

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 026**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2014 PCT/EP2014/079205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15097236**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014 E 14835555 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3086822**

54 Título: **Formulación de FGF-18 en hidrogeles de alginato/colágeno**

30 Prioridad:

24.12.2013 EP 13199591

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

16.02.2021

73 Titular/es:

**ARES TRADING SA (100.0%)
Zone Industrielle de l'Ourietzaz
1170 Aubonne, CH**

72 Inventor/es:

**CANAL, FABIANA y
LO PRESTI, CATERINA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 806 026 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

Formulación de FGF-18 en hidrogeles de alginato/colágeno

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas. Más particularmente, se dirige a formulaciones de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18), en hidrogeles de alginato/colágeno, y a métodos para producir dichos hidrogeles/formulaciones.

Antecedentes de la invención

10 El factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18) es un miembro de la familia de proteínas de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), estrechamente relacionado con FGF-8 y FGF-17. Los miembros de la familia de FGF se caracterizan por dominios de unión a heparina. Dicho supuesto dominio de unión a heparina se ha identificado para FGF-18. Se postula que la señalización mediada por el receptor se inicia tras la unión del ligando FGF complejado con proteoglicanos de sulfatos de heparina de la superficie celular.

15 Se ha demostrado que FGF-18 es un agente proliferativo para condrocitos y osteoblastos (Ellsworth et al. 2002; Shimoaka et al., 2002). El FGF-18 se ha propuesto para el tratamiento de trastornos del cartílago tales como la osteoartritis (OA) y lesión del cartílago (CI), ya sea solo (documento WO2008/023063) o en combinación con ácido hialurónico (documento 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 donde dicha composición comprende FGF-18, un tampón, un tensioactivo de poloxámero y un azúcar como agente estabilizante. Dicha formulación liofilizada de FGF-18 está mostrando resultados prometedores en el tratamiento de la OA o CI. El régimen de dosificación actual, usando dicha formulación liofilizada, es un ciclo de tratamiento de inyección una vez por semana durante 3 semanas. El ciclo de tratamiento puede repetirse.

25 En el caso de CI, el principal inconveniente de la formulación actual es que, una vez inyectada por vía intraarticular (i.a.), la presencia de FGF-18 en el líquido sinovial puede inducir el crecimiento descontrolado de cartílago también en zonas sanas. Esto puede inducir, por supuesto, efectos no deseados tales como la movilidad articular reducida. El suministro de FGF-18 de forma selectiva a nivel del sitio objetivo podría promover el crecimiento del cartílago solo en la zona dañada. En particular, el suministro de FGF-18 a nivel de la zona dañada podría ser altamente beneficioso para el tratamiento de la CI junto con microfractura. La microfractura es una técnica quirúrgica de reparación del cartílago articular que funciona creando pequeñas fracturas en el hueso subyacente. Esto provoca la liberación de células madre mesenquimales pluripotentes de la médula ósea (Ringe J. et al., 2012). Llenar el agujero del cartílago con un gel inyectable que contiene FGF-18 dirigiría las células dentro del gel que, a su vez, actuarían como soporte mecánico para el crecimiento de las células y el depósito del fármaco. Por esta razón, sería preferible que FGF-18 no se liberase del gel, sino que quedase atrapado en la matriz.

35 Un enfoque típico en la ingeniería de tejidos es el confinamiento de factores de crecimiento en una matriz 3D, es decir, un andamio, que puede implantarse o inyectarse, dependiendo de las propiedades mecánicas, con el fin de asumir la forma del sitio aceptor. Las características obligatorias del andamio son la biocompatibilidad y la reabsorbibilidad. Además, los andamios deben ser capaces de proporcionar a las células el entorno ideal para crecer, proliferar y reformar el tejido dañado. Idealmente, la matriz debería tener propiedades mecánicas similares al tejido original y debería presentar una microporosidad capaz de albergar células (poros interconectados con un tamaño suficiente) (Tessmar y Göpferich, 2007). Por ejemplo, el documento WO2012113812 describe un andamio nanofibroso recubierto con al menos una capa de polianiones y una capa de policationes. Se pueden incluir moléculas terapéuticas, tales como FGF18, en el andamio. En particular, la molécula terapéutica puede formar la capa de polianiones. Dicho andamio puede comprender opcionalmente además osteoblastos dentro de un hidrogel de colágeno y condrocitos dentro de un hidrogel de alginato, depositándose cada hidrogel sobre el andamio recubierto. Dicho andamio se implantará in situ, mediante cirugía. El documento CA 2 254 350 enseña un cartílago de bioingeniería que comprende agregados de condrocitos en una composición de hidrogel que comprende alginato, colágeno y elastina.

50 Los hidrogeles son redes tridimensionales de cadenas poliméricas hidrófilas capaces de absorber y retener grandes cantidades de agua. Su característica principal es que se pueden hinchar o encoger, pero no disolver en medios acuosos. Por lo tanto, es posible atrapar en su matriz una molécula activa (un ingrediente farmacéutico activo, es decir, API) que después se libera lentamente o es retenida, dependiendo de la presencia de interacciones específicas entre la matriz y el API (Lo Presti et al., 2011). La ventaja del uso de hidrogeles inyectables para tratar un trastorno del cartílago es la posibilidad de inyectar el andamio por artroscopia en el defecto del cartílago, sin la necesidad de ninguna cirugía invasiva usando andamios sólidos.

55 Entre los diversos hidrogeles que ya se conocen, algunas formulaciones se basan en polímeros capaces de sufrir el proceso de gelificación en respuesta a un estímulo físico o químico particular. Estos están presentes como líquidos inyectables viscosos que, una vez inyectados, se convierten en geles macroscópicos en respuesta a estímulos ambientales en el sitio de inyección, tales como cambios en la temperatura, el pH o la fuerza iónica. La composición

- de la formulación se puede ajustar con el fin de obtener hidrogeles con diferentes características, tales como propiedades viscoelásticas, microporosidad, etc. (documento WO2008063418; Lo Presti et al., 2011; C. Dispenza et al, 2011). Cuando se prepara una composición farmacéutica que comprende una proteína bioactiva, dicha composición debe formularse de tal manera que la actividad de la proteína se mantenga durante un período de tiempo adecuado. Una pérdida en la actividad/estabilidad de la proteína puede resultar de inestabilidades químicas o físicas de la proteína, principalmente debido a desnaturalización, agregación u oxidación. Por lo tanto, los productos resultantes pueden ser farmacéuticamente inaceptables. Aunque se sabe que el uso de excipiente(s) y/o hidrogel(es) aumenta la estabilidad de una proteína dada, los efectos estabilizantes de estos excipientes dependen en gran medida del polímero en los geles, la naturaleza de los excipientes y la propia proteína bioactiva.
- 5 Siguen siendo necesarias formulaciones adicionales que contengan FGF-18 como ingrediente activo, en donde dichas formulaciones a la vez que mantienen la bioactividad del ingrediente activo y son adecuadas para uso en inyección, preferiblemente para inyección intraarticular, permiten reducir el número de inyecciones necesarias para el tratamiento. Dicha característica permitiría reducir el riesgo de infecciones y aumentaría la conveniencia del paciente, ya que no requiere cirugía ni implantación invasiva. Dichas formulaciones podrían ser útiles para la administración en el
- 10 tratamiento de un trastorno del cartílago en un paciente, tal como la osteoartritis o la lesión del cartílago.
- 15

Sumario de la invención

- Se describe en el presente documento una nueva formulación que contiene una proteína FGF-18. Más particularmente, dicha formulación es un hidrogel homogéneo que contiene FGF-18, en donde dicho hidrogel es preferiblemente un hidrogel sensible a iones, y más preferiblemente un gel de alginato/colágeno. También se describen
- 20 en el presente documento métodos para preparar el hidrogel homogéneo según la presente invención. El hidrogel que contiene FGF-18, descrito en el presente documento, puede ser útil para la administración en el tratamiento de trastornos del cartílago. De particular interés es un hidrogel de alginato/colágeno, que contiene además proteína FGF-18.

- En un primer aspecto, se describe en el presente documento un hidrogel (es decir, una formulación de gel), que es homogéneo, que comprende o consiste en alginato, colágeno, FGF-18, un azúcar como agente de isotonicidad/estabilizante, así como una sal. Esta formulación se proporciona como un sistema de gelificación de 2 componentes, estando cada sistema en forma líquida cuando se separa. Alternativamente, el sistema de gelificación de componentes que comprende alginato puede estar en una forma liofilizada. Uno de los componentes comprende o consiste en una composición líquida o liofilizada de alginato, colágeno, FGF-18 y el azúcar (solución 1). Los componentes forman una composición homogénea. El segundo componente comprende o consiste en la sal también en forma líquida (solución 2).
- 25

- 30 La invención proporciona un sistema de gelificación de dos componentes, en donde dicho sistema de gelificación se forma a partir de:

a. un primer componente (solución 1) que comprende o consiste en FGF-18, alginato, colágeno y un azúcar como agente estabilizante, y

b. un segundo componente (solución 2) que comprende o consiste en una sal dicatiónica.

- 35 Una vez que los sistemas de gelificación de 2 componentes (solución 1 y solución 2) se mezclan (o combinan) entre sí, se forma el gel. Dicho gel también es homogéneo. En una realización preferida, el agente estabilizante es un azúcar o un alcohol de azúcar, tal como sacarosa, manitol, trehalosa, D-sorbitol y la sal es una sal dicatiónica (tal como sal de magnesio, sal de cobre, sal de zinc o sal de calcio, p. ej., cloruro de calcio). En una realización preferida, en el primer componente del sistema de gelificación (es decir, solución 1), la concentración en alginato es de o aproximadamente de 1 a 5% en peso, preferiblemente de o aproximadamente de 2,5 a 4,5, incluso preferiblemente de o aproximadamente de 3 o 4% en peso, el colágeno está en una concentración de o aproximadamente de 0,1 a 5 µg/ml, preferiblemente de o aproximadamente de 1 o 2 µg/ml, la concentración en sacarosa es de o aproximadamente de 10-100 mg/ml, preferiblemente de o aproximadamente de 30-70 mg/ml, tal como de o aproximadamente de 30, 40,
- 40 50, 60 o 70 mg/ml, incluso preferiblemente 70 mg/ml; la concentración de la solución salina, en el segundo componente del sistema de gelificación (es decir, la solución 2), es de o aproximadamente de 1 a 20 mg/ml, preferiblemente 10 mg/ml. Cuando se mezclan entre sí, la relación en volumen de la solución 1:solución 2 es de 5:1 a 1:2, más preferiblemente de 2:1 (en caso de formulación liofilizada, el volumen de la solución 1 se considera antes del proceso de liofilización). Preferiblemente, el FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura de FGF-18 humano, correspondiente a la secuencia que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o consiste en una forma truncada de FGF-18 humano que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 1, y 3) un polipéptido que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, el FGF-18 es esprifermina, como se define más adelante. El primer componente del sistema de gelificación puede comprender además un tampón y/u otros excipientes opcionales.
- 45 50

- 55 La solución 1 preferiblemente se debe coinyectar con la solución 2 para formar un hidrogel in situ.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para preparar un hidrogel homogéneo de FGF-18, que comprende las etapas de:

1) preparar la solución 1 que comprende o consiste en FGF-18, junto con alginato, colágeno y un agente de isotonicidad/estabilizante,

2) preparar la solución 2 que comprende o consiste en una sal, y

3) coinyectar ambas soluciones para formar el gel,

5 en donde el agente de isotonicidad/estabilizante es un azúcar o un alcohol de azúcar, tal como sacarosa, manitol, trehalosa o D-sorbitol, y la sal es una sal dicatiónica, tal como una sal de magnesio, sal de cobre, sal de zinc o sal de calcio (p. ej., cloruro de calcio). Preferiblemente, el pH de la formulación final se mantiene de o aproximadamente de 6 a 8, y más particularmente a o aproximadamente a 7. En una realización preferida, el FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura del FGF-18 humano, que
10 corresponde a la secuencia que comprende o que consiste del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o consiste en una forma truncada del FGF-18 humano que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 1, y 3) un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, FGF-18 es esprifermina, como se define más adelante. La solución 1 puede comprender además un tampón y/u otros excipientes opcionales.

15 En un tercer aspecto, se describe en el presente documento un artículo de fabricación para uso farmacéutico o veterinario, que comprende:

1) un primer recipiente que comprende alginato, colágeno, proteína FGF-18 y un agente de isotonicidad/estabilizante (solución 1) (dicha composición es homogénea), y

2) un segundo recipiente que comprende una sal (solución 2),

20 en donde el agente de isotonicidad/estabilizante es un azúcar o un alcohol de azúcar, tal como sacarosa, manitol, trehalosa o D-sorbitol, y la sal es una sal dicatiónica, tal como una sal de magnesio, sal de cobre, sal de zinc o sal de calcio (p. ej., cloruro de calcio).

La invención proporciona un artículo de fabricación que comprende dos recipientes, en donde:

25 a. el primer recipiente comprende o consiste en una primera solución homogénea, en donde dicha primera solución comprende o consiste en FGF-18, alginato, colágeno y un azúcar como agente estabilizante, y

b. el segundo recipiente comprende o consiste en una segunda solución, comprendiendo o consistiendo dicha segunda solución en una sal dicatiónica.

Preferiblemente, el FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura de FGF-18 humano, que corresponde a la secuencia que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al
30 resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o consiste en una forma truncada de FGF-18 humano que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 1, y 3) un polipéptido que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, FGF-18 es esprifermina, como se define más adelante. La solución 1 puede comprender además un tampón y/u otros excipientes opcionales. El contenido de cada
35 recipiente después se mezcla in situ tras la inyección simultánea. Preferiblemente, el primer recipiente y el segundo recipiente del artículo de fabricación son los dos compartimentos de un sistema de doble cámara o doble inyección.

Definiciones

- La expresión "proteína FGF-18" o "FGF-18", como se usa en el presente documento, pretende ser una proteína que mantiene al menos una actividad biológica de la proteína FGF-18 humana. FGF-18 puede ser natural, en su forma
40 madura, o una forma truncada del mismo. Las actividades biológicas de la proteína FGF-18 humana incluyen en especial el aumento de la actividad osteoblástica (véase el documento WO98/16644) o en formación de cartílago (véase el documento WO2008/023063). El FGF-18 humano nativo o de tipo natural es una proteína expresada por los condrocitos del cartílago articular. El FGF-18 humano se denominó primero zFGF-5 y se describe detalladamente en el documento WO98/16644. La SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano natural, con un péptido señal que consiste en los restos de aminoácidos 1 (Met) a 27 (Ala). La forma madura del FGF-18
45 humano corresponde a la secuencia de aminoácidos del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEC ID NO: 1 (180 aminoácidos).

El FGF-18, en la presente invención, puede producirse por un método recombinante, tal como se enseña en la solicitud WO2006/063362. Dependiendo de los sistemas y condiciones de expresión, el FGF-18 en la presente
50 invención se expresa en una célula hospedante recombinante con una metionina (resto Met) de inicio o con una secuencia señal para la secreción. Cuando se expresa en un hospedante procariota, tal como en *E. coli*, FGF-18 contiene un resto 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 el extremo N (posición 1) seguido de los restos 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEC ID NO: 1.

- La expresión "forma truncada" de FGF-18, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que

- comprende o consiste en los restos 28 (Glu) a 196 (Lys) de la SEC ID NO: 1. Preferiblemente, la forma truncada de la proteína FGF-18 es el polipéptido designado "trFGF-18" (170 aminoácidos), que comienza con un resto Met (en el N terminal) seguido de los restos de aminoácidos 28 (Glu) -196 (Lys) del FGF-18 humano de tipo natural. 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 la SEQ ID NO: 1). trFGF-18 es una forma truncada recombinante del FGF-18 humano, producida en E. coli (véase el documento WO2006/063362). La denominación común internacional (DCI) para esta forma particular de FGF-18 es esprifermina. Se ha demostrado que la esprifermina muestra actividades similares a las del FGF-18 humano maduro, p. ej. aumenta la proliferación de condrocitos y la deposición de cartílago, lo que lleva a la reparación y reconstrucción de una variedad de tejidos cartilagosos (véase el documento WO2008/023063).
- 5
- 10
- Las expresiones "molécula activa" e "ingrediente activo" se refieren a un ingrediente farmacéutico activo, es decir, API. El API preferido, en el contexto de la presente invención, es FGF-18.
 - Los términos "gel" o "hidrogel" se usan de manera intercambiable en esta solicitud. Se refieren a una matriz 3D, o andamio, útil como formulación farmacéutica. No son andamios sólidos.
- 15
- El término "homogéneo" significa que los diversos componentes de la formulación se mezclan, combinan, agitan o funden juntos, es decir, no forman capas separadas de componentes.
 - El término "alginato", también conocido como ácido alginico o algina, se refiere a cualquier forma de alginato. Es un agente gelificante bien conocido, especialmente cuando se usa con una sal dicatiónica. Una de las formas que se pueden usar en el contexto de la presente invención es el alginato de sodio.
- 20
- El término "colágeno" se refiere a un grupo de proteínas naturales. Aunque existen casi 30 formas diferentes de colágenos, la principal es el colágeno de tipo I. El colágeno de tipo I, así como el colágeno de tipo II, son las formas preferidas que pueden usarse en el contexto de la presente invención. Sin embargo, se pueden usar otras formas de colágeno.
 - El término "alginato/colágeno" como se usa en la presente solicitud se refiere a una combinación de alginato y colágeno.
- 25
- La expresión "sal dicatiónica" se refiere, pero no se limita a una sal que comprende magnesio, cobre, zinc o calcio, por ejemplo. Se incluyen cloruro de magnesio, cloruro de cobre, cloruro de zinc o cloruro de calcio. Preferiblemente, la sal dicatiónica de acuerdo con la invención no es una sal policatiónica, ni derivada de un componente policatiónico (como las descritas en el documento WO2012/113812).
- 30
- El término solución o formulación "estable", como se usa en el presente documento, es una solución o formulación en donde el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica y similares, de las proteínas en la misma se controla de manera aceptable, y no aumenta de manera inaceptable con el tiempo. Preferiblemente, la formulación retiene al menos más de 80% de la actividad del FGF-18 durante un período de al menos 12 meses a temperatura ambiente. La formulación estabilizada de la presente invención que comprende FGF-
- 35
- 18 tiene preferiblemente una vida en anaquel de al menos aproximadamente 12 meses, 18 meses, más preferiblemente al menos 20 meses, aún más preferiblemente aproximadamente 24 meses, cuando se almacena a temperatura ambiente o a 2-8°C por ejemplo. Los métodos para controlar la estabilidad de la formulación de FGF-18 de la presente invención están disponibles en la técnica.
 - La expresión "agente estabilizante", "estabilizante" o "agente de isotonicidad", como se usa en el presente documento, es un compuesto que es tolerado fisiológicamente y confiere una estabilidad/tonicidad adecuada a una formulación. Evita en especial el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Durante el procedimiento de liofilización (congelación-secado), el estabilizante también es efectivo como un crioprotector (es decir, lioprotector). Los compuestos tales como la glicerina se usan comúnmente para dichos fines. Otros agentes de estabilidad adecuados incluyen, pero no se limitan a aminoácidos o proteínas (p. ej., glicina o albúmina), sales (p. ej., cloruro de sodio) y azúcares o alcoholes de azúcar (p. ej., dextrosa, manitol, trehalosa, sacarosa, D-sorbitol o lactosa). De acuerdo con la presente invención, el agente estabilizante/de tonicidad preferido es un azúcar, incluso más preferiblemente sacarosa.
 - El término "tampón", como se usa en el presente documento, se refiere a soluciones de compuestos que se sabe que son seguros en formulaciones para uso farmacéutico o veterinario y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en el intervalo de pH deseado para la formulación. Los tampones aceptables para controlar el pH de un pH moderadamente ácido a un pH moderadamente básico incluyen, pero no se limitan a, tampones de fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina. "TRIS" se refiere a 2-amino-2-hidroxi-1,3-propanodiol y a cualquier sal farmacológicamente aceptable del mismo. Un tampón preferido puede ser un tampón de histidina.
 - El término "disolvente", como se usa en el presente documento, se refiere a un disolvente líquido, ya sea acuoso o no acuoso. La selección del disolvente depende en especial de la solubilidad del compuesto farmacológico en dicho disolvente y del modo de administración. El disolvente acuoso puede consistir únicamente en agua, o puede consistir en agua más uno o más disolventes miscibles, y puede contener solutos disueltos tales como azúcares, tampones,
- 55

sales u otros excipientes. Los disolventes no acuosos usados más habitualmente son los alcoholes orgánicos de cadena corta, tales como metanol, etanol, propanol, cetonas de cadena corta, tales como acetona, y polialcoholes, tales como glicerol. De acuerdo con la presente invención, el disolvente preferido es un disolvente acuoso tal como agua o un disolvente salino.

5 - El término "vial" o "recipiente", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a un depósito adecuado para retener el alginato/colágeno en una forma líquida, o en una forma liofilizada. Del mismo modo, retendrá la mezcla de sal líquida. Los ejemplos de un vial que se puede usar en la presente invención incluyen jeringas, ampollas, cartuchos u otro depósito similar adecuado para suministrar la formulación de FGF-18 al paciente mediante inyección, preferiblemente mediante inyección intraarticular. Alternativamente, los viales que retienen la solución de alginato/colágeno y el que retiene la sal se presentan como los 2 compartimentos de un sistema de doble cámara (jeringa o cartucho, por ejemplo, una jeringa de doble cámara o un dispositivo de inyección de doble aguja, etc.). Los viales adecuados para envasar productos para administración intraarticular son bien conocidos y reconocidos en la técnica.

