 3'; 5' AAG GAA GGC TGG AAG AGA GC 3'; Los cebadores de agrecano fueron: 5' AAG AGA GCC AAA CAG CCG A 3'; 5' CTG GTA GTC CTG GGC ATT GT 3'.

Se midió la síntesis de proteoglicano usando el ensayo colorimétrico del azul de dimetilmetileno (DMMB) de acuerdo con el método que se describe en Farndale et al. (Farndale et al., 1982). El medio de cultivo se puede concentrar con un filtro centricon durante 10 a 20 minutos a 5000 rev/min. El contenido en GAG se puede determinar mezclando 20 μl de medio de cultivo concentrado o diluido con 200 μl de solución de DMMB y midiendo la densidad óptica a 525 - 530 nm. Para la estandarización del sulfato de condroitina se puede usar (sulfato de condroitina A 94%, tráquea de bovino, ICN). Se calculó la media de todas las medidas por microgramo de ADN o número de células.

### Ejemplo 8: Inducción de proteoglicano en células del disco intervertebral de conejo

Cuando las células de IVD de conejo aisladas de acuerdo con el ejemplo 5 alcanzaron un 90% de confluencia, las células se colocaron en placas de 6 pocillos para estudiar la síntesis de proteoglicano. Las células se cultivaron durante 5 o más días. Para analizar la influencia de CD-RAP sobre la síntesis de proteoglicano, el medio se cambió a FCS al 1% y se añadió BMP-2 (100 ng/ml) solo o en combinación con CD-RAP (100 ng/ml) al cultivo. Después de 5 días, se midió la síntesis de proteoglicano en el sobrenadante del cultivo celular usando el ensayo colorimétrico del azul de dimetilmetileno (DMMB) como se describe en el ejemplo 7. Los resultados de la estimulación de GAG de tres experimentos independientes se resumen en la Fig. 3. Estos datos indican que la adición de CD-RAP a BMP-2 estimuló las células de IVD conduciendo a un aumento de GAG en las células de IVD de conejo cultivadas.

### Listado de referencias

- Aota, Y., An, H. S., Homandberg, G., Thonar, E.J., Andersson, G. B., Pichika, R., y Masuda, K. (2005). Differential effects of fibronectin fragment on proteoglycan metabolism by intervertebral disc cells: a comparison with articular chondrocytes. *Spine* 30, 722-728.
- Bauer, R., Humphries, M., Fassler, R., Winklmeier, A., Craig, S.E., y Bosserhoff, A.K. (2006). Regulation of integrin activity by MIA. *J Biol Chem* 281, 11669-11677.
- Bosserhoff, A.K. y Buettner, R. (2003). Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation. *Biomaterials* 24, 3229-3234.
- Bosserhoff, A.K., Kondo, S., Moser, M., Dietz, U.H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Buettner, R., y Sandell, L.J. (1997). Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev. Dyn.* 208, 516-525.
- Bosserhoff, A.K., Moser, M., y Buettner, R. (2004). Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene Expr. Patterns.* 4, 473-479.
- Dietz, U.H. y Sandell, L.J. (1996). Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* 271,3311-3316.
- Farndale, R.W., Sayers, CA, y Barrett, A.J. (1982). A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect. Tissue Res.* 9, 247-248.
- Homandberg, GA y Hui, F. (1996). Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and strome-lysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 325-331.
- Homandberg, GA, Hui, F., Wen, C., Purple, C., Bewsey, K., Koepf, H., Huch, K., y Harris, A (1997). Fibronectin-fragment-induced cartilage chondrolysis is associated with release of catabolic cytokines. *Biochem. J* 321 (Pt 3), 751-757.
- Honda, M.J., Yada, T., Ueda, M., and Kimata, K. (2004). Cartilage formation by serial passaged cultured chondrocytes in a new scaffold: hybrid 75:25 poly(L-lactide-epsilon-caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg* 62,1510-1516.

