

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



07/80231

21. EXPEDIENTE N°.

TRATAMIENTO LOCAL DE EFECTO OSEOS CON MATRIZ

54. TÍTULO

DE LIBERACION DE BMP O PTH

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

KUROS BIOSURGERY AG

DOMICILIO

ZURICH, SUIZA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

CCC. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-080231- -00000-0000

Fecha: 2007-08-06 16:31:08 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

6 agosto 2007

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **KUROS BIOSURGERY AG**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Suiza.Dirección: Technoparkstrasse 1,
8005 Zürich,
SuizaDomicilio: Zürich,
Suiza**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Jason SCHENSE**
Arosastrasse 14,
8008 Zürich,
Suiza
3. **Isabelle ARRIGHI**
Geissbergweg 21,
8006 Zürich,
Suiza2. **John WATSON**
Dorfstrasse 32,
8126 Zumikon,
Suiza

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/050070Fecha: 6 de enero de 2006Publicación Internacional No. WO 2006/072623 A1Fecha: 13 de julio de 2006

6

Título (54)**TRATAMIENTO LOCAL DE EFECTOS OSEOS CON MATRIZ DE
LIBERACION DE BMP O PTH**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 038/018

8

PrioridadSi ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US

(32) Fecha

6 de enero de 2005
10 de enero de 2005

(31) Número de Solicitud

60/641,830
60/642,848

9

Comprobante de pago No.: 07-61,635**Fecha:** 31 de julio de 2007

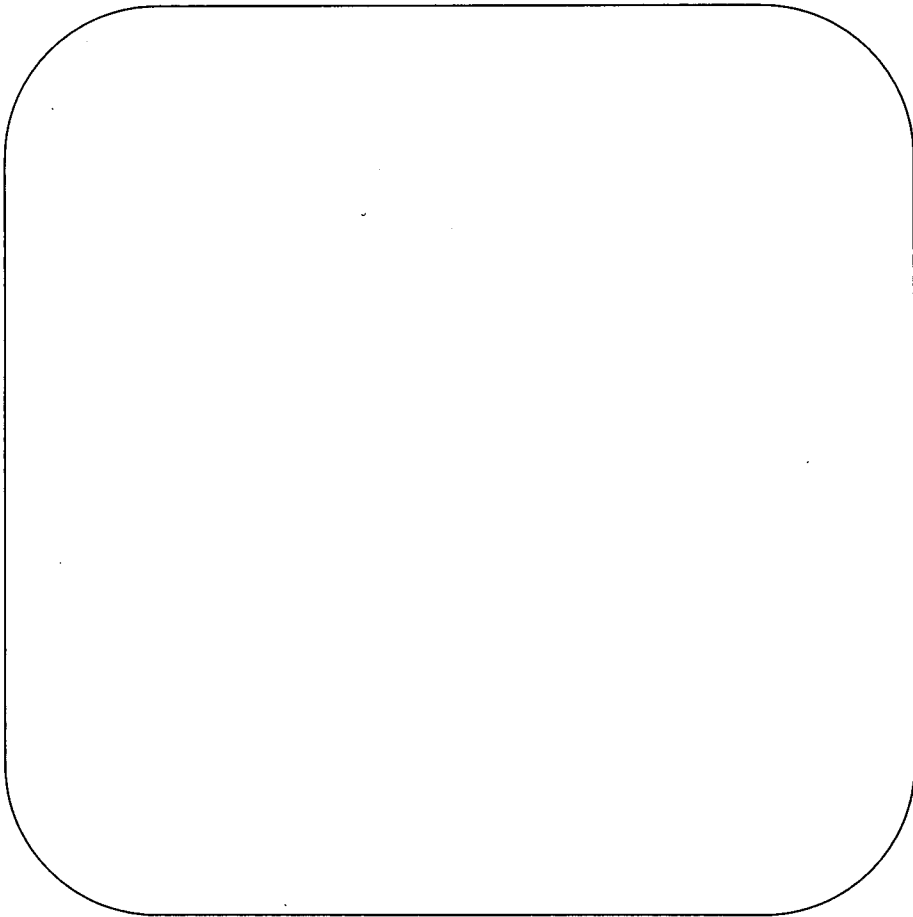
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

B

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/072623 A1

Descripción:

Páginas 43 en el idioma original

Páginas 64 en español

Reivindicaciones: Número (s) 34

Figuras: Número (s) 2

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.
4. ☒ Extracto de publicación.

**SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 July 2006 (13.07.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/072623 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 38/18 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
A61K 38/29 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A61L 24/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2006/050070

(22) International Filing Date: 6 January 2006 (06.01.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/641,830 6 January 2005 (06.01.2005) US
60/642,848 10 January 2005 (10.01.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **KUROS BIOSURGERY AG** [CH/CH]; Technoparkstrasse 1, CH-8005 Zürich (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **SCHENSE, Jason** [US/CH]; Arosastr. 14, CH-8008 Zürich (CH). **WATSON, John** [GB/CH]; Dorfstrasse 32, CH-8126 Zumikon (CH). **ARRIGHI, Isabelle** [FR/CH]; Geissbergweg 21, CH-8006 Zurich (CH).

(74) Agents: **HEPP, Dieter et al.**; Friedtalweg 5, CH-9500 Wil (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: LOCAL TREATMENT OF BONE DEFECTS WITH MATRIX RELEASING BMP OR PTH

(57) Abstract: A method of local treatment of specific bone defects such as osteoporosis or bone cysts comprises the step of local administration of a formulation comprising a fusion peptide containing a first domain comprising PTH or BMP 2 or BMP 7, and a second domain comprising a covalently crosslinkable substrate domain; and a material suitable of forming a biodegradable matrix suitable for cellular growth or in-growth, wherein the fusion peptide is covalently linked to the matrix. In one embodiment, the matrix contains one or more contrast agents, and is preferably formed in the absence of a growth factor. The matrix may be used in the treatment of fluid-filled cysts such as Tarlov cysts, ovarian cysts, arachnoid cysts, aneurysmal bone cysts or hepatic cysts.

WO 2006/072623 A1

LOCAL TREATMENT OF BONE DEFECTS WITH MATRIX RELEASING BMP OR PTH

Field of the Invention

The present invention relates to a method of local treatment of bone cysts and a prophylactic local treatment of areas in non-healthy bones affected by osteoporosis.

Background of the Invention**Osteoporosis**

Bone loss is a natural part of aging with both men and women losing bone mass at a rate of 0.6 to 1.2% per year starting on average between the ages of 40 to 50. Following the menopause in women bone loss accelerates to 2-3% per year. However, in particular in post-menopausal women, the rate of bone loss may increase dramatically. This disease state is called osteoporosis. Osteoporosis is of major world-wide significance, affecting nearly 200 million people. At present 10 million people in the US suffering from osteoporosis and a further 18 million have osteopenia putting them at risk of developing the disease. Of this at-risk population, 80% are women. Osteoporosis is a systemic skeletal disease generally affecting the entire skeleton in which the overall mass of bone is decreased and the structure of the bone deteriorates, which increases bone porosity. These changes in bone mass and structure reduce the overall strength of the bone and make it prone to fracture.

Osteoporosis is a complex interaction between systemic hormones and local factors and the exact cellular mechanisms of osteoporosis remain to be defined. As a result the current therapies do not tackle directly the causes of the condition. For example, derivatives of the most commonly used therapeutics, bisphosphonates, are at best only 50% efficacious in reducing the incidence of fracture. Bisphosphonates currently approved for use include, alendronate (FOSAMAX®), etidronate (DIDROCAL®) and risedronate (ACTONEL®). Given either in tablet form or intravenously, bisphosphonates are a family of drugs used to prevent and treat osteoporosis by coating bones and preventing osteoclast activity.

Bone Cysts

Bone cysts are benign unilocular lytic areas usually in the proximal end of a long bone with well defined and narrow endosteal margins. An unicameral bone cyst, otherwise known as a simple bone cyst, is a fluid-filled cavity in the bone, lined by compressed fibrous tissue. It usually occurs in the long bones of a growing child, especially the upper part of the humerus (50 - 60% of the time) or the upper part of the femur (25-30 % of the time). Other bones, however, can be affected. These cysts usually affect children primarily between the ages of 5 to 15, but can affect older children or adults. In older children and adults, they tend to occur in flat bones (such as the pelvis, jaw, skull or rib cage) or in the large heel bone (calcaneus).

Unicameral bone cysts are considered benign. They do not metastasize (spread) beyond the bone. Some heal spontaneously, while others enlarge. More invasive cysts can grow to fill most of the bone's metaphysis (the transitional zone where the shaft of the bone joins the end of the bone) and cause what is known as a pathological fracture. A more invasive cyst could also destroy the bone's growth plate, leading to shortening of the bone. These cysts are sometimes classified as either "active" or "latent." An active cyst is adjacent to the growth plate and tends to enlarge, causing the problems mentioned above. A latent cyst is one that is more apt to heal with treatment because the growth plate has migrated away from the cyst.

Current treatment is aimed primarily at preventing recurrent fractures. The following surgical procedures are applied currently: Curettage/Bone Grafting (a surgical scraping of the cyst with a special instrument called a curette that has a scoop, loop or ring at its tip), steroid injection, or bone marrow injection.

Periarticular subchondral bone cysts, also referred to as subchondral cystic lesions (SCLs), may occur in young horses and are a similar clinical entity to unicameral bone cysts in humans. They are commonly recognised pathological entities which often lead to lameness in young horses. The most common site at which SCLs are encountered is in the stifle (the equivalent of the human knee). Specifically, bone cysts are found in the main weight bearing aspect of the stifle (the medial femoral condyle) and rarely at other locations within the joint (proximal lateral tibia and lateral femoral condyle). SCLs are radiolucent areas of bone that, depending on their stage of development, are well demarcated from the surrounding tissue through a sclerotic rim and are

generally filled with fibrous connective tissue and serous fluid resembling synovial fluid. In horses a joint connection to the overlying articular cartilage surface can be found in a third of cases. The size of a medial femoral cyst varies from shallow dome-shaped defects (approximately 8mm x 3mm) to large ovoid-shaped cysts of 40mm x 30mm.

Treatment options for SCLs causing lameness include long term rest, anti-arthritis and intra-articular corticosteroid therapy and surgery. Conservative therapy, which may require nine to twelve months of paddock rest, has been associated with resolution of lameness. Unfortunately the number of horses managed by conservative therapy that have been evaluated in the veterinary literature is very limited, but success rates are approximately 50%.

Numerous surgical techniques have been used in the treatment of equine bone cysts. Current recommended treatment involves arthroscopic removal (curettage) of the cystic contents, cyst lining and the overlying unsupported cartilage. Additional techniques used in an attempt to enhance healing and improve outcome have included bone drilling and grafting, both of which are now considered to offer no benefit. Further, bone cysts may continue to expand and finally lead to secondary osteoarthritis in the equine joint.

Over the past twenty years, several bioactive factors have been investigated for their ability to influence the regeneration of bone tissue. Parathyroid hormone (PTH) is an 84 amino acid peptide that is made and secreted by the parathyroid gland. This hormone plays a primary role in controlling serum calcium levels through its action on various tissues, including bone. Studies in human with various forms of parathyroid hormone have demonstrated an anabolic effect on bone when applied systemically. This makes parathyroid hormone interesting for the systemic treatment of osteoporosis and related bone disorders (U.S. Patent No. 5,747,456 to Chorev, *et al.* and WO 00/10596 to Eli Lilly & Co.). The parathyroid hormone acts on cells by binding to a cell surface receptor. This receptor is known to be found on osteoblasts, the cells that are responsible for forming new bone.

The N-terminal 34 amino acid domain of the human parathyroid hormone has been reported to be biologically equivalent to the full length parathyroid hormone. Parathyroid hormone₁₋₃₄ and its mode of action were first reported in U.S. Patent No. 4,086,196. Research has been done on parathyroid hormone₁₋₃₄ and other truncated versions of the native human parathyroid hormone

form, as e.g. 1 to 25, 1 to 31 and 1 to 38 (see e.g. Rixon RH, *et al.*, *J Bone Miner. Res.*, 9 (8): 1179-89 (Aug. 1994).

The mechanism by which PTH influences bone remodelling is complicated, which has led to conflicting results and subsequently, a significant number of studies on the exact mechanisms involved. It has been demonstrated that if PTH is administered systemically in a continuous manner, that the bone density will decrease. In contrast, it has been reported that if the same molecule is administered systemically in pulsatile fashion, the bone density will increase (see e.g. WO 99/31137 to Eli Lilly & Co.). This apparent contradiction can be explained by the mechanism in which PTH modulates bone remodelling and subsequently the observable parameter of bone density. Within mature bone, the PTH receptor has only been shown to be present on the surface of cells of the osteoblast lineage, but not on osteoclasts. The role that PTH plays in bone remodelling is directed through the osteoblasts as opposed to the osteoclasts. However, the cells at different stages of the osteoblast lineage respond differently when they bind to parathyroid hormone. Therefore, the dramatic differences that are observed when PTH is administered using different methods can be accounted for by understanding the different effects that the same molecule has on the different cells within the osteoblast lineage.

When PTH binds to a mesenchymal stem cell, the cell is induced to differentiate into a preosteoblast. Thus, by adding PTH to the system, there is an increase in the preosteoblast population. However, these preosteoblast cells have the PTH receptor as well, and the subsequent binding of PTH to the receptor on these cells leads to a different response. When PTH binds to the preosteoblast, it results in two separate consequences that lead to bone resorption. First, it inhibits the further differentiation of the preosteoblasts into osteoblasts. Second, it increases the secretion of Interleukin 6 (IL-6) from the preosteoblasts. IL-6 both inhibits preosteoblast differentiation as well as increases preosteoclast differentiation into osteoclasts. This dual response from the cells within the osteoblast lineage is what provides the complex reaction between bone remodelling and PTH exposure. If PTH is dosed periodically for short periods of time, then the mesenchymal stem cells are induced to differentiate into osteoblasts. The short dosing periods then prevent the newly formed preosteoblasts from producing IL-6, preventing activation of the osteoclasts. Therefore, during the intervals of dosing, these newly formed preosteoblasts can further differentiate into osteoblasts, resulting in bone formation. However, if a constant dose of PTH is applied, then the preosteoblasts will have

the opportunity to begin producing IL-6, thus activating the osteoclasts and inhibiting themselves, leading to the opposite effect: bone resorption.

Another bioactive factor which has been explored is the group of the bone morphogenetic proteins (BMPs) and transforming growth factors (TGF β s). There are at least 20 structurally and functionally related BMPs and several TGF β s, which are members of the TGF-beta superfamily. BMPs were originally identified as protein regulators of cartilage and bone formation. They are also involved in embryogenesis and morphogenesis of various tissues and organs. BMPs regulate the growth, differentiation, chemotaxis and apoptosis of various cell types, including mesenchymal cells, epithelial cells, hematopoietic cells and neuronal cells. Similar to other TGF-beta family proteins, BMPs are highly conserved across animal species.

Bone morphogenetic proteins 2 and 7 (BMP 2 and 7) are of specific interest in bone or cartilage formation applications. BMP 2 induces the formation of both cartilage and bone. The protein is synthesized as a prepropeptide. Full length human prepropeptide BMP 2 is a glycosylated polypeptide having a sequence of 396 amino acids, consisting of a 19-amino acid signal sequence, a 263 amino acid pro region and a 114 amino acid mature segment. Cleavage of the pro-region occurs prior to segregation. The mature form has 7 cysteine moieties and one N-linked glycosylation site. The functional form of the protein consists of two disulfide-linked mature chains. It has been found that BMP 2 variants consisting only of a part of the mature amino acid sequence of BMP 2, such as the amino acids 283 to 396, also exhibit biological activity.

Human BMP 7, or osteogenic protein-1 (Op-1), is a 49 kDa, 431 amino acid preproprotein that is cleaved, similarly to BMP 2, into a 292 amino acid preproregion and a 139 amino acid mature segment. The mature segment contains three potential N-linked glycosylation sites plus seven cysteine residues.

For tissue repair or regeneration, cells must migrate into a wound bed, proliferate, express matrix components or form extracellular matrix, and form a final tissue shape. Multiple cell populations often participate in this morphogenetic response, frequently including vascular and nerve cells. Matrices which have the bioactive factors incorporated therein have been demonstrated to greatly enhance, and in some cases have been found to be essential, for this to

10

occur. Approaches have been made in developing matrices from natural or synthetic origins or a mixture of both. Natural cell in-growth matrices are subject to remodelling by cellular influences, all based on proteolysis, e.g. by plasmin (degrading fibrin) and matrix metalloproteinases (degrading collagen, elastin, etc.). Such degradation is highly localized and occurs only upon direct contact with the migrating cell. In addition, the delivery of specific cell signalling proteins such as growth factors is tightly regulated. In the natural model, macroporous cell in-growth matrices are not used, rather microporous matrices that the cells can degrade, locally and upon demand, as the cells migrate into the matrix, are formed. Due to concerns regarding immunogenicity, expensive production, limited availability, batch variability and purification, matrices based on synthetic precursor molecules, such as modified polyethylene glycol, have been developed for tissue regeneration in and/or on the body.

While much work has been done studying the systemic effects of PTH, as described above, research has hardly explored local or topical administration of PTH. In WO 03/052091, a way of locally administering PTH has been described. WO 03/052091 describes parathyroid hormone as being covalently attached to synthetic and natural matrices, in particular fibrin and polyethyleneglycol-matrices. In that way, parathyroid hormone may be administered locally and released at the site of need in a controlled fashion. It has been shown in WO 03/052091 that this system triggers the formation of bone tissue in healthy bone.

It is the object of the present invention to provide a method of local treatment of areas in non-healthy bones, i.e. bones affected by osteoporosis or, i.e. bones affected by bone cysts and bone tumours.

Summary of the Invention

It has been surprisingly found that areas of non-healthy bones, e.g. bones or specific bone areas which are affected and weakened by osteoporosis or bone cysts or bone tumours, can be effectively treated by the local administration of bioactive factors.

Thus, the present invention is related to the use of a formulation comprising a bioactive factor selected from the group consisting of a PTH and a BMP or a fusion peptide comprising a PTH or BMP in a first domain, and a covalently crosslinkable substrate domain in a second domain, and

a composition capable of forming a matrix at a site in bone in need of treatment, for the manufacture of a medicament for locally treating non-healthy bone areas.

Matrices containing a bioactive factor (also referred to herein as "supplemented matrices") that are suitable for the local regeneration of areas of non-healthy bone or the local increase of bone density in areas of non-healthy bone and methods for making and using the matrices are described herein. In a preferred embodiment the bioactive factor is releasably incorporated into the matrix. The matrix can be formed *in-situ* at the site of non healthy bone areas or, dependent on the indication, can be formed outside the body and applied to the body in pre-shaped formed through surgery. The bioactive factor is released from the matrix and triggers regeneration of bone tissue locally. Suitable bioactive factors include molecules, peptides and proteins having the capabilities of triggering regeneration of bone tissue. The bioactive factor is preferably PTH or a BMP. The parathyroid hormone can be PTH₁₋₈₄ (native), PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁, PTH₁₋₂₈ or PTH₁₋₂₅, or any modified or allelic versions of PTH having the capabilities of triggering regeneration of bone tissue, or BMP₂ or BMP₇. The most preferred bioactive factors are PTH₁₋₃₄ or BMP₂. In one embodiment, the bioactive factor is in a fusion peptide. The fusion peptide contains a first domain comprising the bioactive factor, preferably PTH or BMP, and a second domain comprising a crosslinkable substrate domain.

In a further preferred embodiment, the bioactive factor forms part of a precursor composition suitable for forming a supplemented matrix at the site of need in the affected bone. The composition for forming the supplemented matrix is preferably injectable and formed from liquid (at 25°C) precursor component(s). One method of administering the supplemented matrix to and/or into areas of non-healthy bone requires at least one liquid precursor component capable of forming a matrix at physiological temperatures and a bioactive factor and applying the precursor component and bioactive factor to and/or into the area of non-healthy bone. The bone defects, i.e. the areas of non-healthy bones are generally bone areas being affected by osteoporosis, bone cysts or bone tumours. In case of osteoporotic bone, the treatment results in a local increase of bone density in the osteoporotic part of the bone, which can be, for example, the femoral neck or vertebra (and thus lower fracture rate of the bone or part of the bone). In that sense the method of treating non-healthy areas of bones with the supplemented matrix as described in the present application is a prophylactic treatment in particular for the prevention of bone fractures. In cases in which the supplemented matrix is applied into or formed in a cleaned cavity of a bone cyst or

after removal of a bone tumour, the supplemented matrix induces bone formation in the cavity which serves at restoring the integrity of the bone both functionally, as well as structurally.

Preferably the matrix is a fibrin matrix or a matrix based on polyethyleneglycol.

Cells can also be added to the matrix prior to or at the time of implantation, or even subsequent to implantation, either at or subsequent to crosslinking of the polymer to form the matrix. This may be in addition to or in place of crosslinking the matrix to produce interstitial spacing designed to promote cell proliferation or in-growth.

In one embodiment, the matrix contains one or more contrast agents, and can also be formed in the absence of a growth factor. Generally the contrast agents enable imaging of the distribution and positioning of the formulation during injection and gelation. If the formulation is used without a bioactive factor, the matrix may preferably be used in the treatment of fluid-filled cysts such as Tarlov cysts, ovarian cysts, arachnoid cysts, aneurysmal bone cysts, or hepatic cysts.

Therefore, the present invention is also related to a A formulation comprising

- i) a composition capable of forming a matrix under physiological conditions;
- ii) a PTH, aBMP or a fusion peptide comprising at least two domains wherein the first domain comprises a PTH or BMP and the second domain comprising a crosslinkable substrate domain; and
- iii) a contrast agent.

The present invention is also related to a supplemented matrix comprising a natural or synthetic matrix material, a bioactive factor selected from the group consisting of a PTH and a BMP and a contrast agent.