10 - La expresión "trastorno del cartílago", como se usa en el presente documento, abarca trastornos que resultan de daños debidos a lesión traumática o condropatía. Los ejemplos de trastornos del cartílago que pueden tratarse mediante la administración de la formulación de FGF-18 descrita en el presente documento incluyen, pero no se limitan a artritis, tal como osteoartritis o artritis reumatoide, y lesión del cartílago.

15 - El término "osteoartritis" se usa para referirse a la forma más común de artritis. Puede ser causada por la descomposición del cartílago. Los pedacitos de cartílago pueden desprenderse y causar dolor e hinchazón en la articulación entre los huesos. Con el tiempo, el cartílago puede desgastarse por completo y los huesos rozarán entre sí. La osteoartritis puede afectar a cualquier articulación, pero generalmente se refiere a manos y articulaciones que soportan peso, tales como caderas, rodillas, pies y columna vertebral. En un ejemplo preferido, la osteoartritis puede ser osteoartritis de rodilla u osteoartritis de cadera. La persona experta conoce perfectamente las clasificaciones de osteoartritis que se utilizan en la técnica, en particular el sistema de evaluación OARSI (véase, por ejemplo, Custers et al., 2007). La osteoartritis es uno de los trastornos del cartílago preferidos que pueden tratarse administrando las formulaciones de FGF-18 de acuerdo con la presente invención.

20 - La expresión "lesión del cartílago" como se usa en el presente documento es un trastorno del cartílago o daño del cartílago que resulta en especial de un traumatismo. Las lesiones del cartílago pueden ocurrir como resultado de la destrucción mecánica traumática, especialmente después de un accidente o cirugía (tal como las técnicas de microfractura). También se considera dentro de esta definición la lesión relacionada con el deporte o el desgaste relacionado con el deporte, de los tejidos de la articulación.

25 - Los términos "µg" o "mcg" se usan indistintamente y se refieren a una división de la unidad SI para masa.

Descripción detallada de la invención

30 En el presente documento se describe una formulación de gel (o hidrogel) de alginato/colágeno que comprende o consiste en un alginato, un colágeno, una proteína FGF-18, un azúcar como agente estabilizante y una sal. Dicho hidrogel es homogéneo. El hidrogel puede comprender además un tampón y/u otros excipientes opcionales. En una realización preferida, el agente estabilizante es un azúcar o un alcohol de azúcar tal como sacarosa, manitol, trehalosa o D-sorbitol y la sal es una sal dicatiónica tal como una sal de magnesio, sal de cobre, sal de zinc o sal de calcio (p. ej. cloruro de calcio). Dicho hidrogel es adecuado para inyección a nivel del cartílago. Preferiblemente, la proteína FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura del FGF-18 humano, que corresponde a la secuencia que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o consiste en una forma truncada del FGF-18 humano que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 1, y 3) un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, el FGF-18 es esprifermina.

35 La ventaja del uso de hidrogeles homogéneos inyectables es la posibilidad de inyectar el andamio (o el componente del andamio), que ya contiene FGF-18, en el defecto del cartílago, sin la necesidad de ninguna cirugía invasiva utilizando andamios sólidos. Preferiblemente, dicha inyección del hidrogel se realiza por artroscopia

40 Lo más preferiblemente, los hidrogeles homogéneos como se describe en el presente documento se preparan a partir de dos soluciones, una que contiene el polímero (en el presente documento un sistema de alginato; solución 1) y la otra que contiene los iones (en el presente documento en la forma de una sal; solución 2), y se forman in situ, tras la inyección, mezclando (o combinando) las 2 soluciones. La mezcla (o combinación) de las 2 soluciones se realiza preferiblemente por coinyección. La solución 1 puede comprender además un tampón y/u otros excipientes opcionales. Un objeto de la invención es un sistema de gelificación de dos componentes, en donde dicho sistema de gelificación se forma a partir de:

45 a. un primer componente (solución 1) que comprende o consiste en FGF-18, alginato, colágeno y un azúcar como agente estabilizante, y

b. un segundo componente (solución 2) que comprende o consiste en una sal dicatiónica.

En una realización preferida, se describe en el presente documento el uso de soluciones poliméricas líquidas homogéneas capaces de experimentar un proceso de gelificación, una vez administradas, debido a variaciones en la concentración de iones. En una realización alternativa, la solución polimérica puede estar en forma liofilizada. Cuando la solución polimérica está en tal forma liofilizada, dicha solución puede comprender opcionalmente además un lioprotector. Los lioprotectores conocidos son, por ejemplo, azúcares y polioles en general, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o D-sorbitol.

Si la solución 1 se encuentra en forma liofilizada, la liofilización se lleva a cabo preferiblemente utilizando procedimientos convencionales

La concentración de FGF-18, en la solución 1, es preferiblemente de o aproximadamente de 0,1 a 300 mcg/ml, preferiblemente de o aproximadamente de 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 54, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o 300 mcg/ml. Más preferiblemente, el FGF-18 está en una concentración de o aproximadamente de 0,1 a 100 mcg/ml, incluso más preferiblemente de o aproximadamente de 10 a 60 mcg/ml. El FGF-18 se puede añadir en un exceso del 5%, para evitar posibles pérdidas de proteínas que podrían ocurrir durante la formulación. Por ejemplo, para una concentración de FGF-18 de 30 mcg/ml, el compuesto se puede añadir en una cantidad de 31.5 mcg/ml.

El componente de gelificación en la solución 1, es decir, el alginato, está en una concentración de o aproximadamente de 1 a 5% en peso, preferiblemente de o aproximadamente de 2,5 a 4,5% en peso, incluso preferiblemente de o aproximadamente de 3 o 4% en peso.

El agente estabilizante del hidrogel descrito en el presente documento es preferiblemente un azúcar o un alcohol de azúcar, tal como sacarosa, manitol, trehalosa o D-sorbitol. El azúcar preferido del hidrogel descrito en el presente documento es sacarosa. Preferiblemente, según la invención, la concentración del agente estabilizante en la solución 1 es de o aproximadamente de 10 a 100 mg/ml, más preferiblemente de o aproximadamente de 30-70 mg/ml, tal como de o aproximadamente de 30, 40, 50, 60 o 70 mg/ml, incluso preferiblemente de o aproximadamente de 70 mg/ml.

El colágeno según la presente invención, en la solución 1, está preferiblemente en una concentración de o aproximadamente de 0,1 a 5 mcg/ml, más preferiblemente de o aproximadamente de 1 a 2 mcg/ml, más particularmente de o aproximadamente de 1 o 2 mcg/ml.

La sal, en el segundo componente del sistema de gelificación (es decir, la solución 2), es una sal dicatiónica como una sal de magnesio, sal de cobre, sal de zinc o sal de calcio (p. ej., cloruro de calcio). La concentración de la solución de sal es de o aproximadamente de 1 a 20 mg/ml, preferiblemente de o aproximadamente de 10 mg/ml.

En una realización preferida, la solución 1 que comprende o consiste en FGF-18 en aproximadamente en 0,1-100 mcg/ml, alginato en o aproximadamente en 4% en peso, sacarosa en o aproximadamente en 70 mg/ml y colágeno en o aproximadamente en 2 mcg/ml; y la solución 2 que comprende o que consiste en una sal de dicatiónica (tal como cloruro de calcio) en o aproximadamente en 10 mg/ml. La solución 1 puede comprender además un tampón y/u otros excipientes opcionales. La solución 1 es homogénea.

Cuando se mezclan, la relación en volumen de la solución 1:solución 2 es de 5:1 a 1:2, más preferiblemente de 2:1 (en caso de formulación liofilizada, el volumen de la solución 1 se considera antes del proceso de liofilización).

Una vez mezcladas entre sí, las concentraciones finales de cada componente son preferiblemente las siguientes:

- FGF-18: de 0,00006 a 0,2% p/v, tal como 0,0036% p/v (cuando FGF-18 está en 0,1-300 mcg/ml antes de mezclar, basado en la concentración de FGF-18 dada en la sección de ejemplos)

- alginato: de 0,6 a 3,33% p/v tal como 2,67% p/v (cuando el alginato está en 4% p/v antes de mezclar)

- colágeno: intervalo de 0,00006 a 0,003% p/v tal como 0,00133% p/v (cuando el colágeno está en 2 mcg/m antes de mezclar)

- agente estabilizante: de 0,6 a 6% p/v tal como 4,67% p/v (cuando la sacarosa, por ejemplo, está en 70 mg/ml antes de mezclar)

- sal dicatiónica: de 0,033 a 0,66% p/v tal como 0,33% p/v (cuando la sal está en 10 mg/ml antes de mezclar)

En una realización preferida, el pH de la formulación final se mantiene de o aproximadamente de 6 a 8, más particularmente en o aproximadamente en 7.

La invención proporciona además un método para preparar los hidrogeles homogéneos de FGF-18, que comprende las etapas de:

1) preparar una primera solución (solución 1) que comprende o consiste en el FGF-18, junto con alginato, colágeno y agente estabilizante,

2) preparar una segunda solución (solución 2) que comprende o consiste en una sal, y

3) coinyectar ambas soluciones para formar el gel,

en donde el agente estabilizante es un azúcar o un alcohol de azúcar, tal como sacarosa, manitol, trehalosa o D-sorbitol, y la sal es una sal dicatiónica, tal como una sal de magnesio, sal de cobre, sal de zinc o sal de calcio (p. ej., calcio cloruro). La solución 1 puede comprender además un tampón y/u otros excipientes opcionales. La solución 1 es homogénea. En una realización preferida, el pH de la formulación final se mantiene de o aproximadamente de 6 a 8, y más particularmente en o aproximadamente en 7. Preferentemente, el FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura de FGF-18 humano, que corresponde a la secuencia que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o consiste en una forma truncada del FGF-18 humano que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 196 (Lys) de SEQ ID NO: 1, y 3) un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, FGF-18 es esprifermina, como se define en el presente documento.

Cada uno de los compuestos (es decir, FGF-18, alginato, colágeno, el agente estabilizante y la sal) se puede usar de acuerdo con cualquiera de las concentraciones, pH y/o relaciones descritas anteriormente. Preferiblemente, la relación solución 1:solución 2 (volumen a volumen, es decir, v:v) es de o aproximadamente de 1:2 a 5:1, más preferiblemente de o aproximadamente de 2:1 (en caso de formulación liofilizada, el volumen de la solución 1 se considera antes del procedimiento de liofilización).

Cuando la solución 1 del hidrogel de la invención está en forma liofilizada, debe reconstituirse antes de la etapa 3) (es decir, antes de la coinyección).

En un tercer aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación para uso farmacéutico o veterinario, que comprende:

1) un primer recipiente que comprende o consiste en un alginato, un colágeno, una proteína FGF-18 y un agente estabilizante (solución 1), y

2) un segundo recipiente que comprende o consiste en una sal (solución 2),

en donde el agente estabilizante es un azúcar o un alcohol de azúcar, tal como sacarosa, manitol, trehalosa o D-sorbitol, y la sal es una sal dicatiónica tal como una sal de magnesio, sal de cobre, sal de zinc o sal de calcio (p. ej., cloruro de calcio). La solución 1 puede comprender además un tampón y/u otros excipientes opcionales. La solución 1 es homogénea. Preferiblemente, FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en:

1) un polipéptido que comprende o consiste en la forma madura del FGF-18 humano, que corresponde a la secuencia que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEC ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o consiste en una forma truncada de FGF-18 humano que comprende o consiste del resto 28 (Glu) al resto 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 1, y 3) un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, el FGF-18 es esprifermina, como se define en el presente documento.

Cada uno de los compuestos (es decir, FGF-18, alginato, colágeno, el agente estabilizante y la sal) se puede usar de acuerdo con cualquiera de las concentraciones, pH y/o relaciones descritas anteriormente. Preferiblemente, la relación en volumen de solución 1:solución 2 (v:v) es de o aproximadamente de 1:2 a 5:1, más preferiblemente de o aproximadamente de 2:1 (en el caso de formulación liofilizada, el volumen de solución 1 se considera antes del procedimiento de liofilización). Después el contenido de cada recipiente se mezcla in situ tras la inyección simultánea (p. ej., coinyección).

Preferiblemente, el recipiente que retiene la formulación de FGF-18 y el que retiene la sal corresponden a los dos compartimentos de un sistema de doble cámara o de un sistema de inyección dual (jeringa o cartucho, por ejemplo).

Cuando la solución polimérica (es decir, la solución 1) está en forma liofilizada, el artículo de fabricación puede comprender además un tercer recipiente que comprende o consiste en el disolvente, tal como agua o una solución salina (p. ej., cloruro de sodio al 0,9% p/v para inyección), necesaria para la reconstitución.

También se describe un material de envasado que proporciona instrucciones para formar el hidrogel de acuerdo con la presente invención, preferiblemente in situ.

Es importante destacar que los autores de la invención mostraron sorprendentemente (véase la sección de ejemplos) que cuando los geles se formaban usando un conector de jeringas que permitía la inyección contemporánea de las dos soluciones, no se observaba fase líquida restante en ninguna concentración del polímero. De hecho, la inyección contextual de las dos soluciones permite una mezcla más rápida y homogénea de los dos flujos conduciendo a una gelificación instantánea.

Los diferentes componentes del hidrogel de la invención pueden almacenarse durante al menos aproximadamente 12 meses a aproximadamente 24 meses. En condiciones de almacenamiento preferidas, antes del primer uso, las formulaciones se mantienen alejadas de la luz brillante (preferiblemente en la oscuridad), a temperatura refrigerada (a o aproximadamente a 2-8°C).

El hidrogel de la invención debe ser preparado durante la inyección.

5 Cuando la solución 1 del hidrogel de la invención está en una forma liofilizada, debe reconstituirse antes de su uso. Se reconstituye preferiblemente en condiciones estériles, con un disolvente, tal como agua o una solución salina (p. ej., cloruro de sodio al 0,9% p/v para inyección) antes de su uso, es decir antes de la combinación (o mezcla) con la solución 2, y por lo tanto antes de la inyección. Después de la reconstitución, el volumen es preferiblemente el mismo que antes de la liofilización, tal como de aproximadamente 0,5 ml a 5 ml, más preferiblemente de o aproximadamente de 0,5, 1 o 2 ml. El sistema debe dejarse disolver y homogeneizar, por ejemplo, durante 30 minutos, antes de que esté listo para la inyección. Dicha solución debe usarse preferiblemente dentro de una hora de la reconstitución.

10 También se describen en el presente documento hidrogeles homogéneos que comprenden FGF-18, en particular para un solo uso, adecuados para uso farmacéutico o veterinario. Los hidrogeles que comprenden FGF-18, de acuerdo con la presente invención, pueden usarse para la administración para mejorar la reparación del cartílago o para el tratamiento de trastornos del cartílago, tales como osteoartritis o lesiones del cartílago.

15 Estos hidrogeles homogéneos son adecuados para usar en sistemas de inyección y suministro alternativos. En una realización particularmente preferida, las formulaciones de la invención son para inyección intraarticular (i.a.). Se pueden administrar por inyección directa en el defecto, en donde el gel se forma preferiblemente in situ. En una realización preferida de la presente invención, la administración i.a. se realiza en una articulación seleccionada de la articulación de la cadera, rodilla, codo, muñeca, tobillo, columna vertebral, pies, dedos de manos, dedos de pies, mano, hombro, costillas, omóplatos, muslos, espinillas, talones y a lo largo de los puntos óseos de la columna vertebral. En otra realización preferida más, la administración i.a. se realiza en la articulación de la cadera o la rodilla. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la preparación de las formulaciones e hidrogeles descritos en el presente documento. El alcance de la invención no se interpretará como simplemente consistente en los siguientes ejemplos.

Descripción de la figura:

25 Figura 1: Ensayo de barrido de frecuencia realizado en gel basado en alginato al 3% en peso placebo (sin FGF), con FGF-18 54 mcg/ml en la solución de alginato (con FGF (54)) y con FGF-18 540 mcg/ml en solución de alginato (con FGF (540)).

Figura 2: Ensayo de barrido de frecuencia realizado en geles basados en alginato al 4% en peso: placebo (sin FGF), con FGF-18 54 mcg/ml en la solución de alginato (c FGF (54)) y con FGF-18 540 mcg/ml en la solución de alginato (con FGF (540)).

30 Figura 3: Ensayo de barrido de frecuencia realizado en geles basados en alginato de calidad farmacéutica (PG) al 3% en peso: placebo (sin FGF), con FGF-18 54 mcg/ml en la solución de alginato (con FGF (54)) y con FGF-18 540 mcg/ml en la solución de alginato (con FGF (540)).

35 Figura 4: Ensayo de barrido de frecuencia realizado en geles basados en alginato PG al 4% en peso: placebo (sin FGF), con FGF-18 54 mcg/ml en la solución de alginato (con FGF (54)) y con FGF-18 540 mcg/ml en la solución de alginato (con FGF (540)).

Figura 5: Proporción de hinchamiento de geles basados en alginato candidatos placebo (sin FGF) y activos (con FGF), preparados con alginato de sodio no PG.

Figura 6: Proporción de hinchamiento de geles basados en alginato placebo (sin FGF) y activos (con FGF) sin colágeno tipo I, preparados con alginato de sodio no PG.

40 Figura 7: Grado de hinchamiento de geles basados en alginato candidatos (sin FGF) y activos (con FGF), preparados con alginato de sodio PG

Figura 8: Bioensayo de FGF-18 en gel de alginato al 4% en peso con 2 mcg/ml de colágeno tipo I

Figura 9: Imágenes de SEM (100x) de geles basados en alginato de soluciones de polímeros líquidas al 3% en peso o 4% en peso, que contienen 0, 1 o 2 mcg/ml de colágeno tipo I y FGF-18 54 mcg/ml.

45 Figura 10: Vista en sección de una imagen 3D adquirida por CLSM para (a) gel basado en alginato con 2 µg/ml de colágeno tipo I después de incubación con células HTB94 durante 72 h, y (b) gel basado en alginato sin colágeno después de incubación con células HTB94 durante 144 h. En blanco, células HTB94 marcadas con rodamina B. Mano derecha: parte superior del gel; mano izquierda: fondo del gel.

50 Figura 11: Secuencia de FGF-18 humano, que corresponde a la SEQ ID NO: 1 (a) y secuencia de esprifermina que corresponde a la SEQ ID NO: 2 (b)

Figura 12: Variación del pH de la formulación liofilizada (FD) a lo largo del tiempo en la estabilidad de 3 meses en condiciones normales de almacenamiento (5°C), condiciones aceleradas (25°C) y condiciones estresadas (40°C)

Figura 13: % de variación del contenido de humedad de la formulación liofilizada (FD) a lo largo del tiempo en la estabilidad de 3 meses en condiciones normales de almacenamiento (5°C), condiciones aceleradas (25°C) y condiciones estresadas (40°C)

5 Figura 14: Variación del contenido de FGF-18 de la formulación liofilizada (FD) a lo largo del tiempo en la estabilidad de 3 meses en condiciones normales de almacenamiento (5°C), condiciones aceleradas (25°C) y condiciones estresadas (40°C)

Figura 15: Variación del contenido de alginato de la formulación liofilizada (FD) a lo largo del tiempo en la estabilidad de 3 meses en condiciones normales de almacenamiento (5°C), condiciones aceleradas (25°C) y condiciones estresadas (40°C)

10 Figura 16: a) variación de la viscosidad intrínseca, calculada como media \pm desviación estándar dentro de la velocidad de cizalladura de 10-50 s⁻¹, de la formulación liofilizada (FD) a lo largo del tiempo en la estabilidad de 3 meses en condiciones normales de almacenamiento (5°C), condiciones aceleradas (25°C) y condiciones estresadas (40°C).
Figura 16 b: influencia de la velocidad de cizalladura en la viscosidad de cizalladura intrínseca de la formulación liofilizada (FD) en el tiempo 0 y después de 3 meses de estabilidad en condiciones normales de almacenamiento (5°C),
15 condiciones aceleradas (25°C) y condiciones estresadas (40°C)

Figura 17: evaluación de propiedades mecánicas. Figura 17 a: Variación del módulo de almacenamiento (G') de la formulación liofilizada (FD) a lo largo del tiempo en la estabilidad de 3 meses en condiciones normales de almacenamiento (5°C), condiciones aceleradas (25°C) y condiciones estresadas (40°C). XXX. Figura 17 b: Ensayo de barrido de frecuencia realizado en la formulación liofilizada (FD) en el tiempo cero y después de 3 meses de estabilidad en condiciones de almacenamiento normales (5°C), condiciones aceleradas (25°C) y condiciones estresadas (40°C)

20 Descripción de las secuencias:

Descripción de las secuencias:

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

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

Ejemplos

25 Materiales

El FGF-18 truncado recombinante (trFGF-18 o esprifermina) de los presentes ejemplos se ha preparado internamente por expresión en *E. coli*, de acuerdo con la técnica descrita en la solicitud WO2006/063362. En los siguientes ejemplos, esprifermina y FGF-18 se usan indistintamente. Otras sustancias principales utilizadas en los ejemplos son las siguientes:

- 30 - Alginato de sodio, Sigma Aldrich A2158,
- Alginato de sodio, FMC BioPolymer Keltone LVCR (Alginato de calidad farmacéutica),
- Sacarosa, Merck 1.07653.9029
- Colágeno tipo I de piel humana, CalbioChem 234149 y CalbioChem 234138
- Cloruro de calcio (CaCl₂), Merck 1.02382.0250,
35 - δ -lactona del ácido D-(+)-glucónico, Sigma Aldrich G4750
- Quitosano 75% DD HMW, Sigma Aldrich 419419,
- Quitosano 95% DD LMW, Faravelli 43000,
- Quitosano 95% DD HMW, Heppe medical 24711,

40 Los siguientes ejemplos describen la preparación y caracterización de dos tipos de hidrogeles, es decir, hidrogeles sensibles a iones y sensibles a la temperatura. Los hidrogeles sensibles a iones se han preparado en especial con alginato de sodio, capaz de formar hidrogeles en presencia de cationes divalentes, mientras que los hidrogeles sensibles a la temperatura se han preparado en especial con quitosano, conocido por ser un polisacárido sensible a la temperatura (Tomme et al., 2008). Ambos polímeros utilizados en este estudio son polisacáridos naturales biocompatibles.