- Karageorgiou, V. y Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474-5491.
- 5 Kawakami, M., Matsumoto, T., Hashizume, H., Kuribayashi, K., Chubinskaya, S., y Yoshida, M. (2005). Osteogenic protein-1 (osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7) inhibits degeneration and pain-related behavior induced by chronically compressed nucleus pulposus in the rat. *Spine* 30, 1933-1939.
- Kelley, LA., MacCallum, R-M., y Sternberg, MJ. (2000). Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol. Biol* 299, 499-520.
- 10 Levicoff, EA., Gilbertson, L-G., y Kang J.D. (2005). Gene therapy for disc repair. *Spine J* 5, 287S-296S.
- Lougheed, J.C., Holton, J.M., Alber, T., Bazan, J.F., y Handel, T.M. (2001). Structure of melanoma inhibitory activity protein, a member of a recently identified family of secreted proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5515-5520.
- 15 Masuda, K. y An, H.S. (2004). Growth factors and the intervertebral disc. *Spine J* 4, 330S-340S.
- Masuda, K., Oegema, T. R., Jr., y An, H.S. (2004). Growth factors and treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine* 29, 2757-2769.
- 20 Meyenburg, S., Lilie, H., Panzner, S., y Rudolph, R. (2000). Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system. Studies on the in vitro release behavior. *J Control Release* 69, 159-168.
- 25 Paul, R., Haydon, R.C., Cheng, H., Ishikawa, A., Nenadovich, N., Jiang, W., Zhou, L., Breyer, B., Feng, T., Gupta, P., He, T.C., y Phillips, F.M. (2003). Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease. *Spine* 28, 755-763.
- Roberts, MJ., Bentley, M.D., y Harris, J.M. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev* 54, 459-476.
- 30 Saito, S., Kondo, S., Mishima, S., Ishiguro, N., Hasegawa, Y., Sandell, L.J., y Iwata, H. (2002). Analysis of cartilage-derived retinoic-acid-sensitive protein (CD-RAP) in synovial fluid from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg Br* 84, 1066-1069.
- 35 Sakai, D., Mochida, J., Iwashina, T., Watanabe, T., Nakai, T., Ando, K., y Hotta, T. (2005). Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 30, 2379-2387.
- 40 Sakano, S., Zhu, Y., y Sandell, L.J. (1999). Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein and type II collagen expression during fracture healing are potential targets for Sox9 regulation. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1891-1901.
- Singh, K., Masuda, K., and An, H.S. (2005). Animal models for human disc degeneration. *Spine J* 5, 267S-279S.
- 45 Sobajima, S., Kim J.S., Gilbertson, L.G., y Kang, J.D. (2004). Gene therapy for degenerative disc disease. *Gene Ther.* 11, 390-401.
- Sobajima, S., Kompel, J.F., Kim, J.S., Wallach, C.J., Robertson, D.D., Vogt, M.T., Kang, J.D., y Gilbertson, L.G. (2005). A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine* 30, 15-24.
- 50 Sofia, S., McCarthy, M.B., Gronowicz, G., y Kaplan, D.L. (2001). Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 54, 139-148.
- 55 Stoll, R., Renner, C., Buettner, R., Voelter, W., Bosserhoff, A.K., y Holak, TA (2003). Backbone dynamics of the human MIA protein studied by (15)N NMR relaxation: implications for extended interactions of SH3 domains. *Protein Sci.* 12, 510-519.
- 60 Stoll, R., Renner, C., Zweckstetter, M., Bruggert, M., Ambrosius, D., Palme, S., Engh, R-A., Golob, M., Breibach, I., Buettner, R., Voelter, W., Holak, TA, y Bosserhoff, A.K. (2001a). The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J.* 20, 340-349.
- Stoll, R., Renner, C., Zweckstetter, M., Bruggert, M., Ambrosius, D., Palme, S., Engh, R.A., Golob, M., Breibach, I., Buettner, R., Voelter, W., Holak, TA, y Bosserhoff, A.K. (2001b). The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *Embo J* 20, 340-349.
- 65 Takegami, K., An, H.S., Kumano, F., Chiba, K., Thonar, E.J., Singh, K., y Masuda, K. (2005). Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase

ABC-induced in vitro chemonucleolysis. Spine J 5, 231-238.