The present invention is also related to a kit comprising fibrinogen, thrombin, a calcium source, a bioactive factor selected from the group consisting of PTH and a BMP and a contrast agent.

Brief Description of the Drawings

FIG. 1 shows the bioactivity of PTH variants. Cells transfected with a reporter gene linked to a promoter for a PTH receptor were treated with equal amounts of either PTH₁₋₃₄, TG-pl-PTH₁₋₃₄ (described hereinafter) or the international 84 amino acid standard. The inhibition of expression of the luciferase reporter gene was measured and compared to transfected cells that were not exposed to PTH in solution (control).

FIG. 2 shows the results of a PTH release assay from a fibrin matrix.

Detailed Description of the Invention

A method for local treatment of bone defects and structures in non-healthy bones (summarized areas of non-healthy bone) are described herein. Preferably treated are areas in osteoporotic bone and/or bone cysts and/or bone tumours. The method uses natural and synthetic matrices having bioactive factors, in particularly PTH or BMP, releasably incorporated in the matrix. The supplemented matrices are injectable, biocompatible and biodegradable and can be formed *in vitro* or *in vivo*, at the time of implantation. The bioactive factor can be incorporated into the matrices and retain its full bioactivity. Particularly preferred bioactive factors PTH₁₋₃₄, BMP 2 or BMP 7 can be releasably incorporated by covalent or non-covalent interaction with the matrix, using techniques that provide control over how and when and to what degree the PTH or BMPs is released, so that the supplemented matrix can be used for tissue repair directly or indirectly, using the supplemented matrix as a controlled release vehicle.

Definitions

"Adhesion site or cell attachment site" as generally used herein refers to a peptide sequence to which a molecule, for example, an adhesion-promoting receptor on the surface of a cell, binds. Examples of adhesion sites include, but are not limited to, the RGD sequence from fibronectin, and the YIGSR (SEQ ID NO: 1) sequence from laminin. Adhesion sites can be optionally incorporated into the matrix by including a substrate domain crosslinkable to the fibrin matrix.

24

"Biological activity" as generally used herein refers to functional events mediated by a protein of interest. In some embodiments, this includes events assayed by measuring the interactions of a polypeptide with another polypeptide. It also includes assaying the effect which the protein of interest has on cell growth, differentiation, death, migration, adhesion, interactions with other proteins, enzymatic activity, protein phosphorylation or dephosphorylation, transcription, or translation.

"Conjugated unsaturated bond" as generally used herein refers to the alternation of carbon-carbon, carbon-heteroatom or heteroatom-heteroatom multiple bonds with single bonds, or the linking of a functional group to a macromolecule, such as a synthetic polymer or a protein. Such bonds can undergo addition reactions.

"Conjugated unsaturated group" as generally used herein refers to a molecule or a region of a molecule, which contains an alternation of carbon-carbon, carbon-heteroatom or heteroatom-heteroatom multiple bonds with single bonds, which has a multiple bond which can undergo addition reactions. Examples of conjugated unsaturated groups include, but are not limited to vinyl sulfones, acrylates, acrylamides, quinones, and vinylpyridiniums, for example, 2- or 4-vinylpyridinium and itaconates.

"Contrast agents" as generally used herein means a molecule or substance used to increase a contrast of an image and which enables monitoring of the substance or molecule in the body.

"Cross-linking" as generally used herein means the formation of covalent linkages.

"Crosslink density" as generally used herein refers to the average molecular weight between two crosslinks (M_c) of the respective molecules.

"Equilibrium state" as generally used herein as the state in which a hydrogel undergoes no mass increase or loss when stored under constant conditions in water.

"Equivalent weight" as generally used herein refers to mmol of functional group/g of substance.

15
"Fibrin Matrix" as generally used herein means the product of a process in which substantially all of the precursor components fibrinogen and thrombin crosslink in the presence of a calcium source and Factor XIIIa to form a three-dimensional network. The terms matrix, gel and three-dimensional or polymeric network are used synonymously.

"Functionalize" as generally used herein refers to modifying a molecule in a manner that results in the attachment of a functional group or moiety. For example, a molecule may be functionalized by the introduction of a molecule which makes the molecule a strong nucleophile or a conjugated unsaturated molecule. Preferably a molecule, for example PEG, is functionalized to become a thiol, amine, acrylate, or quinone. Proteins, in particular, may also be effectively functionalized by partial or complete reduction of disulfide bonds to create free thiols.

"Functionality" as generally used herein refers to the number of reactive sites on a molecule.

"Functionality of the branching points" as generally used herein refers to the number of arms extending from one point in the molecule.

"Fusion peptides or proteins" as generally used herein refers to a peptide or protein which contains at least a first and a second domain. One domain contains a bioactive factor, preferably PTH 1-34, BMP 2 or BMP 7 and the other domain contains a substrate domain crosslinkable to a matrix during or after its formation. An enzymatic or hydrolytic degradation site can also be present between the first and the second domain.

"Matrix" as generally used herein refers to a material intended to interface with biological systems to treat, augment, or replace any tissue or function of the tissue depending on the material either permanently or temporarily. The matrix can serve as a delivery device for bioactive factors incorporated therein and/or as a cell-ingrowth matrix. The matrices described herein are formed from liquid precursor components which are able to form a scaffold in the body at the site of need. The terms "matrix" and "gel" are used synonymously herein. The terms "matrix" and "gel" refer to the composition formed after the precursor components are mixed together. Thus the terms "matrix" and "gel" encompass partially or fully crosslinked polymeric networks. They may be in the form of a liquid, semi-solid, such as a paste, or a solid.

Depending on the type of precursor materials, the matrix may be swollen with water but not dissolved in water, i.e. form a hydrogel which stays in the body for a certain period of time.

"Multifunctional" as generally used herein refers to more than one electrophilic and /or nucleophilic functional group per molecule (i.e. monomer, oligo and polymer).

"Naturally occurring precursor components or polymers" as generally used herein refers to molecules which could be found in nature.

"Non-healthy bone or areas of non-healthy bones" as generally used herein refers to bone or parts of the bone, which have disorders caused by structural or genetic deterioration as caused by osteoporosis, local inflammation as in bone cysts or tumour growth as in cancer, i.e. to bone structure in a diseased state, irrespective of the kind of disease. Bone fractures in osteoporotic bone are contemplated to be a bone defect in the sense of the present invention.

"Osteoporosis" as generally used herein refers to a systemic, skeletal disease characterized by low bone mass and the structural deterioration of bone tissue, which increases bone porosity and susceptibility to fractures. Bone loss is asymptomatic, some people may not be aware that they have osteoporosis until they suffer bone fractures. Two major types of osteoporosis are known: primary osteoporosis and secondary osteoporosis. Primary osteoporosis is subdivided into Type I osteoporosis, which affects women in whom the onset of menopause has caused accelerated bone loss; and type II osteoporosis, which affects people in whom the aging process has led to a reduction in bone density. Secondary osteoporosis occurs in people who experience bone loss secondary to other diseases or who use certain types of drugs. The wrist, vertebra and hip are at mainly susceptible to osteoporosis related fractures. Preferred is the treatment of osteoporosis type I.

"Polyethyleneglycol Matrices" as generally used herein means the product of a process in which at least two precursor polyethyleneglycol components with functional groups crosslink self-selectively with each other to form a three-dimensional crosslinked network. These systems are known and described, such as in WO 03/052091.

"PTH" as used herein includes the human sequence of PTH₁₋₈₄ and all truncated, modified and allelic versions of PTH which exhibit bone formation properties, in particular when incorporated

preferably covalently bound to a fibrin matrix. Preferred truncated versions of PTH are PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ or PTH₁₋₂₅. Most preferred is PTH₁₋₃₄. Preferably, the PTH is human PTH, although PTH from other sources, such as bovine PTH, may be suitable.

"Periosteum" as used herein means the outer layer of bones forming a dense, fibrous layer, with the exception of those portions that form a joint structure which covers the entire bone structure and contains the vasculature that nourishes the exterior bone tissue.

"Physiological" as generally used herein means conditions as they can be found in living vertebrates. In particular, physiological conditions refer to the conditions in the human body such as temperature and pH. Physiological temperatures mean in particular a temperature range of between 35°C to 42°C, preferably around 37°C.

"Polymeric network" as generally used herein means the product of a process in which substantially all of the monomers, oligos or polymers are bound by intermolecular covalent linkages through their available functional groups to result in one huge molecule.

"Strong nucleophile" as generally used herein refers to a molecule which is capable of donating an electron pair to an electrophile in a polar-bond forming reaction. Preferably the strong nucleophile is more nucleophilic than water at physiologic pH. Examples of strong nucleophiles are thiols and amines.

"Synthetic precursor molecules" as generally used herein refers to molecules which do not exist in nature.

"Self selective reaction" as generally used herein means that the first precursor component of a composition reacts much faster with the second precursor component of the composition and *vice versa* than with other compounds present in a mixture or at the site of the reaction. As used herein, the nucleophile preferentially binds to an electrophile and an electrophile preferentially binds to a strong nucleophile, rather than to other biological compounds.

18

"Swelling" as generally used herein refers to the increase in volume and mass by uptake of water by the matrix. The terms "water-uptake" and "swelling" are used synonymously throughout this application.

"Supplemented matrix" as generally used herein refers to a matrix in which bioactive factors, optionally fusion peptides, are releasably incorporated therein. The bioactive factors are incorporated through either covalent or non-covalent interaction.

I. Supplemented Matrices

A. Matrix Materials

The matrix is formed by crosslinking ionically, covalently, or by combinations thereof precursor molecules to a polymeric network and/or by swelling one or more polymeric materials, i.e. matrices, to form a polymeric network having sufficient inter-polymer spacing to allow for in-growth or migration into the matrix of cells. In one embodiment the matrix is formed of proteins, preferably proteins naturally present in the patient into which the matrix is to be implanted. A particularly preferred matrix protein is fibrin, although matrices made from other proteins, such as collagen and gelatine can also be used. Polysaccharides and glycoproteins may also be used to form the matrix. It is also possible to use synthetic polymers which are crosslinkable by ionic or covalent binding.

Fibrin matrices

Fibrin is a natural material which has been reported for several biomedical applications. Fibrin has been described as material for cell in-growth matrices in U.S. Patent No. 6,331,422 to Hubbell *et al.* Fibrin gels have been used as sealants because of its ability to bind to many tissues and its natural role in wound healing. Some specific applications include use as a sealant for vascular graft attachment, heart valve attachment, bone positioning in fractures and tendon repair. Additionally, these gels have been used as drug delivery devices, and for neuronal regeneration. Although fibrin provides a solid support for tissue regeneration and cell in-growth, there are few active sequences in the monomer that directly enhance these processes.

The process by which fibrinogen is polymerized into fibrin has also been characterized. Initially, a protease cleaves the dimeric fibrinogen molecule at the two symmetric sites. There are several possible proteases than can cleave fibrinogen, including thrombin, peptidase, and protease III, and each one severs the protein at a different site. Once the fibrinogen is cleaved, a self-polymerization step occurs in which the fibrinogen monomers come together and form a non-covalently crosslinked polymer gel. This self-assembly happens because binding sites become exposed after protease cleavage occurs. Once they are exposed, these binding sites in the centre of the molecule can bind to other sites on the fibrinogen chains, which are present at the ends of the peptide chains. In this manner, a polymer network is formed. Factor XIIIa, a transglutaminase activated from Factor XIII by thrombin proteolysis, may then covalently crosslink the polymer network. Other transglutaminases exist and may also be involved in covalent crosslinking and grafting to the fibrin network.

Once a crosslinked fibrin gel is formed, the subsequent degradation is tightly controlled. One of the key molecules in controlling the degradation of fibrin is $\alpha 2$ -plasmin inhibitor. This molecule acts by crosslinking to the α chain of fibrin through the action of Factor XIIIa. By attaching itself to the gel, a high concentration of inhibitor can be localized to the gel. The inhibitor then acts by preventing the binding of plasminogen to fibrin and inactivating plasmin. The $\alpha 2$ -plasmin inhibitor contains a glutamine substrate. The exact sequence has been identified as NQEQVSPL (SEQ ID NO: 2), with the first glutamine being the active amino acid for crosslinking.

It has been demonstrated that bi-domain peptides, which contain a factor XIIIa substrate sequence and a bioactive peptide sequence, can be cross-linked into fibrin matrix and that this bioactive peptide retains its cellular activity *in vitro*.

Depending on the indication and substances mixed into the fibrin matrix the concentration of thrombin might vary. In one preferred embodiment, the fibrin matrix contains fibrinogen in a range of 5 to 65 mg per millilitre fibrin matrix, more preferably 15 to 60 mg per millilitre fibrin matrix, even more preferably from 25 to 55 mg per millilitre fibrin matrix, and most preferably 30 to 45 mg per millilitre fibrin matrix. Thrombin is present in a range of 0.5 to 5 I.U. per millilitre fibrin matrix, more preferably in a range of between 1.25 to 3.25 I.U. per millilitre fibrin matrix, most preferably from 1.5 to 2.5 I.U. per millilitre fibrin matrix. Additionally a

calcium ion source helps to form the fibrin matrix. The calcium ion source is preferably $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in a concentration of 0.5 to 5 mg per ml fibrin matrix, even more preferable of 2 to 3.5 mg per ml fibrin matrix, most preferably of 2.5 to 3 mg per ml fibrin matrix. I.U. stands for one international unit of thrombin and is defined as the activity contained in 0.0853 mg of the First International Standard of Human Thrombin. Supplemented fibrin matrices formed from materials present in these concentration ranges are preferably used for all the indications which do not require the addition of a contrast agent, like bone cysts and bone tumours.

When one or more contrast agents are present in the matrix, the amount of thrombin in the fibrin matrix is generally greater than the amount of thrombin in the same fibrin matrix in the absence of a contrast agent. Contrast agents are preferably added when the supplemented matrix is used as a prophylactic treatment to prevent fractures in osteoporotic bones, i.e. injection into the vertebra or femoral neck. In these cases the fibrin matrix typically contains thrombin in a concentration range of between 7.5 to 125 I.U. thrombin per millilitre fibrin matrix, preferably in a range of between 25 to 50 I.U. thrombin per millilitre fibrin matrix and most preferred in a range of between 35 to 40 I.U. thrombin per millilitre fibrin matrix.

Precursor solutions for forming fibrin matrices

Preferably two precursor solutions are used to form a fibrin matrix. The first precursor solution contains fibrinogen, preferably 10 to 130 mg fibrinogen per millilitre precursor solution, more preferably 30 to 120 mg fibrinogen per millilitre precursor solution, even more preferably from 50 to 110 mg fibrinogen per millilitre precursor solution, and most preferably 60 to 90 mg fibrinogen per millilitre precursor solution. If thrombin has to be added to form the matrix and in those cases in which the indication requires one or more contrast agents, the second precursor solution contains thrombin, preferably 15 to 250 I.U. thrombin per millilitre precursor solution, more preferably 50 to 100 I.U. thrombin per millilitre precursor solution, and most preferably 70 to 80 I.U. thrombin per millilitre precursor solution. Additionally a calcium ion source may be present in at least one of the precursor solutions. The calcium ion source is preferably $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, preferably in a concentration of 1 to 10 mg per ml precursor solution, even more preferable of 4 to 7 mg per ml precursor solution, most preferably of 5 to 6 mg per ml precursor solution. Optionally, an enzyme capable of catalyzing the matrix formation, such as Factor XIIIa, is added to at least one precursor solution. Preferably, Factor XIIIa is present in a concentration of

0.5 to 100 I.U. per millilitre precursor solution, more preferably of 1 to 60 I.U. per millilitre precursor solution, and most preferably of 1 to 10 I.U. per millilitre precursor solution.

In cases in which the presence of a contrast agent is not required, the fibrin matrix is preferably formed from preferably two precursor solutions. The first precursor solution typically contains fibrinogen, preferably in a concentration range from 10 to 130 mg fibrinogen per millilitre precursor solution, more preferably from 30 to 120 mg fibrinogen per millilitre precursor solution, even more preferably from 50 to 110 mg fibrinogen per millilitre precursor solution, and most preferably from 60 to 90 mg fibrinogen per millilitre precursor solution. If thrombin has to be added to form the matrix, the second precursor solution contains thrombin, preferably in a concentration range from 1 to 10 I.U. thrombin per millilitre precursor solution, more preferably from 2.5 to 6.5 I.U. thrombin per millilitre precursor solution, most preferably from 3 to 5 I.U. thrombin per millilitre precursor solution. Additionally a calcium ion source is in one of the precursor solutions. The calcium ion source is preferably $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in a concentration range from 1 to 10 mg per ml precursor solution, even more preferably from 4 to 7 mg per ml precursor solution, most preferably from 5 to 6 mg per ml precursor solution. Optionally, an enzyme capable of catalyzing the matrix formation, like Factor XIIIa, is added to a precursor solution. Preferably, Factor XIIIa is present in a concentration range from 0.5 to 100 I.U. per millilitre precursor solution, more preferably from 1 to 60 I.U. per millilitre precursor solution, and most preferably from 1 to 10 I.U. per millilitre precursor solution.

Synthetic matrices and precursor solutions

Crosslinking reactions for forming synthetic matrices for application in the body include (i) free-radical polymerization between two or more precursors containing unsaturated double bonds, as described in Hern *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 39:266-276 (1998), (ii) nucleophilic substitution reaction such as e.g. between a precursor including an amine group and a precursor including a succinimidyl group as disclosed in U.S. Patent No. 5,874,500 to Rhee *et al.*, (iii) condensation and addition reactions, and (iv) Michael type addition reactions between a strong nucleophile and a conjugated unsaturated group or bond (as a strong electrophile). Particularly preferred is the reaction between a precursor molecule having a thiol or amine group as the nucleophilic group and precursor molecules including acrylate or vinyl sulfone groups as electrophilic groups. The most preferred nucleophilic group is the thiol group. Michael type addition reactions are

described in WO 00/44808 to Hubbell *et al.* Michael type addition reactions allow for *in situ* crosslinking of at least a first and a second precursor component under physiological conditions in a self-selective manner, even in the presence of sensitive biological materials. When one of the precursor components has a functionality of at least two, and at least one of the other precursor components has a functionality greater than two, the system will self-selectively react to form a cross-linked three dimensional matrix.

Preferably the conjugated unsaturated groups or conjugated unsaturated bonds are acrylates, vinylsulfones, methacrylates, acrylamides, methacrylamides, acrylonitriles, vinylsulfones, 2- or 4-vinylpyridinium, maleimides, or quinones.

The nucleophilic groups are preferably thiol-groups, amino-groups or hydroxyl-groups. Thiol groups are substantially more reactive than unprotonated amine groups. The pH is important in this consideration: the deprotonated thiol is substantially more reactive than the protonated thiol. Therefore, the addition reactions involving a conjugated unsaturation, such as an acrylate or a quinone, with a thiol to convert two precursor components into a matrix, will often be best carried out most quickly and self-selectively at a pH of approximately 8. At pH of approximately 8, most of the thiols of interest are deprotonated (and thus more reactive) and most of the amines of interest are still protonated (and thus less reactive). When a thiol is used as the first precursor molecule, a conjugate structure that is selective in its reactivity for the thiol relative to amines is highly desirable.

Suitable first and second precursor molecules include proteins, peptides, polyoxyalkylenes, poly(vinyl alcohol), poly(ethylene-co-vinyl alcohol), poly(acrylic acid), poly(ethylene-co-acrylic acid), poly(ethyloxazoline), poly(vinyl pyrrolidone), poly(ethylene-co-vinyl pyrrolidone), poly(maleic acid), poly(ethylene-co-maleic acid), poly(acrylamide), and poly(ethylene oxide)-co-poly(propylene oxide) block copolymers. A particularly preferred precursor molecule is polyethylene glycol.

Polyethylene glycol (PEG) provides a convenient building block. One can readily purchase or synthesize linear (meaning with two ends) or branched (meaning more than two ends) PEGs and then functionalize the PEG end groups to introduce either a strong nucleophile, such as a thiol, or a conjugated structure, such as an acrylate or a vinylsulfone. When these components are either

23

mixed with each other or with a corresponding component in a slightly basic environment, a matrix will be formed by reaction between the first and the second precursor component. A PEG component can be reacted with a non-PEG component, and the molecular weight or hydrophilicity of either component can be controlled to manipulate the mechanical characteristics, the permeability, and the water content of the resulting matrix.

In the formation of matrices, especially matrices that are desired to degrade *in vivo*, peptides provide a very convenient building block. It is straightforward to synthesize peptides that contain two or more cysteine residues, and this component can then readily serve as the first precursor component with nucleophilic groups. For example, a peptide with two free cysteine residues will readily form a matrix when mixed with a PEG tri-vinylsulfone (a PEG having three arms with vinylsulfones at each of its arms) at physiological or slightly higher pH (e.g., 8 to 9). The gelation can also proceed well at even higher pH, but at the potential expense of self-selectivity. When the two liquid precursor components are mixed together, they react over a period of a few minutes to form an elastic gel, consisting of a network of PEG chains, bearing the nodes of the network, with the peptides as connecting links. The peptides can be selected as protease substrates, so as to make the network capable of being infiltrated and degraded by cells, as is done in a protein-based network, such as in a fibrin matrix. Preferably the sequences in the domains are substrates for enzymes that are involved in cell migration (e.g., as substrates for enzymes such as collagenase, plasmin, metalloproteinase (MMP) or elastase), although suitable domains are not be limited to these sequences. One particularly useful sequence is a substrate for the enzyme plasmin. The degradation characteristics of the gels can be manipulated by changing the details of the peptide that serves as the cross-linking nodes. One may make a gel that is degradable by collagenase, but not plasmin, or by plasmin, but not collagenase. Furthermore, it is possible to make the gel degrade faster or slower in response to such an enzyme, simply by changing the amino acid sequence so as to alter the K_m or k_{cat} , or both, of the enzymatic reaction. One can thus make a matrix that is biomimetic, in that it is capable of being remodeled by the normal remodeling characteristics of cells. For example, such a study shows substrate sites for the important protease plasmin. The gelation of the PEG with the peptide is self-selective.