45 Con el fin de distinguir claramente en esta sección entre la formulación antes del proceso de gelificación y la formulación después de que se forma un gel, la primera se ha denominado "solución líquida" y la segunda "gel", respectivamente.

Métodos

Tiempo y temperatura de gelificación

El tiempo de gelificación se evaluó para todas las formulaciones mediante el "ensayo de inclinación". Los geles se prepararon en placas de Petri de vidrio con 3 cm de diámetro y se incubaron a diferentes temperaturas. A intervalos de tiempo predeterminados, las placas de Petri se inclinaron y el tiempo de gelificación se consideró como el tiempo al cual la formulación no mostraba ningún flujo.

Propiedades mecánicas

Las propiedades reológicas de los hidrogeles se investigaron utilizando un reómetro AR 2000 (TA Instruments) con una geometría de cono-placa (pendiente de 1°) con 40 mm de diámetro. Se aplicaron discos abrasivos en ambas placas con el fin de evitar el deslizamiento de las muestras durante el ensayo. El espesor de todas las muestras estaba comprendido entre aproximadamente 1-2 mm, dependiendo del volumen de la muestra. Se usó una trampa de disolvente para mantener una atmósfera saturada de agua para evitar la evaporación del disolvente durante la medición.

Después de hinchar completamente los hidrogeles a partir de sus soluciones líquidas originales en placas de Petri, las muestras se colocaron en el reómetro y se equilibraron a 37°C durante 2 minutos. Luego, las muestras se analizaron en el ensayo de barrido de frecuencia en un intervalo de frecuencias de 0,1 a 100 rad/s. El esfuerzo oscilatorio se ajustó a 10 Pa y los módulos de almacenamiento, G' y de pérdida, G'', se registraron en función de la frecuencia.

Ensayo de comportamiento de hinchamiento

Una de las propiedades típicas de los hidrogeles es su capacidad de hincharse en presencia de una solución acuosa debido a su naturaleza hidrófila. Para evaluar el comportamiento de hinchamiento de los geles, estos se sumergieron en una solución de líquido sinovial simulado (MSF) y se pesaron con el tiempo. Los experimentos se realizaron por triplicado en placas de 12 pocillos equipadas con insertos colgantes que tenían una membrana porosa de 0,4 µm en la parte inferior.

Solo se seleccionaron geles de alginato para este ensayo. Los geles se prepararon en viales de 5 ml mezclando 200 µl de solución de cloruro de calcio y 400 µl de solución líquida de polímero, preparadas como se describe en el ejemplo 2, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Después los geles se transfirieron a insertos vacíos previamente pesados. Se pesaron los insertos con muestras de gel y el peso correspondiente se consideró como el tiempo 0 del peso de referencia. Los insertos que contienen los geles se colocaron en la placa y se añadieron 1.5 ml de MSF al pocillo, asegurándose de que el fondo poroso del inserto se sumergiera en la solución. La placa se cerró bien con Parafilm para evitar fenómenos de evaporación y se incubó a 37°C en el agitador orbital. En tiempos de medición predeterminados, los insertos que contenían los geles se retiraron de los pocillos. El exceso de MSF se eliminó secando el fondo poroso con papel de filtro y luego se pesaron los insertos con geles. Las soluciones en los pocillos se recogieron, se almacenaron a -80 °C y se reemplazaron por MSF de nueva aportación. La composición del MSF era: tampón PBS 1X a pH 7,3, F68 (es decir, poloxámero 188) 0,25 g/l, albúmina de suero humano (HSA) al 1% en peso, PenStrep al 1% en peso. Antes de su uso, el MSF se filtró a través de filtros de 0,22 µm. Los resultados se dieron como relación de hinchamiento, es decir, la relación entre el peso en el tiempo t y el peso en el tiempo t=0.

Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica de microscopía electrónica de barrido se utilizó para analizar la estructura tridimensional de la red polimérica una vez que se forma el gel. Los geles activos basados en alginato se prepararon en una placa de Petri de vidrio con un diámetro de 3 cm siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo relacionado con el "tiempo de gelificación", mezclando 1 ml de solución líquida de polímero y 0,5 ml de solución de calcio. El gel obtenido se incubó luego a 37°C durante 30 minutos. Se prepararon seis muestras a partir de una solución líquida de polímero a una concentración de 3% en peso o 4% en peso de alginato, ambas conteniendo 0, 1 o 2 µg/ml de colágeno tipo I. Los geles después se liofilizaron durante 48 horas. El ciclo de liofilización comprendía una etapa de congelación, una etapa de secado primario y una etapa de secado secundario. Durante la etapa de congelación, se aplicó una rampa de temperatura desde temperatura ambiente hasta -45°C, seguida de una etapa a -45°C durante 4 horas. A esto le seguía una etapa de secado primario, cuando se aplicaba una rampa de temperatura de -45°C a -10°C con una velocidad de 1°C/min a 50 mTorr de presión, seguido de una etapa a -10°C y a 50 mTorr durante 24 horas y 30 minutos. La etapa de secado secundario comprendía dos etapas: se aplicó una primera rampa de temperatura de -10°C a 21°C con una velocidad de 1°C/min a 50 mTorr de presión, seguida de una etapa a 21°C y a 50 mTorr durante 12 horas y 30 minutos, y luego se aplicó una segunda rampa de temperatura de 21°C a 37°C con una velocidad de 1°C/min a 50 mTorr, seguida de una etapa a 37°C y a 50 mTorr durante 6 horas. Finalmente, se alcanzaron la temperatura ambiente y la presión atmosférica. Después cada muestra se tiñó y analizó por SEM.

Estudio de liberación in vitro

Las mismas muestras utilizadas para los ensayos de hinchamiento se analizaron también para los ensayos de liberación in vitro. En particular, las fases recogidas almacenadas a -80°C (como se describe en la sección anterior

"Ensayo de comportamiento de hinchamiento") se analizaron por HPLC. Las muestras seleccionadas también se analizaron por Biacore (datos no mostrados).

Ensayo ex vivo en un modelo animal

5 Se realizaron ensayos preliminares en un modelo animal ex vivo para investigar la capacidad de la formulación de alginato para adherirse a una articulación de rodilla real. La formulación ensayada se eligió basándose en los resultados del ensayo de invasión celular, descrito en el ejemplo 9. En particular, el modelo utilizado consistió en la parte superior de la tibia y la parte inferior del fémur que constituyen una rodilla de vaca. Se hicieron orificios de 1 cm de profundidad y de 0,4 cm de diámetro en ambas partes de la rodilla usando un extractor de hueso, con el fin de imitar los agujeros hechos por los cirujanos cuando llevan a cabo la microfractura. Los agujeros se llenaron después con la formulación de alginato al 4% en peso que contenía 1,3 µg/ml de colágeno tipo I y 36 µg/ml de FGF-18 de concentraciones finales en el gel. El ensayo se realizó usando una válvula para infusión con el fin de conectar dos jeringas diferentes, una que contiene la solución de alginato y otra que contiene la solución de calcio. Los émbolos de las dos jeringas se empujaron al mismo tiempo de modo que la válvula pudiera mezclar las soluciones. La formulación se inyectó en los orificios tanto en posición derecha como invertida, para verificar la posibilidad de administración en los diferentes escenarios reales posibles in vivo. Después de aproximadamente 2 horas de incubación a 37°C, el gel se retiró del agujero para verificar su estado mediante inspección visual.

Bioensayo in vitro

20 Una placa de 96 pocillos para luminometría (placa de ensayo) se recubre con 50 µl/pocillo de solución de alginato de sodio al 4% y 25 µl/pocillo de solución de CaCl₂ 10 mg/ml, y se incuba durante 30 minutos a 37°C, 5% de CO₂ para permitir la formación de hidrogel basal.

25 Se dispensan en una placa de 96 pocillos (placa primaria) 160 µl/pocillo de medio de ensayo desde la fila B a la fila H. Luego, el patrón de referencia de FGF-18 y las muestras se diluyen a 10 µg/ml en medio de ensayo y se añaden por triplicado (100 µl/pocillo) en la fila A considerando los grupos de columnas como repeticiones. Mediante el uso de una pipeta multicanal, se realizan diluciones seriadas 1:5 desde el pocillo en la fila A al pocillo en la fila H, transfiriendo 40 µl de la fila A a la fila H.

Desde la placa primaria, se transfieren 25 µl/pocillo de diluciones del patrón de referencia de FGF-18 a una placa basal de 96 pocillos recubierta con hidrogel (placa de ensayo) y se incuban durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂.

30 Los cultivos de células BaF3/FGFR3c, sembrados a 10.000.000 SM en un matraz de 75 cm² y privados de alimento durante 24 horas antes del ensayo, se diluyen a 800 000 células/ml en medio de ensayo y luego se añaden 25 µl/pocillo (20.000 células/pocillo) en cada pocillo al FGF-18 y la placa basal recubierta con hidrogel durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Se añaden 100 µl/pocillo del reactivo "ATPlite 1 step" para revelar la proliferación, mezclando lentamente la placa y leyendo la luminiscencia emitida con un contador de luminiscencia.

Ejemplo 1: preformulaciones

35 Durante el trabajo de preformulación, se mezclaron alginato o quitosano con otros excipientes con el fin de obtener soluciones acuosas con una osmolalidad aceptable para inyecciones i.a. (objetivo: 350 mOsm/Kg). Después se ensayó en las soluciones líquidas su tiempo y temperatura de gelificación. Las formulaciones capaces de formar hidrogeles en 5 minutos y/o a una temperatura de aproximadamente 37°C se formularon adicionalmente con FGF-18 en diferentes concentraciones (datos no mostrados).

40 Ejemplo 2: preparación de geles sensibles a iones (alginato)

Generalidades

45 Se usó alginato de sodio para obtener un gel sensible a iones, ya que en presencia de cationes divalentes que funcionan como agente de reticulación entre las cadenas de polímeros, tales como Ca²⁺, es capaz de formar una red polimérica que da lugar a un hidrogel. La formulación consistía en dos soluciones, una que contenía el polímero y la otra que contenía los iones. Una vez mezcladas entre sí, las soluciones formaban un gel.

50 La solución de calcio era la misma tanto para el placebo como para los geles activos y consistía en una solución de cloruro de calcio CaCl₂ en agua milliQ a una concentración de 10 mg/ml. En la solución líquida de polímero, además del alginato, se añadieron colágeno tipo I y la molécula activa (aquí, esprifermina), así como sacarosa para ajustar el valor de osmolalidad. La solución líquida de polímero placebo se preparó de la siguiente manera: se preparó una solución de sacarosa en agua milliQ a una concentración de 70 mg/ml y se usó para disolver alginato de sodio a una concentración de 3% en peso o 4% en peso, con agitación. Una vez que se solubilizó el alginato, se añadió con agitación una solución de colágeno tipo I, disuelta en ácido clorhídrico y diluida en agua milliQ a una concentración de 30 µg/ml o 60 µg/ml, con el fin de obtener una concentración de colágeno en la solución líquida de polímero de 1 µg/ml o 2 µg/ml, respectivamente. Para la preparación de la solución líquida de polímero activo, se disolvió alginato a una

concentración de 3% en peso o 4% en peso con una solución de sacarosa en agua milliQ a una concentración de 70 mg/ml que contenía FGF-18 a granel en una concentración de 54 µg/ml. Luego, se siguió el mismo procedimiento descrito para el placebo para la adición de colágeno tipo I. Los geles se prepararon mezclando la solución líquida de polímero con la solución de calcio en la proporción 2:1 (v:v). Antes de la caracterización adicional, los geles se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

Cribado preliminar de formulaciones de placebo:

Después de ensayar que la cantidad de iones fisiológicos no era suficiente para promover el proceso de gelificación, se eligió el catión divalente Ca^{2+} como agente de reticulación, en forma de cloruro de calcio. Para evitar el uso de calcio, posible responsable de fenómenos de calcificación no deseados, también se ensayó el cloruro de magnesio, pero el intento fue menos satisfactorio.

Luego, se realizó un cribado de las posibles formulaciones y se seleccionó una formulación de placebo preliminar. Se consideraron y cambiaron diferentes parámetros durante el cribado, tales como la concentración de alginato, concentración de CaCl_2 , relación entre los volúmenes de soluciones de polímero y calcio, presencia de otros excipientes, tales como δ -lactona del ácido D-(+)-glucónico, utilizada como retardante para la gelificación, o HSA, añadida a PBS para imitar mejor las condiciones fisiológicas. Se descubrió que la presencia de HSA o ácido D-glucónico no tenía un efecto significativo sobre el gel resultante y, por lo tanto, se descartaron, para evitar la adición de componentes no útiles.

También se observó que la concentración óptima de alginato entre los valores ensayados era de 2,5% en peso a 4,5% en peso, y en especial 3% en peso o 4% en peso. De hecho, las concentraciones más bajas de alginato, es decir, 1% en peso o 2% en peso, no eran aplicables, ya que no se registró la formación completa de gel. Por otro lado, una concentración de alginato demasiado alta (5% en peso) condujo a una solución líquida de polímero muy viscosa, muy difícil de manejar.

La formulación de placebo preliminar seleccionada consistía en una solución líquida de alginato en una concentración de 3% en peso en agua y una solución de calcio de CaCl_2 en una concentración de 10 mg/ml en PBS en la proporción 2:1 (v: v).

Adición de FGF-18

Con el fin de obtener la formulación activa, se llevaron a cabo ensayos sobre la adición de FGF-18 a las dos soluciones. En todos los ensayos siguientes, la relación entre las dos soluciones se mantuvo constante en solución de alginato a solución de calcio 2:1 vol/vol. La adición de FGF-18 a la solución de alginato causó fenómenos de precipitación, detectados por inspección visual. Como una posible solución, el alginato se disolvió en tampón de PBS que contenía 0,25 g/l de tensioactivo F68. Sin embargo, todavía se producía la precipitación. Para superar este problema, se añadió FGF-18 al tampón antes de solubilización de alginato. De esta manera, se evitó la precipitación en la solución de polímero y la proteína se distribuyó de manera homogénea, pero la consistencia física del gel resultante se vio comprometida, en comparación con el placebo preparado en agua. Además, se encontró precipitación microscópica de todos modos, analizando la fase líquida residual después de la formación del gel. Investigaciones posteriores demostraron que la precipitación era causada por la interacción entre CaCl_2 y PBS, que probablemente conduzca a la formación de fosfato de calcio. Por esta razón, el PBS se eliminó tanto de la solución líquida de polímero como de la solución de calcio, y se usó solo agua milliQ como disolvente.

Optimización de la formulación.

Se consideró un aumento en la concentración de alginato hasta 4% en peso, con el objetivo de obtener geles con un tamaño de malla más denso. Esto debería conferir al material la capacidad de resistir más tiempo in vivo y garantizar una mayor retención de la proteína encapsulada. También se investigó una minimización del contenido de calcio, para reducir los posibles efectos secundarios: se encontró que la cantidad mínima requerida para obtener un gel, manteniendo constantes todos los demás parámetros, era de 4 mg/ml. Como la mezcla de las soluciones de calcio y polímero causa la formación inmediata de un gel, no era posible medir el pH y la osmolalidad de la formulación final. Por lo tanto, la osmolalidad de la solución líquida de polímero se ajustó al valor de ~300 mOsm/kg usando sacarosa 70 mg/ml. Esta adición causaba una alteración en la formación del gel, con fase líquida residual no observada en ausencia de sacarosa. Se planteó la hipótesis de que la sacarosa interfería con la formación del gel al interactuar con alginato o con calcio. Por lo tanto, la concentración de calcio se elevó nuevamente a 10 mg/ml, lo que condujo a la formación de un gel sin líquidos residuales ni precipitados.

El pH de la solución de polímero se midió obteniendo el valor de 7,0. La solución de calcio mostró un valor de pH de 5,3 y una osmolalidad de aproximadamente 170 mOsm/kg.

La cantidad de proteína cargada en la solución líquida de polímero se ajustó a 54 µg/ml.

Finalmente, se añadió colágeno tipo I a la solución líquida de polímero, para mejorar la capacidad de invasión celular del gel, como se describe en Rayatpisheh et al. (2011). Se probaron dos concentraciones diferentes, 1 y 2 µg/ml, de acuerdo con la bibliografía (Tsai et al., 1998).

Al final de este cribado preliminar, se seleccionaron cuatro formulaciones candidatas. Para todas ellas, la solución de calcio estaba compuesta de cloruro de calcio 10 mg/ml en agua MilliQ, mientras que las soluciones de polímeros diferían tanto para el contenido de alginato como de colágeno tipo I como se muestra en la Tabla 1.

5 Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando un alginato de sodio fácilmente disponible proporcionado por Sigma Aldrich. En la última parte del estudio, se adquirió un alginato de sodio que tenía las mismas características, pero certificado como de calidad farmacéutica (PG) de FMC BioPolymer Keltone. Después las cuatro formulaciones candidatas se volvieron a preparar utilizando alginato PG y se compararon con las no PG obteniendo resultados comparables en términos de inspección visual. Los geles obtenidos con alginato PG y no PG se compararon también en cuanto a su hinchamiento y propiedades mecánicas.

10 Se espera que, aunque los experimentos se han realizado con cloruro de calcio, se habrían obtenido resultados similares con cualquier otra sal dicatiónica, como la sal de magnesio, sal de cobre o sal de zinc.

Ejemplo 3: preparación de geles sensibles a la temperatura (quitosano)

Generalidades

15 Para el cribado de las formulaciones de quitosano, la preparación de las soluciones líquidas de polímero usaba tres quitosanos diferentes: 95% de grado de desacetilación (DD) con alto peso molecular (HMW), 95% de DD con bajo MW (LMW) y 75% de DD con alto MW (HMW). Las soluciones líquidas de polímero se prepararon añadiendo gradualmente el quitosano a una solución de ácido acético 0,1 N con agitación enérgica a 5°C o 25°C. Se calculó que la cantidad de polímero tenía una concentración final de polímero en la solución líquida de polímero de 1% en peso, 1.5% en peso o 2% en peso. Una vez que el quitosano se había solubilizado por completo, se añadió una solución de KH₂PO₄ en una concentración de 10 mM, 100 mM o 500 mM en agua milliQ con agitación, para tener una concentración final en la solución líquida de polímero de 1 mM, 10 mM o 50 mM. Finalmente, se añadió una solución de β-glicerofosfato (β-GP) en una concentración de 20% en peso en agua milliQ con el fin de ajustar el pH de la solución líquida final a un valor de 6,0, 6,5 o 7,0. La concentración final de β-GP en la solución líquida de polímero varió de 0,5% en peso a 7% en peso, para las formulaciones aceptadas. No siempre era posible alcanzar el valor de pH deseado ya que era necesaria una cantidad demasiado alta de β-GP, excediendo el valor de osmolalidad objetivo de 350 mOsm/Kg u obteniendo un gel ya a temperatura ambiente. Las soluciones líquidas de polímero, cuando correspondía, después se incubaron a 37°C hasta la formación del gel. Se midió la osmolalidad de todas las formulaciones cribadas, descartando las formulaciones con una osmolalidad superior a 350 mOsm/Kg, es decir, formulaciones con concentraciones finales de β-GP superiores al 2.5% en peso.

30 Cribado preliminar de formulaciones de placebo:

Los geles sensibles a la temperatura se basan en un material polimérico que sufre transiciones de solución-gelificación (sol-gel) que cambian la temperatura del entorno local. Se ha descrito que el quitosano puede experimentar transiciones de sol-gel con cambios de temperatura, pero el proceso está muy influenciado por el peso molecular del polímero (MW), su grado de desacetilación (DD), la concentración del polímero en la solución, temperatura, tiempo y velocidad de mezcla durante la solubilización del polímero, el pH final de la solución y la presencia de otros excipientes.

35 Por lo tanto, se requería un cribado exhaustivo de las diferentes combinaciones posibles. Es de destacar que el quitosano se puede solubilizar en agua solo a pH ácido. Un aumento en el pH provoca su agregación y precipitación. Una forma de superar este problema es el uso de β-GP para aumentar el pH a la vez que se mantiene el quitosano en solución.

40 El estudio se centró al principio en el quitosano HMW con 75% de DD. Se prepararon varias soluciones líquidas poliméricas en ácido clorhídrico 0,1 N, que diferían en la concentración final de quitosano, de 1% en peso a 2.5% en peso, concentración final de β-GP de 1,6% en peso a 50% en peso (1,6, 5, 5,6, 8, 30, 50%), diferentes excipientes, en particular gelatina, glucosamina, ácido hialurónico, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, trehalosa y diferentes valores finales de pH de 6,0 a 7,0. Se describió que estos excipientes desempeñan un papel en la inducción de la formación de gel (Cheng et al., 2010; Schuetz et al., 2008; Yan et al, 2010).