5 Tscheudschilsuren. G., Bosserhoff. A.K., Schlegel J., Vollmer, D., Anton. A, Schnettler, R., Brandt, J., y Proetzel, G. (2005). Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA. Experimental Cell Research 1-10.

Wells, DJ. (2004). Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. Gene Ther. 11, 1363-1369.

10 Wozney J.M. y Rosen, V. (1998). Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop 346, 26-37.

15 Yang, S.H., Chen, P.Q., Chen, Y.F., and Lin, F-H. (2005). An in-vitro study on regeneration of human nucleus pulposus by using gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan tri-copolymer scaffold. Artif. Organs 29, 806-814.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Scil Technology GmbH

20 <120> Un implante del núcleo pulposo espinal

<130> 38961PCT

<150> EP 06021093.7

25 <151> 06-10-2006

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

30

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 1

Gly Pro Met Pro Lys Leu Ala Asp Arg Lys Leu Cys Ala Asp Gln Glu  
1 5 10 15

Cys Ser His Pro Ile Ser Met Ala Val Ala Leu Gln Asp Tyr Met Ala  
20 25 30

Pro Asp Cys Arg Phe Leu Thr Ile His Arg Gly Gln Val Val Tyr Val  
35 40 45

Phe Ser Lys Leu Lys Gly Arg Gly Arg Leu Phe Trp Gly Gly Ser Val  
50 55 60

Gln Gly Asp Tyr Tyr Gly Asp Leu Ala Ala Arg Leu Gly Tyr Phe Pro  
65 70 75 80

ES 2 708 851 T3

Ser Ser Ile Val Arg Glu Asp Gln Thr Leu Lys Pro Gly Lys Val Asp  
85 90 95

Val Lys Thr Asp Lys Trp Asp Phe Tyr Cys Gln  
100 105

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un implante o formulación para el núcleo pulposo espinal que comprende un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago que comprende la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID NO. 1, para su uso en el tratamiento de un trastorno de la columna vertebral.
2. El implante o formulación para el núcleo pulposo espinal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el implante se puede inyectar o se puede implantar por vía transdiscal.
- 10 3. El implante o formulación para el núcleo pulposo espinal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el implante o formulación comprende un transportador.
- 15 4. El implante o formulación para el núcleo pulposo espinal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el implante o formulación comprende un dispositivo de liberación sostenida.
5. El implante o formulación para el núcleo pulposo espinal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago está encapsulado en liposomas.
- 20 6. El implante o formulación para el núcleo pulposo espinal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el implante para el núcleo pulposo espinal comprende tejido o células del núcleo pulposo.
- 25 7. Uso de un factor de diferenciación y mantenimiento del cartílago que comprende la secuencia madura de la CD-RAP de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, o los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID NO. 1, para la fabricación de una composición farmacéutica, que es un implante o formulación para el núcleo pulposo espinal, para el tratamiento de un trastorno de la columna vertebral.
- 30 8. Uso de la reivindicación 7, en el que el trastorno de la columna vertebral es dolor idiopático de la parte inferior de la espalda, hernia de disco, rotura interna del disco o discos fisurados, radiculopatía, estenosis espinal, ciática inducida por núcleo pulposo herniado, ciática, escoliosis o mielopatía idiopática.
- 35 9. Uso de la reivindicación 7 u 8, en el que la composición farmacéutica tiene los rasgos que se definen en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
- 40 10. El implante o formulación para el núcleo pulposo espinal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno de la columna vertebral es dolor idiopático de la parte inferior de la espalda, hernia de disco, rotura interna del disco o discos fisurados, radiculopatía, estenosis espinal, ciática inducida por núcleo pulposo herniado, ciática, escoliosis o mielopatía idiopática.