Optionally, biofunctional agents can be incorporated into the matrix to provide chemical bonding to other species (e.g., a tissue surface). Having protease substrates incorporated into the matrix is important when the matrix is formed from PEG vinylsulfone. Other than matrices formed

from the reaction of PEG acrylates and PEG thiols, matrices formed from PEG vinylsulfones and PEG thiols do not contain hydrolytically degradable bonds. Therefore, the incorporation of protease substrates allows the matrix to degrade in the body.

The synthetic matrices are operationally simple to form. Two liquid precursors are mixed; one precursor contains a precursor molecule with nucleophilic groups and the other precursor molecule contains the electrophilic groups. Physiological saline can serve as the solvent. Minimal heat is generated by reaction. Therefore, the gelation can be carried out *in vivo* or *in vitro*, in direct contact with tissue, without untoward toxicity. Thus polymers other than PEG may be used, either telechelically modified or modified on their side groups.

For most healing indications, the rate of cell in-growth or migration of cells into the matrix in combination with an adapted degradation rate of the matrix is crucial for the overall healing response. The potential of hydrolytically non-degradable matrices to become invaded by cells is primarily a function of network density. If the existing space between branching points or nodes is too small in relation to the size of the cells or if the rate of degradation of the matrix, which results in creating more space within the matrix, is too slow, a very limited healing response will be observed. Healing matrices found in nature, as e.g. fibrin matrices, which are formed as a response to injury in the body are known to consist of a very loose network which very easily can be invaded by cells. The infiltration is promoted by ligands for cell adhesion which are an integrated part of the fibrin network.

Matrices made from synthetic hydrophilic precursor molecules, like polyethylene glycol, swell in aqueous environment after formation of the polymeric network. In order to achieve a sufficiently short gelling time (between 3 to 10 minutes at a pH of between 7 to 8 and a temperature in a range of 36 to 38°C) and quantitative reaction during *in-situ* formation of the matrix in the body, the starting concentration of the precursor molecules must be sufficiently high. Under such conditions, swelling after network formation would not take place, and the necessary starting concentrations would lead to matrices too dense for cell infiltration when the matrix is not degradable in aqueous environment. Thus swelling of the polymeric network is important to enlarge and widen the space between the branching points.

Irrespective of the starting concentration of the precursor molecules, hydrogels made from the same synthetic precursor molecules, such as a four arm PEG vinylsulfone and a peptide with SH groups, swell to the same water content in equilibrium state. This means that the higher the starting concentration of the precursor molecules are, the higher the end volume of the hydrogel is when it reaches its equilibrium state. If the space available in the body is too small to allow for sufficient swelling and in particular if the linkage formed from the precursor components are not hydrolytically degradable, the rate of cell infiltration and the healing response will decrease. As a consequence, the optimum between two contradictory requirements for application in the body must be found. Good cell infiltration and subsequent healing responses have been observed with a three-dimensional polymeric network formed from the reaction of a trifunctional branched polymer with at least three arms substantially similar in molecular weight and a second precursor molecule that is at least a bifunctional molecule. The ratio of equivalent weight of the functional groups of the first and second precursor molecules is between 0.9 and 1.1. The molecular weights of the arms of the first precursor molecule, the molecular weight of the second precursor molecule and the functionality of the branching points are selected such that the water content of the resulting polymeric network is between the equilibrium weight % and 92 weight % of the total weight of the polymeric network after completion of water uptake. Preferably the water content is between 93 and 95 weight % of the total weight of the polymeric network and the water after completion of water uptake. Completion of water uptake can be achieved either when the equilibrium concentration is reached or when the space available in the matrix does not allow for further volume increase. It is therefore preferred to choose the starting concentrations of the precursor components to be as low as possible. This is true for all swellable matrices but in particular for those matrices which undergo cell-mediated degradation and do not contain hydrolytically degradable linkages in the polymeric network.

The balance between gelling time and low starting concentration in particular for hydrolytically non-degradable gels should to be optimized based on the structure of the precursor molecules. In particular, the molecular weight of the arms of the first precursor molecule, the molecular weight of the second precursor molecule and the degree of branching, i.e. the functionality of the branching points, have to be adjusted accordingly. The actual reaction mechanism has a minor influence on this interplay.

26

If the first precursor molecule is a three or four arm polymer with a functional group at the end of each arm and the second precursor molecule is a linear bifunctional molecule, preferably a peptide containing at least two cysteine groups, then the molecular weight of the arms of the first precursor molecule and the molecular weight of the second precursor molecule are preferably chosen such that the links between the branching points after formation of the network have a molecular weight in the range of between 10 to 13 kDa (under the conditions that the links are linear, not branched), preferably between 11 and 12 kDa. This allows for a starting concentration of the sum of first and second precursor molecules in a range of between 8 to 12 weight %, preferably between 9 and 10 weight% of the total weight of the first and second precursor molecule in solution (before network formation). In case the branching degree of the first precursor component is increased to eight and the second precursor molecule is still a linear bifunctional molecule, the molecular weight of the links between the branching points is preferably increased to a molecular weight of between 18 to 24 kDa. When the branching degree of the second precursor molecule is increased from a linear to a three or four arm precursor component, the molecular weight, i.e. the length of the links increase accordingly. In a preferred embodiment a composition is chosen including as the first precursor molecule a trifunctional three arm 15kD polymer, i.e. each arm having a molecular weight of 5kD and as the second precursor molecule a bifunctional linear molecule of a molecular weight in the range of between 0.5 to 1.5kD, even more preferably around 1kD. Preferably the first and the second precursor component is a polyethylene glycol.

In a preferred embodiment the first precursor component includes as functional groups conjugated unsaturated groups or bonds, most preferred an acrylate or a vinylsulfone and the functional groups of the second precursor molecule includes a nucleophilic group, preferably a thiol or amino groups. In another preferred embodiment of the present invention the first precursor molecule is a four arm 15 to 20kD polymer, preferably 15kD polymer, having functional groups at the terminus of each arm and the second precursor molecule is a bifunctional linear molecule of a molecular weight in the range of between 3 and 4 kDa, preferred between 3.4 kDa. Preferably the first precursor molecule is a polyethylene glycol having acrylate groups and the second precursor molecule is a polyethyleneglycol having thiol groups. In both preferred embodiments the starting concentration of the sum of first and second precursor molecule ranges from the 8 to 11 weight %, preferably between 9 and 10 weight % of the total weight of the first and second precursor molecule and water (before formation of polymeric network), preferably between 5

and 8 weight % to achieve a gelling time of below 10 minutes. These compositions have a gelling time at pH 8.0 and 37°C of about 3-10 minutes after mixing.

When the matrix contains hydrolytically degradable linkages, formed e.g. by the preferred reaction between acrylates and thiols, the network density with regard to cell infiltration is especially important in the beginning, but in aqueous environment the linkages will be hydrolyzed and the network will be loosened, to allow for cell infiltration. With an increase in the overall branching degree of the polymeric network the molecular weight of the interlinks, i.e. the length of the links must increase.

B. Cell attachment sites

Cells interact with their environment through protein-protein, protein-oligosaccharide and protein-polysaccharide interactions at the cell surface. Extracellular matrix proteins provide a host of bioactive signals to the cell. This dense network is required to support the cells, and many proteins in the matrix have been shown to control cell adhesion, spreading, migration and differentiation. Some of the specific proteins that have been shown to be particularly active include laminin, vitronectin, fibronectin, fibrin, fibrinogen and collagen. Many studies of laminin have been conducted, and it has been shown that laminin plays a vital role in the development and regeneration of nerves *in vivo* and nerve cells *in vitro*, as well as in angiogenesis. Some of the specific sequences that directly interact with cellular receptors and cause either adhesion, spreading or signal transduction have been identified.

Laminin, a large multidomain protein, has been shown to consist of three chains with several receptor-binding domains. These receptor-binding domains include the YIGSR (SEQ ID NO: 1) sequence of the laminin B1 chain, LRGDN (SEQ ID NO: 3) of the laminin A chain and PDGSR (SEQ ID NO: 4) of the laminin B1 chain. Several other recognition sequences for cells have been identified. These include IKVAV (SEQ ID NO: 5) of the laminin A chain, and the sequence RNIAEIIKDI (SEQ ID NO: 6) of the laminin B2 chain. Particularly preferred is the RGD sequence from fibronectin.

In a further preferred embodiment peptide sites for cell adhesion are incorporated into the matrix, namely peptides that bind to adhesion-promoting receptors on the surfaces of cells. Such

28

adhesion promoting peptides include those described above. Particularly preferred are the RGD sequence from fibronectin, the YIGSR (SEQ ID NO: 1) sequence from laminin. Incorporation of cell attachment sites is particularly preferred with synthetic matrices. However, cell attachment sites can also be included with some of the natural matrices. The incorporation can be accomplished, for example, by mixing a cysteine-containing cell attachment peptide with the precursor molecule including the conjugated unsaturated group, such as PEG acrylate, PEG acrylamide or PEG vinylsulfone. This step may occur shortly, e.g. a few minutes, before mixing with the remainder of the precursor component including the nucleophilic group, such as thiol-containing precursor component. If the cell attachment site does not include a cysteine, it can be chemically synthesized to include one. During this step, the adhesion-promoting peptide will become incorporated into one end of the precursor multiply functionalized with a conjugated unsaturation; when the remaining multi-thiol is added to the system, a cross-linked network will form.

The concentration of adhesion sites covalently bound into the matrix can influence the rate of cell infiltration. For example, for a given hydrogel, a RGD concentration range can be incorporated into the matrix with supports cell in-growth and cell migration in an optimal way. The optimal concentration range of adhesion sites like RGD is between 0.04 and 0.05 mM and even more preferably 0.05 mM in particular for a matrix having a water content between equilibrium concentration and 92 weight % after termination of water uptake.

A preferred embodiment is a supplemented matrix containing a bioactive factor, a four arm polyethylene glycol with a molecular weight of about 20,000 Da crosslinked with a protease degradation site GCRPQGIWGQDRC (SEQ ID NO: 7) and 0.050 mM RGD; this matrix demonstrates particularly good cell in-growth results and healing of bone defects. Preferably the matrix contains PTH 1-34 covalently bound to the matrix. The starting concentration of PEG and peptide is below 10 weight % of the total weight of the molecules and water (before swelling). The gels have a useable consistency and allow the osteoblasts and precursor cell to easily infiltrate the matrix.

C. Bioactive factors

Bioactive factors are the active ingredients for the treatment of the specific bone defects areas of non-healthy bone, e.g. osteoporosis and bone cysts. It has been surprisingly found that specific bioactive factors, i.e. PTH and BMP, in particular PTH₁₋₃₄, BMP2 and BMP 7 are suitable for local treatment of osteoporotic bones and bone areas as well as areas of bone cysts and bone tumours. In the past, these bone factors have been explored for systemic treatment. However, there was no suggestion that they may be useful active ingredients of locally applied formulations, insofar as the treatment of the bone defects are concerned. It has been found that when these bioactive factors are incorporated into an injectable matrix formulation and injected into specific bone defects areas of non-healthy bone they increase the bone density in that bone area. Preferably the bioactive factor is covalently attached to the above-described matrices, thus ensuring a controlled release of the bioactive factors. The bioactive factor may be in the form of a fusion peptide, which contains the bioactive factor in a first domain and a covalently crosslinkable substrate domain in a second domain. Optionally, a degradation site is located between the first and second domains.

a. PTH

The term "PTH" as used herein includes the human sequence of PTH₁₋₈₄ and all truncated, modified and allelic versions of PTH which exhibit bone formation properties when covalently bound to biodegradable natural or synthetic matrices. Preferred truncated versions of PTH are PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁, PTH₁₋₂₈ or PTH₁₋₂₅. Most preferred is PTH₁₋₃₄. Preferably, the PTH is human PTH, although PTH from other sources, such as bovine PTH, may be suitable.

b. BMP

The bone morphogenetic protein can be any of the known BMPs or any modified or allelic version of BMP exhibiting bone forming properties. Particularly preferred are BMP 2 and BMP 7.

BMP 2

The term "BMP 2" as used herein includes the human sequence of BMP 2₁₋₃₉₆ and all truncated, modified and allelic versions of BMP 2 which exhibit similar biological activity when covalently bound to biodegradable natural or synthetic matrices. A preferred truncated version of BMP 2 is BMP 2₂₈₃₋₃₉₆. Preferably, the BMP 2 is human BMP 2, although BMP 2 from other sources may be suitable, in particular from mouse or rat in view of a 100% identity of the amino acid sequences of BMP 2 from humans, mice or rats.

BMP 7

The term "BMP 7" as used herein includes the human sequence of BMP 7₁₋₄₃₁ and all truncated, modified and allelic versions of BMP 7 which exhibit similar biological activity when covalently bound to biodegradable natural or synthetic matrices. A preferred truncated version of BMP 7 is BMP 7₂₉₃₋₄₃₁. Preferably, the BMP 7 is human BMP 7, although BMP 7 from other sources may be suitable, in particular from mouse in view of a 98% identity of the amino acid sequences of BMP 7 from humans and mice.

c. Fusion Peptides

Crosslinkable substrate domains

The fusion peptides comprise at least two domains wherein the first domain comprises the bioactive factor and the second domain comprises a substrate domain crosslinkable to the matrix before, during or after its formation. The substrate domain can be a domain for an enzyme, preferably a substrate domain for a transglutaminase ("transglutaminase substrate domain"), more preferably for a tissue transglutaminase ("tissue transglutaminase substrate domain"), and most preferably it is a substrate domain for Factor XIIIa ("Factor XIIIa substrate domain").

Transglutaminases catalyse acyl-transfer reactions between the gamma-carboxamide group of protein bound glutaminy residues and the epsilon-amino group of lysine residues, resulting in the formation of N-epsilon-(gamma-glutamyl)lysine isopeptide side chains bridges. The amino acid sequence of the fusion peptide can be designed to further contain an enzymatic or hydrolytic

31

cleavage site, thus that the bioactive factor can be released with little or no modification to the primary structure. Transglutaminase substrate domains and in particular, Factor XIIIa substrate domains are suitable to link the fusion peptide to fibrin matrices but also to synthetic matrices in case pending primary amino groups are present at the synthetic molecule. When used with a fibrin matrix the degradation site in the fusion peptide is preferably enzymatically degradable, so that the release of the PTH is controlled by cell specific processes, such as localized proteolysis.

The crosslinkable substrate domain may include *GAKDV* (SEQ ID NO: 8), *KKKK* (SEQ ID NO: 9), *YRGDTIGEGQQHHLGG* (SEQ ID NO: 10), or *NQEQVSPL* (SEQ ID NO: 2).

The most preferred Factor XIIIa substrate domain has an amino acid sequence of *NQEQVSPL* (SEQ ID NO: 2) and is herein referred to as "TG" and TG-PTH.

The PTH fusion peptide may be produced recombinantly or by chemical synthesis. The PTH 1-34 fusion peptide is preferably produced by chemical synthesis. The BMP fusion peptide is produced recombinantly preferably by bacterial processes.

For the incorporation of PTH, BMP 2 or BMP 7 into a matrix formed from synthetic precursor components, the PTH or BMP fusion peptide or any other peptide can be also incorporated when synthesized with at least one additional cysteine group (-SH) preferably at the N terminus of PTH₁₋₃₄, BMP 2 or BMP 7 as the crosslinkable substrate domain. The cysteine can be either directly attached to the PTH₁₋₃₄, BMP 2 or BMP 7 or through a linker sequence. The linker sequence can additionally include an enzymatically or hydrolytically degradable amino acid sequence, so that the PTH, BMP 2 or BMP 7 can be cleaved from the matrix by enzymes in substantially the native form. The free cysteine group reacts with the conjugated unsaturated group of the precursor component in a Michael type addition reaction. The thiol group of the cysteine can react with a conjugated unsaturated bond on the synthetic polymer to form a covalent linkage.

These sites may be degradable either by non-specific hydrolysis (i.e. an ester bond) or they may be substrates for specific enzymatic (either proteolytic or polysaccharide degrading) degradation.

32

The degradation sites allow the PTH, BMP 2 or BMP 7 to be released with little or no modification to the primary peptide sequence, which may result in higher activity of the factor. In addition, it allows the release of the factor to be controlled by cell specific processes. This allows factors to be released at different rates within the same material depending on the location of cells within the material. This also reduces the amount of total PTH₁₋₃₄, BMP 2 or BMP 7 needed, since its release is controlled by cellular processes. In one possible explanation for the strong healing of the above mentioned bone defects with PTH incorporated and preferably bound to a matrix, it is deemed important that the PTH is administered locally over an extended period of time (i.e. not just a single pulsed dose) but not in a continuous fashion. This is accomplished by a slow degradation, through either enzymatic cleavage or hydrolytic cleavage of the matrix. In this way, the molecule is then delivered through a pseudo-pulsed effect that occurs over a sustained period of time. When a preosteoblastic cell infiltrates the matrix, it will encounter a PTH molecule which will induce further proliferation of the preosteoblast as well as synthesis of multiple growth factors crucial for new bone formation. However, if that particular cell does not continue to liberate bound PTH from the matrix, it will not begin to produce interleukin-6, thereby avoiding the later stage catabolic effects on osteoclasts formation. The net result is then higher bone mineral density and net formation of bone matrix. Finally, the therapeutic effects of the peptide are localized to the defect region and are subsequently magnified.

Degradation sites of the fusion peptide

An enzymatic or hydrolytic degradation site can be present between the first and the second domains of the fusion peptide. The degradation sites may be degradable by specific enzymatic degradation. Preferably the degradation site is cleavable by an enzyme selected from the group consisting of plasmin and matrix metalloproteinase. By careful selection of K_m and k_{cat} of this enzymatic degradation site, degradation could be controlled to occur either before or after the matrix formation and/or by utilizing similar or dissimilar enzymes to degrade the matrix. These degradable sites allow the engineering of more specific release of bioactive factors from matrices. The degradable site can be cleaved by enzymes released from cells which invaded the matrix. The degradation site allows the rate of delivery to be varied at different locations within the matrix depending on cellular activity at that location and/or within the matrix. Additional benefits include the lower total drug dose within the delivery system, and spatial regulation of

release which permits a greater percentage of the drug to be released at the time of greatest cellular activity. The degradation site is abbreviated herein as “pl”.

Proteolytically degradable sites could include substrates for collagenase, plasmin, elastase, stromelysin, or plasminogen activators. Exemplary substrates are listed below. N1-N5 denote amino acids 1-5 positions toward the amino terminus of the protein from the site where proteolysis occurs. N1'-N4' denote amino acids 1-4 positions toward the carboxy terminus of the protein from the site where proteolysis occurs.

Table 1: Sample substrate sequences for protease

Protease	N5	N4	N3	N2	N1	N1'	N2'	N3'	N4'	SEQ ID NO
Plasmin ¹			L	I	K	M	K	P		SEQ ID NO:
Plasmin ¹			N	F	K	S	Q	L		SEQ ID NO:
Stromelysin ²	Ac	G	P	L	A	L	T	A	L	SEQ ID NO:
Stromelysin ²		Ac	P	F	E	L	R	A	NH ₂	SEQ ID NO:
Elastase ³			Z-	A	A	F	A	NH ₂		SEQ ID NO:
Collagenase ⁴		G	P	L	G	I	A	G	P	SEQ ID NO :
t-PA ⁵	P	H	Y	G	R	S	G	G		SEQ ID NO :
u-PA ⁵	P	G	S	G	R	S	A	S	G	SEQ ID NO:

Reference:

- 1 Takagi and Doolittle, (1975) *Biochem.* 14:5149-5156.
2. Smith et al., (1995). *J. Biol. Chem.* 270:6440-6449.
3. Besson et al., (1996) *Analytical Biochemistry* 237:216-223.
4. Netzel-Arnett et al., (1991) *J. Biol. Chem.* 266:6747-6755.
5. Coombs et al., 1998. *J. Biol. Chem.* 273:4323-4328

In a preferred embodiment, the sequence YKNR (SEQ.NO: 11) is located between the first domain and the second domain and makes the linkage plasmin degradable.

A particular preferred PTH fusion peptide is TGplPTH:

NQEQVSPLYKNRSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 12)

Enzymes that could be used for proteolytic degradation are numerous. Proteolytically degradable sites could include substrates for collagenase, plasmin, elastase, stromelysin, or plasminogen activators.

In another preferred embodiment an oligo-ester domain could be inserted between the first and the second domain. This can be accomplished using an oligo-ester such as oligomers of lactic acid.