45 Solo una de las formulaciones seleccionadas podía formar un gel a 37°C después de 5 minutos de incubación a 37°C, pero la cantidad de β-GP era mayor de 8% en peso, descrito en la bibliografía como el límite por encima del cual se registra citotoxicidad (Ahmadi et al., 2008). Por lo tanto, todas las siguientes formulaciones se prepararon teniendo en cuenta esa limitación. El cribado continuó moviéndose a un quitosano que tenía un valor de DD más alto. Los primeros ensayos se basaron en quitosano LMW con 95% de DD. Las soluciones de polímeros se prepararon siempre en ácido clorhídrico 0,1 N, disolviendo el polímero con agitación vigorosa a 5°C o a 25°C.

50 Después de la solubilización completa del polímero, se añadieron los otros excipientes, añadiendo β-GP solo al final. El β-GP era el responsable del aumento en el valor de pH, promoviendo entonces el proceso de gelificación. Los primeros ensayos se centraron en formulaciones basadas solo en quitosano y β-GP en diferentes combinaciones de concentraciones relativas. Se observó que usando altas concentraciones de quitosano (2% o 3% en peso) y altas concentraciones de β-GP (8% en peso), la formación del gel se producía ya a temperatura ambiente, y en algunos casos también a 5°C.

Al disminuir las concentraciones de cualquiera de los componentes, la formulación permanecía líquida, también después de una larga incubación a 37°C. Solo en un caso se registró la formación del gel, pero después de 2 horas de incubación a 37°C, demasiado tiempo para el propósito de este estudio. Por lo tanto, la adición de un excipiente era obligatoria para mejorar la formulación. Se seleccionó hidroxietilcelulosa (HEC) como el excipiente más apropiado y se llevó a cabo un cribado adicional. Durante esta evaluación, la concentración de quitosano varió de 1.5% en peso a 2% en peso y la concentración inicial de HEC era de 0,5% en peso, pero en estas condiciones, la solución de polímero se convirtió en un gel incluso a temperatura ambiente durante la adición de β -GP, si su concentración estaba por encima de 1,8% en peso. Se obtuvo una solución líquida capaz de convertirse en un gel a 37°C después de 13 minutos de incubación con la siguiente composición: 1.5% en peso de quitosano, 0,5% en peso de HEC y 1,7% en peso de β -GP.

Optimización de la formulación

En el intento de mejorar esta formulación, se realizaron los siguientes ensayos manteniendo la concentración de β -GP casi constante en el valor de 1,65-1,7% en peso, la concentración de quitosano variaba de 1,5% en peso a 1,8% en peso y la cantidad de HEC disminuía gradualmente hasta 0,1% en peso. Se seleccionaron varias formulaciones candidatas con esta estrategia. Sin embargo, la investigación no continuó en esta dirección, ya que se descubrió que el excipiente HEC puede contener un contaminante descrito como citotóxico y, por otro lado, responsable de la modulación del proceso de gelificación en presencia de quitosano (Hoemann et al., 2007). Otros excipientes probados en los experimentos anteriores, tales como la gelatina o la glucosamina, no dieron resultados positivos.

Luego se inició un trabajo de cribado final, utilizando tres tipos de polímeros de quitosano, que difieren en peso molecular y DD: quitosano HMW con 75% de DD, quitosano HMW con 95% de DD y quitosano LMW con 95% de DD. El trabajo también se planeó con quitosano LMW con 85% de DD, pero el material no estaba disponible antes del final del estudio. En ese trabajo, cada quitosano se ensayó en tres concentraciones fijas, 1, 1,5 y 2% en peso, y las soluciones de polímero se prepararon con el fin de tener valores finales de pH de 6,0, 6,5 y 7,0. Con el fin de reducir la cantidad de β -GP utilizada para aumentar el valor de pH de la solución, el polímero se disolvió en ácido acético 0,1 N, en lugar de HCl 0,1 N utilizado en los experimentos anteriores. La osmolalidad de la solución final también se controló y se mantuvo por debajo del valor de \sim 350 mOsm/kg. Por lo tanto, se descartaron las formulaciones que requerían una cantidad demasiado alta de β -GP para alcanzar el pH deseado que conducía también a un valor de osmolalidad demasiado alto. En estos ensayos de cribado, también se estudió la contribución de la fuerza iónica, ya que se describió que la presencia de sales podría aportar una contribución positiva al proceso de gelificación (Filion et al., 2007).

Como las sales de sodio debían evitarse por las posibles interacciones con la proteína, se eligió KH_2PO_4 y se añadió a la solución de polímero en la concentración final de 1 mM, 10 mM o 50 mM. El quitosano con 75% de DD no dio resultados positivos y se abandonó por completo. Ninguno de los quitosanos HMW con 95% de DD dio resultados positivos: las concentraciones de quitosano superiores a 1% en peso requerían una cantidad demasiado alta de β -GP para alcanzar los valores de pH fijos, excediendo el valor de osmolalidad objetivo, y las formulaciones al 1% en peso no pudieron formar un gel a 37°C. Se seleccionaron dos formulaciones candidatas con quitosano LMW que tenía 95% de DD, ya que experimentaban una transición sol-gel a 37°C, pero la preparación de estas soluciones de polímero no era completamente reproducible. De hecho, se observó que el tiempo requerido para obtener un gel y las características físicas macroscópicas de las soluciones líquidas de polímeros cambiaban significativamente, dependiendo del tiempo empleado para disolver el polímero, la velocidad de mezcla durante la disolución del polímero y durante la mezcla de los excipientes y, finalmente, la temperatura y el volumen de la solución preparada.

Esta alta variabilidad en los resultados llevó a la decisión de interrumpir el estudio sobre este polímero.

Ejemplo 4: tiempo y temperatura de gelificación

Todas las formulaciones estudiadas en este trabajo están planificadas para ser utilizadas como geles de formación in situ. Por lo tanto, un requisito importante era un tiempo de gelificación rápido, tanto para geles sensibles a iones como a temperatura. De hecho, era importante identificar una formulación con buenas propiedades gelificantes pero cuyo proceso de gelificación no sea demasiado rápido (para permitir la inyección) ni demasiado lento (para no arriesgarse a perder material). El tiempo de gelificación se determinó mediante el ensayo de inclinación: las soluciones se invirtieron y el gel se consideró formado cuando no se observó flujo de líquido.

Formulaciones basadas en iones

En el caso de formulaciones basadas en alginato, en el proceso de gelificación influía la concentración de la solución de calcio y la relación relativa entre las soluciones de calcio y alginato. Los geles se prepararon en placas de Petri de vidrio añadiendo primero la solución de alginato y, luego, la solución de calcio tratando de homogeneizar las dos soluciones tanto como fuera posible. Si la cantidad de cloruro de calcio no era suficiente, no se observaba formación de gel, incluso después de incubación a 37°C durante mucho tiempo. Al aumentar la cantidad de agente de reticulación (calcio) y ajustar la relación solución de polímero:solución de calcio, se formó un gel casi instantáneamente, tan pronto como las dos soluciones se mezclaron. En algunos casos, se observó una fase líquida restante. El tiempo requerido para la desaparición total del líquido después de la incubación a 37°C se consideró como el tiempo de gelificación.

El tiempo de gelificación varió de 5 minutos a 2 horas y, en algunos casos, no se alcanzó la desaparición total del líquido. La gelificación era más rápida con solución líquida de polímero con una concentración de alginato al 4% en peso que al 3% en peso. La adición de colágeno tipo I no mostró ningún impacto en el tiempo de gelificación. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Las dos formulaciones candidatas con concentración de alginato de 4% en peso de la solución de polímero mostraron un tiempo de gelificación de 5 minutos, mientras que las dos candidatas con una solución de polímero al 3% en peso mostraron una gelificación completa en 15 minutos.

Es importante destacar que cuando los geles se formaban utilizando un conector de jeringas que permitía la inyección contemporánea de las dos soluciones, no se observaba fase líquida restante a ninguna concentración del polímero. De hecho, la inyección contextual de las dos soluciones permite una mezcla más rápida y más homogénea de los dos flujos que conduce a una gelificación instantánea.

Se espera que aunque los experimentos se han realizado con cloruro de calcio, se habrían obtenido resultados similares con cualquier otra sal dicatiónica, tal como la sal de magnesio, sal de cobre o sal de zinc.

Formulaciones basadas en temperatura

Los geles sensibles a la temperatura se diseñaron para ser líquidos a temperatura ambiente durante la fase de preparación y manipulación y convertirse en un gel después de la inyección, es decir, a 37°C en condiciones fisiológicas. El ensayo se llevó a cabo incubando las diferentes formulaciones basadas en quitosano a 5°C, 25°C y 37°C para controlar el tiempo de gelificación en función de la temperatura mediante el ensayo de inclinación. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Dependiendo de las concentraciones de quitosano y β -GP, el comportamiento cambió significativamente. Usando soluciones demasiado concentradas en β -GP, la gelificación se produjo ya a temperatura ambiente, durante la preparación de la solución líquida. Por esta razón, era importante no solo optimizar la formulación cambiando las concentraciones de los componentes, sino también disolver y mezclar todos los ingredientes a 5°C y luego incubar la solución líquida a 37°C. Después de una optimización adecuada, como se describe en el ejemplo 3, se obtuvo la formación de gel a 37°C después de 15 minutos, pero se encontró que el resultado no era reproducible. En particular, se observó que en el tiempo de gelificación influía la velocidad y la duración de la mezcla requerida para disolver el quitosano y mezclarlo con los otros componentes.

Ejemplo 5: propiedades mecánicas

Los hidrogeles son un grupo de materiales semisólidos hechos de redes de polímeros hidrófilos con alta capacidad de retención de agua. En general, los hidrogeles tienen características mecánicas intermedias entre líquidos viscosos y sólidos elásticos (propiedades viscoelásticas) (Anseth et al., 1996). Es importante que sus propiedades mecánicas se determinen y midan en condiciones que se asemejan al entorno objetivo in vivo.

Los análisis mecánicos dinámicos pueden caracterizar el comportamiento viscoelástico de los hidrogeles que refleja las respuestas combinadas viscosas y elásticas tras la aplicación de un esfuerzo oscilatorio (típicamente cizallamiento). Los materiales viscoelásticos se caracterizan por un módulo de almacenamiento, G' , y un módulo de pérdida o viscoso, G'' , que dan una medida de las contribuciones elásticas y viscosas del comportamiento dinámico de esfuerzo-deformación, respectivamente.

Los hidrogeles se definen, en términos reológicos, como materiales viscoelásticos que presentan $G' > G''$ y G' y G'' independientes de la frecuencia de oscilación (Peppas et al., 2000). En particular, cuanto mayor sea G' , mayor sea la resistencia de los hidrogeles y mayor sea la diferencia entre G' y G'' menor será el comportamiento similar a líquido frente a similar a sólido. En esta sección se describe la investigación de las propiedades viscoelásticas de hidrogeles de alginato utilizando un reómetro equipado con una geometría de cono-placa (véase la sección experimental) realizando ensayos de barrido de frecuencia. En los ensayos de barrido de frecuencia se aplica un esfuerzo de cizallamiento oscilatorio en un intervalo de frecuencias (0,1-100 rad/s). G' y G'' se representan, entonces, frente a la frecuencia.

La Figura 1 muestra los resultados del barrido de frecuencias en relación con geles de alginato al 3% en peso, con diferentes contenidos de colágeno (0, 1, 2 μ g/ml) en la solución de alginato y diferentes contenidos de FGF-18 en la solución de alginato (0, 54, 540 μ g/ml). Todas las muestras se analizaron después de 30 minutos de incubación a 37°C después de la adición de la solución de calcio. Se realizaron mediciones con FGF-18 a 540 μ g/ml en la solución de alginato para investigar si una concentración de proteína diez veces mayor podría afectar a la estructura interna del material.

Como se ve, todas las muestras mostraron el comportamiento típico de los geles, mostrando $G' \gg G''$, ambos independientes de la frecuencia angular. Los valores de G' están comprendidos para todas las muestras entre aproximadamente 300 y 400 Pa. Estas diferencias en G' no eran indicativas de diferencias sustanciales en la respuesta elástica de estos materiales. Esto significa que la baja concentración de colágeno en la formulación (1 o 2 μ g/ml) no afectó a las propiedades mecánicas del gel en el tiempo cero. De todos modos, puede promover una mayor estabilidad del gel tras la incubación, como se mostrará en la siguiente sección.

También es importante notar que la presencia de FGF-18 no tenía impacto en las propiedades mecánicas del material en 54 o 540 $\mu\text{g/ml}$ en solución de alginato. De hecho, no se pudieron identificar diferencias o tendencias significativas entre el placebo y los geles activos en las dos concentraciones de proteínas diferentes. Este es un parámetro importante ya que permite la formulación de FGF-18 en un amplio intervalo de concentraciones de proteína en solución de alginato (0-540 $\mu\text{g/m}$) sin afectar a las propiedades de la matriz.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos en los candidatos de alginato al 4% en peso, el placebo correspondiente y el placebo sin colágeno. También en este caso, todas las muestras mostraron el comportamiento típico de geles con $G' \gg G''$, ambos independientes de la frecuencia angular. Nuevamente, no había impacto visible ni del colágeno ni del FGF-18, ya sea con 54 o 540 $\mu\text{g/ml}$ en solución de alginato, estando todos los valores de G' entre aproximadamente 380 y 500 Pa. Se podría esperar que una mayor concentración de alginato condujera a una mayor densidad de reticulación, por lo tanto, de módulo elástico, G' . La diferencia registrada, en cambio, no era pronunciada.

De todos modos, es importante subrayar el hecho de que la solución de calcio añadida a las soluciones de alginato tanto al 3% en peso como al 4% en peso era la misma. Esto significa que la solución de alginato al 3% en peso se expuso a una concentración relativa más alta de agente de reticulación que incluso podría conducir a una malla más densa, dependiendo de la reorganización de las cadenas de polímero en solución.

Al final del estudio, estaba disponible un alginato de calidad farmacéutica (PG). Con el fin de asegurarse de que el nivel de pureza del alginato no afectaba a la estructura de los geles, se realizaron ensayos de barrido de frecuencia también en geles basados en alginato PG. Los resultados se muestran en la Figura 3 y la Figura 4.

Los resultados obtenidos para el alginato PG eran perfectamente comparables a los obtenidos con alginato no PG. La única diferencia era una dispersión de resultados ligeramente más ancha dentro de los geles tanto al 3% en peso como al 4% en peso. Esto podría deberse a una ligera diferencia en la distribución de pesos moleculares de la materia prima, a pesar de que las hojas técnicas del alginato PG y el alginato no PG informan de las mismas especificaciones.

De todos modos, nuevamente, no se pudo observar una tendencia particular o diferencias notables dentro de los sistemas de 3% en peso y 4% en peso y los valores de G' ligeramente más altos observados para los sistemas de 4% en peso también se confirmaron con la materia prima PG.

Ejemplo 6: comportamiento de hinchamiento

Un parámetro típico que debe evaluarse para los materiales de hidrogel es su capacidad de hincharse o encogerse en presencia de un líquido. El ensayo se usó para predecir el comportamiento del material una vez inyectado en condiciones in vivo, donde estará en contacto con el líquido sinovial fisiológico.

El estudio se llevó a cabo solo en geles basados en alginato preparados según el ejemplo 2, ya que las formulaciones de quitosano se descartaron, como se explica en el ejemplo 3. Por lo tanto, los cuatro geles basados en alginato candidatos se incubaron a 37°C en contacto con MSF y se controló su comportamiento durante 30 días (véase "ensayo de comportamiento de hinchamiento" en la sección de métodos).

En la Figura 5, se describe el comportamiento de hinchamiento durante 1 mes para los cuatro geles basados en alginato candidatos tanto para placebo como para geles activos. Como referencia, también se ensayaron los mismos geles sin colágeno tipo I, para investigar sus efectos sobre las características estructurales de los geles. Estos resultados se dan en la Figura 6. Tanto la figura 5 como la 6 se refieren a alginato de calidad no farmacéutica (no PG).

En ambos casos, cuanto mayor es la concentración de alginato, mayor es la relación de hinchamiento. Aparentemente, este comportamiento contrasta con los resultados obtenidos por mediciones reológicas. En particular, las concentraciones de polímeros más altas deberían formar una red más densa que, a su vez, generalmente se asocia con una menor capacidad para absorber soluciones acuosas. Por cierto, debe considerarse que la concentración de Ca^{2+} se mantenía constante y, por lo tanto, la relación entre el polímero y el agente de reticulación variaba variando la concentración del polímero. Una menor disponibilidad de agente de reticulación podría conducir a la formación de zonas donde el polímero no está reticulado, permitiendo que el agua penetre fácilmente. Esto podría explicar las diferencias en las relaciones de hinchamiento entre los candidatos al 3% en peso y 4% en peso de alginato y se confirmó por las imágenes de SEM que se muestran en la siguiente sección.

Una comparación entre la Figura 5 y la Figura 6 muestra que la presencia de colágeno tipo I tiene un impacto en el comportamiento de hinchamiento, especialmente en términos de cinética. Mientras que en ausencia de colágeno, todos los geles aumentaron su peso de forma monótonica durante aproximadamente 15 días y luego alcanzaron una meseta, la presencia de colágeno, independientemente de la concentración, conducía a una tendencia sinusoidal. La primera meseta alcanzada después de 2 días en presencia de colágeno indica un hinchamiento de equilibrio correspondiente a la cantidad máxima de agua que el gel puede retener. Este valor era menor que los valores de la relación de hinchamiento correspondientes en ausencia de colágeno, lo que sugiere una estructura más ajustada de los geles, como se esperaba después de la adición de colágeno. El aumento de la relación de hinchamiento posterior después de 15 días de incubación indicó el inicio de un fenómeno de erosión de la red, con la consiguiente absorción de solución de MSF a medida que la malla se aflojaba. Luego se alcanzaba una segunda meseta después de 24 días y se mantenía hasta el final del período de observación de 1 mes. Se esperaba que la erosión adicional de la red

condujera a un aumento adicional de peso, por lo tanto, relación de hinchamiento, seguido de una disminución hasta que se haya producido una erosión completa. En ausencia de colágeno (Figura 6), se observaba un aumento continuo de la relación de hinchamiento seguido de una erosión lenta. Es probable que este comportamiento esté relacionado con la erosión contemporánea y la absorción de agua debido a la estructura más floja de los geles.

- 5 Como se mencionó, no se registraron diferencias entre los geles obtenidos con 1 o 2 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno tipo I en la solución de polímero.

Es interesante que no se observaron diferencias tampoco entre placebo y geles activos. Esto sugería que una concentración final de 36 $\mu\text{g/ml}$ de FGF-18 en los geles no tenía impacto en la estructura interna del material. Los experimentos se repitieron con las mismas formulaciones, esta vez preparadas con alginato PG y los resultados se dan en la Figura 7.

10 Como se ve, los resultados son perfectamente comparables a los obtenidos con alginato no PG, la única diferencia es una desviación más baja entre las relaciones de hinchamiento de geles de alginato al 3% en peso y 4% en peso en comparación con el material no PG. El experimento se llevó a cabo hasta 50 días para los geles al 4% en peso que muestran el comportamiento esperado, es decir, una disminución de peso después de la segunda meseta que indica una lenta erosión continua.

15 Ejemplo 7: Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se tomaron imágenes de SEM para investigar la estructura microscópica del material una vez que se forma el gel. El análisis se llevó a cabo en geles recién preparados y después se liofilizaron.

20 La comparación de muestras con y sin colágeno tipo I, en ambas concentraciones de polímero, presentadas en la Figura 8, puso de manifiesto que el colágeno no tenía un efecto significativo en la microporosidad de los geles de alginato al 3% en peso y solo un ligero efecto en el de 4% en peso que mostraba una estructura ligeramente más apretada cuando se añadía colágeno, ya sea 1 o 2 $\mu\text{g/ml}$.

A partir de las micrografías, es evidente una diferencia en la porosidad entre los dos materiales, el gel de alginato al 4% en peso muestra cavidades más grandes que el de 3% en peso. Esto puede explicarse, nuevamente, por el hecho de que la concentración relativa de agente de reticulación en la formulación de alginato al 3% en peso era mayor que en el caso del 4% en peso. Esto podría inducir una estructura más densa en los geles al 3% en peso.

25 Estas imágenes estaban en línea con los resultados de hinchamiento y en aparente contradicción con el análisis de propiedades mecánicas. De hecho, las cavidades más grandes presentes en los geles al 4% en peso explican el mayor grado de hinchamiento observado en comparación con el 3% en peso. Por otro lado, el módulo elástico ligeramente más alto, G' , observado para el 4% en peso, puede explicarse por la presencia de cadenas de alginato no reticuladas o poco reticuladas en los poros grandes, que de todos modos contribuían a G' .

30 Ejemplo 8: Estudio de liberación in vitro

El estudio de liberación in vitro se realizó contextualmente al ensayo de hinchamiento, recogiendo la fase de recepción de cada pocillo en cada tiempo de medición considerado. Todas las muestras procedentes de geles activos basados en alginato se analizaron por RP-HPLC. Además, las muestras seleccionadas también se analizaron por Biacore, un método analítico más específico y sensible, en un intento de encontrar una confirmación de los resultados obtenidos por RP-HPLC.