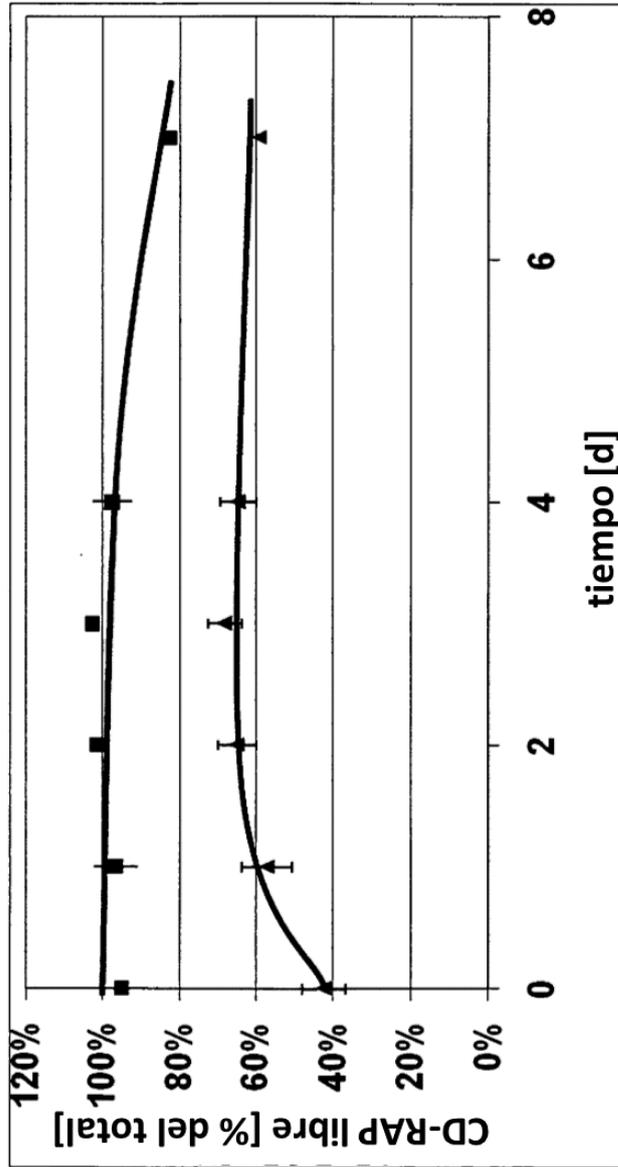


Fig. 1

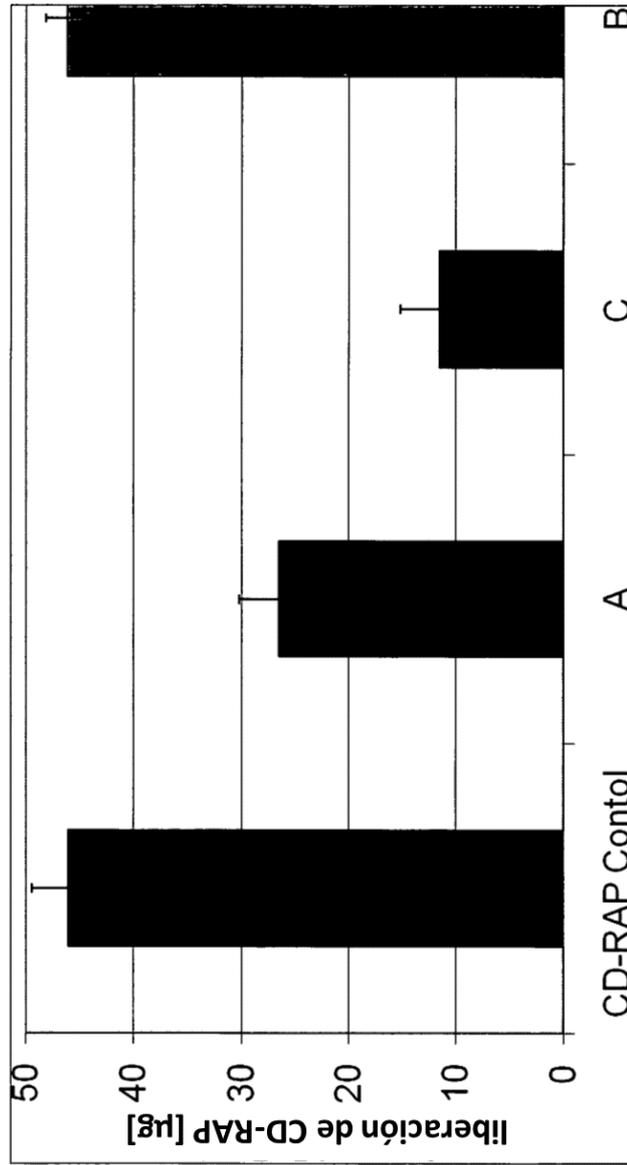