Design of fusion proteins for incorporation

Preferred fusion proteins include:

TG-PTH₁₋₃₄: This is a modified form of PTH comprising the amino acids 1-34 of the native PTH as well as a TG (transglutaminase) substrate domain:

NQEQVSPLSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 13)

TG-pl-PTH₁₋₃₄: This form corresponds to TG-PTH except that it additionally contains a plasmin-degradable sequence (pl) between the TG sequence and the PTH₁₋₃₄: NQEQVS-PLYKNRSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 12)

TG-BMP 2₂₈₃₋₃₉₆: This is a modified form of BMP 2 comprising the amino acids 283-396 of the native PTH as well as a TG (transglutaminase) substrate domain:

Met-Asn- Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Pro-Val-Glu-Leu-Pro-Leu-Ile-Lys-Met-Lys-Pro-His-BMP 2₂₈₃₋₃₉₆ (SEQ ID NO: 14)

Combination of Matrices or precursor components and bioactive factors

In a preferred embodiment the supplemented synthetic or fibrin matrix (respectively its precursor solutions) comprises the matrix and PTH or PTH fusion peptide, preferably in a concentration range of between 0.01 and 2 mg PTH or PTH fusion peptide/mL matrix or precursor components forming the matrix, preferably of between 0.02 to 1.0 mg PTH or PTH fusion peptide/mL matrix or precursor components forming the matrix, more preferably of between 0.03 and 0.5 mg PTH or PTH fusion peptide/mL matrix or precursor components forming the matrix and most

preferably in a range of between 0.05 to 0.2 mg PTH or PTH fusion peptide/mL of matrix or precursor components forming the matrix. Depending on the age of the patient, certain subranges of the PTH concentration or PTH fusion peptide concentration are preferred. If the supplemented matrix is applied to treat bone cysts in children, the concentration of PTH or PTH fusion peptide is preferably in a range of between 0.01 and 0.35 mg PTH or PTH fusion peptide/mL matrix or precursor components forming the matrix and most preferably in a concentration range of between 0.05 and 0.15 mg PTH or PTH fusion peptide/mL matrix or precursor components forming the matrix. Whereas if the formulation is applied to locally increase the bone density of osteoporotic bone in adults, the preferred concentration of PTH or PTH fusion peptide is in a range of between 0.5 and 2 mg PTH or PTH fusion peptide/mL matrix or precursor components forming the matrix, more preferably between 0.7 and 1.5 mg PTH or PTH fusion peptide/mL matrix or precursor components and most preferably between 0.9 and 1.1 mg PTH or PTH fusion peptide/mL matrix or precursor components forming the matrix. In a preferred embodiment the matrix is a fibrin matrix.

II. Methods for incorporation and/or release of bioactive factors

In one preferred embodiment for incorporation of a bioactive factor, like PTH, or BMP or a fusion peptide within the matrix, the bioactive factor will be incorporated, physically or chemically within the matrix during its gelation. In case of a fibrin matrix, Factor XIIIa is a transglutaminase that is active during coagulation to fibrin. This enzyme, formed naturally from factor XIII by cleavage by thrombin or additionally added to the fibrin precursor solutions if higher concentrations are required, functions to attach fibrin chains to each other via amide linkages, formed between glutamine side chains and lysine side chains. The enzyme also functions to attach other peptides to fibrin during coagulation. Specifically the sequence NQEQVSPL (SEQ ID NO: 2), has been demonstrated to function as an effective substrate for Factor XIIIa. In case of synthetic matrices the fusion peptide should be a functional group being able to react with a functional group of the precursor components forming the synthetic matrix under physiological conditions in the body. For example if the precursor molecule contains acrylate groups the fusion peptide should contain free thiol groups which react with the acrylate group in a Michael type addition reaction. Depending of the nature of the bioactive factor mixing of an unmodified factor is also possible to achieve a sustained release from the matrix.

III. Methods of Application

The supplemented matrices may be formed *in situ* at the desired location upon injection of the separated precursor components, or may be preformed and then implanted into the desired location. Depending on the indication the supplemented matrices are applied or injected at different stages of gelation. If the matrix is injected into bone cysts, it is preferably applied right after mixing of the precursor solutions, i.e. in a still liquid state. If the injection of the supplemented matrix is in areas of non-healthy bones which are affected by osteoporosis, they are preferably injected in a pre-gelled state. The precursor solutions are mixed and after gelation (usually after about 30 sec to 2 min) the gel is injected through a thick needle into the affected area in the bone. This is done to prevent leakage of a still liquid matrix into the blood circulation.

For some of the indications there might be the desire to see distribution of the material in the bone area to which it is applied during injection. In a preferred embodiment, an X-ray contrast agent, preferably one that is soluble in the matrix material, is added to the matrix precursor material.

Generally, contrast agents are classified as ionic and non-ionic contrast agents. Non-ionic contrast agents are preferred, although ionic contrast agents may also be used. Iodine-containing X-ray contrast agents are preferred.

Preferred non-ionic contrast agents include iodixanol, iohexol, iopamidol, iopentol, iopromide, iorneprol, iosimide, iotasul, iotrolan, ioversol, ioxilan, and metrizamide. The most preferred non-ionic contrast agent is Iohexol (CAS No. 66108-95-0). If iohexol is added to visualise the gel under fluoroscopy or X-ray, the matrix preferably contains 100 to 600 mg per millilitre of the matrix or precursor solutions that form the matrix, more preferably 250 to 500 mg per millilitre of the matrix or the precursor components forming the matrix, most preferably 300 to 450 mg per millilitre in the matrix or the precursor components forming the matrix.

Preferred ionic contrast agents include diatrizoate, iobenzamate, iocarmate, iocetamate, iodamide, iodipamide, iodoxamate, ioglicate, ioglycamate, iopanoate, iophendylate, iopronate, ioserate, iothalamate, iotroxate, ioxaglate, ioxithalamate, and metrizoate.

Contrast agents are commercially available and can be readily synthesized, as is well-known to the man skilled in the art.

Monitoring of the contrast agents may be accomplished with the methods generally used in the art, for example by X-ray, magnetic resonance imaging (MRI) or ultrasound imaging. It is well-known that contrast agents function by either modifying the X-ray absorption characteristics of the body sites in which they are distributed, by modifying the relaxation times of the water protons and thus are observable via magnetic resonance imaging, or by modifying the speed of sound or density in the body sites in which they are distributed. According to the present invention, it is preferred to use contrast agents which can be monitored by X-ray imaging.

As described herein, the supplemented matrix formulation injected into the body at different stages of gelation can gel *in situ* in or on the body. In another embodiment the supplemented matrix can be formed outside the body and then applied in the preformed shape. Irrespective of the kind of precursor component used, the precursor components should be separated prior to application of the mixture to the body to prevent combination or contact with each other under conditions that allow polymerization or gelation of the components. To prevent contact prior to administration, a kit which separates the compositions from each other may be used. Upon mixing under conditions that allow polymerization, the compositions form a bioactive factor supplemented three dimensional network. Depending on the precursor components and their concentrations, gelling can occur quasi-instantaneously after mixing.

In one embodiment the matrix is formed from fibrinogen. Fibrinogen, through a cascade of various reactions gels to form a matrix, when brought in contact with thrombin and a calcium source at appropriate temperature and pH. The three components, fibrinogen, thrombin, and the calcium source, should be stored separately. However, as long as at least one of the three components is kept separate, the other two components can be combined prior to administration.

In one embodiment, fibrinogen is dissolved (which may contain additionally aprotinin to increase stability) in a buffer solution at physiological pH (in a range from pH 6.5 to 8.0, preferably from pH 7.0 to 7.5) to form a first precursor solution and is stored separately from a solution of thrombin in a calcium chloride buffer (e.g. concentration range of from 40 to 50 mM). The buffer solution for the fibrinogen can be a histidine buffer solution at a preferred

38

concentration of 50 mM including additionally NaCl at a preferred concentration of 150 mM or TRIS buffer saline (preferably at a concentration of 33mM).

In a preferred embodiment, a kit contains a fusion protein, fibrinogen, thrombin, and a calcium source. Optionally, the kit may contain a crosslinking enzyme, such as Factor XIIIa. The fusion protein contains a bioactive factor, a substrate domain for a crosslinking enzyme and, optionally, a degradation site between the substrate domain and bioactive factor. The fusion protein may be present in either the fibrinogen or the thrombin precursor solution. In a preferred embodiment the fibrinogen precursor solution contains the fusion protein.

The solutions are preferably mixed by a two way syringe device, in which mixing occurs by squeezing the contents of both syringes through a mixing chamber and/or needle and/or static mixer.

In a preferred embodiment, both fibrinogen and thrombin are stored separately in lyophilised form. Either of the two can contain the bioactive factor, which is preferably a fusion protein. Prior to use, the tris or histidine buffer is added to the fibrinogen, the buffer may additionally contain aprotinin. The lyophilized thrombin is dissolved in the calcium chloride solution. Subsequently, the fibrinogen and the thrombin solutions are placed in separate containers/vials/syringe bodies and mixed by a two way connecting device, such as a two-way syringe. Optionally, the containers/vials/syringe bodies are bipartited thus having two chambers separated by an adjustable partition which is perpendicular to the syringe body wall. One of the chambers contains the lyophilised fibrinogen or thrombin, while the other chamber contains an appropriate buffer solution. When the plunger is pressed down, the partition moves and releases the buffer into the fibrinogen chamber to dissolve the fibrinogen. Once both fibrinogen and thrombin are dissolved, both bipartite syringe bodies are attached to a two-way connecting device and the contents are mixed by squeezing them through the injection needle attached to the connecting device. Optionally, the connecting device contains a static mixer to improve mixing of the contents.

In a preferred embodiment the fibrinogen is diluted eight fold and thrombin is diluted 20 fold prior to mixing. This ratio results in a gelation time of approximately one minute.

39

In another preferred embodiment, the supplemented matrix is formed from synthetic precursor components capable of undergoing a Michael addition reaction. Since the nucleophilic precursor component (the multi-thiol) only reacts with the multi-acceptor component (the conjugated unsaturated group) at basic pH, the three components which have to be stored separately prior to mixing are: the base, the nucleophilic component and the multi-acceptor component. Both the multi-acceptor and the multi-thiol component are stored as solutions in buffers. Both of the compositions can include the cell attachment site and additionally the bioactive molecule. Thus, the first composition of the system can for example include the solution of the nucleophilic component and the second composition of the system can include the solution of the multi-acceptor component. Either or both of the two compositions can include the base. In another embodiment, the multi-acceptor and the multi-thiol can be included as solution in the first composition and the second composition can include the base. Connecting and mixing occurs in the same way as previously described for fibrinogen. The bipartite syringe body is equally suitable for the synthetic precursor components. Instead of fibrinogen and thrombin the multi-acceptor and multi-thiol components are stored in pulverized form in one of the chamber and the other chamber contains the basic buffer.

Additionally, other components beside the above mentioned ingredients may be incorporated into the systems of the present invention. For example, a material containing a calcium mineral, i.e. a naturally occurring homogenous substance containing calcium ions such as hydroxyapatite, may be used.

While the compositions and methods have been described in terms of preferred embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the composition, methods and in the steps or in the sequence of steps of the method described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention.

Examples

Example 1: Bioactivity of PTH₁₋₃₄ and TGpIPTH₁₋₃₄

PTH₁₋₃₄- peptide showing similar activity to the full length PTH₁₋₈₄, and proteins of this length can be synthesized by standard solid state peptide synthesis methods.

All peptides were synthesized on solid resin using an automated peptide synthesizer using standard 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chemistry. Peptides were purified by c18 chromatography and analyzed using reverse phase chromatography via HPLC to determine purity as well as mass spectroscopy (MALDI) to identify the molecular weight of each product. Using this method, PTH₁₋₃₄ as well as, TG-pl-PTH₁₋₃₄ (NQE QVSPLYKNRSVSEIQLMHN LGKHLNSMERVEWL-RKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 12)) and TGPTH₁₋₃₄ (NQE QVSPLSVSEIQLMHN LGKHLNSMERVEWL RKKLQDVHNF (SEQ ID NO: 13)) were synthesized. TGplPTH₁₋₃₄ and TGPTH₁₋₃₄ differs from PTH₁₋₃₄ in that it additionally comprises the Factor XIIIa substrate domain which is linked to PTH₁₋₃₄ via the plasmin degradable pl-sequence YKNR (SEQ ID NO: 15) in case of TGplPTH₁₋₃₄ and directly in case of TGPTH₁₋₃₄.

To study the bioactivity of the PTH fusion peptides, a reporter gene assay was established. In this assay, a plasmid that contains luciferase reporter gene which is linked to the promoter for the parathyroid hormone receptor is transfected into cells. Then, if the cell is exposed to PTH and the PTH subsequently binds to its receptor on the cell, a signal cascade, directed through elevated cAMP levels, is initiated. Through a natural feedback regulation, this then leads to a reduction of PTH receptor levels. As the reduction is directed through the promoter, it also then leads to a decrease in production of the linked reporter gene. Using this assay, the activity of both native PTH₁₋₃₄ as well as TG-pl-PTH₁₋₃₄ were studied and compared to an international standard. It was observed that both of these molecules showed a similar level of activity, as the reduction in reporter gene expression for both was the same, and this level of activity was the same as for the international standard. The results are shown in Figure 1.

Example 2: PTH release from a fibrin matrix

A fibrin matrix was made from TISSEEL[®] Kit (Baxter AG, CH-8604 Volketswil/ZH) fibrin precursor components. The composition is listed in Table 2. In the presence of 0.1 µg/ml of PTH₁₋₃₄ or TGPTH₁₋₃₄ was then added to the thrombin, and mixed to form a homogenous concentration. TGPTH₁₋₃₄ only has a transglutaminase sequence at the amino terminus, without a degradation site. Thus, TGPTH₁₋₃₄ can only be liberated by degradation of the fibrin matrix itself. This peptide was synthesized as described above in Example 1.

For the first release assay, a fibrin matrix of 50 μ l with 0.1 mg PTH or TGPTH per ml fibrin matrix was incubated at 37°C in 10 ml buffer. Therefore, the concentration of PTH or TGPTH in the buffer in case of a total release would be 0.5 μ g PTH or TGPTH /mL fibrin matrix. In order to compare the stability of PTH or TGPTH during the assay, samples of PTH or TGPTH were diluted directly in the buffer to a concentration of 0.5 μ g PTH or TGPTH /mL fibrin matrix. Different buffers were tested: distilled water, phosphate buffer saline, tris-buffer saline.

Aliquots were taken at days 0, 1, 2, 4 and 6 and analysed by direct ELISA. The results showed that the PTH was not stable for more than 2 days in any of the buffers. Therefore, no conclusion could be made on the release data. The PTH stability was certainly affected by its low concentration and the buffers that were not optimal.

The release experiment was repeated by using a stabilizing buffer containing 50 mM mannitol in a 10mM sodium acetate buffer. In addition, the buffer was exchanged every 2 days in order to prevent any degradation of peptide. The concentration of PTH or TGPTH was increased to 1 mg PTH or TGPTH /mL fibrin matrix in a 100 μ l fibrin matrix and the incubation was achieved in 1 ml buffer. The concentration of PTH or TGPTH in the buffer in case of a total release would be 100 μ g/mL fibrin matrix (200 times more than before). As in the first experiment, spiked samples (same amount of PTH or TGPTH dissolved in the buffer as control) were prepared to evaluate the stability of PTH or TGPTH during the experiment (100 μ g/ml). Samples were collected every 2 to 4 days (with a change of buffer) during 2 weeks and analysed by direct ELISA. Spiked samples were also collected every 2 days. The results showed that under these conditions PTH and TGPTH are stable over 2 weeks.

As can be seen from Figure 2, the major release from the fibrin matrix is achieved within 3 days. Almost 60% of PTH and 13% of TGPTH were released after day 3. These data demonstrate the retention of PTH in the fibrin matrix is highly enhanced by addition of the TG sequence.

Example 3: Synthesis of a supplemented fibrin matrix comprising a PTH fusion peptide

The fibrin matrix was formed starting from the TISSEEL[®] Kit (Baxter AG, CH-8604 Volketswil/ZH) giving 4mL fibrin matrix. TISSEEL[®] was produced from human derived pooled

plasma and the content of active ingredients may vary from lot to lot within predefined ranges. Table 2 lists the final composition used.

Table 2: Final Composition comprising TISSEEL® and active component

Ingredients	Dose per 2 mL gel
Syringe 1	
Active Component: PTH ₁₋₃₄ fusion peptide (TGplPTH ₁₋₃₄)	0.2 to 20 mg
Clotting Agents Fibrinogen	66-100 mg
Other Proteins Aprotinin (Bovine)	2046-3409 KIE
Human Albumin	9.1-18.2 mg
Buffer Components Niacinamide	2.7-8.2 mg
L-Histidine	9.1-22.7 mg
Sodium Citrate	4.4-8.8 mg
Polysorbate 80	0.6-1.7 mg
Water for Injection	to 1 mL
Syringe 2	
Clotting Agents Thrombin (Human)	2.5-6.5 I.U.
Buffer Components Calcium Chloride	5.88±0.6 mg
Sodium Chloride	3.5-5.5 mg
Protein (human serum albumin)	45-55 mg
Water for Injection	to 1 mL

Fibrinogen was suspended in a solution with aprotinin, a serine proteinase inhibitor which helps reduce fibrolysis to retain the integrity of the fibrin matrix. This solution was inserted into a first chamber of a two-way syringe (syringe 1). Thrombin was provided separately in a calcium chloride solution in a second chamber of the two-way syringe (syringe 2). Fibrin sealants also con-

ained other components of fibrin scaffolds, such as plasma fibronectin, Factor XIII, plasminogen, and human albumin. TGpl-PTH₁₋₃₄ was formulated into the fibrinogen component to give a final concentration in the matrix of 0.1mg/mL to 10mg/mL in the matrix. The exact composition used is given in table 2.

When the fibrinogen and thrombin components were mixed in equal volumes, a clotting process occurred to form fibrin, a natural extracellular matrix. During the gelation process TGpl-PTH₁₋₃₄ became crosslinked to the matrix. The clotting process took place over 45-60 seconds which allowed for the simultaneous injection of liquids, through a mixer tip, into the defect, where the gel solidified.

Example 4: Treatment of subchondral cystic lesions in horses using PTH₁₋₃₄ cross-linked to an injectable fibrin matrix

Subchondral bone cysts in horses are a similar clinical entity to unicameral bone cysts in humans and have therefore been used as a model to assess the healing potential of PTH₁₋₃₄ cross-linked to fibrin matrices.

12 horses (12 cysts) were subject to surgery whereby the cyst content was removed by drainage curettage. Cysts were located at various joints in the foreleg as well as in the hind leg.

The composition of Example 3 containing equal volumes of fibrinogen and thrombin were injected into the SCLs together with TGplPTH₁₋₃₄ at final concentrations of 10, 1 and 0.4 mg/mL and allowed to polymerize *in situ*. An average volume of 2 mL of supplemented matrix was used to fill the defects, with volumes ranging from 0.2-5 mL of supplemented matrix. The age of the horses was ranging from 2 months to 11 years. Follow-ups were performed at 2, 4, 6 and 12 months postoperatively investigating radiographic as well as clinical healing.

Intralesional administration resulted in very good healing of the SCLs. All horses analyzed, showed significant progress in clinical and radiographic healing. Radiographic healing was reflected by a higher density of the cyst content and a reduction in cysts size and occurred 2-6 months postoperatively with a tendency to faster healing at lower concentrations of PTH₁₋₃₄. Al-

most all horses were clinically healed after only 2-4 months postoperatively, and thus showing no lameness anymore.

These results are especially encouraging as successful healing was achieved in adult horses with an age of 3 years or older, known to carry a particularly bad prognosis for bone regeneration.

Concentrations of 0.4 to 10 mg/mL have shown to be effective with a tendency of better healing at lower concentrations.

Treatments with the supplemented matrix containing lower doses of TGpIPTH₁₋₃₄ (0.1 mg/mL) have also shown to promote healing of SCLs.

TABLE 3: General patient information and location of the SCL

Internal No.	Race	Sex	Age	Location of the SCL
1	Inländer	mare	1 yr	1st phalanx / pastern joint, front left
2	Inländer	mare	10 yr	cannon bone / fetlock joint, front right
3	Württemberg	mare	11 yr	radius, right
5	Pinto	mare	3 yr	patella / stifle joint, right
7	Vollblut	mare	3 yr	sesamoid bone / fetlock joint, front right
12	Oldenburger	mare	3 yr	sesamoid bone / fetlock joint, front left
13	Inländer	mare	3 yr	femur / stifle joint, right
15	Inländer	mare	2 mo	osteomyelitis femur / stifle joint, right
16	Inländer	gelding	2 mo	osteomyelitis femur / stifle joint, right
18	Araber	gelding	5 yr	cannon bone / fetlock joint, front left
19	Inländer	stallion	3 yr	cannon bone / fetlock joint, front right
20	Inländer	gelding	9 yr	calcaneus bone, hock joint, right

TABLE 4: Lameness Grade Before and During Treatment

Internal No.	TGpIPTH ₁₋₃₄ in fibrin mat-rix[mg/mL]	Clinical healing (lameness grade)				
		Before treatment	2 months	4 months	6 months	12 months
2	10	3	2	healed	healed	healed
1	1	3-4	1	healed	-	healed
3	1	2	healed	healed	-	-
5	1	3	healed	-	healed	
7	1	2	1	healed	-	
19	1	1	healed	healed		
12	0.4	3	healed	healed	-	
13	0.4	2	healed	-		
15	0.4	5	2	-	healed	
16	0.4	4	1			
18	0.4	1	healed			
20	0.4	3	-	1		

healed = no lameness present
- = no control visit

The lameness was graded using the criteria set forth in Table 5.

TABLE 5: Lameness Grades and Corresponding Criteria

Lameness grade	Criteria
1 – minor, unclear	Lameness not consistently apparent: no lameness by walking, only irregular by trotting
2 – minor, clear	Lameness consistently apparent under spe- cial circumstances: no lameness by walking, lameness at each step by trotting
3 – medium	Lameness consistently apparent: clear lameness by walking and trotting
4 – high-grade lameness	Severe lameness
5 – highest-grade lameness	no loading anymore

Example 5: Rabbit Trabecular Bone Model

In order to study the potential for fibrin-TGpIPTH to induce the intraosseous thickening of trabe-
cular bone a rabbit model was established. 150µl of several doses of TGpIPTH in fibrin was in-
jected into the distal femurs of sixteen New Zealand White rabbits. The rabbits were anaesthe-
tised and the femoral condyles exposed. A small hole was drilled through the cortical bone into
the side of the condyle and the material introduced into the bone through a 22G needle connected

to a 1 mL syringe. Doses tested were 0, 0.1, 0.4, and 1.0 mg TGplPTH₁₋₃₄/mL of fibrin matrix with the opposite leg of each rabbit being an untreated control. After 8 weeks the animals were sacrificed and the femoral condyles subjected to μ CT to assess bone density following treatment. Bone density increased by approximately 10% following treatment with 1 mg TGplPTH₁₋₃₄/mL fibrin matrix.