40 Antes de comenzar con este experimento, se evaluó la viabilidad de la prueba. En particular, se investigó la recuperación del FGF-18 en el sistema de placa de pocillos. De hecho, se sabe a partir de estudios previos que la proteína tiende a adherirse a diferentes materiales plásticos, tales como poliestireno y membranas. La recuperación de una cantidad conocida de FGF-18 libre se evaluó en diferentes condiciones experimentales. Se ensayaron los posibles efectos positivos de la presencia de tensioactivo F68 y/o del pretratamiento de los pocillos con una solución concentrada de HSA o FGF-18. El experimento se realizó añadiendo una solución de FGF-18 en una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ en los insertos y en cada pocillo en las siguientes soluciones:

- 45 - a) solución de HSA al 1% en peso en PBS,
 - b) solución de HSA al 1% en peso en PBS+F68,
 - c) y d) lo mismo que a) y b), pero pretratando el pocillo con una solución concentrada de HSA,
 - e) y f) lo mismo que a) y b) pero pretratando el pocillo con un volumen concentrado de FGF-18.

50 Después de la incubación a 37°C durante 16 horas, se analizaron las fases en los pocillos y en las cestas y la recuperación fue de alrededor de 75% para todas las muestras. Por lo tanto, ninguna de las estrategias para mejorar los ensayos tuvo un efecto positivo significativo, ya que la recuperación era comparable. La liberación in vitro se llevó a cabo entonces utilizando una solución de HSA al 1% en peso en PBS con F68 0,25 g/l como fase receptora.

Se llevaron a cabo experimentos manteniendo los geles con incubación durante 30 días. No se detectó FGF-18 en ninguna de las fracciones recogidas por HPLC o Biacore. Esto sugiere que la proteína está atrapada en la matriz de gel durante el periodo de observación.

5 Se pueden esperar estos resultados teniendo en cuenta la fuerte interacción que ocurre entre el FGF-18 y el alginato. De hecho, considerando la estructura de las dos moléculas, es probable que ocurran interacciones tanto iónicas como hidrófobas. Además, FGF-18 es una proteína de unión a heparina que muestra interacciones secundarias de alta energía con la heparina. El alginato es un carbohidrato natural con una estructura molecular similar a la heparina, por lo tanto, es muy probable que tenga lugar una interacción secundaria muy fuerte entre las dos macromoléculas.

10 Para confirmar esto, se llevaron a cabo experimentos de separación, que muestran que solo las columnas cromatográficas recubiertas con HIC o heparina eran capaces de separar el FGF-18 del alginato.

Ejemplo 9: Ensayo in vitro de invasión celular

15 La administración de FGF-18 en formulaciones capaces de crear una estructura 3D después de la inyección, como es el caso de los hidrogeles basados en alginato, tiene el propósito de localizar la molécula activa (API) en el sitio de inyección. Al mismo tiempo, la formulación crea un andamio en el que se puede anclar el cartílago en crecimiento. Por esta razón, un requisito importante para el gel basado en alginato seleccionado es la compatibilidad del material con las células condrocitos y la capacidad de ser invadido por las células. Por lo tanto, se llevó a cabo un estudio sobre las propiedades de invasión celular, citotoxicidad y quimiotaxis de formulaciones alternativas basadas en hidrogeles formadores in situ cargados con FGF-18.

20 El ensayo de invasión celular in vitro se realizó con dos líneas celulares de condrosarcoma, la línea celular condrogénica murina ATDC5 y la línea celular de condrosarcoma humano CRL-7891, comúnmente utilizadas para estudiar el comportamiento de los condrocitos. Los experimentos se realizaron en geles preparados a partir de soluciones líquidas de alginato al 3% en peso o 4% en peso que contenían 0, 1 o 2 µg/ml de colágeno tipo I y 54 µg/ml de FGF-18.

25 La invasión celular se controló después de 24, 48, 72 y 144 horas de incubación. El gel se retiró del pocillo y se cortó una lámina, se colocó en un vidrio y se observó al microscopio Axiovert 200 con objetivo Zeiss A-Plan 10x/0,25. De esta manera, era posible analizar una sección de gel y localizar las células a diferentes niveles de profundidad de penetración. Se capturaron y procesaron imágenes mediante el Software AxioVision 4.2. Algunas muestras también se analizaron mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM), utilizando un Olympus FV10, disponible por un período limitado para uso de demostración. Para estos experimentos, los geles se trataron con una solución de rodamina B en PBS en una concentración de 0,2 µg/ml, añadida al medio en el pocillo, 1 hora antes del análisis. La rodamina B se usó para teñir las células, que luego se visualizaron excitando las muestras con un láser a 553 nm.

30 La invasión celular en geles basados en alginato con solución líquida de polímero al 3% en peso o al 4% en peso, con o sin colágeno, se controló a las 24, 48, 72 y 144 horas. En cada tiempo de medición, se cortó una lámina de gel para observar la sección del gel (datos no mostrados). La primera observación fue una buena compatibilidad de las formulaciones con las células, ya que los geles basados en alginato parecían no ser tóxicos para ambas líneas celulares, lo que mostraba un comportamiento comparable incluso procediendo de diferentes especies (ratón y humano).

35 En formulaciones con geles de alginato al 4% en peso, se encontraron más células y grupos de células dentro del gel. Se puede observar un comportamiento diferente para los geles de alginato al 4% en peso que contienen 2 µg/ml de colágeno tipo I. Más células invadieron el gel en comparación con las otras formulaciones. Además, las células no crearon grupos, pero aparecían bien distribuidas a lo largo del gel como células individuales y bien separadas. Su aspecto parecía poner de manifiesto que estaban en condiciones sanas. Finalmente, se observó que penetraban en la matriz de gel con el tiempo. Al comparar el gel al 4% en peso, con colágeno 2 µg/ml y sin colágeno, se observó que la invasión era más rápida y más homogénea en presencia de colágeno (véase la Figura 9). El análisis llevado a cabo por CLSM confirmó la capacidad de las células para invadir la matriz de gel.

Ejemplo 10: Ensayo ex vivo en un modelo animal

La terapia basada en estas formulaciones de alginato puede combinarse con la estrategia de microfractura. Por lo tanto, para demostrar la compatibilidad de los geles con esta técnica, se requirió un estudio preliminar sobre un modelo animal ex vivo y para ese propósito se utilizó una rodilla de vaca.

50 Se realizaron experimentos en el alginato al 4% en peso con gel candidato con colágeno tipo I, 2 µg/ml. Este gel se seleccionó entre los otros candidatos, ya que mostró los resultados más prometedores en términos de invasión celular como se ha mostrado antes.

55 Se hicieron agujeros tanto en la parte superior de la tibia como en la parte inferior del fémur, que tenían las mismas dimensiones esperadas para una cirugía de microfractura (1 cm de profundidad x 4 mm de diámetro). Luego, los agujeros se llenaron con el gel candidato, se inyectó con un conector de jeringas que mezclaba la solución de alginato y la solución de calcio en el momento de la inyección, respectivamente. Esto permitía obtener instantáneamente un

gel homogéneo, sin ningún fenómeno de goteo. Las inyecciones se realizaron tanto en posición derecha como invertida, confirmando que en ambos casos el gel permanecía dentro del agujero y no se observaba goteo de material. La articulación también se sometió a sacudidas y movimientos rápidos, lo que demuestra que los geles estaban bien fijados dentro de los agujeros y no se observó pérdida de material. Después la articulación con los geles inyectados se evaluó tras 2 horas de incubación a 37°C: el gel todavía llenaba todo el agujero y, una vez retirado, parecía de color ligeramente rojo, lo que indica que la sangre que salió de la fractura fue absorbida por el gel

5

Estos resultados preliminares sugieren la viabilidad de la formulación de alginato en la estrategia de microfractura.

Ejemplo 11: Bioensayo in vitro

El ensayo de proliferación celular, realizado como se describe en la sección de métodos, mostró que el FGF-18 atrapado en el gel es bioactivo con una curva clara de dosis-respuesta, como se muestra en la Figura 10.

10

Conclusión

Los geles sensibles a iones se obtuvieron a partir de alginato de sodio tras la adición de cloruro de calcio como agente de reticulación, mientras que los geles termosensibles se obtuvieron a partir de quitosano con la adición de β -GP para ajustar el pH sin ninguna precipitación del polímero.

15 Las formulaciones basadas en alginato o quitosano se ensayaron a diferentes concentraciones de polímeros y se consideró la adición de otros excipientes para ajustar el pH y la osmolalidad de las formulaciones y, en algunos casos, favorecer el proceso de gelificación.

Los resultados del tiempo de gelificación mostraron que los geles basados en alginato presentaban una gelificación extremadamente rápida y reproducible en comparación con el quitosano. Por lo tanto, se seleccionaron geles de alginato para su posterior desarrollo.

20

Se seleccionaron cuatro formulaciones de gel candidatas para la caracterización en términos de propiedades mecánicas, hinchamiento, liberación in vitro e invasión celular, formadas por la adición de una solución de cloruro de calcio 10 mg/ml a una solución de alginato que contiene 3% o 4% en peso de alginato, 1 o 2 μ g/ml de colágeno tipo I, sacarosa 70 mg/ml y FGF-18 54 μ g/ml. La relación de volumen de solución de alginato a volumen de calcio era 2:1.

25 Las propiedades mecánicas de los geles candidatos no se vieron afectadas por la concentración de colágeno o la concentración de FGF-18 al menos hasta 540 μ g/ml. Este es un objetivo importante ya que la concentración objetivo para el FGF-18 en el hidrogel aún no está determinada, lo que permite la posibilidad de formular FGF-18 en estas matrices en un amplio intervalo de concentraciones sin afectar a las características del gel final. No se observaron diferencias importantes en el módulo elástico, G', de los geles de alginato al 3% en peso y al 4% en peso, presentando todos valores comprendidos entre aproximadamente 300 y 500 Pa, presentando los valores más altos los geles al 4% en peso.

30

Todos los geles candidatos mostraron los mismos perfiles de hinchamiento, lo que indica procesos similares de hidratación y degradación. La única diferencia estaba en los valores absolutos, ligeramente más altos para el gel de alginato al 4% en peso. Este resultado está de acuerdo con las micrografías de SEM que ponían de manifiesto una mayor dimensión de poros para estos geles.

35

Después de 15 días de incubación a 37°C en líquido sinovial simulado, todos los candidatos mostraron un primer proceso de degradación indicado por un aumento de peso. De hecho, la degradación inicial de la red generalmente conduce a una estructura más floja que puede, por lo tanto, acomodar mayores cantidades de agua. Después de 1 mes, la degradación continua de la red conduce al inicio de una erosión de gel macroscópica, indicada por una pérdida de peso lenta. Por cierto, después de 50 días de observación, los geles todavía no están completamente erosionados, como lo indica la presencia de algo de gel dentro de las cestas porosas (valor de la relación de hinchamiento a los 50 días) (Lo Presti C. et al., 2011; Dang et al., 2011).

40

Se desarrolló un ensayo de invasión celular. La formulación de gel que muestra los resultados de invasión celular más prometedores contenía alginato al 4% en peso y colágeno 2 μ g/ml. Esta formulación, entonces, se seleccionó para un experimento ex vivo sobre las propiedades de adherencia del gel. Estos experimentos ex vivo, llevados a cabo en una articulación de vaca, mostraron que el gel de alginato candidato puede inyectarse, usando un inyector doble para las soluciones de alginato y calcio, ya sea en dirección ascendente o descendente sin goteo. Además, el gel mostró que se llenaba perfectamente y se adhería a los agujeros del cartílago imitando la situación de microfractura (datos no mostrados).

45

Los ensayos de proliferación celular mostraron que el FGF-18 atrapado en el gel es bioactivo con una curva clara de dosis-respuesta. Como después de 50 días de observación, los geles todavía no están completamente degradados y puesto que los experimentos de liberación in vitro no mostraban ninguna evidencia de FGF-18 liberado en el líquido sinovial simulado, esto sugiere que el FGF-18 permanecerá en el gel y, por lo tanto, probablemente será más eficiente a largo plazo al actuar sobre las células que han migrado en el gel. Estos resultados son, por lo tanto, prometedores.

50

Ejemplo 12: formulación liofilizada

Después de la preparación de la solución líquida de polímero que contiene FGF18, azúcar (sacarosa) y colágeno tipo I (véase el ejemplo 2), la solución se distribuyó en viales. Cada vial (Fiolax Clear de 10 ml 45x24, forma vitrum SCHOTT) se llenó con 2 ml de solución líquida de polímero. Todos los viales llenos se sometieron al proceso de liofilización. En detalles, el proceso preveía las siguientes etapas:

- 5 - Fase de enfriamiento de 25°C a -40°C durante 1 hora, donde comienza la congelación del producto
- Fase de congelación a -40 °C durante 4 horas, donde el producto se mantiene congelado
- Fase de vacío, con disminución drástica de la presión hasta vacío
- 10 - Primera fase de secado, con una temperatura que va de -40°C a -10°C durante 30 minutos y luego se mantiene a -10°C durante 10 horas
- Segunda fase de secado, con una temperatura que va de -10°C a 21°C durante 30 minutos y luego se mantiene a 21°C durante 34 horas
- Tercera fase de secado, con una temperatura que va de 21°C a 37°C durante 16 minutos y luego se mantiene a 37°C durante 20 horas.

15 Una vez finalizado el proceso de liofilización, los viales se cerraron con tapones y se almacenaron a 2-8°C. El producto liofilizado debe reconstituirse antes de usarlo para la inyección. Debe equilibrarse a temperatura ambiente, luego se inyectan 2 ml de WFI (agua para inyección) en el vial, que luego se agitaba y se movía para facilitar la reconstitución de la torta. El sistema se deja disolver y homogeneizar durante 30 minutos, antes de que esté listo para la inyección.

20 La formulación liofilizada después se sometió a un estudio de estabilidad de 3 meses a 3 temperaturas diferentes: las condiciones normales de almacenamiento a 5°C, a 25°C para realizar la estabilidad acelerada y en condiciones de estrés de 40°C. Los análisis se llevaron a cabo a las 0, 2, 4, 8 y 12 semanas, después de la reconstitución de las muestras con 2 ml de agua. Se siguieron los siguientes parámetros:

- pH
- contenido de humedad
- 25 • Contenido de FGF18
- Contenido de alginato
- Distribución de MW del alginato
- Viscosidad
- Propiedades mecánicas
- 30 • Capacidad de invasión celular

A continuación, los principales resultados hasta 12 semanas.

35 pH: No se registraron variaciones significativas en el valor de pH de la formulación durante el tiempo de incubación a las tres temperaturas diferentes. El pH de la formulación FD es más alto que el del líquido (probablemente debido al procedimiento de filtración y liofilización al que fue sometido), pero no cambiaba con el tiempo. Los datos presentados en la figura 12 sugerían que la formulación es estable en condiciones normales de almacenamiento hasta 12 semanas.

40 Contenido de humedad: El contenido de humedad residual estaba siempre dentro de los criterios de aceptación (3%). El valor era constante para la formulación almacenada a 2-8°C, mientras que aumentaba ligeramente con el tiempo a 25°C después de 12 semanas de incubación, y aún más a 40°C ya después de 2 semanas, como se esperaba. Los datos (véase la figura 13) sugerían que la formulación es estable en condiciones normales de almacenamiento hasta 12 semanas.

45 Contenido de FGF18: No se observó una variación significativa en el contenido de FGF18 en la formulación a lo largo del tiempo a las tres temperaturas diferentes, con un contenido total ligeramente inferior a la concentración objetivo de 54 µg/ml, probablemente debido a la pérdida de material durante las diferentes etapas de fabricación, y en particular durante la filtración. Las diferencias observadas en los diferentes tiempos de medición probablemente se debían a la variabilidad del método, aún en desarrollo, al hecho de que la cantidad de FGF18 era cercana al límite de detección del método, y también a la variabilidad del contenido del vial, como lo demuestra también la DEV STD significativa de los resultados: de hecho, la alta viscosidad de la solución no permitía un volumen de llenado bien preciso operado a

escala de laboratorio. En general, los datos sugerían que la formulación es estable en condiciones normales de almacenamiento hasta 12 semanas (véase la figura 14).

5 Contenido de alginato: No se observaron cambios significativos en el contenido de alginato a lo largo del tiempo en las tres temperaturas diferentes. Las variaciones observadas se debían lo más probablemente a la variabilidad del método, aún en desarrollo, y a la variabilidad en el contenido del vial, ya que la viscosidad de la solución no permitía obtener un proceso de llenado bien preciso a escala de laboratorio. Los datos, según la figura 15, sugerían que la formulación es estable en condiciones normales de almacenamiento hasta 12 semanas.

10 Distribución de MW del alginato: No se observaron cambios en los perfiles cromatográficos y, por lo tanto, en la distribución global de pesos moleculares del polímero, de la formulación a lo largo del tiempo a las tres temperaturas diferentes: el pico indicaba una distribución de MW ancha, de más de 870 kDa a aproximadamente 40 kDa, con un máximo de aproximadamente 520 kDa. La distribución de MW se evaluó por comparación con patrones de referencia con MW bien determinado. El pequeño hombro detectado en la parte izquierda del pico era atribuible al colágeno. Los datos sugerían que la formulación es estable en condiciones normales de almacenamiento hasta 12 semanas (datos no mostrados).

15 Viscosidad: Se observó una ligera disminución en la viscosidad de la formulación con respecto al tiempo cero para las muestras almacenadas a 25°C y 40°C, debido a las condiciones de degradación aceleradas, mientras que no se observaron diferencias significativas para las muestras almacenadas en condiciones normales (2-8°C): las variaciones observadas probablemente estaban relacionadas con la variabilidad del método y del proceso de llenado. Los datos sugerían que la formulación es estable en condiciones normales de almacenamiento hasta 12 semanas (véase la figura 16).

20 Propiedades mecánicas: La formulación de alginato FD, reconstituida con agua en cada tiempo de medición del estudio de estabilidad, se usó para formar el hidrogel, mezclándolo con una solución de cloruro de calcio. Se investigaron las propiedades mecánicas del hidrogel obtenido. No se observaron cambios en el módulo de almacenamiento G' y, por lo tanto, en las propiedades mecánicas a lo largo del tiempo a las tres temperaturas diferentes. Los resultados presentados en la figura 17 sugerían que la formulación es estable en condiciones normales de almacenamiento hasta 12 semanas.

30 Capacidad de invasión celular: La formulación de alginato FD, reconstituida con agua en cada tiempo de medición del estudio de estabilidad, se usó para formar el hidrogel, mezclándolo con una solución de cloruro de calcio. Se investigó la capacidad de invasión celular del hidrogel obtenido, incubando los hidrogeles con las células durante 72 horas y luego analizando las muestras por microscopía de barrido de láser confocal. No se observaron variaciones significativas en el número de células vivas capaces de penetrar en la matriz de hidrogel a lo largo del tiempo, considerando las muestras almacenadas en las mismas condiciones de temperatura (datos no mostrados). En cada tiempo de medición, las muestras almacenadas a 40°C mostraron un mayor número de células que penetraban que las muestras almacenadas a 2-8°C, lo que sugiere que la incubación a alta temperatura causaba una alteración parcial de la matriz polimérica. Los datos sugerían que la formulación es estable en condiciones normales de almacenamiento hasta 12 semanas.

35 Conclusión: La formulación de alginato liofilizado mostró una buena estabilidad en condiciones normales de almacenamiento (2-8°C) hasta 12 semanas, y parecía ser al menos tan estable como la formulación líquida correspondiente.