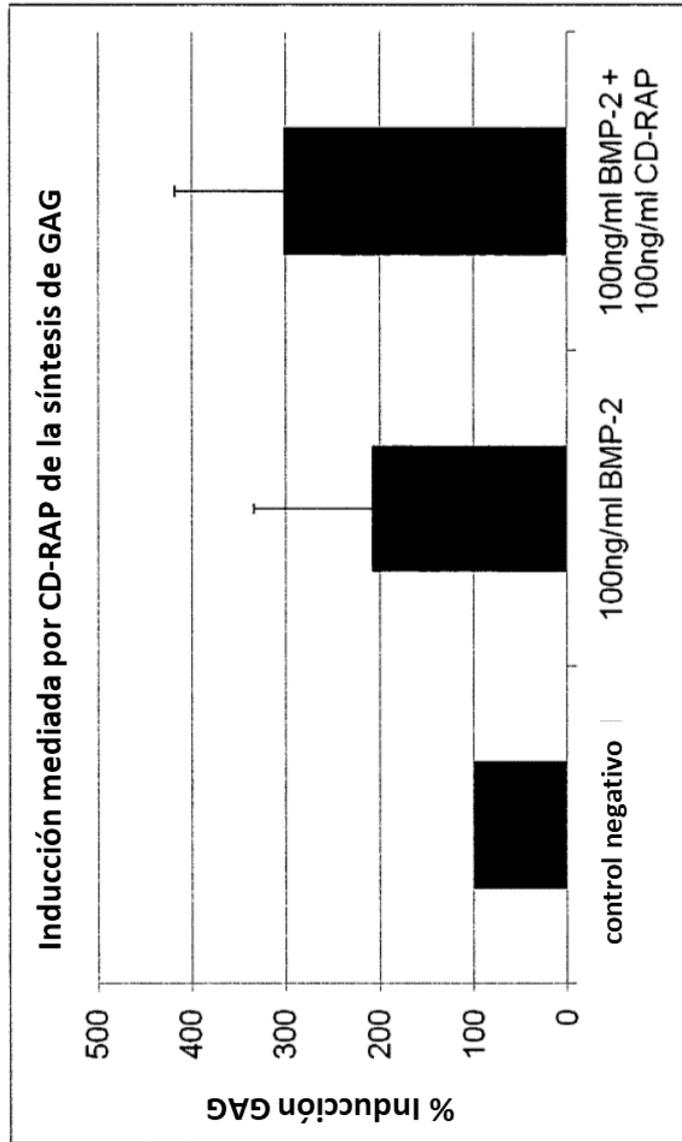


FIG. 2



**FIG. 3**