Example 6: Visualization, monitoring and handling tests of radioopaque fibrin injected into ovine bone

In order to visualise the flow of a fibrin matrix within bone under fluoroscopy and X-ray, an iodine-based contrast agent, iohexol was incorporated into fibrin matrix. 600-800mg of iohexol was dissolved into the thrombin precursor solution to give final concentrations of 300-400mg/mL iohexol per fibrin matrix. A range of thrombin in the thrombin precursor composition (4-10U/mL) was tested. The other components of the fibrin matrix were as described in Table 2.

A gelation test showed that higher concentrations of thrombin were required to form the gel. Both components were injected as liquids simultaneously into the sheep vertebrae and distal femur via a dual syringe and a needle placed into the bone and allowed to polymerise *in situ*. The gel could be clearly visualised using X-ray and fluoroscopy.

Example 7: Pre-polymerised fibrin injected into ovine bone, visualisation and handling tests

In order to visualise and test the handling of a pre-polymerised fibrin matrix within bone under fluoroscopy and X-ray, an iodine-based contrast agent, iohexol was incorporated into the gel. 600-800mg of iohexol was dissolved into the thrombin dilution buffer to give final concentration of 300-400mg/mL iohexol in fibrin matrix. The thrombin precursor was added to the buffer-iohexol solution at a concentration of 75U/mL buffer solution. The other components of the fibrin matrix were as described in Table 2.

A gelation test showed that there was a rapid formation of the matrix upon mixing the precursor components comprising the thrombin and fibrinogen components. Both precursor solutions were injected as liquids simultaneously into a third syringe with a screw thread and allowed to fully

polymerise. The contrast agent containing matrix was introduced into ovine vertebrae through a large needle placed in the bone. The gel could be clearly visualised using X-ray and fluoroscopy.

28

Claims

1. Use of a formulation comprising a bioactive factor selected from the group consisting of a PTH and a BMP or a fusion peptide comprising a PTH or BMP in a first domain, and a covalently crosslinkable substrate domain in a second domain, and a composition capable of forming a matrix at a site in bone in need of treatment, for the manufacture of a medicament for locally treating non-healthy bone areas.
2. Use according to claim 1, wherein the fusion peptide is covalently linked to the matrix during its formation.
3. Use according to claim 1 or 2, wherein the composition capable of forming a matrix is injectable.
4. Use according to any of claims 1 to 3, wherein the non-healthy bone areas are selected from the group consisting of bone areas affected by osteoporosis, bone cysts and bone tumours.
5. Use according to any of claims 1 to 4, wherein the fusion peptide further comprises a degradation site between the first and the second domain.
6. Use according to any of claims 1 to 5, wherein the PTH is selected from the group consisting of PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₂₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ and PTH₁₋₂₅.
7. Use according to claim 6, wherein the PTH is PTH₁₋₃₄.
8. Use according to any of claims 1 to 7, wherein the BMP is BMP 2 or BMP 7.
9. Use according to any of claims 1 to 8, wherein the second domain of the fusion peptide comprises a transglutaminase substrate domain.
10. Use according to claim 9, wherein the transglutaminase substrate domain is a Factor XIIIa substrate domain.

11. Use according to any of claims 1 to 10, wherein the composition capable of forming a matrix comprises fibrinogen, thrombin, and a calcium source.
12. Use according to any of claims 1 to 11, wherein the matrix is formed by a Michael type addition reaction between a first precursor molecule comprising n nucleophilic groups and a second precursor molecule comprising m electrophilic groups, wherein n and m are at least two and the sum $n+m$ is at least five.
13. Use according to claim 12, wherein the electrophilic groups are conjugated unsaturated groups and the nucleophilic groups are selected from the group consisting of thiols and amines.
14. Use according to claim 12, wherein the precursor components are functionalized polyethylene glycols.
15. Use according to any of claims 1 to 14, wherein the second domain of the fusion peptide comprises at least one cysteine.
16. Use according to any of claims 1 to 15, wherein the composition capable of forming a matrix comprises more than one component, and wherein the formulation is provided in a kit in which at least one of the components of the composition capable of forming a matrix is stored separately from the other components of the composition.
17. Use according to claim 16, wherein the kit further comprises a crosslinking enzyme.
18. A formulation comprising
- i) a composition capable of forming a matrix under physiological conditions;
 - ii) a PTH, aBMP or a fusion peptide comprising at least two domains wherein the first domain comprises a PTH or BMP and the second domain comprising a crosslinkable substrate domain; and
 - iii) a contrast agent.

- 50
19. The formulation according to claim 18, wherein the PTH is PTH₁₋₃₄.
 20. The formulation according to claim 18 or 19, wherein the composition capable of forming a matrix comprises fibrinogen, thrombin and a calcium source.
 21. The formulation according to any of claims 18 to 20, wherein the composition capable of forming a matrix comprises a first precursor molecule comprising n nucleophilic groups and a second precursor molecule comprising m electrophilic groups, wherein n and m are at least two and the sum n+m is at least five.
 22. The formulation according to any of claims 18 to 21, wherein the contrast agent is selected from the group consisting of iodixanol, iohexol, iopamidol, iopentol, iopromide, iorneprol, iosimide, iotasul, iotrolan, ioversol, ioxilan, and metrizamide.
 23. The formulation according to claim 22, wherein the contrast agent is iohexol.
 24. The formulation according to any of the claims 18 or 23, wherein the composition capable of forming a matrix comprises more than one component, and wherein the formulation is provided in a kit in which at least one of the components of the composition capable of forming a matrix is stored separately from the other components of the composition.
 25. A supplemented matrix comprising a natural or synthetic matrix material, a bioactive factor selected from the group consisting of a PTH and a BMP and a contrast agent.
 26. The supplemented matrix according to claim 25, wherein supplemented matrix is formed from a composition capable of forming a matrix and a fusion peptide, comprising the bioactive factor in a first domain, and a covalently crosslinkable substrate domain in a second domain.
 27. The supplemented matrix according to claim 25 or 26, wherein the PTH is selected from the group consisting of PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₂₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ and PTH₁₋₂₅.

28. The supplemented matrix according to claim 27, wherein the PTH is PTH₁₋₃₄.
29. The supplemented matrix according to any of claims 25 to 28, wherein the BMP is BMP 2 or BMP 7.
30. The supplemented matrix according to any of claims 26 to 29, wherein the second domain of the fusion peptide comprises a transglutaminase substrate domain.
31. The supplemented matrix according to claim 30, wherein the transglutaminase substrate domain is a Factor XIIIa substrate domain.
32. The supplemented matrix according to any of claims 25 to 31, wherein the matrix material comprises fibrin.
33. The supplemented matrix according to any of claims 25 to 32, wherein the matrix material is formed by a Michael type addition reaction between a first precursor molecule comprising n nucleophilic groups and a second precursor molecule comprising m electrophilic groups, wherein n and m are at least two and the sum n+m is at least five.
34. A kit comprising fibrinogen, thrombin, a calcium source, a bioactive factor selected from the group consisting of PTH and a BMP and a contrast agent.

S2
13

FIG. 1

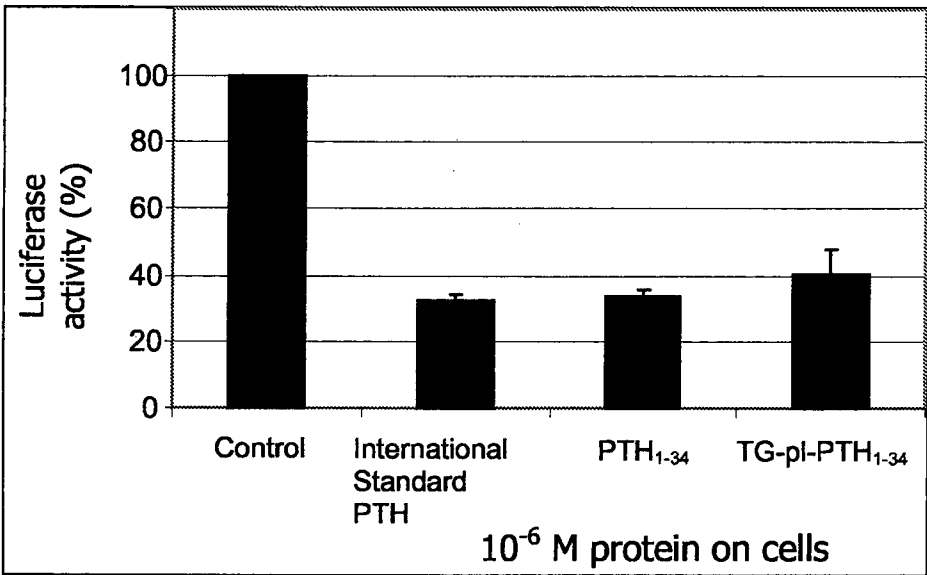
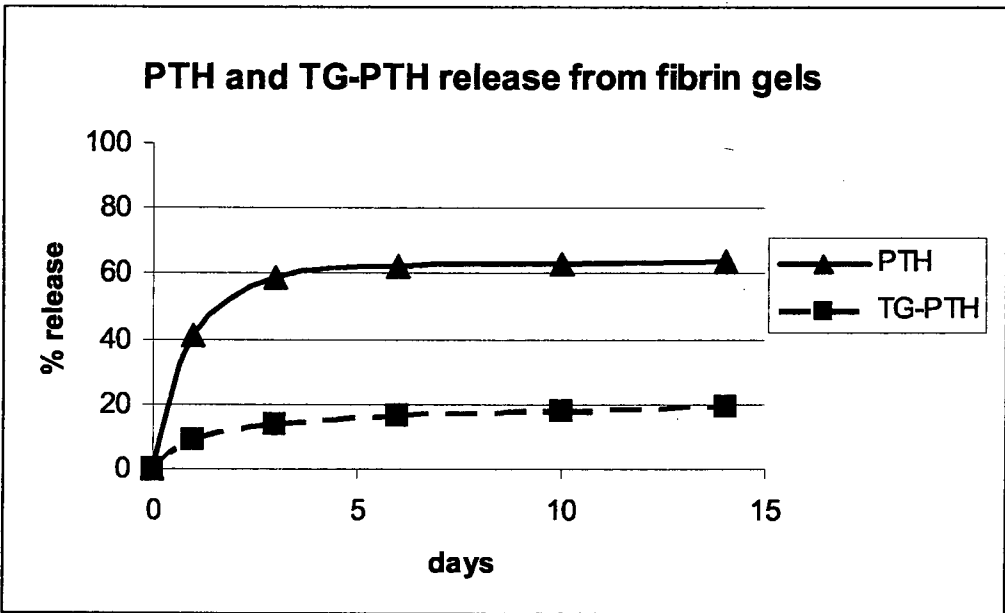


FIG. 2



TRATAMIENTO LOCAL DE DEFECTOS ÓSEOS CON MATRIZ DE
LIBERACIÓN DE BMP O PTH

Campo de la Invención

5

La presente invención se relaciona con un método para tratamiento local de quistes óseos y un tratamiento local profiláctico de áreas en huesos no saludables afectados por osteoporosis.

10 **Antecedente de la Invención**

Osteoporosis

La pérdida ósea es una parte natural del envejecimiento de hombres y mujeres
15 que pierden masa ósea en una proporción de 0.6 a 1.2% por año partiendo en promedio entre las edades de 40 a 50. Luego de la menopausia en las mujeres la pérdida ósea se acelera a 2-3% por año. Sin embargo, en particular en mujeres post menopáusicas, la tasa de pérdida ósea se puede incrementar dramáticamente. Este estado de la enfermedad se llama osteoporosis. La
20 osteoporosis es de mayor importancia a nivel mundial, que afecta casi doscientos millones de personas. En la actualidad diez millones de personas en los Estados Unidos sufren de osteoporosis y diez y ocho millones adicionales tienen osteopenia que los pone en riesgo de desarrollar la enfermedad. De esta población en riesgo, el 80% son mujeres. La osteoporosis es una enfermedad
25 esquelética sistémica que afecta generalmente el esqueleto completo en el cual la masa general ósea se reduce y la estructura ósea se deteriora, lo cual incrementa

54

la porosidad ósea. Estos cambios en la masa ósea y la estructura reducen la fortaleza general del hueso y lo hacen propenso a fractura.

La osteoporosis es una interacción compleja entre hormonas sistémicas y factores
5 locales y los mecanismos celulares exactos de la osteoporosis están por definir.
Como un resultado la terapia actual no aborda directamente la causa de la
condición. Por ejemplo, dos de los terapéuticos más comúnmente utilizados,
bifosfonatos, son a lo sumo solo 50% eficaces en la reducción de la incidencia de
fractura. Los bifosfonatos actualmente aprobados para uso incluyen alendronato
10 (FOSOMAX®), etidronato (DIDROCAL®) y risedronato (ACTONEL®). Dados en
forma de tableta o intravenosamente, los bifosfonatos son una familia de drogas
utilizadas para evitar y tratar la osteoporosis al recubrir los huesos y evitar la
actividades de osteoclastos.

15 **Quistes óseos**

Los quistes óseos son áreas líticas uniloculares benignas en el extremo próximo
de un hueso largo con márgenes endósticos angostos y bien definidos. Un quiste
óseo unicameral, conocido como un quiste óseo simple, es una cavidad llena de
20 fluido en el hueso, recubierto por tejido fibroso comprimido. Esto ocurre
usualmente en huesos largos de un niño en crecimiento, especialmente la parte
superior del húmero (50-60% del tiempo) o la parte superior del fémur (25-30% del
tiempo). Otros huesos, sin embargo, se pueden afectar. Estos quistes afectan
usualmente a los niños principalmente entre edades de 5 a 15, pero pueden
25 afectar a niños mayores o adultos. En niños mayores y adultos, ellos tienden a
ocurrir en huesos planos (tal como pelvis, mandíbula, cráneo o caja torácica) o en
el calcáneo grande (calcaneus).

SS

Los quistes óseos unicamerales se consideran benignos. Ellos no hacen metástasis (propagación) más allá del hueso. Algunos se curan espontáneamente mientras otros se agrandan. Los quistes más invasivos pueden crecer para llenar la mayoría de la metafisis del hueso (la zona de transición en donde el eje del hueso se une al extremo del hueso) y originar lo que se conoce como una fractura patológica. Un quiste más invasivo también pueden destruir la placa de crecimiento del hueso, conduciendo al acortamiento del hueso. Estos quistes son algunas veces clasificados como "activos" o "latente". Un quiste activo está adyacente a la placa de crecimiento y tiende a agrandarse, originando los problemas mencionados anteriormente. Un quiste latente es aquel que es más apto para curarse con tratamiento debido a que la placa de crecimiento ha migrado lejos del quiste.

El tratamiento actual está destinado principalmente a prevenir fracturas recurrentes. Los siguientes procedimientos quirúrgicos se aplican actualmente: injerto óseo/ legrado (un pelado quirúrgico del quiste con un instrumento especial llamado Legra que tiene una cuchara, aro o anillo en su punta, inyección de esteróides, o inyección de médula ósea.

Quistes óseos subcondriales pediarticulares, también referidas como lesiones quísticas subcondriales (SCL), pueden ocurrir en caballos jóvenes y son una entidad clínica similar para los quistes óseos unicamerales en humanos. Ellos son entidades patológicas comúnmente reconocidas que a menudo conducen a cojera en caballos jóvenes. El sitio más común en el que se encuentra el SCL es en la babilla (el equivalente de la rodilla humana). Específicamente, los quistes óseos se encuentran en la parte principal que lleva peso de la babilla (el cóndilo femoral

medio) y raramente en otras ubicaciones dentro de la articulación (tibia lateral
próxima y cóndilo femoral lateral). Las SCL son áreas radio transparentes del
hueso que, dependiendo de su etapa de desarrollo, son bien demarcadas del
tejido circundante a través de un aro esclerótico y se llenan generalmente con
5 tejido conectivo fibroso y fluido seroso que semeja fluido sinovial. En caballos, una
conexión de articulación para la superficie de cartílago articular subpradyacente se
puede encontrar en un tercer caso. El tamaño de un quiste femoral medio varía de
defectos con forma de domo superficiales (aproximadamente 8 mm por 3 mm) a
quistes con forma ovoide grandes de 40 mm por 30 mm.

10

Las opciones de tratamiento para SCL que producen cojera incluyen cirugía y
terapia intra articular corticosteroíde, anti artrítica, y descanso a largo plazo. La
terapia conservadora, que puede requerir 9 a 12 meses de descanso en prado, se
ha asociado con la resolución de la cojera. Desafortunadamente el número de
15 caballos manejados por la terapia conservadora que se han evaluado en la
literatura veterinaria es muy limitado, pero las tasas de éxito son de
aproximadamente 50%.

Numerosas técnicas quirúrgicas se han utilizado en el tratamiento de los quistes
20 óseos equinos. El tratamiento actualmente recomendado involucra remoción
artroscópica (legrado) de los contenidos quísticos, forrar el quiste y recubrir el
cartílago no soportado. Se utilizan técnicas adicionales en un intento para mejorar
la curación y mejorar el resultado han incluido perforación ósea en injerto, ambas
se consideran ahora que no ofrecen beneficio. Adicionalmente, los quistes óseos
25 pueden continuar expandiéndose y finalmente conducir a una osteoartritis
secundaria en la articulación equina.

Durante los pasados veinte años, se han investigado varios factores biológicos por su capacidad para influenciar la regeneración del tejido óseo. La hormona paratiroide (PTH) es un péptido de aminoácido 84 que se hace y secreta por la glándula paratiroide. Esta hormona juega un papel principal en controlar los niveles de calcio en suero a través de su acción en varios tejidos, que incluyen el hueso. Estudios en humanos con varias formas de hormona paratiroide han demostrado un efecto anabólico en el hueso cuando se aplican sistemáticamente. Esto hace a la hormona paratiroide interesante para el tratamiento sistémico de osteoporosis y trastornos óseos relacionados (Patente Estadounidense número 5, 747, 456 otorgada a Chorev, et al. y WO 00/10596 otorgada a Eli Lilly & Co). La hormona paratiroide actúa sobre las células al unir a un receptor de superficie celular. Este receptor se conoce por encontrarse en osteoblastos, las células que son responsables de la formación de hueso nuevo.

El dominio de aminoácido 34 N-terminal de la hormona paratiroide humana se ha reportado que es biológicamente equivalente a la hormona paratiroide de longitud completa. La hormona paratiroide ₁₋₃₄ y su forma de acción se reportan primero en la Patente Estadounidense número 4, 086, 196. Se ha hecho una investigación sobre la hormona paratiroide ₁₋₃₄ y otras versiones truncadas de la forma de hormona paratiroide humana nativa, como por ejemplo 1a 25, 1 a 31 y 1 a 38 (ver por ejemplo Rixon RH, et al., *J Bone Miner. Res*, 9 (8): 1179-89 (Aug. 1994).

El mecanismo mediante el cual el PTH influencia el remodelamiento óseo es complicado, que ha conducido a resultados conflictivos y posteriormente, un número significativo de estudios sobre los mecanismos exactos involucrados. Se ha demostrado que si el PTH se administra sistemáticamente en una forma continua, se reducirá aquella de la densidad ósea. En contraste, se ha reportado

que si la misma molécula se administra sistemáticamente en forma pulsátil, la densidad ósea se incrementará (ver por ejemplo WO 99/31137 otorgado a Eli Lilly & Co). Esta contradicción evidente se puede explicar por el mecanismo en la que el PTH modula la remodelación ósea y posteriormente el parámetro observable de la densidad ósea. Dentro del hueso maduro, el receptor PTH solo ha sido mostrado por estar presente en las superficies de las células de linaje de osteoblasto, pero no osteoclastos. El papel que juega el PTH en la remodelación ósea se dirige a través de los osteoblastos en oposición a los osteoclastos. Sin embargo, las células en diferentes etapas del linaje de osteoblasto responden de manera diferente cuando ellas se unen a la hormona paratiroide. Por lo tanto, las diferencias dramáticas que se observan cuando el PTH se administra utilizando diferentes métodos se pueden contar al entender los efectos diferentes que tiene la misma molécula sobre diferentes células dentro del linaje de osteoblastos.

Cuando el PTH se une a una célula madre mesenquimatosa, la célula se induce a diferenciación dentro de un preosteoblasto. Así, al agregar PTH a sistema, existe un incremento en la población de preosteoblastos. Sin embargo, estas células de preosteoblastos tienen el receptor PTH, y la posterior unión del PTH al receptor en estas células conduce a una respuesta diferente. Cuando el PTH se une al preosteoblasto, esto resulta en dos consecuencias separadas que conducen a la reabsorción ósea. Primero, esto inhibe la diferenciación adicional de los preosteoblastos en osteoblastos. Segundo, esto incrementa la secreción de interleukina 6 (IL-6) de los preosteoblastos. La IL-6 inhibe la diferenciación de preosteoblastos así como también incrementa la diferenciación de preosteoclastos dentro de los osteoclastos. Esta respuesta dual de las células dentro del linaje de osteoblastos es la que suministra la reacción compleja entre el remodelamiento óseo y la exposición al PTH. Si el PTH se dosifica periódicamente durante

periodos cortos de tiempo, entonces las células madre mesenquimatosas son inducidas a diferenciación dentro de los osteoblastos. Los periodos cortos de dosificación evitan luego nuevamente que los preosteoblastos formados de la producción de IL-6, eviten la activación de los osteoclastos. Por lo tanto, durante
5 los intervalos de dosificación, estos preosteoblastos formados nuevamente se pueden diferenciar adicionalmente en osteoblastos, resultando en formación ósea. Sin embargo, si se aplica una dosis constante de PTH, entonces los preosteoblastos tendrán la oportunidad de ser productores de IL-6, activando así los osteoclastos en inhibir lo mismos, conduciendo al efecto opuesto: reabsorción
10 ósea.