40 Tablas

Tabla 1: Composición de las soluciones líquidas de polímero y de calcio de cuatro formulaciones basadas en alginato candidatas

Formulaciones candidatas	CaCl ₂ (S ₂) (mg/ml)	Solución líquida de polímero (alginato) en agua milliQ (S ₁)						S ₁ :S ₂ (v:v)	Gel final	
		Alginato (% en peso)	Sacarosa (mg/ml)	Colágeno (µg/ml)	FGF-18 (µg/ml)	pH	Osm (mOsm/kg)		FGF-18 (µg/ml)	pH
1	10	4	70	1	54	6,9	315	2:1	36	7
2	10	4	70	2	54	7,3	318	2:1	36	7
3	10	3	70	1	54	6,9	296	2:1	36	7
4	10	3	70	2	54	6,9	304	2:1	36	7

Tabla 2: Tiempo de gelificación de formulaciones activas basadas en alginato

Formulaciones candidatas	Tiempo de gelificación a 37°C.	
	Gel preparado en placa de Petri (adiciones posteriores)	Gel preparado con dispositivo conector de jeringas (mezcla)
1	5 min	instantáneo
2	<5 min	instantáneo
3	15 min	instantáneo
4	15 min	instantáneo

Tabla 3: Tiempo de gelificación a 37°C de formulaciones basadas en quitosano seleccionadas

Formulación	Quitosano MW y DD	Quitosano (% en peso)	B-GP (% en peso)	HEC (% en peso)	KH ₂ PO ₄ (mM)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Tiempo de gelificación
I	HMW 75%	1,8	50	/	/	/	/	5 min
II	HMW 75%	2	6,9	/	/	7,2	/	2 h
III	HMW 75%	2	1,2	0,5	/	6,1	/	25 min
IV	HMW 75%	1,5	1,7	0,5	/	6,1	/	13 min
V	HMW 75%	1,5	1,6	0,25	/	6,2	/	19 min
VI	HMW 75%	1,6	1,6	0,25	/	6,3	/	30 min
VII	HMW 75%	1,8	1,5	0,5	/	6,3	/	12 min
VIII	HMW 75%	1,8	1,7	0,1	/	6,4	/	50 min
IX	HMW 95%	1,0	2,5	/	0	6,8	384	24 h
X	LMW 75%	2,0	2,1	/	10	7,0	346	3 h
XI	LMW 75%	2,0	2,5	/	10	6,9	379	2 h

Referencias

1. Ellsworth *et al.*, 2002, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10: 308-320
2. Shimoaka *et al.*, 2002, *JBC* 277(9):7493-7500
3. WO2008023063
4. WO2004032849
5. WO2012172072
6. Ringe J. *Et al.*, 2012, *Nature Reviews Rheumatology* 8(8): 493-498
7. C. Dispenza *et al.*, 2011, *Polym. Chem.*, 2, 192)
8. J.K. Tessmar, A.M. Göpferich, 2007, *Adv. Drug Delivery Rev.* 59:274-291
9. C. Lo Presti *et al.*, 2011, *Reactive & Functional Polymers*, 71: 155–167
10. WO2008063418
11. S.R. Van Tomme *et al.*, 2008, *Int. J. Pharm.* 355: 1-18
12. WO98/16644
13. WO2006/063362
14. Custers *et al.*, 2007, *Osteoarthritis and Cartilage*, 15:1241-1248
15. Rayatpisheh *et al.*, 2011, *J. Biomed. Mater. Res.* 98A :235-244
16. Tsai *et al.*, 1998, *Biotech. Techniques* 12: 21-23
17. Cheng *et al.*, 2010, *Tissue Engineering* 16A:695-703
18. Schuetz *et al.*, 2008, *Eur. J. Pharm.Biopharm.* 68:19-25
19. Yan *et al.*, 2010, *J.Biomater. Appl.* 24:625-637
20. Ahmadi *et al.*, 2008, *J. Biomed. Mater. Res.* 86A:824-832.
21. Hoemann *et al.*, 2007, *J. Biomed. Mater Res.* 83A:521-529
22. Fillion *et al.* 2007, *Biomacromol.* 8:3224-3234
23. Anseth *et al.*, 1996, *Biomaterials* 17:1647-1657
24. Peppas *et al.*, 2000, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50:27-46
25. Dang *et al.*, 2011, *Carbohydrate Polymers* 83: 171–178
26. WO2012113812

Lista de secuencias

- <110> ARES TRADING S.A.
- <120> Formulación de FGF-18 en hidrogeles de alginato/colágeno
- <130> P 13/241
- 5 <150> EP 13199591.2
- <151> 24-12-2013
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1
- <211> 207
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> FGF-18 humano
- 15 <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
- <210> 2
- <211> 170
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 20 <220>

ES 2 806 026 T3

<223> FGF-18 truncado recombinante (esprifermina)

<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

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de gelificación de dos componentes, en donde dicho sistema de gelificación se forma a partir de:
 - a. un primer componente (solución 1) que comprende o consiste en el factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18), alginato, colágeno y un azúcar como agente estabilizante, y
 - 5 b. un segundo componente (solución 2) que comprende o consiste en una sal dicatiónica.
2. Un método para producir un hidrogel homogéneo, que comprende las etapas de:
 - a. preparar una primera solución homogénea que comprende o consiste en el factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18), alginato, colágeno y un azúcar como agente estabilizante,
 - b. preparar una segunda solución que comprende o que consiste en una sal dicatiónica,
 - 10 c. mezclar las 2 soluciones antes de la inyección o coinyección de ambas soluciones para formar el hidrogel.
3. El sistema de gelificación de dos componentes según la reivindicación 1 o el método según la reivindicación 2, en donde el agente estabilizante es sacarosa.
4. El sistema de gelificación de dos componentes o el método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la sal dicatiónica es una sal de calcio, sal de magnesio, sal de cobre o sal de zinc.
- 15 5. El sistema de gelificación de dos componentes o el método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. un polipéptido que comprende o consiste en los restos de aminoácidos 28-207 de la SEQ ID NO: 1,
 - b. un polipéptido que comprende o consiste en los restos de aminoácidos 28-196 de la SEQ ID NO: 1, y
 - c. un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2.
- 20 6. El sistema de gelificación de dos componentes o el método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en las soluciones respectivas, el alginato está en una concentración de 3 a 4% en peso, el colágeno está en una concentración de 1 a 2 mcg/ml, el agente estabilizante está en una concentración de 10 a 100 mg/ml, y la sal está en una concentración de 1 a 20 mg/ml.
- 25 7. El sistema de gelificación de dos componentes o el método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relación de solución 1:solución 2 es 2:1 (volumen a volumen).
8. Un artículo de fabricación que comprende dos recipientes, en donde:
 - a. el primer recipiente comprende o consiste en una primera solución homogénea, en donde dicha primera solución comprende o consiste en el factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18), alginato, colágeno y un azúcar como agente estabilizante, y
 - 30 b. el segundo recipiente comprende o consiste en una segunda solución, comprendiendo o consistiendo dicha segunda solución en una sal dicatiónica.
9. El artículo de fabricación según la reivindicación 8, en donde el agente estabilizante es sacarosa.
10. El artículo de fabricación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde la sal dicatiónica es una sal de calcio, sal de magnesio, sal de cobre o sal de zinc.
- 35 11. El artículo de fabricación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. un polipéptido que comprende o consiste en los restos de aminoácidos 28-207 de la SEQ ID NO: 1,
 - b. un polipéptido que comprende o consiste en los restos de aminoácidos 28-196 de la SEQ ID NO: 1, y
 - c. un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2.
- 40 12. El artículo de fabricación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde en las soluciones respectivas, el alginato está en una concentración de 3 a 4% en peso, el colágeno está en una concentración de 1 a 2 mcg/ml, el agente estabilizante está en una concentración de 10 a 100 mg/ml, y la sal está en una concentración de 1 a 20 mg/ml.
- 45 13. El artículo de fabricación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde la relación solución 1:solución 2 es 2:1 (volumen a volumen).

14. El artículo de fabricación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde el primer recipiente y el segundo recipiente son los dos compartimentos de un sistema de doble cámara o de un dispositivo de inyección de doble aguja.