Otros factores bioactivos que se han explorado es el grupo de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y factores de transformación de crecimiento (TGF β s). Existen al menos 20 BMP estructural y funcionalmente relacionados y varios
15 TGF β s que son miembros de la súper familia TGF - β . Los BMP se identifican originalmente como reguladores de proteína de formación de hueso y cartílago. Ellas también están involucradas en la embriogénesis y morfogénesis de varios tejidos y órganos. El BMP regula el crecimiento, diferenciación, quimiotaxis y apoptosis de varios tipos celulares, que incluyen células mesenquimales, células
20 epiteliales, células hemotopoyéticas y células neuronales. De manera similar a las otras proteínas de la familia TGF - β , el BMP se conserva altamente en especies animales.

Las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 7 (BMP 2 y 7) son de interés específico
25 en aplicaciones de formación de cartílago o hueso. El BMP 2 induce la formación de cartílago y hueso. La proteína se sintetiza como un prepropéptido. El prepropéptido humano de longitud completa BMP es un polipéptido glicosilado que

tiene una secuencia de 396 aminoácidos, que consiste de una secuencia de señal de aminoácido 19, una región pro de aminoácido 263 y un segmento maduro de aminoácido 114. El clivaje de la pro- región ocurre antes de segregación. La forma madura tiene siete porciones de cisteína y un sitio de glicosilación N- ligado. La forma funcional de la proteína consiste de dos cadenas maduras ligadas a disulfuro. Se ha encontrado que las variantes BMP 2 solo consisten de una parte de la secuencia de aminoácido madura del BMP 2, tal como los aminoácidos 283 a 396, también exhiben actividad biológica.

El BMP 7 humano, o proteína-1 osteogénica (OP-1), es una proteína de aminoácido 431 de 49 kDa que se cliva, de forma similar al BMP 2, dentro de una preproregión de aminoácido 292 y un segmento maduro de aminoácido 139. El segmento maduro contiene tres sitios de glicosilación N- ligados potenciales más siete residuos de cisteína.

Para reparar tejidos o regeneración, las células deben migrar dentro de un lecho de herida, proliferar, en componentes de matriz de expresión o formar matriz extracelular, y formar un tejido final. Múltiples poblaciones celulares precipitan a menudo en esta respuesta morfogénica, que incluyen frecuentemente células neuronales y vasculares. Las matrices que tienen los factores bioactivos incorporados allí se han demostrado por mejorar grandemente, y en algunos casos haber encontrado ser esenciales, para que esto ocurra. Se han hecho aproximaciones en matrices para desarrollo a partir de orígenes naturales o sintéticos o una mezcla de ambos. Las células naturales en matrices de crecimiento se someten a remodelación por influencia celular, todas basadas en proteólisis, por ejemplo por plásmido (degradación por fibrina) y metaloproteinasas de matriz (degradación por colágeno, elastina, etc.). Tal degradación se localiza

principalmente y ocurre solo luego de contacto directo con las células que migran. Adicionalmente, el suministro de células específicas que señalan proteínas tal como factores de crecimiento se regula firmemente. En el modelo natural, no se utilizan matrices en crecimiento de células macroporosas, a diferencia de matrices microporosas que las células pueden degradar, localmente y luego de demanda, ya que las células migran dentro de la matriz. Debido a las preocupaciones relacionadas con la inmunogenisidad, producción costosa, disponibilidad limitada, variabilidad de tandas y purificación, las matrices basadas en moléculas precursoras sintéticas, tal como polietilenglicol modificado, se han desarrollado para la regeneración de tejidos en y/o sobre el cuerpo.

Mientras que muchos trabajos se han hecho al estudiar los efectos sistémicos del PTH, como se describió anteriormente, la investigación ha explorado bastante la administración local o tópica del PTH. En la WO 03/052091, se ha descrito una forma de administración local PTH. La WO 03/052091 describe la hormona paratiroide por estar unida covalentemente a matrices naturales y sintéticas, en particular fibrina y matrices de polietilenglicol. En esa forma, se puede administrar localmente la hormona paratiroide y liberar en el sitio de necesidad en una forma controlada. Se ha mostrado en la WO 03/052091 que este sistema activa la formación de tejido óseo en hueso saludable.

Es el objeto de la presente invención suministrar un método de tratamiento local de áreas en huesos no saludables, es decir huesos afectados por osteoporosis, o, es decir huesos afectados por quistes óseos y tumores óseos.

Resumen de la Invención

Se ha encontrado sorprendentemente que las áreas de los huesos no saludables, por ejemplo huesos o áreas óseas específicas que están afectadas y debilitadas por la osteoporosis o quistes óseos o tumores óseos, se puede tratar efectivamente por la administración local de factores bioactivos.

Así, la presente invención se relaciona con el uso de una formulación que comprende un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de un PTH y BMP o un péptido de fusión que comprende un PTH o un BMP en un primer dominio, y un dominio de sustrato reticulable covalentemente en un segundo dominio, y una composición capaz de formar una matriz en un sitio en un hueso en necesidad de tratamiento, para la fabricación de un medicamento para tratar localmente áreas óseas no saludables.

Las matrices que contienen un factor bioactivo (también referidas aquí como "matrices complementadas") que son adecuadas para la regeneración local de áreas de hueso no saludable o el incremento local de la densidad ósea en áreas de hueso no saludable y métodos para elaborar y utilizar las matrices se describen aquí. En una modalidad preferida del factor bioactivo es la liberación incorporada dentro de la matriz. La matriz se puede formar in situ en el sitio de las áreas óseas no saludables o, dependiendo de la indicación, se pueden formar al exterior del cuerpo y aplicar el cuerpo en la forma preformada a través de cirugía. El factor bioactivo se libera de la matriz y activa la regeneración de tejido óseo localmente.

Los factores bioactivos adecuados incluyen moléculas, péptidos y proteínas que tienen la capacidad de activar la regeneración de tejido óseo. Los factores

bioactivos son preferencialmente PTH o un BMP. La hormona paratiroide puede ser PTH₁₋₈₄ (nativa), PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁, PTH₁₋₂₈ o PTH₁₋₂₅, o cualquier versión alélica o modificada de PTH que tiene la capacidad de activar la regeneración de tejido óseo, o BMP₂ o BMP₇. Los factores bioactivos más
5 preferidos son PTH₁₋₃₄ o BMP₂. En una modalidad, el factor bioactivo está en un péptido de fusión. El péptido de fusión contiene un primer dominio que comprende un factor bioactivo, preferiblemente PTH o BMP y un segundo dominio que comprende un dominio de sustrato reticulable.

- 10 En una modalidad adicional preferida, el factor bioactivo forma parte de una composición precursora adecuada para formar una matriz complementada en el sitio de necesidad en el hueso afectado. La composición para formar la matriz complementada es preferiblemente inyectable y formada a partir de componentes
15 precursores líquidos (a 25°C). Un método para administrar la matriz complementada y/o en áreas de hueso no saludable requiere al menos un componente precursor líquido capaz de formar una matriz a temperaturas fisiológicas y un factor bioactivo y aplicar el componente precursor y el factor bioactivo a y/o dentro del área del hueso no saludable. Los defectos óseos, es decir las áreas de hueso no saludables son áreas óseas generalmente que se
20 afectan por la osteoporosis, los quistes óseos o tumores óseos. En el caso del hueso osteoporósico, el tratamiento resulta en un incremento local de la densidad ósea en la parte osteoporósica que puede ser, por ejemplo, el cuello femoral o vértebra (y así reducir la tasa de fractura del hueso o parte del hueso). En ese sentido el método de tratamiento de áreas no saludables de huesos con la matriz
25 complementada como se describe en la presente solicitud es un tratamiento profiláctico en particular para la prevención de fracturas óseas. En casos en que la matriz complementada se aplica en o su forma en una cavidad limpia de quiste

óseo o después de la remoción de un tumor óseo, la matriz complementada induce la formación ósea en la cavidad que sirve restaurar la integridad del hueso funcionalmente, así como también estructuralmente.

- 5 Preferiblemente la matriz es una matriz de fibrina o una matriz basada en polietilenglicol.

Las células también se pueden agregar a la matriz antes de o al tiempo de implantación, o aún posterior a la implantación, en o posterior a la reticulación del
10 polímero para formar la matriz. Esto puede ser en adición a o en lugar de reticular la matriz para producir espacio intersticial diseñado para promover la proliferación celular o el crecimiento interno.

En una modalidad, la matriz contiene uno o más agentes de contraste, y también
15 se puede formar en la ausencia de un factor de crecimiento. Generalmente los agentes de contraste permiten la formación de imágenes de la distribución y posicionamiento de la formulación durante la inyección y la gelación. Si la formulación se utiliza sin un factor bioactivo, la matriz se puede utilizar preferiblemente en el tratamiento de quistes llenos de fluido tal como quistes de
20 Tarlov, quistes de ovario, quistes aracnoides, quistes óseos aneurismales, o quistes hepáticos.

Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con una formulación A que comprende.

25

- i) una composición capaz de formar una matriz bajo condiciones fisiológicas;

65

- ii) un PTH, un BMP o un péptido de fusión que comprende al menos dos dominios en donde el primer dominio comprende un PTH o BMP y el segundo dominio comprende un dominio de sustrato reticulado; y

- iii) una agente de contraste.

La presente invención también se relaciona con una matriz complementada que comprende un material de matriz sintético o natural, un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de un PTH y un BMP y un agente de contraste.

La presente invención también se relaciona con un kit que comprende fibrinógeno, trombina, una fuente de calcio, un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de PTH y un BMP y un agente de contraste.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 muestra la bioactividad de las variantes PTH. Las células transfectadas con un gen reportero ligado a un promotor para un receptor PTH se tratan con cantidades iguales de PTH₁₋₃₄, TG-pl-PTH₁₋₃₄ (descrita aquí en adelante) o el aminoácido 84 internacional estándar. La inhibición de la expresión del gen reportero de luciferaza se mide y se compara con células transfectadas que no se exponen a PTH en solución (control).

La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo de liberación de PTH a partir de una matriz de fibrina.

Descripción detallada de la Invención

5

Se describe aquí un método para tratamiento local de defectos óseos y estructuras en huesos no saludables (áreas resumidas de huesos no saludables). Preferiblemente las áreas tratadas están en huesos osteoporóticos y/o quistes óseos y/o tumores óseos. El método utiliza matrices naturales y sintéticas que
10 tiene factores bioactivos, en particular PTH o BMP, incorporados de forma liberable en la matriz. Las matrices complementadas son inyectables, biocompatibles y biodegradables y se pueden formar in Vitro o in vivo, al tiempo de implantación. El factor bioactivo se puede incorporar dentro de las matrices y retener su bioactividad completa. Los Factores bioactivos particularmente
15 preferidos PTH₁₋₃₄, BMP 2 BMP 7 se pueden incorporar literalmente mediante interacción covalente o no covalente con la matriz, utilizando técnicas que suministran control sobre como y cuando y en que grado se libera el PTH o el BMP, de tal forma que la matriz complementada se puede utilizar para reparar directa o indirectamente tejido, utilizando la matriz complementada como un
20 vehículo de liberación controlada.

Definiciones

“Sitio de adhesión o sitio de adhesión celular” como se utiliza generalmente aquí se refiere a una secuencia de péptido a la que una molécula, por ejemplo, un
25 receptor de promoción de adhesión sobre la superficie de una célula, se une. Ejemplos de sitios de adhesión incluyen, pero no se limitan a, secuencia RGDE de fibronectina, y la secuencia YIGSR (SEQ ID No 1) de laminina. Los sitios de

adhesión se pueden incorporar opcionalmente dentro de la matriz al incluir un dominio de sustrato reticulable para la matriz de fibrina.

“Actividad biológica” como generalmente se utiliza aquí se refiere a eventos
5 funcionales mediados por una proteína de interés. En algunas modalidades, esto incluye eventos ensayados al medir las interacciones de un polipéptido con otro polipéptido. Esto también incluye ensayar el efecto que la proteína de interés tiene sobre el crecimiento celular, diferenciación, muerte, migración, adhesión, interacciones con otras proteínas, actividad enzimática, fosforilación de proteína o
10 desfosforilación, transcripción o traducción.

“Enlace conjugado insaturado” como se utiliza generalmente aquí se refiere a la alteración de enlaces múltiples carbono-carbono, carbono-heteroátomo o heteroátomo-heteroátomo con enlaces sencillos, o el enlace de un grupo funcional
15 con una macro molécula, tal como un polímero sintético o una proteína. Tales enlaces pueden experimentar reacciones de adición.

“Grupo insaturado conjugado” como se utiliza generalmente aquí se refiere a una molécula o una región de una molécula, que contiene una alternación de múltiples
20 enlaces carbono-carbono, carbono- heteroátomo o heteroátomo- heteroátomo con enlaces sencillos, que tienen un enlace múltiple que puede experimentar reacciones de adición. Ejemplos de grupos conjugados insaturados incluyen, pero no se limitan a vinilsulfonas, acrilatos, archilamidas, quinonas, y vinilpiridinio, por ejemplo, 2- o 4- vinilpiridinio en itaconatos.

“Agentes de contraste” como se utiliza generalmente aquí se refiere a una molécula o sustancia utilizada para incrementar un contraste de una imagen y que permite monitorear la sustancia o molécula en el cuerpo.

- 5 “Reticulación” como se utiliza generalmente aquí se refiere a la formación de uniones covalentes.

“Densidad de reticulación” como se utiliza generalmente aquí se refiere al peso molecular promedio entre dos reticulaciones (M_c) de las respectivas moléculas.

10

“Estado de equilibrio como se utiliza generalmente aquí se refiere al estado en el que un hidrogel no experimenta incremento de masa o pérdida cuando se almacena bajo condiciones constantes en agua.

- 15 “Peso equivalente” como se utiliza generalmente aquí se refiere a mMol de grupo funcional/g de sustancia

- “Matriz de fibrina” como se utiliza generalmente aquí se refiere al producto de un proceso en el que sustancialmente todos los componentes precursores de Fibrinógeno y trombina reticulan en la presencia de una fuente de calcio y Factor XIIIa para formar una red tridimensional. Los términos matriz, gel y red tridimensional o polimérica se utilizan como sinónimos.
- 20

- “Funcionaliza” como se utiliza generalmente aquí se refiere a la modificación de una molécula en una forma que resulta en la unión de un grupo funcional o porción. Por ejemplo, una molécula se puede funcionalizar mediante la introducción de una molécula que hace a la molécula un nucleófilo fuerte o una
- 25

molécula conjugada insaturada. Preferiblemente una molécula, por ejemplo PEG, se funcionaliza para llegar a ser un tiol, amina, acrilato, o quinona. Las proteínas, en particular, también se pueden funcionalizar efectivamente mediante reducción completa o parcial de enlaces de disulfuro para crear tioles libres.

5

“Funcionalidad” como se utiliza generalmente aquí se refiere al número de sitios reactivos sobre una molécula.

10

“Funcionalidad de los puntos de ramificación” como se utiliza generalmente aquí se refiere al número de brazos que se extienden desde un punto en la molécula.

15

“Péptidos de fusión o proteínas” como se utiliza generalmente aquí se refiere a un péptido o proteína que contiene al menos un primer y un segundo dominio. Un dominio contiene un factor bioactivo, preferiblemente PTH₁₋₃₄, BMP 2 o BMP 7 y el otro dominio contiene un dominio de sustrato reticulable con una matriz durante o después de su formación. Un sitio de degradación hidrolítica o enzimática también puede estar presente entre el primer y segundo dominio.

20

“Matriz” como se utiliza generalmente aquí se refiere a un material destinado a estar en interfaz con sistemas biológicos para tratar, aumentar, o reemplazar cualquier tejido o función del tejido dependiendo del material ya sea permanentemente o temporalmente. La matriz puede servir como un dispositivo de suministro para factores bioactivos incorporados allí y/o como una matriz de célula en crecimiento. Las matrices descritas aquí se forman a partir de componentes precursores líquidos que son capaces de formar un andamio en el cuerpo en el sitio de necesidad. Los términos “matriz” y “gel” se utilizan como sinónimos aquí. Los términos “matriz” y “gel” se refieren a la composición formada después que se

25



mezclan los componentes precursores. Así los términos "matriz" y "gel" abarcan parcialmente o completamente las redes poliméricas reticuladas. Ellas pueden estar en la forma de un líquido, semi sólido, tal como una pasta, o un sólido.

- 5 Dependiendo del tipo de materiales precursores, la matriz se puede hinchar con agua pero no disolver en agua, es decir forma un hidrogel que permanece en el cuerpo durante un cierto periodo de tiempo.

10 "Multifuncional" como se utiliza generalmente aquí se refiere a más de un grupo electrofílico y/o nucleofílico funcional por molécula (es decir monómero, oligo y polímero).

15 "Polímeros o componentes precursores de ocurrencia natural" como se utiliza generalmente aquí se refiere a moléculas que se pueden encontrar en la naturaleza.

"Huesos no saludables o áreas de huesos no saludables" como se utiliza generalmente aquí se refiere a hueso o partes de hueso, que tienen trastornos originados por deterioro genético o estructural originado por osteoporosis, inflamación local como en quistes óseos o crecimiento de tumor como en cáncer, es decir a la estructura ósea en un estado de enfermedad, con respecto a la clase de la enfermedad. Las fracturas óseas en huesos osteoporóticos se contemplan por ser un defecto óseo en el sentido de la presente invención.

25 "Osteoporosis" como se utiliza generalmente aquí se refiere a una enfermedad esquelética, sistémica caracterizada por pérdida de masa ósea y el deterioro estructural del tejido óseo, que incrementa la porosidad ósea y la susceptibilidad a

71

facturas. La pérdida ósea es asintomática, algunas personas pueden no ser consientes que ellas tienen osteoporosis hasta que ellas sufren fracturas óseas. Los dos mayores tipos de osteoporosis conocidos son: osteoporosis primario y osteoporosis secundaria. La osteoporosis primaria se subdivide en osteoporosis tipo I, que afecta mujeres que inician la menopausia y han origina pérdida ósea acelerada; y la osteoporosis tipo II que afecta personas en proceso de envejecimiento que han conducido a una reducción en la densidad ósea. La osteoporosis secundaria ocurre en personas que experimentan pérdida ósea secundaria a otras enfermedades o quienes utilizan ciertos tipos de drogas. La muñeca, vértebra y cadera son principalmente susceptibles a fracturas relacionadas con osteoporosis. Se prefiere el tratamiento de la osteoporosis tipo I.

"Matrices de polietilenglicol" como se utiliza generalmente aquí se refiere a el producto de un proceso en el que al menos dos componentes precursores de polietilenglicol con grupos funcionales de reticulación auto selectiva con la otra forman una red tridimensional reticulada. Estos sistemas se conocen y describen, tal como en la WO 03/052091.

"PTH" como se utiliza generalmente aquí incluye la secuencia humana de PTH₁₋₈₄ y todas las versiones truncadas, modificadas y alélicas de PTH que exhiben propiedades de formación ósea, en particular cuando se incorporan preferiblemente unidas covalentemente a una matriz de fibrina. Las versiones truncadas preferidas de PTH son PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ o PTH₁₋₂₅. El más preferido es el PTH₁₋₃₄. Preferiblemente, el PTH es PTH humano, aunque el PTH de otras fuentes, tal como el PTH bovino también puede ser adecuado.

72

"Periostio" como se utiliza generalmente aquí se refiere a la capa externa de los huesos que forman una capa fibrosa, densa, con la excepción de aquellas porciones que forman una estructura de articulación que cubre la estructura completa del hueso y contiene la basculatura que alimenta el tejido óseo exterior.

5

"Fisiológico" como se utiliza generalmente aquí se refiere a condiciones que ellas se pueden encontrar en vertebrados vivos. En particular, las condiciones fisiológicas se refieren a las condiciones en el cuerpo humano tal como temperatura y ph. La temperatura fisiológica significa en particular un rango de

10

temperatura entre 35°C a 42 °C, preferiblemente entre 37°C.

"Rede polimérica" como se utiliza generalmente aquí se refiere al producto de un proceso en el que sustancialmente todos los monómeros, oligos y polímeros se unen por enlaces covalentes intermoleculares a través de sus grupos funcionales

15

disponibles para resultar en una molécula grande.

"Neutrofilo fuerte" como se utiliza generalmente aquí se refiere a una molécula que es capaz de donar un par de electrones a un electrofilo en una reacción que forma enlace polar. Preferiblemente, el nucleófilo fuerte es más nucleofílico que el agua

20

en ph fisiológico. Ejemplos de nucleófilos fuertes son los tioles y las aminas.

"Moléculas precursoras sintéticas" como se utiliza generalmente aquí se refiere a moléculas que no existen en la naturaleza.

25

"Reacción auto selectiva" como se utiliza generalmente aquí significa que el primer componente precursor de una composición reacciona mucho más rápido con el segundo componente precursor de la composición y viceversa que con otros

compuestos presentes en una mezcla o en el sitio de reacción. Como se utiliza aquí, el nucleófilo se une preferencialmente a un electrofilo y un electrofilo se une preferencialmente a un nucleófilo fuerte, a diferencia de otros compuestos biológicos.

5

“Hinchamiento” como se utiliza generalmente aquí se refiere a un incremento en el volumen y masa mediante la toma de agua por la matriz. Los términos “toma de agua” en “hinchamiento” se utilizan como sinónimos a través de esta solicitud.

10 “Matriz complementada” como se utiliza generalmente aquí se refiere a una matriz en la que los factores bioactivos, opcionalmente péptidos de fusión se incorporan allí de forma liberable. Los factores bioactivos se incorporan a través de su interacción covalente o no covalente.