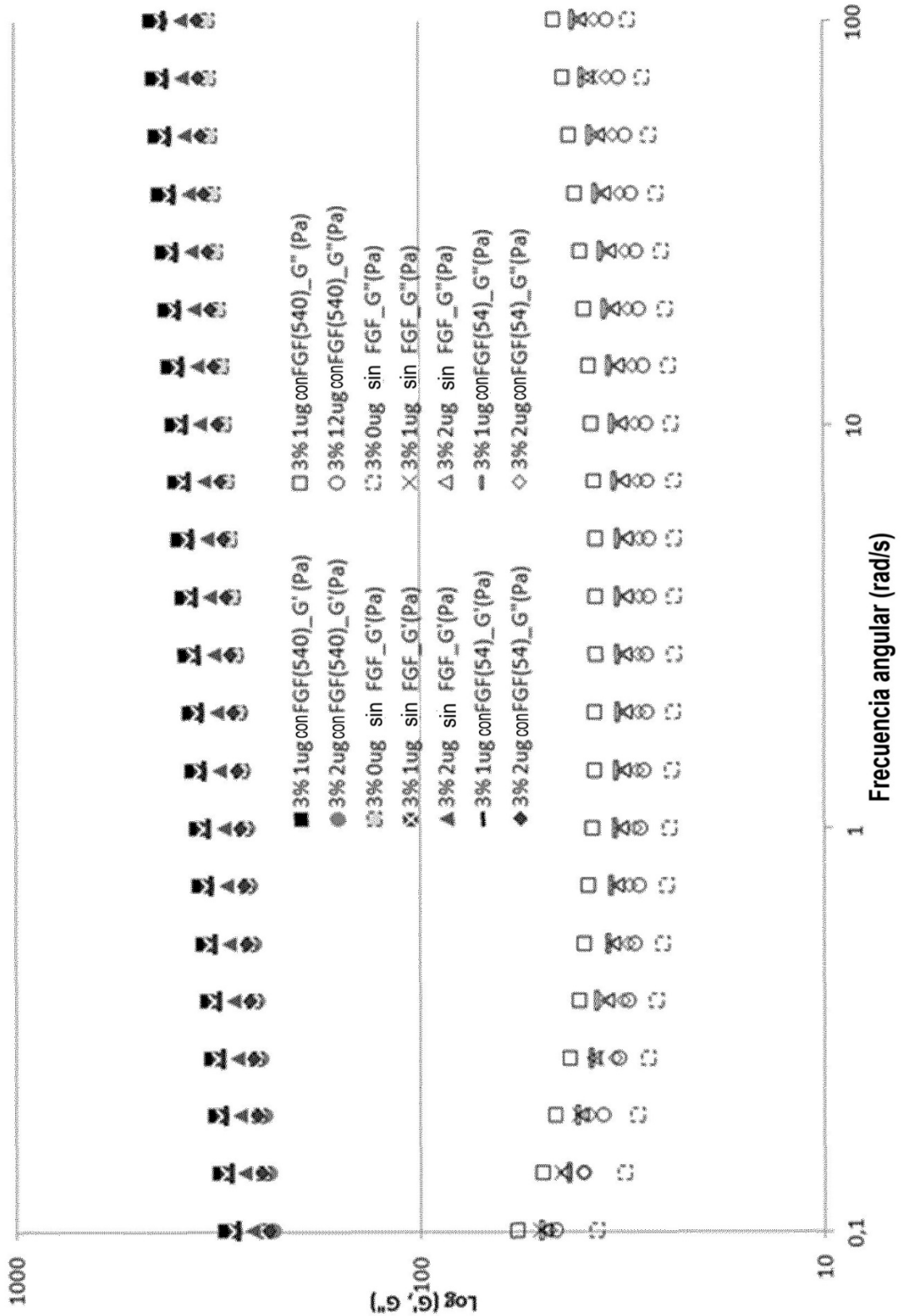


Figura 1

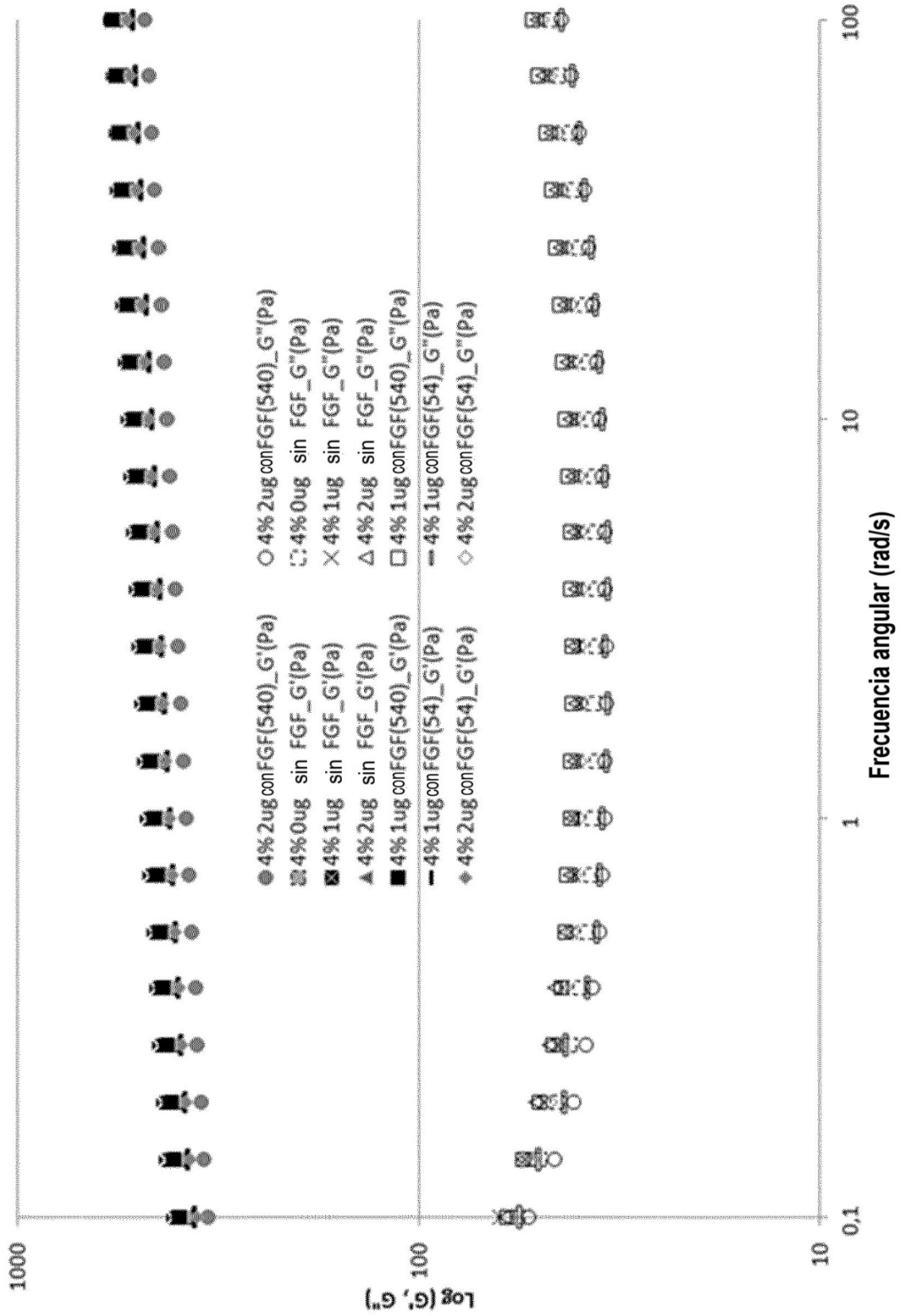


Figura 2

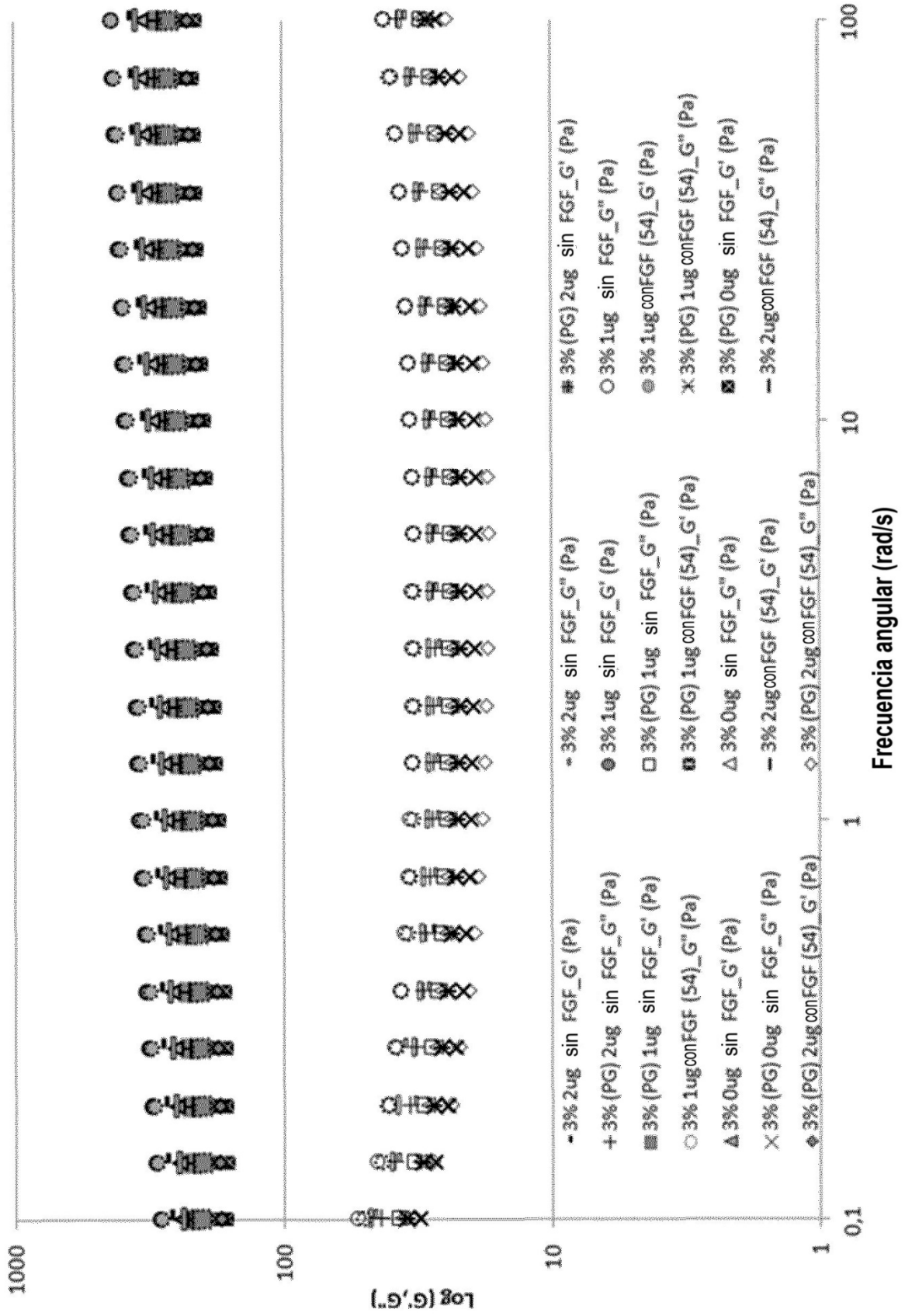


Figura 3

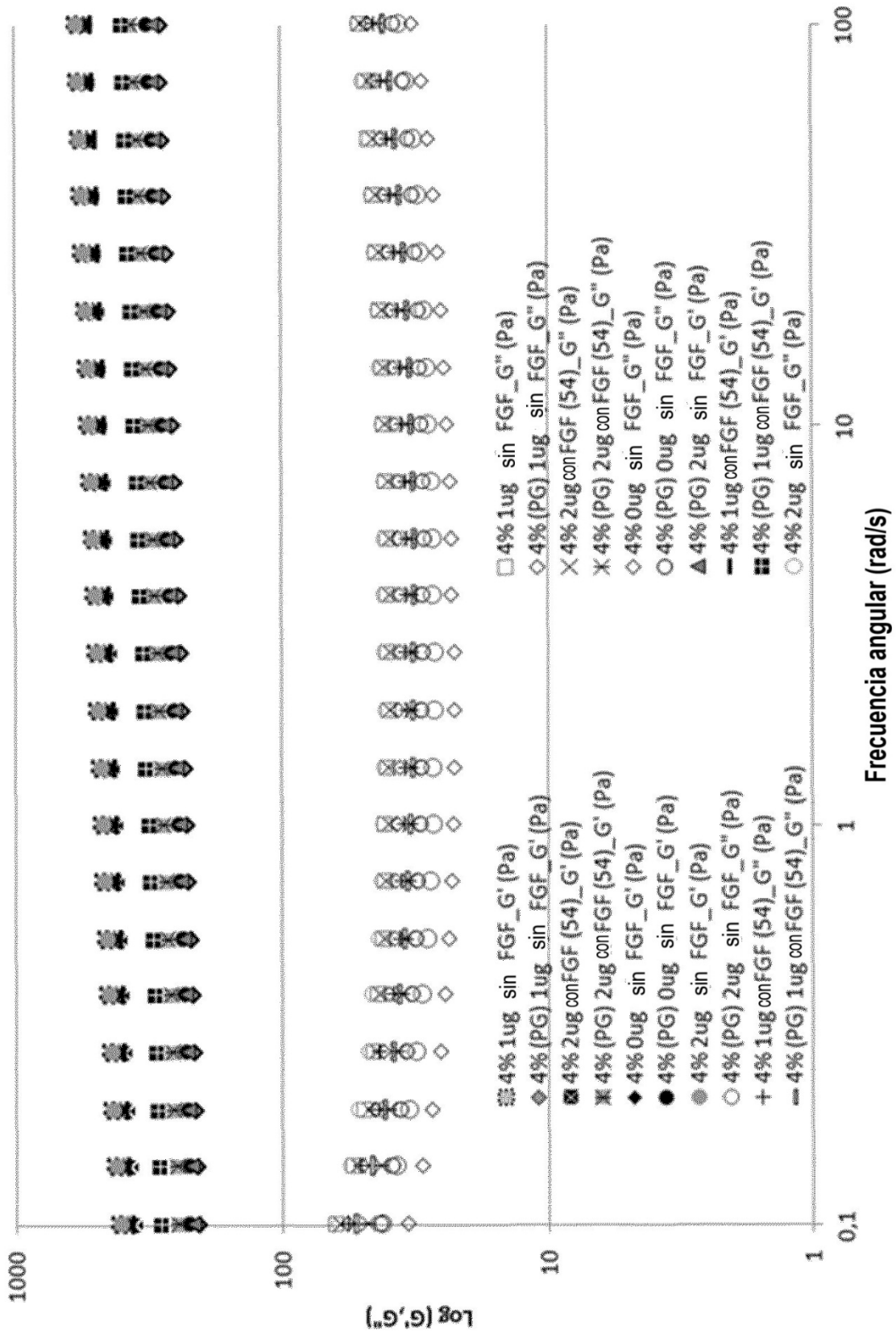


Figura 4

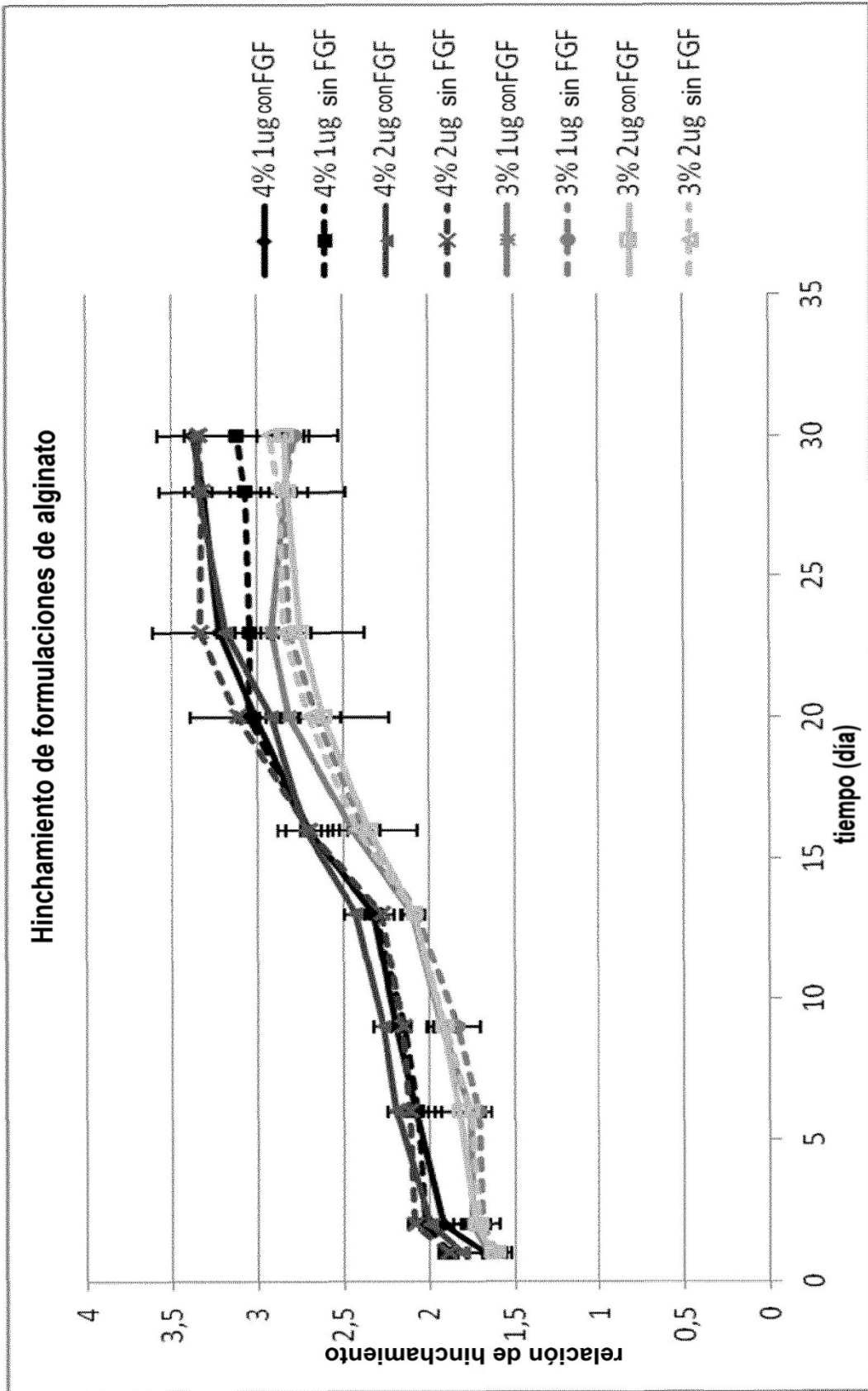


Figura 5

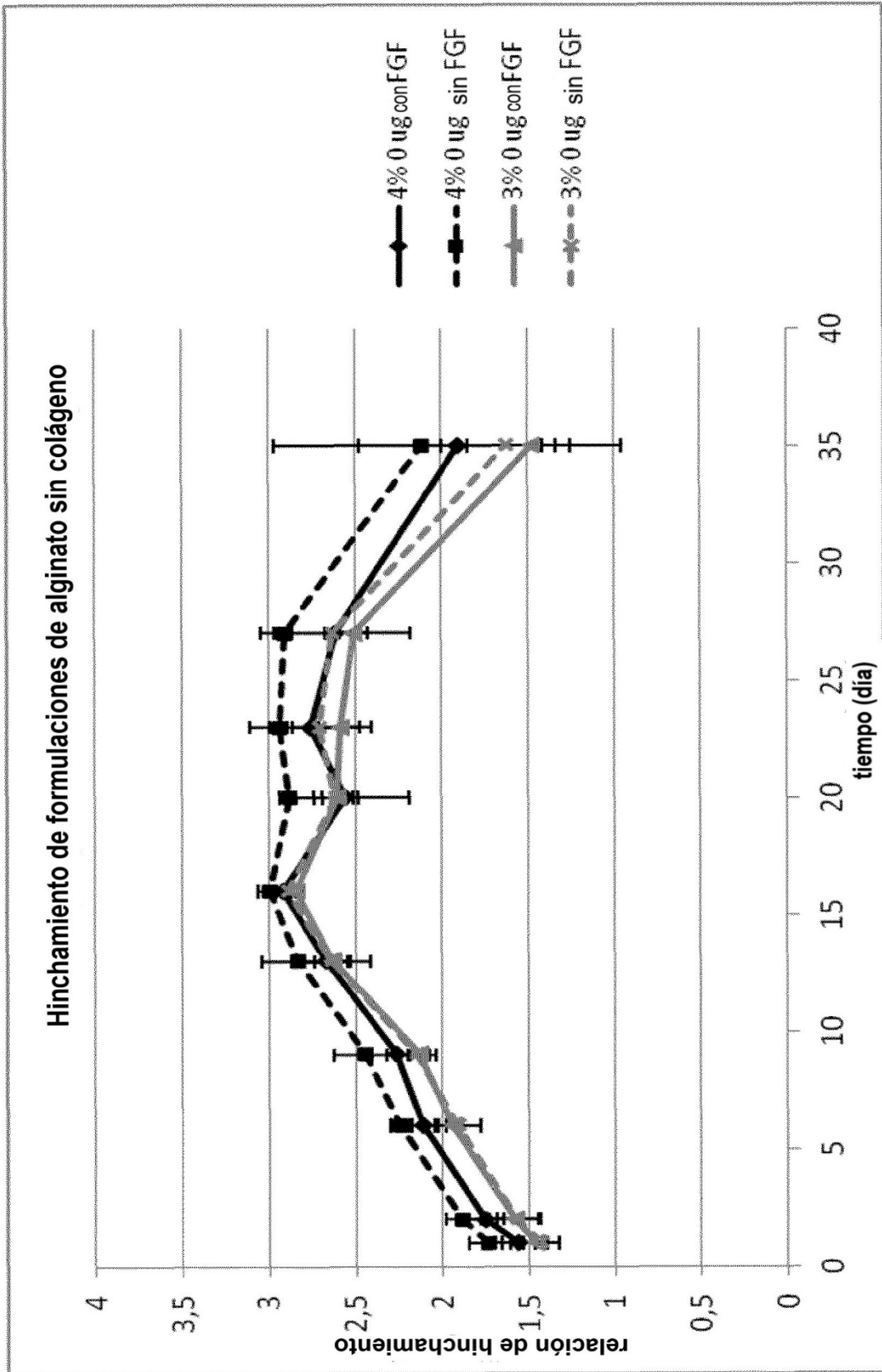


Figura 6

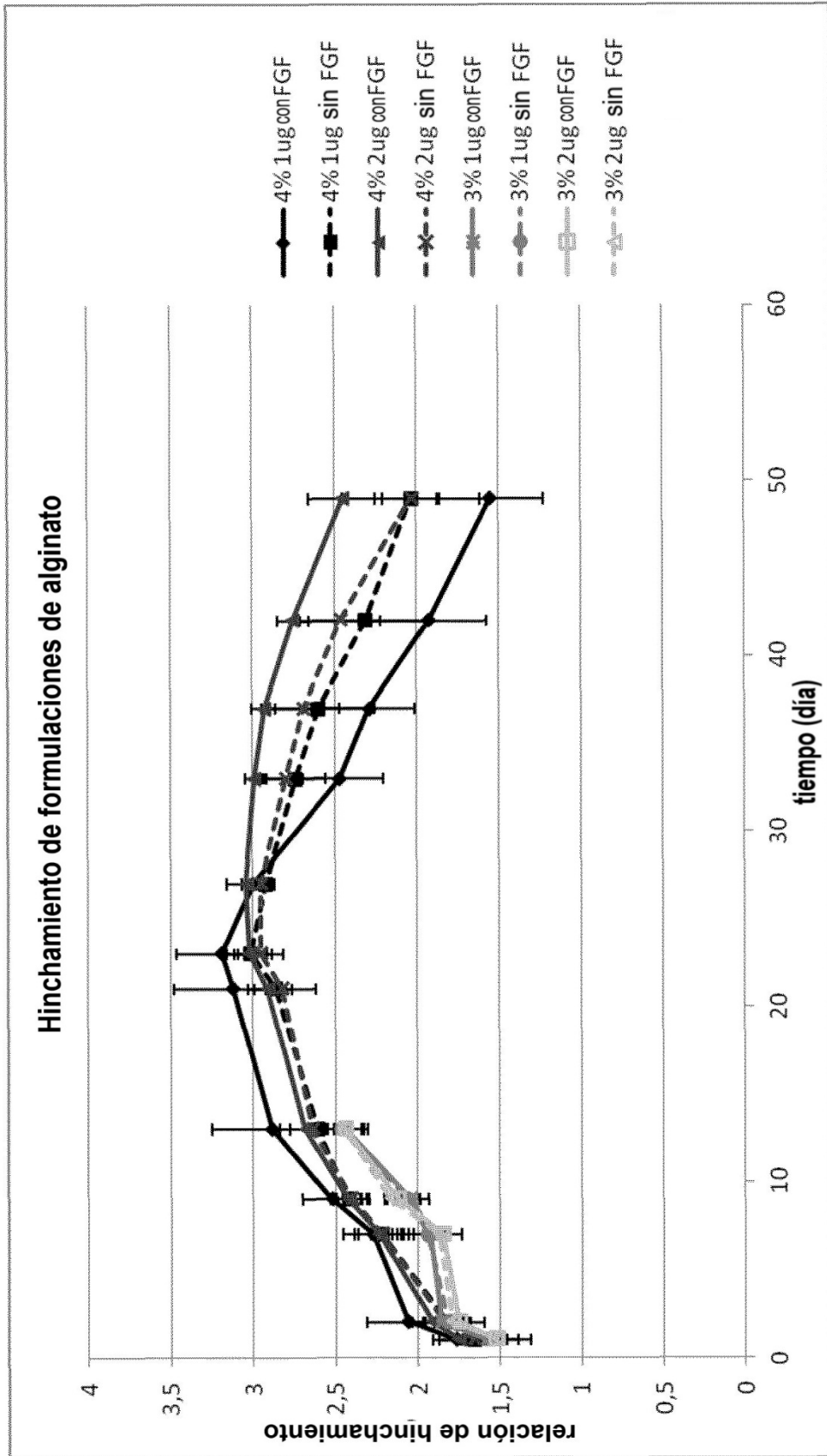


Figura 7

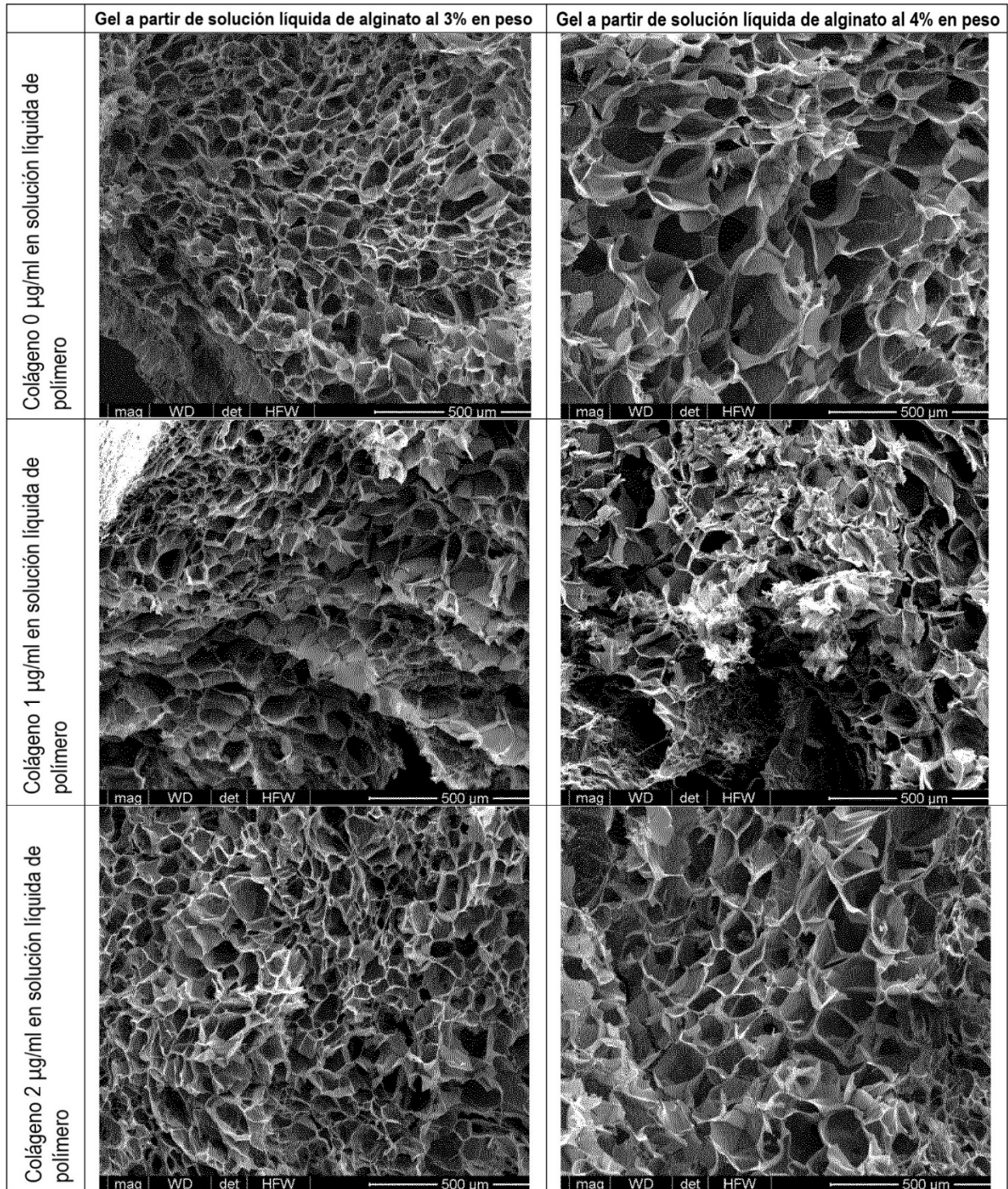


Figura 8

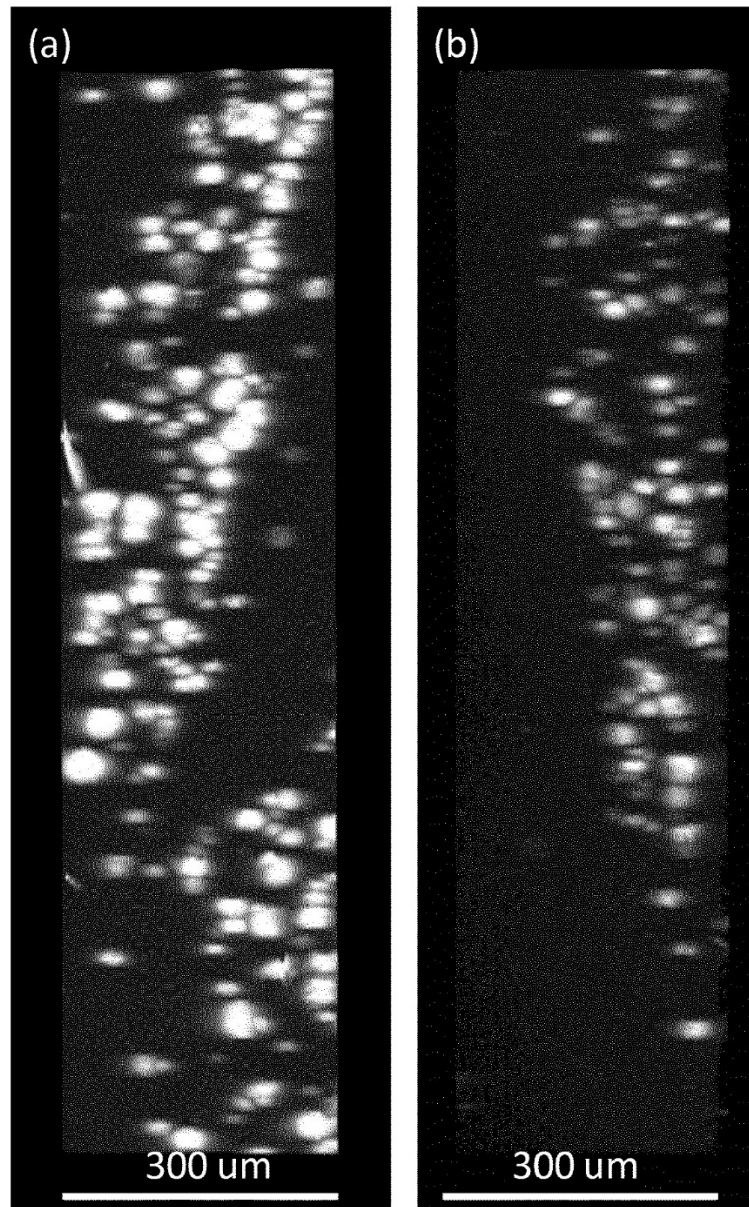


Figura 9

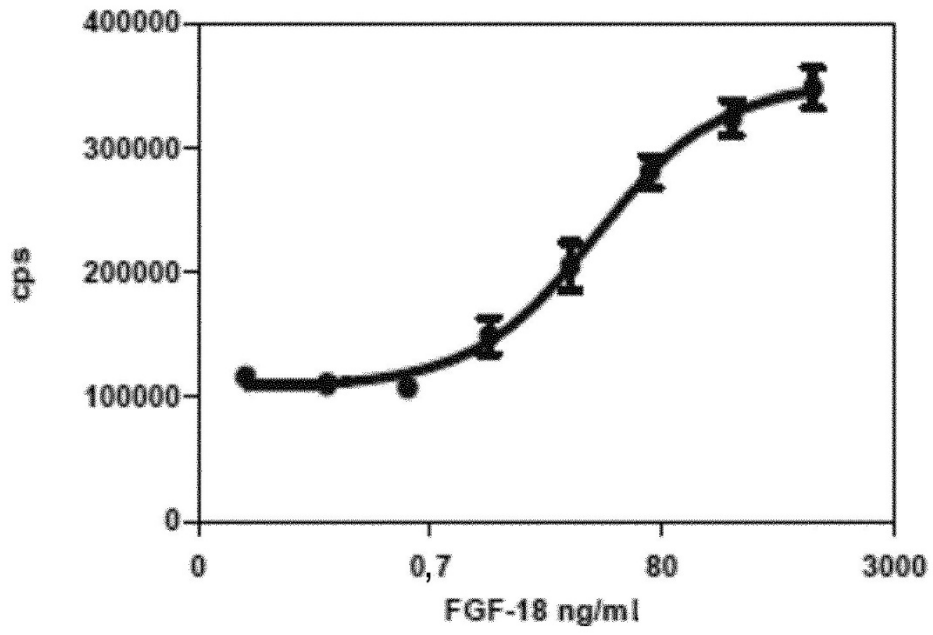


Figura 10

SEQ ID NO:1 (FGF-18 humano)

MYSAPSACTCLCLHFLLLCFVQVQLVAEENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRISA
RGEDGDKYAQLLVETDTFGSQVRIKGGKTEFYLCMNRKGLVGKPDGTSKECVFIEKVLNNYTALMSAKYSGWY
VGF'KKGRPRKGPKTRENQQDVHFMKRYPKGQPELQKPFKYTTVTKRSRRIRP'HPA

Figura 11 a

SEQ ID NO:2 (esprifermina)

MEENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRISARGEDGDKYAQLLVETDTFGSQVRIK
KTEFYLCMNRKGLVGKPDGTSKECVFIEKVLNNYTALMSAKYSGWYVGF'KKGRPRKGPKTRENQQDVHFMK
RYPKGQPELQKPFKYTTVTK