15 I. Matrices complementadas

A. Materiales de matriz

La matriz se forma por reticulación iónicamente, covalentemente, o por
20 combinaciones de moléculas precursoras de estos con una red polimérica y/o por hinchamiento de uno o más materiales poliméricos, es decir matrices, para formar una red polimérica que tiene suficiente espacio inter polímero para permitir el crecimiento interno o migración de células dentro de la matriz. En una modalidad la matriz se forma de proteínas, preferiblemente proteínas naturalmente presentes
25 en el paciente dentro del cual la matriz se implanta. Una proteína de matriz particularmente preferida es fibrina, aunque matrices hechas de otras proteínas, tal como colágeno y gelatina también se pueden utilizar. Los polisacáridos y

glicoproteínas también se pueden utilizar para formar la matriz. También es posible utilizar polímeros sintéticos que son reticulables por unión covalente o iónica.

5 **Matrices de fibrina**

La fibrina es un material natural que se ha reportado para varias aplicaciones biomédicas. La fibrina se ha descrito como material para matrices de células en crecimiento en la Patente Estadounidense número 6, 331, 422 otorgada a Hub-bell
10 et al. Los geles de fibrina se han utilizado como sellantes debido a su capacidad para unir muchos tejidos y su papel natural en la curación de heridas. Algunas aplicaciones específicas incluyen el uso como un sellante para unión de injerto vascular, unión de válvula cardíaca, posicionamiento óseo en fracturas, y reparación de tendones. Adicionalmente, estos geles se han utilizado como
15 dispositivos de suministro para drogas, y para regeneración neuronal. Aunque las fibrinas suministran un soporte sólido para la regeneración de tejidos y el crecimiento interno celular, existen pocas secuencias activas en el monómero que mejoran directamente estos procesos.

20 Los procesos mediante los cuales el fibrinógeno se polimeriza en fibrina también se han caracterizado. Inicialmente, una proteasa cliva la molécula de fibrinógeno dimérica en los dos sitios simétricos. Existen varias proteasas posibles que pueden clivar el fibrinógeno, que incluyen trombina, peptidaza, y proteasa III, y cada una sirve como la proteína en un sitio diferente. Una vez se cliva el
25 fibrinógeno, ocurre una etapa de auto polimerización en la que los monómeros de fibrinógeno llegan juntos y forman un gel de polímero reticulado no covalentemente. Este auto ensamble sucede debido a que los sitios de unión

llegan a estar expuestos después que ocurre el clivaje de proteasa. Una vez ellos se exponen, estos sitios de unión en el centro de la molécula pueden unirse a otros sitios en las cadenas de fibrinógeno, que están presentes en los extremos de las cadenas de péptido. De esta manera, se forma una red de polímero. El Factor XIIIa, una transglutaminasa activada a partir del Factor XIII por proteólisis de trombina, pueden luego reticular covalentemente la red de polímero. Existen otras transglutaminasas y también pueden estar involucradas en la reticulación covalente en injerto a la red de fibrina.

Una vez se forma el gel de fibrina reticulado, la posterior degradación se controla rígidamente. Una de las moléculas claves en controlar la degradación de la fibrina es el inhibidor $\alpha 2$ -plasmin. Esta molécula actúa al reticular a la cadena alfa de fibrina a través de la acción del Factor XIIIa. Al unir en si mismo al gel, se puede localizar una alta concentración de inhibidor para el gel. El inhibidor luego puede actuar al evitar la unión del plasminógeno a la fibrina en inactivar el plasmin. El inhibidor $\alpha 2$ -plasmin contiene un sustrato glutamina. La secuencia exacta se ha identificado como NQEQVESPL (SEQ ID No 2), siendo la primer glutamina el aminoácido activo para reticulación.

Se ha demostrado que los péptidos bidominio, que contienen una secuencia de sustrato de Factor XIIIa y una secuencia de péptido bioactivo, se puede reticular en la matriz de fibrina y que este péptido bioactivo retiene su actividad celular in Vitro.

Dependiendo de la indicación y las sustancias mezcladas en la matriz de fibrina la concentración de trombina puede variar. En una modalidad preferida, la matriz de fibrina contiene fibrinógeno en un rango de 5 a 65 mg por mililitro de matriz de

76

fibrina, más preferiblemente 15 a 60 mg por mililitro de matriz de fibrina, aún más preferiblemente de 25 a 55 mg por mililitro de matriz de fibrina, y más preferiblemente de 30 a 45 mg por mililitro de matriz de fibrina. La trombina está presente en un rango de 0.5. a 5 I.U. por mililitro de matriz de fibrina. Más
5 preferiblemente en un rango de entre 1.25 a 3.25 I.U. por mililitro de matriz de fibrina, más preferiblemente de 1.5 a 2.5 I.U. por mililitro de matriz de fibrina. Adicionalmente, una fuente de ión de calcio ayuda a formar la matriz de fibrina. La fuente de ión de calcio es preferiblemente $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en una concentración de 0.5 a 5 mg por ml de matriz de fibrina, aún más preferiblemente de 2 a 3.5 mg por
10 ml de matriz de fibrina, más preferiblemente de 2.5 a 3 mg por ml de matriz de fibrina. El I.U. representa una unidad internacional de trombina y se define como la actividad contenida en 0.0853 mg del primer estándar Internacional de Trombina Humano. Las matrices de fibrina complementadas formadas a partir de materiales presentes en estos rangos de concentración se utilizan preferiblemente para todas
15 las indicaciones que no requieren la adición de un agente de contraste, como quistes óseos y tumores óseos.

Cuando uno o más agentes de contraste se encuentran presentes en la matriz, la cantidad de trombina en la matriz de fibrina es generalmente mayor que la
20 cantidad de trombina en la misma matriz de fibrina en la ausencia de un agente de contraste. Los agentes de contraste están preferiblemente agregados cuando la matriz complementada se utiliza como un tratamiento profiláctico para evitar fracturas en huesos osteoporóticos, es decir dentro de la vértebra o cuello femoral. En estos casos típicamente la matriz de fibrina contiene trombina en un
25 rango de concentración entre 7.5 a 125 I.U. de trombina por mililitro de matriz de fibrina, preferiblemente en un rango entre 25 a 50 I.U. de trombina por mililitro de

matriz de fibrina, y más preferido en un rango entre 35 a 40 I.U de trombina por mililitro de matriz de fibrina.

Soluciones precursoras para formar matrices de fibrina

5

Se utiliza preferiblemente dos soluciones precursoras para formar una matriz de fibrina. La primer solución precursora contiene fibrinógeno, preferiblemente 10 a 130 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, más preferiblemente 30 a 120 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, aún más preferiblemente de 50 a 110 m,g de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, y más preferiblemente 60 a 90 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora. Si no se ha agregado trombina para formar la matriz y en aquellos casos en los que la indicación requiere uno o más agentes de contraste la segunda solución precursora contiene trombina, preferiblemente 15 a 250 I.U. de trombina por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 50 a 100 I.U. de trombina por mililitro de solución precursora, y más preferiblemente 70 a 80 I.U. de trombina por mililitro de solución precursora. Adicionalmente una fuente de ión de calcio puede estar presente en al menos una de las soluciones precursoras. La fuente de ión de calcio es preferiblemente $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, preferiblemente en una concentración de 1 a 10 mg por ml de solución precursora, aún más preferiblemente de 4 a 7 mg por ml de solución precursora, más preferiblemente 5 a 6 mg por ml de solución precursora. Opcionalmente, una enzima capaz de catalizar la formación de matriz, tal como el Factor XIIIa se agrega al menos una solución precursora. Preferiblemente, el Factor XIIIa está presente en una concentración de 0.5 a 100 I.U. por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 1 a 60 I.U por mililitro de solución precursora y más preferiblemente de 1 a 10 de I.U. por mililitro de solución precursora.

78

En los casos en los cuales la presencia de un agente de contraste no se requiere, la matriz de fibrina se forma preferiblemente de dos soluciones precursoras. La primer solución precursora contiene típicamente fibrinógeno, preferiblemente en un rango de concentración de 10 a 130 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 30 a 120 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, aún más preferiblemente de 50 a 110 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora, y más preferiblemente de 60 a 90 mg de fibrinógeno por mililitro de solución precursora. Si se ha agregado trombina para formar la matriz, la segunda solución precursora contiene trombina, preferiblemente en una rango de concentración de 1 a 10 I.U de trombina por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 2.5 a 6.5 I.U de trombina por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 3 a 5 I.U de trombina por mililitro de solución precursora. Adicionalmente una fuente de ión de calcio está en una de las soluciones precursoras. La fuente de ión de calcio es preferiblemente $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un rango de concentración de 1 a 10 mg por ml solución precursora, aún mas preferiblemente de 4 a 7 mg por ml de solución precursora, más preferiblemente de 5 a 6 mg por ml de solución precursora. Opcionalmente, una enzima capaz de catalizar la formación de matriz, como el Factor XIIIa se agrega a una solución precursora. Preferiblemente, el Factor XIIIa está presente en un rango de concentración de 0.5 a 100 I.U por mililitro de solución precursora, más preferiblemente de 1 a 60 I.U por mililitro de solución precursora, y más preferiblemente de 1 a 10 I.U por mililitro de solución precursora.

Matrices sintéticas y soluciones precursoras

Las reacciones de reticulación para formar matrices sintéticas para la aplicación en el cuerpo incluyen (i) polimerización de radical libre entre dos o más precursores que contienen enlaces dobles insaturados, como se describe en Hern et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 39; 266-276 (1998), (ii) reacción de sustitución nucleofílica tal como por ejemplo entre un precursor que incluye un grupo amina y un precursor que incluye un grupo succinimidilo como se describe en la Patente Estadounidense 5, 874,500 otorgada a Rhee et al., (iii) reacciones de condensación y adición, y (iv) reacciones de adición del tipo Michael entre un nucleófilo fuerte y un grupo insaturado conjugado o enlace (como un electrofilo fuerte). Se prefiere particularmente la reacción entre una molécula precursora que tiene un grupo amina o tiol como el grupo nucleofílico y moléculas precursoras que incluyen acrilato o grupos vinilsulfona como grupos electrofílicos. El grupo electrofílico más preferido es el grupo tiol. Las reacciones de adición del tipo Michael se describen en la WO 00/44808 otorgada a Hubbell et al. Las reacciones de adición del tipo Michael permiten la reticulación in situ de al menos un primer y un segundo componente precursor bajo condiciones fisiológicas en una forma auto selectiva, aún en la presencia de materiales biológicos sensibles. Cuando uno de los componentes precursores tiene una Funcionalidad de al menos 2 y al menos 1 de los otros componentes precursores tiene una Funcionalidad mayor de dos, el sistema reaccionará auto selectivamente para formar una matriz tridimensional reticulada.

Preferiblemente los grupos conjugados insaturados o enlaces conjugados insaturados son acrilatos, vinilsulfonas, metacrilatos, archilamidas, metacrilamidas, acrilonitrilos, vinilsulfonas, 2- o 4-vinilpiridinio, maleimidias, o quinonas.



Los grupos nucleofílicos son grupos tiol preferiblemente, grupos amino o grupos hidroxilo. Los grupos tiol son sustancialmente más reactivos que los grupos amina no protonados. El pH es importante en esta consideración: el tiol desprotonado es sustancialmente más reactivo que el tiol protonado. Por lo tanto, las reacciones de
5 adición que involucran una insaturación conjugada, tal como un acrilato o una quinona, con un tiol para convertir dos componentes precursores dentro de una matriz, a menudo se llevarán a cabo mejor y más rápidamente y auto selectivamente en un pH de aproximadamente 8. En el pH de aproximadamente 8, la mayoría de los tioles de interés se desprotona (y así son más reactivos) y la
10 mayoría de las aminas de interés se protona aún (y así son menos reactivas). Cuando se utiliza un tiol como la primera molécula precursora, una estructura de conjugado que es selectiva en su reactividad para el tiol con relación a las aminas es altamente deseable.

15 Las primeras y segundas moléculas precursoras adecuadas incluyen proteínas, péptidos, polioxisalquilenos, poli (vinilalcohol), poli(etileno-co-vinilalcohol), poli(ácido acrílico), poli (ácido etileno-co-acrílico, poli (etiloxasolina), poli (vinilpirrolidona), poli (etileno-co- vinilpirrolidona), poli (ácido maléico), poli (ácido etileno-co- maléico), poli (acrilamida), y copolímeros en bloque poli (óxido de etileno)-co-
20 poli(óxido de propileno). Una molécula precursora particularmente preferida es polietilenglicol.

El polietilenglicol (PEG) suministra un elemento fundamental conveniente. Uno puede comprar fácilmente o sintetizar en línea (significa con dos extremos) o
25 ramificado (significa más de dos extremos el PEG y luego funcionalizar los grupos de extremo PEG para introducir un nucleófilo fuerte, tal como un tiol, o una estructura conjugada, tal como un acrilato o una vinilsulfona. Cuando estos

componentes se mezclan con otros o con un componente correspondiente en un ambiente ligeramente básico, se formará una matriz por la reacción entre el primer y segundo componente precursor. Se puede hacer reaccionar un componente PEG con un componente no PEG, y el peso molecular o hidrofiliicidad de cualquier
5 componente se puede controlar para manipular las características mecánicas, la permeabilidad, y el contenido de agua de la matriz resultante.

En la formación de matrices, especialmente las matrices que se desean degrada in vivo, los péptidos suministran un elemento fundamental muy conveniente. Es
10 sencillo sintetizar péptidos que contengan dos o más residuos cisteína, y este componente puede luego servir fácilmente como el primer componente precursor con los grupos nucleofílicos. Por ejemplo, un péptido con dos residuos de cisteína libres formará fácilmente una matriz cuando se mezcla con un PEG tri-vinilsulfona (un PEG que tiene tres brazos con vinilsulfonas en cada uno de sus brazos) en ph
15 fisiológico o ligeramente mayor (por ejemplo, 8 a 9). La gelación también puede proceder bien en un ph mayor, pero en el costo potencial de auto selectividad. Cuando los dos componentes precursores líquidos se mezclan, ellos reaccionan durante un periodo de unos pocos minutos para formar un gel elástico, que contiene una red de cadenas PEG, que llevan los nodos de la red, con los
20 péptidos que conectan enlaces. Los péptidos se pueden seleccionar como sustratos de proteasa, para hacer la rede capaz de ser infiltrada y degradada por células, como se hace en una red basada en proteína, tal como en una matriz de fibrina. Preferiblemente las secuencias en los dominios son sustratos de enzimas que están involucradas en la migración celular (por ejemplo, como sustratos para
25 enzimas tal como colagenasa, plasmin, metaloproteinasa (MMP) o elastasa), aunque los dominios adecuados no se limitan a estas secuencias. Una secuencia particularmente útil es un sustrato para la enzima plasmin. Las características de

degradación de los geles se pueden manipular al cambiar los detalles del péptido que sirve como los nodos de reticulación. Uno puede hacer un gel que es degradable mediante colagenasa, pero no plasmin, o por plasmin, pero no colágenas. Adicionalmente, es posible hacer que el gel se degrade más rápido o más lento en respuesta en tal una enzima, simplemente al cambiar la secuencia de aminoácido de tal forma que altera el K_n o K_{cat} , o ambos, de la reacción enzimática. Uno puede así elaborar una matriz que es biomimética, en la que es capaz de ser remodelada por las características de remodelación normales de las células. Por ejemplo, tal un estudio muestra sitios de sustrato para el plasmin proteasa importante. La gelación del PEG con el péptido es auto selectivo.

Opcionalmente, los agente biofuncionales se pueden incorporar en la matriz para suministrar unión química para otras especies (por ejemplo, una superficie de tejidos). Habiendo incorporado los sustratos de proteasa dentro de la matriz es importante cuando se forma la matriz a partir de PEG vinilsulfona. Diferentes matrices formadas a partir de la reacción de acrilatos PEG y tioles PEG, matrices formadas de vinilsulfonas PEG y tioles PEG no contienen enlaces degradables hidrolíticamente. Por lo tanto, la incorporación de sustratos de proteasa permite a la matriz degradarse en el cuerpo.

Las matrices sintéticas son operacionalmente simples de formar. Se mezclan dos precursores líquidos; un precursor contiene una molécula precursora con grupos nucleofílicos y la otra molécula precursora contiene grupos electrofílicos. La solución salina fisiológica puede servir como el disolvente. Se genera calor mínimo por la reacción. Por lo tanto, la gelación se puede llevar a cabo in Vivo o in vitro, en contacto directo con el tejido, sin toxicidad inconveniente. Así los polímeros

diferentes a PEG se pueden utilizar, ya sea quelicamente modificado o modificado en sus grupos laterales.

Para la mayoría de indicaciones de curación, la tasa de crecimiento interno celular o migración de células dentro de la matriz en combinación con una tasa de degradación adaptada de la matriz es crucial para la respuesta de curación general. El potencial de las matrices no degradables hidrolíticamente para ser invadidas por las células es principalmente una función de la densidad de red. Si el espacio existente entre los puntos de ramificación o nodos es muy pequeño en relación con el tamaño de las células o si la tasa de degradación de la matriz, que resulta en creación de más espacio dentro de la matriz, es muy bajo, se observará una respuesta de curación limitada. Las matrices de curación encontradas en la naturaleza, como por ejemplo matrices de fibrina, que se forman como una respuesta a la lesión en el cuerpo se conocen por consistir de una red muy floja que puede ser fácilmente invadida por células. La infiltración se promueve por ligandos para adhesión celular que están en parte integrados por la red de fibrina.

Matrices hechas de moléculas precursoras hidrofílicas sintéticas, como polietilenglicol, se hinchan en ambiente acuoso después de la formación de la red polimérica. Con el fin de alcanzar un tiempo de gelación suficientemente corto (entre 3 a 10 minutos en un pH entre 7 a 8 y una temperatura en un rango de 36 a 38 °C, y la reacción cuantitativa durante la formación in situ de la matriz en el cuerpo, la concentración de partida de las moléculas precursoras debe ser suficientemente alta. Bajo tales condiciones, el hinchamiento después de la formación de red puede no tener lugar, y las concentraciones de partida necesarias pueden conducir a matrices muy densas para la infiltración celular cuando la matriz no se degrada en ambiente acuoso. Así el hinchamiento de la

rede polimérica es importante para agrandar y ensanchar el espacio entre los puntos de ramificación.

Con respecto a la concentración de partida de las moléculas precursoras, los
5 hidrogeles hechos de las mismas moléculas precursoras sintéticas, tal como un
cuarto graso de vinilsulfona PEG y un péptido con grupos SH, se hinchan para el
mismo contenido de agua en estado de equilibrio. Esto significa que la
concentración de partida mayor de las moléculas precursoras es, el mayor, el
volumen final del hidrogel es cuando este alcanza su estado de equilibrio. Si el
10 espacio disponible en el cuerpo es muy pequeño para permitir suficiente
hinchamiento y en particular si la unión formada de los componentes precursores
no es hidrolíticamente degradable, la tasa de infiltración celular y la respuesta de
curación se reducirán. Como una consecuencia, el óptimo entre dos
requerimientos contradictorios para aplicación en el cuerpo se debe encontrar. Se
15 ha observado buena infiltración celular y la posterior respuesta de curación con
una red polimérica tridimensional formada de la reacción de un polímero
trifuncional ramificado con al menos tres brazos sustancialmente similar en peso
molecular y una segunda molécula precursora que es al menos una molécula
bifuncional. La tasa de peso equivalente de los grupos funcionales de la primer y
20 segunda molécula precursora está entre 0.9 y 1.1. Los pesos moleculares de los
brazos de la primer molécula precursora, el peso molecular de la segunda
molécula precursora y la Funcionalidad de los puntos de ramificación se
seleccionan de tal forma que el contenido de agua de la rede polimérica resultante
está entre el porcentaje de peso de equilibrio y 92% en peso del peso total de la
25 rede polimérica después de terminación de la toma de agua. Preferiblemente el
contenido de agua está entre 93 y 95% en peso del peso total de la rede
polimérica y el agua después de terminación de toma de agua. La terminación de

85

la toma de agua se puede lograr ya sea cuando se alcanza la concentración de equilibrio o cuando el espacio disponible en la matriz no permite incremento de volumen adicional. Se prefiere por lo tanto seleccionar las concentraciones de partida de los componentes precursores por ser tan bajos como sea posible. Esto es verdad para todas las matrices hinchables pero en particular para aquellas matrices en las que se experimenta degradación mediada por la célula y no contienen uniones hidrolíticamente degradables en la red polimérica.

El balance entre el tiempo de gelación y la concentración de partida baja en particular para geles hidrolíticamente no degradables se debe optimizar basado en la estructura de las moléculas precursoras. En particular, el peso molecular de los brazos de la primera molécula precursora, el peso molecular de la segunda molécula precursora y el grado de ramificación, es decir la Funcionalidad de los puntos de ramificación, que se tienen que ajustar de acuerdo con esto. El mecanismo de reacción actual tiene una menor influencia sobre esta interacción.

En la primer molécula precursora existe un polímero de tres o cuatro brazos con un grupo funcional al final de cada brazo y la segunda molécula precursora es una molécula bifuncional lineal, preferiblemente un péptido que contiene al menos dos grupos cisteína, luego el peso molecular de los brazos de la primer molécula precursora y el peso molecular de la segunda molécula precursora se seleccionan preferiblemente de tal manera que se une entre los puntos de ramificación después de la formación de la red que tiene un peso molecular en el rango entre 10 a 13 kDa (bajo las condiciones que las uniones no son lineales, ni ramificadas), preferiblemente entre 11 y 12 kDa. Esto permite una concentración de partida de la suma de primeras y segundas moléculas precursoras en un rango entre 8 a 12% en peso, preferiblemente entre 9 a 10% en peso del peso total de la primera y



segunda molécula precursoras en solución (antes de la formación de red). En el caso que el grado de ramificación del primer componente precursor se incrementa a 8 y la segunda molécula precursora todavía es una molécula bifuncional lineal, el peso molecular de las uniones entre los puntos de ramificación se incrementa preferiblemente a un peso molecular de entre 18 a 24 kDa. Cuando el grado de ramificación de la segunda molécula precursora se incrementa de una lineal a tres o cuatro componentes precursores de brazo, el peso molecular, es decir la longitud de las uniones se incrementa de acuerdo con esto. En una modalidad preferida se escoge una composición que incluye como la primer molécula precursora tres brazos trifuncionales de polímero de 15 kd, es decir cada brazo tiene un peso molecular de 5 kda y como la segunda molécula precursora una molécula lineal bifuncional de un peso molecular en el rango entre 0.5 a 1.5 kd, aún más preferiblemente cerca de 1 kd. Preferiblemente el primer y segundo componente precursor es un polietilenglicol.