Figura 11 b

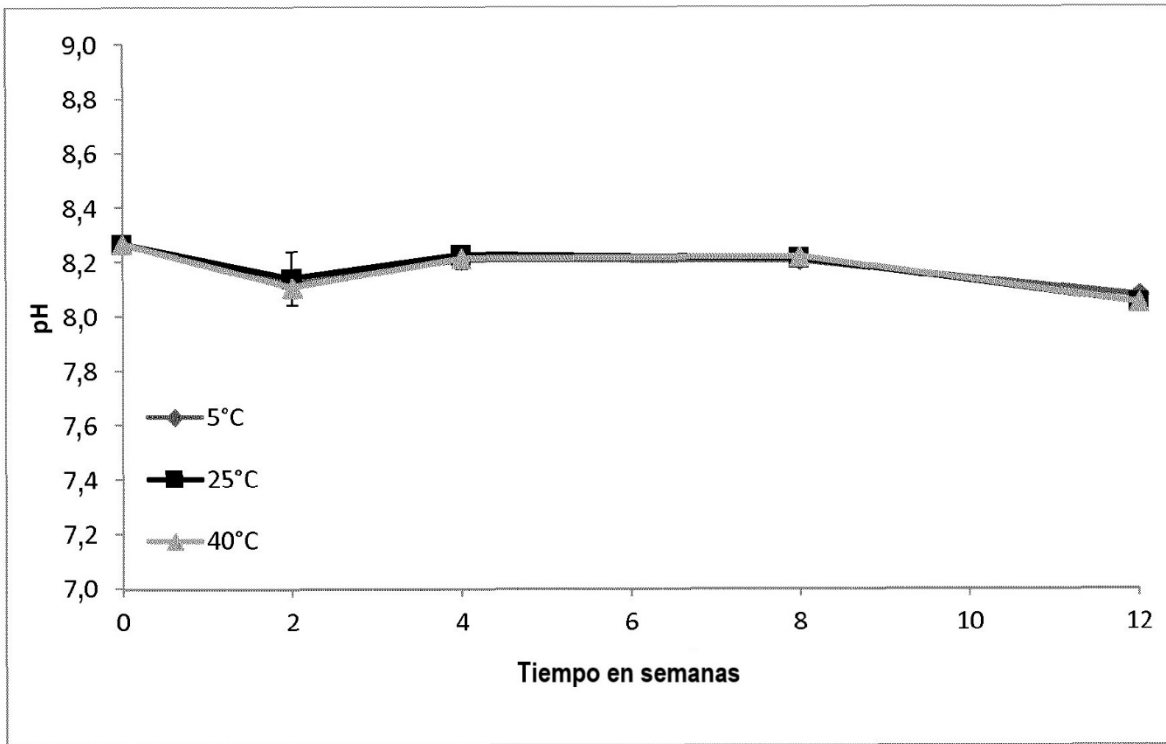


Figura 12

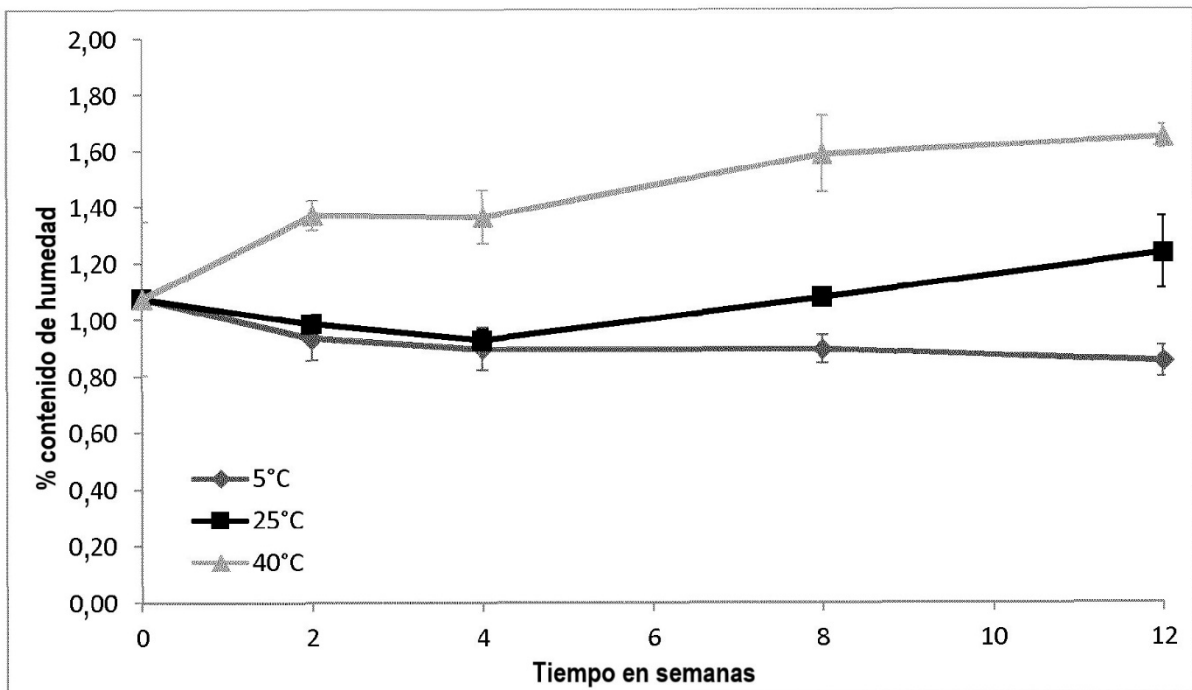


Figura 13

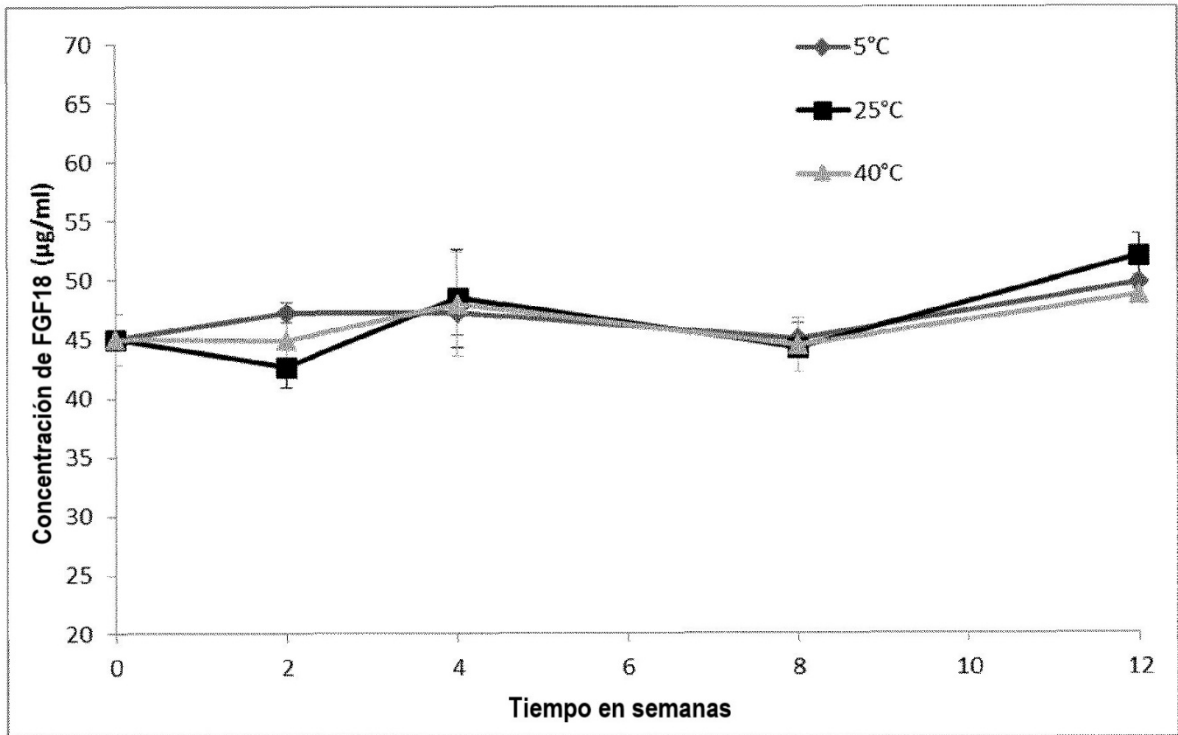


Figura 14

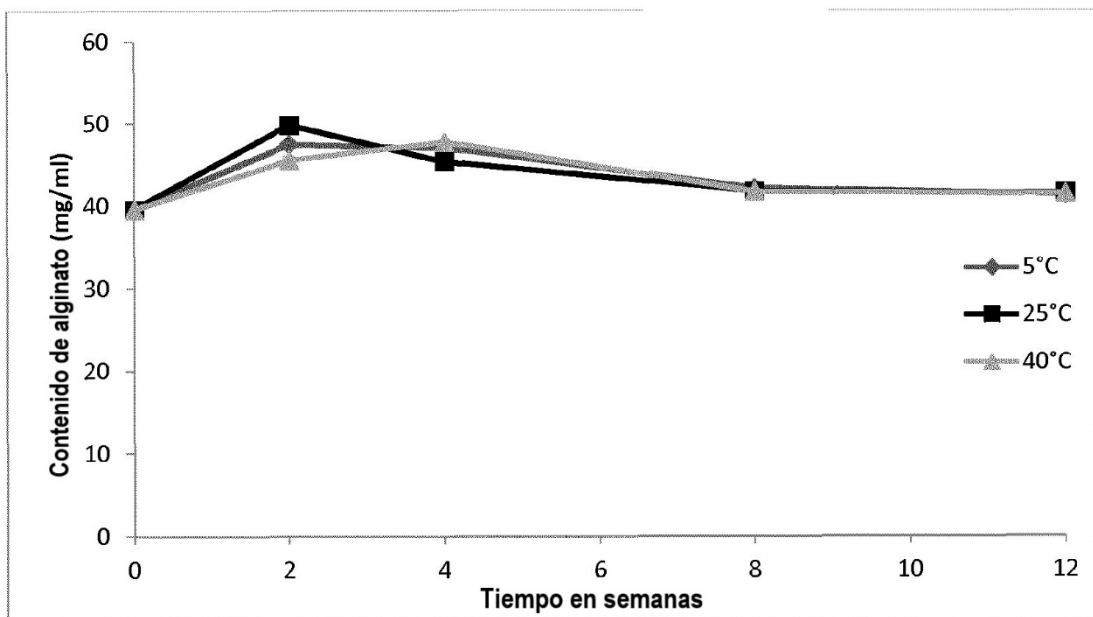


Figura 15

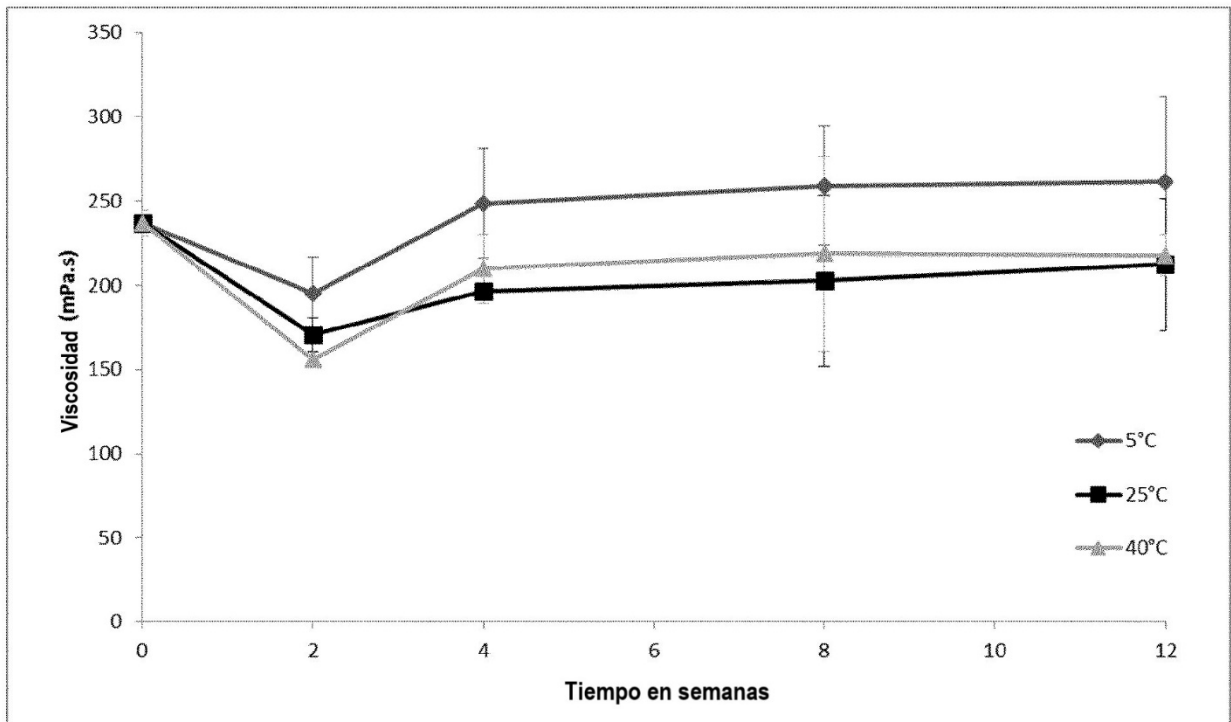


Figura 16 a

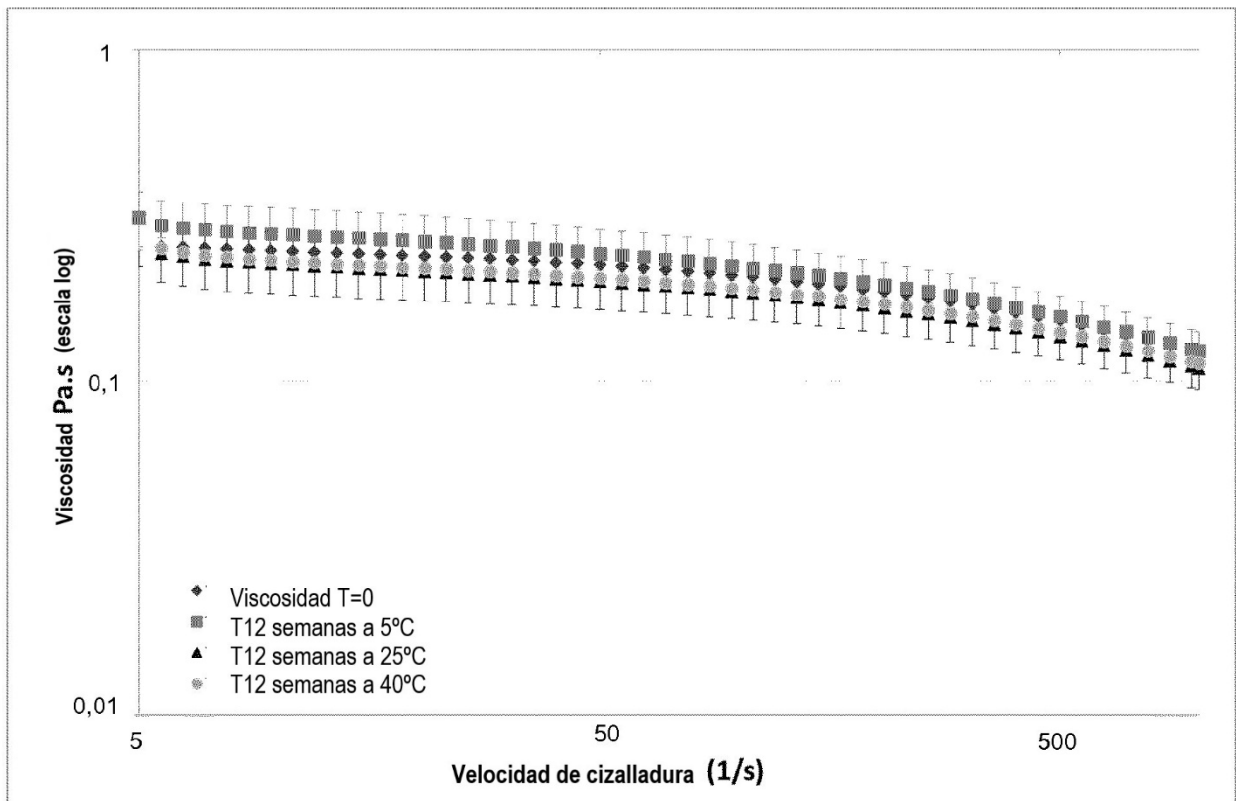


Figura 16 b

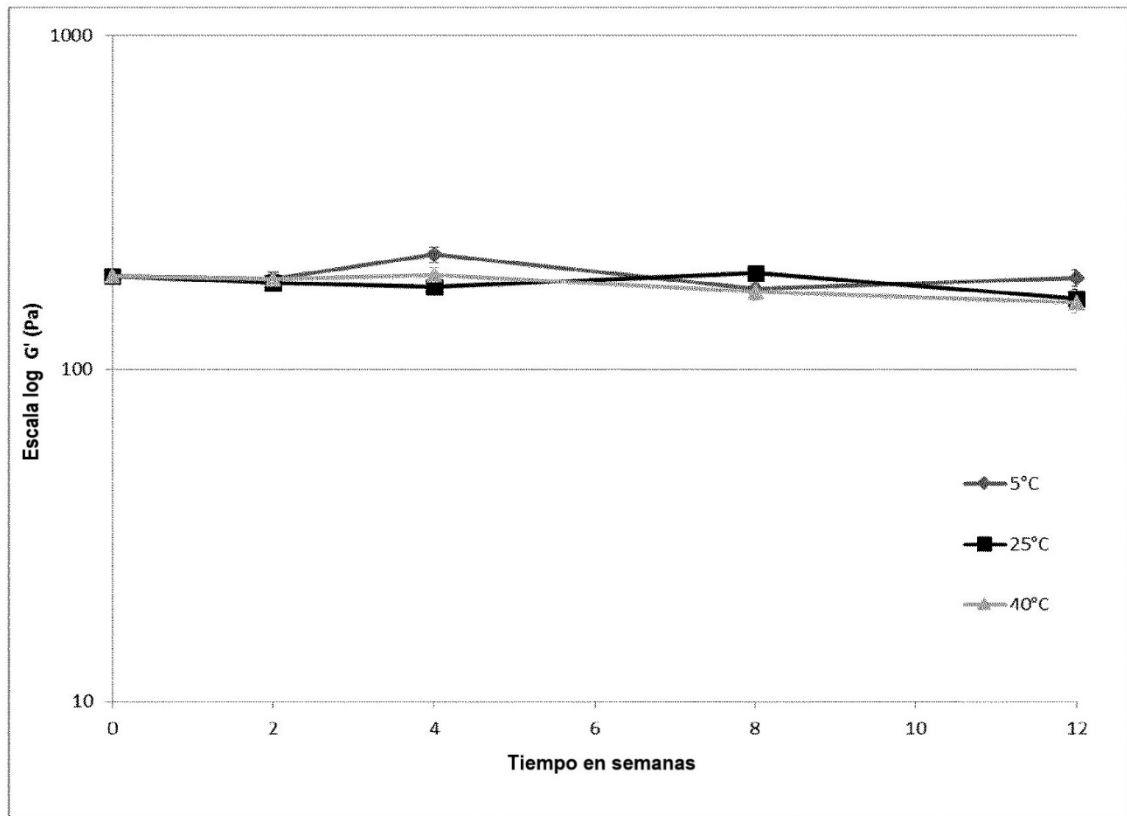


Figura 17 a

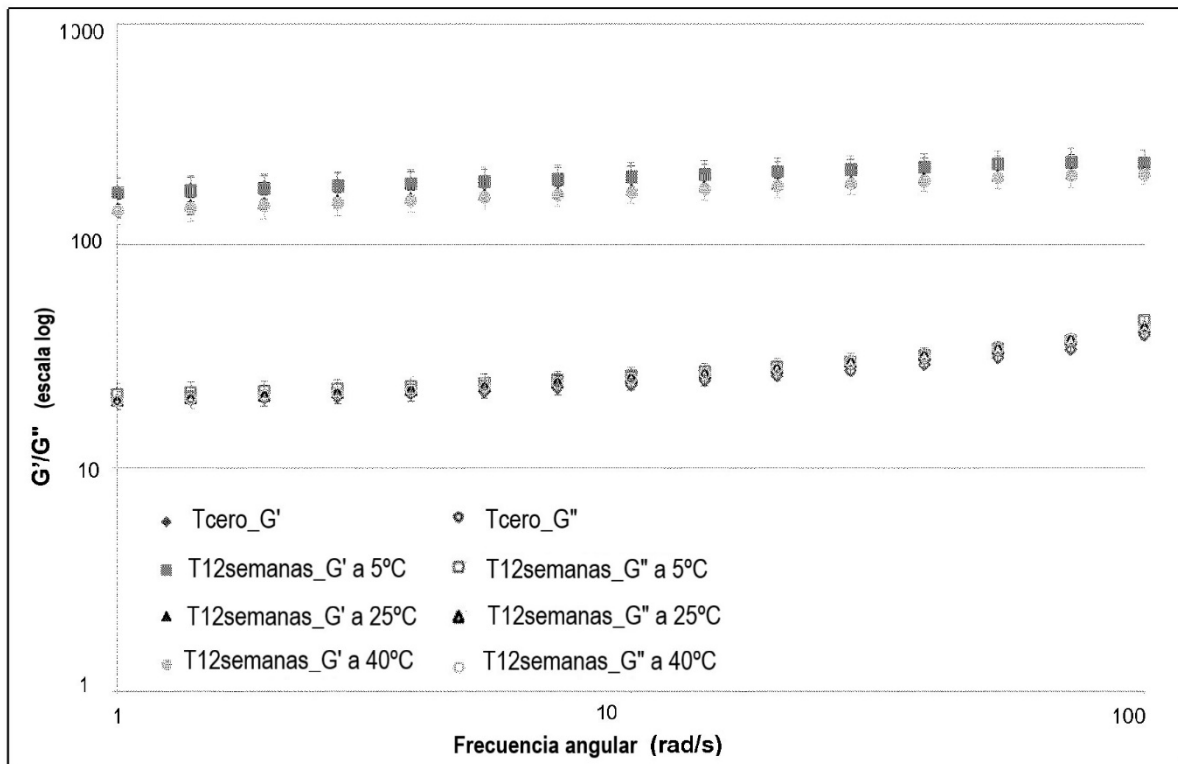


Figura 17 b