En una modalidad preferida el primer componente precursor incluye como grupos funcionales conjugados enlaces o grupos insaturados, se prefiere más un acrilato o una vinilsulfona y los grupos funcionales de la segunda molécula precursora incluyen un grupo nucleofílico, preferiblemente grupos tiol o amina. En otra modalidad preferida de la presente invención la primer molécula precursora es un polímero de 15 a 20 k de de cuatro brazos, preferiblemente polímero de 15 kd, que tiene grupos funcionales en el terminal de cada brazo y la segunda molécula precursora es una molécula lineal bifuncional de un peso molecular en el rango entre 3 y 4 kDa, se prefiere entre 3.4 kDa. Preferiblemente la primera molécula precursora es un polietilenglicol que tiene grupos acrilato y la segunda molécula precursora es un polietilenglicol que tiene grupos tiol. En modalidades preferidas la concentración de partida de la suma de la primera y segunda moléculas

precursoras varía de 8 a 11% en peso, preferiblemente entre 9 y 105 en peso de peso total de la primera y segunda molécula precursoras y agua (antes de la formación de la red polimérica), preferiblemente entre 5 y 8% en peso para alcanzar el tiempo de gelación por debajo de 10 minutos. Estas composiciones
5 tienen un tiempo de gelación en pH 8.0 y 37° de aproximadamente 3-10 minutos después de mezcla.

Cuando la matriz contiene uniones hidrolíticamente degradables, formadas por ejemplo por la reacción precedida entre acrilatos y tioles, la densidad de red con
10 respecto a la infiltración celular es especialmente importante al principio, pero en ambientes acuosos las uniones se hidrolizarán y la red se aflojará, permitiendo la infiltración celular. Con un incremento en el grado de ramificación general de la red polimérica el peso molecular de las inter uniones, es decir la longitud de las uniones se debe incrementar.

15

B. Sitios de unión celular

Las células interactúan con su ambiente a través de interacciones proteína-proteína, proteína-polisacárido y proteína-polisacárido en la superficie celular. Las
20 proteínas de matriz extra celular suministran un huésped de señales bioactivas a la célula. Esta red densa se requiere para soportar las células, y muchas proteínas en la matriz han mostrado que controlan la adhesión celular, difusión, migración y diferenciación. Algunas de las proteínas específicas que se han
mostrado por mostrado por ser particularmente activas incluyen laminina,
25 bitronectina, fibronectina, fibrina, fibrinógeno y colágeno. Se han conducido muchos estudios de laminina, y se han mostrado que la laminina juega un papel vital en el desarrollo y regeneración de nervios in vivo y células nerviosas in Vitro,

así como también en angiogénesis. Algunas de las secuencias específicas que interactúan directamente con los receptores celulares y originan su adhesión, difusión o transducción de señal se han identificado.

5 La laminina, una proteína grande multi dominio, ha sido mostrada por consistir de tres cadenas con varios dominios de unión de receptor. Estos dominios de unión de receptor incluyen la secuencia YIGSR (SEQ ID No1) de la cadena B1 laminina, LRGDN (SEQ ID No 3) de la cadena A de laminina y el PDGSR (SEQ ID No 4) de la cadena B1 de laminina. Varias otras secuencias de reconocimiento para las
10 células se han identificado. Estas incluyen IKVAV (SEQ ID No 5) de la cadena A de laminina, y la secuencia RNIAEIKDI (SEQ ID No 6) de la cadena B2 de laminina. Se prefiere particularmente la secuencia RGDE de fibronectina.

En una modalidad preferida adicional los sitios de péptido para la adhesión celular
15 se incorporan dentro de la matriz, a saber los péptidos que se unen para receptores de adhesión-promoción en las superficies celulares. Tales péptidos de promoción de adhesión incluyen descritos anteriormente, se prefieren particularmente la secuencia RGDE de fibronectina, la secuencia YIGSR (SEQ ID No 1) de laminina. La incorporación de los sitios de unión celular se prefiere
20 particularmente con matrices sintéticas. Sin embargo, los sitios de unión celular también se pueden incluir con algunas de las matrices naturales. La incorporación se puede lograr, por ejemplo, al mezclar un péptido de unión celular que contiene cisteína con la molécula precursora que incluye el grupo conjugado insaturado, tal como acrilato PEG, acrilamida PEG o vinilsulfona PEG. Esta etapa puede ocurrir
25 brevemente, por ejemplo unos pocos minutos, antes de mezclar con el restante del componente precursor que incluye el grupo nucleofílico, tal como componente precursor que contiene tiol. Si el sitio de unión celular no incluye una cisteína, esta

se puede sintetizar químicamente para incluir una. Durante esta etapa, el péptido que promueve la adhesión se incorporará dentro de un extremo que multiplica funcionalizado con una instauración conjugada; cuando el restante multi tior se agrega al sistema, se formará una red reticulada.

5

La concentración de los sitios de adhesión unidos covalentemente dentro de la matriz puede influenciar la tasa de infiltración celular. Por ejemplo, para un hidrogel dado, un rango de concentración RGDE se puede incorporar dentro de la matriz con soporte de célula en crecimiento y migración celular en una forma
10 óptima. El rango de concentración óptimo y de los sitios de adhesión como el RGDE está entre 0.04 y 0.05 mm y aún más preferiblemente 0.05 mm en particular para una matriz que tiene un contenido de agua entre la concentración de equilibrio y 92% en peso después de la terminación de la toma de agua.

15 Una modalidad preferida es una matriz complementada que contiene un factor bioactivo, un polietilenglicol de cuatro brazos con un peso molecular de aproximadamente 20000 DA reticulado con un sitio de degradación de proteasa GCRPQGIWGQDRC (SEQ ID No 7) y 0.050 mm RGD; esta matriz demuestra particularmente bien los resultados de crecimiento interno celular y la curación de
20 los defectos óseos. Preferiblemente la matriz contiene PTH 1-34 unido covalentemente a la matriz. La concentración de partida del PEG y el péptido es por debajo del 10% en peso del peso total de las moléculas y agua (antes de hinchamiento). Los geles tienen una consistencia utilizable y permiten a los osteoblastos y células precursoras infiltrar fácilmente la matriz.

25

C. Factores Bioactivos

210

Los factores bioactivos son los ingredientes activos para el tratamiento de las áreas defectuosas óseas específicas de huesos no saludables, por ejemplo osteoporosis y quistes óseos. Se ha encontrado sorprendentemente que los factores bioactivos, es decir PTH, BMP, en particular PTH₁₋₃₄, BMP 2 y BMP 7 son adecuados para el tratamiento local de huesos osteoporóticos y áreas óseas así como también áreas de quistes óseos y tumores óseos. En el pasado, estos factores óseos se han explorado para tratamiento sistémico. Sin embargo, no existe sugerencia de que ellos sean ingredientes activos útiles de formulaciones localmente aplicadas, en cuanto al tratamiento de defectos óseos se relaciona. Se ha encontrado que cuando estos factores bioactivos se incorporan dentro de una formulación de matriz inyectable y se inyectan en áreas de defectos óseos específicos de huesos no saludables ello incrementan la densidad ósea en esa área del hueso. Preferiblemente el factor bioactivo se une covalentemente a las matrices descritas anteriormente, asegurando así una liberación controlada de los factores bioactivos. El factor bioactivo puede estar en la forma de péptido de fusión, que contiene el factor bioactivo en un primer dominio y un dominio de sustrato reticulable en un segundo dominio. Opcionalmente, un sitio de degradación se ubica entre un primero y segundo dominios.

20 a. PTH

El término "PTH" como se utiliza aquí incluye una secuencia humana de PTH₁₋₈₄ y todas las versiones alélicas modificadas y truncadas de PTH que exhiben propiedades de formación ósea cuando se unen covalentemente a matrices sintéticas o naturales biodegradables. Las versiones truncadas preferidas de PTH son PTH₁₋₃₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁, PTH₁₋₃₈ o PTH₁₋₂₅. El más preferido es el PTH₁₋₃₄.

Preferiblemente, el PTH es PTH humano, aunque PTH de otra fuente, tal como PTH bovino, pueden ser adecuadas.

b. BMP

5

La proteína morfogenética ósea puede ser cualquier BMP conocido o cualquier versión modificada o alélica de BMP que exhibe propiedades de formación ósea. Se prefiere particularmente el BMP 2 y BMP 7.

10 **BMP 2**

El término "BMP 2" como se utiliza aquí incluye la secuencia humana de BMP 2₁₋₃₉₆ todas versiones alélicas modificadas y truncadas de BMP 2 que exhiben similar actividad biológica cuando se unen covalentemente a matrices naturales o sintéticas biodegradables. Una versión truncada preferida de BMP 2 es BMP 2₂₈₃₋₃₉₆. Preferiblemente, el BMP 2 es BMP 2 humano, aunque el BMP 2 de otras fuentes también puede ser adecuado, en particular de ratón o rata en vista del 100% de identidad de las secuencias de aminoácido del BMP 2 de humanos, ratones o ratas.

20

BMP 7

El término "BMP 7" como se utiliza aquí incluye la secuencia humana de BMP 7₁₋₄₃₁ y todas las versiones alélicas modificadas y truncadas de BMP 7 que exhibir similar actividad biológica cuando se unen covalentemente a matrices naturales o sintéticas biodegradables. Una versión truncada preferida de BMP 7 es BMP 7₂₋₄₃₁. Preferiblemente, el BMP 7 es BMP 7 humano, aunque el BMP 7 de otras fuentes

25

también puede ser adecuado, en particular de ratón en vista del 98% de identidad de las secuencias de aminoácido del BMP 7 de humanos, y ratones.

c. Péptido de Fusión

5

Dominios de sustrato reticulables

Los péptidos de fusión comprenden al menos dos dominios en donde el primer dominio comprende el factor bioactivo y el segundo dominio comprende un
10 dominio de sustrato reticulable con la matriz anterior, durante o después de su formación. El dominio de sustrato puede ser un dominio para una enzima, preferiblemente un dominio de sustrato para una transglutaminasa ("dominio de sustrato transglutaminasa"), más preferiblemente para un tejido transglutaminasa ("dominio de sustrato de tejido transglutaminasa"), y más preferiblemente es un
15 dominio de sustrato para el Factor XIII a ("dominio de sustrato Factor XIIIa").

Las reacciones de acil-transferasa catalizan transglutaminasas entre el grupo gama-carboxamida de proteína unida a residuos glutamina y el grupo épsilon-amino de residuos lisina, que resultan en la formación de puentes de cadenas
20 laterales de isopéptidos N-épsilon- (gama-glutamil) lisina. La secuencia de aminoácido de la proteína de fusión se puede diseñar para contener adicionalmente un sitio de clivaje hidrolítico o enzimático, así el factor bioactivo se puede liberar con poco o ninguna modificación a la estructura primaria. Los dominios de sustrato transglutaminasa y en particular, los dominios de sustrato del
25 Factor XIIIa son adecuados para ligar el péptido de fusión a las matrices de fibrina pero también a matrices sintéticas en el caso de los grupos amino primarios pendientes está presente la molécula sintética. Cuando se utiliza con la matriz de

fibrina el sitio de degradación en el péptido de fusión es degradable enzimáticamente preferiblemente, de tal forma que la liberación del PTH se controla por procesos específicos, tal como proteólisis localizada.

- 5 El dominio de sustrato reticulable puede incluir GAVDK (SEQ ID No.: 8), KKKK (SEQ ID No.: 9), YRGDTIGEGQQHHLGG (SEQ ID No.: 10), O NQEQVSPL (SEQ ID No.: 2).

El dominio de sustrato de Factor XIIIa más preferido tiene una secuencia de
10 aminoácido de NQEQVSPL (SEQ ID No.: 2) y se refiere aquí como "TG" y TG-PTH.

El péptido de fusión PTH se puede producir recombinantemente o mediante síntesis química. El péptido de fusión PTH₁₋₃₄ se produce preferiblemente por
15 síntesis química. El péptido de fusión BMP se produce preferiblemente recombinantemente por procesos bacteriales.

Para la incorporación del PTH, BMP 2 o BMP 7 en una matriz formada de componentes de precursor sintético, el péptido de fusión BMP o PTH o cualquier
20 otro péptido también se puede incorporar cuando se sintetiza con al menos un grupo cisteína adicional (-SH) preferiblemente en el N-terminal del PTH₁₋₃₄, BMP 2 o BMP 7 como el dominio de sustrato reticulable. La cisteína puede ser unida directamente al PTH₁₋₃₄, BMP 2 o BMP 7 o a través de una secuencia ligadora. La secuencia ligadora puede adicionalmente incluir una secuencia de aminoácido
25 degradable enzimáticamente o hidrolíticamente, de tal forma que el PTH, BMP 2 o BMP 7 se puede clivar a partir de la matriz por enzimas en sustancialmente la forma nativa. El grupo cisteína libre reacciona con el grupo conjugado insaturado

del componente precursor en una reacción de adición del tipo Michael. El grupo tiol de la cisteína puede reaccionar con un enlace conjugado insaturado en el polímero sintético para formar un enlace covalente.

- 5 Estos sitios pueden ser degradables por hidrólisis no específica (es decir como un enlace éster) o ellos pueden ser sustratos para degradación enzimática específica (ya sea degradación proteolítica o polisacárida). Los sitios de degradación permiten al PTH, BMP 2 o BMP 7 ser liberados con poco o ninguna modificación a la secuencia de péptido primaria, que puede resultar en mayor actividad del factor.
- 10 Adicionalmente, esto permite la liberación del factor a ser controlado por los procesos celulares específicos. Esto permite a los factores ser liberados en diferentes tasas con el mismo material dependiendo de la ubicación de las células dentro del material. Esto también reduce la cantidad total de PTH₁₋₃₄, BMP 2 o BMP 7 necesaria, en razón a que esta se libera de manera controlada por los
- 15 procesos celulares. Es una explicación posible para la curación fuerte de los defectos óseos mencionados anteriormente con PTH incorporado y unido preferiblemente a una matriz, se considera importante que el PTH se administre localmente durante un periodo extendido de tiempo (es decir no solo una dosis única) si no en una forma continua esto acompañado por una lenta degradación, a
- 20 través de clivaje enzimático o clivaje hidrolítico de la matriz. De esta forma, la molécula se suministra luego a través de un efecto pseudo pulsado que ocurre durante un periodo sustancial de tiempo. Cuando una célula proteoblástica infiltra la matriz, esta encontrará una molécula que inducirá una proliferación adicional del proteoblasto así como también la síntesis de múltiples factores de crecimiento
- 25 cruciales para la nueva formación ósea. Sin embargo, si esa célula particular no continúa liberando PTH desde la matriz, esta no empezará a producir interleukina-6, evitando por lo tanto los efectos catabólicos posteriores de la etapa en la

95

formación de osteoclastos. El resultado neto es luego la densidad mineral ósea mayor y la formación neta de la matriz ósea. Finalmente, los efectos terapéuticos del péptido se localizan para la región defectuosa y se magnifican posteriormente.

5 ***Sítos de degradación de la fusión de péptido***

Un sitio de degradación enzimática o hidrolítica puede estar presente entre el primer y segundo domino del péptido de fusión. Los sitios de degradación pueden ser degradables por degradación enzimática específica. Preferiblemente el sitio de degradación es clivable por una enzima seleccionada del grupo que consiste de metaloproteínasa de matriz y de plásmido. Mediante la cuidadosa selección de K_m y K_{cat} de este sitio de degradación enzimático, se puede controlar que ocurra degradación antes o después de la formación de matriz y/o al utilizar enzimas similares o disímiles para degradar la matriz. Estos sitios degradables permiten la construcción por ingeniería de más factores bioactivos de liberación específica de las matrices. Los sitios degradables se pueden clivar por enzimas liberadas de las células que invaden la matriz. Los sitios de degradación permiten que se varíe la tasa de suministro en ubicaciones diferentes dentro de la matriz dependiendo de la actividad celular en la que la ubicación y/o dentro de la matriz. Los beneficios adicionales incluyen la reducción de dosis de droga total dentro del sistema de suministro, y la regulación espacial de liberación que permite un mayor porcentaje de la droga que se libera al tiempo de mayor actividad celular. El sitio de degradación se abrevia aquí como "pl".

25 Los sitios proteolíticamente degradables pueden incluir sustratos para colagenasa, plasmin, elastasa, estromelisin, o activadores de plasminógeno. Sustratos de ejemplo se listan adelante. El N1-N5 denota aminoácidos en las posiciones 1-5

96

hacia el terminal amino de la proteína desde el sitio en donde ocurre la proteólisis, N1'-N4' denota aminoácidos en las posiciones 1-4 hacia el terminal carboxi de la proteína desde el sitio en donde ocurre proteólisis.

5 **Tabla 1: Secuencias de sustrato de muestra para proteasa**

Proteasa	N5	N4	N3	N2	N1	N1'	N2'	N3'	N4'	SEQ ID No:
Plasmín ¹			L	I	K	M	K	P		SEQ ID No:
Plasmín ¹			N	F	K	S	Q	L		SEQ ID No:
Estromelisina ²	Ac	G	P	L	A	L	T	A	L	SEQ ID No:
Estromelisina ²		Ac	P	F	E	L	R	A	NH ₂	SEQ ID No:
Elastasa ³			Z-	A	A	F	A	NH ₂		SEQ ID No:
Colagenasa ⁴		G	P	L	G	I	A	G	P	SEQ ID No:
t-PA ⁵	P	H	Y	G	R	S	G	G		SEQ ID No:
u-PA ⁵	P	G	S	G	R	S	A	S	G	SEQ ID No:

Referencia:

10 1. Takagi and Doolittle, (1975) *Biochem.* 14:5149-5156.
2. Smith et al ., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 6440-6449.
3. Besson et al., (1996) *Analitical Biocehemistry* 237: 216-223.
4. Netzel-Arnett et al ., (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 6747-6755
5. Coombs et al ., 1998. *J. Bio. Chem.* 273: 4323-4328

15

En una modalidad preferida, la secuencia YKNR (SEQ ID No: 11) se ubica entre el primer dominio y el segundo dominio y hace degradable la unión plasmín.

Un péptido de fusión PTH preferido es TGp1PTH:

NQEQVSPLYKNRSVSSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID No: 12).

5

Las enzimas que se puede utilizar para degradación proteolítica son numerosas. Los sitios proteolíticamente degradables pueden incluir sustratos para colágenas, Plasmin, elastasa, estromelisina o activadores de plasminógeno.

10 En otra modalidad preferida un dominio de oligoéster se puede insertar entre el primer y segundo dominio. Esto se puede lograr utilizando un oligoéster tal como oligómeros de ácido láctico.

Diseños de proteínas de fusión para incorporación

15

Las proteínas de fusión preferidas incluyen:

TG- PTH₁₋₃₄: esta es una forma modificada de PTH que comprende los aminoácidos 1-34 del PTH nativo así como también un dominio de sustrato TG (transglutaminasa):

20

NQEQVSPLSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID No: 13).

El TG-pl- PTH₁₋₃₄: esta forma corresponde al TG-PTH excepto que contiene adicionalmente una secuencia de plasmin degradable (pl) entra la secuencia TG y el PTH₁₋₃₄:

25

PLYKNRSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID No: 12).

El TG-BMP 2₂₈₃₋₃₉₆: esta es una forma modificada de BMP 2 que comprende los aminoácidos 283-396 del PTH nativo así como también un dominio de sustrato

5 TG (transglutaminasa):

Met-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Pro-Val-Glu-Leu-Pro-Leu-Ile-Lys-Met-Lys-Pro-His- BMP 2₂₈₃₋₃₉₆ (SEQ ID No: 14).

10 ***Combinación de matrices o componentes precursores y factores bioactivos***

En una modalidad preferida la matriz de fibrina o sintética complementada (respectivamente soluciones precursoras) comprende la matriz y péptido PTH o péptido de fusión PTH, preferiblemente en un rango de concentración entre 0.01 y

15 2 mg de péptido PTH o péptido de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz, preferiblemente entre 0.02 a 1.0 mg de péptido PTH o péptido de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz, más preferiblemente entre 0.03 y 0.5 mg de péptido PTH o péptido de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz y más

20 preferiblemente en un rango entre 0.05 a 0.2 mg de proteína PTH o proteína de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz. Dependiendo de la edad del paciente, ciertos subrangos de concentración PTH o concentración de péptido de fusión PTH se prefieren. Si la matriz complementada se aplica para tratar quistes óseos en niños, la concentración de péptido PTH o

25 péptido de fusión PTH está preferiblemente en un rango entre 0.01 y 0.35 mg de péptido PTH o péptido de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz y más preferiblemente en un rango de concentración entre

0.05 y 0.15 mg de péptido PTH o péptido de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz. Mientras que si la formulación se aplica para incrementar localmente la densidad ósea del hueso osteoporósico en adultos, la concentración preferida de péptido PTH o péptido de fusión PTH está en un rango entre 0.5 y 2 mg de péptido PTH o péptido de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz, más preferiblemente entre 0.7 y 1.5 mg de péptido PTH o péptido de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz y más preferiblemente entre 0.9 y 1.1 mg de péptido PTH o péptido de fusión PTH/ml de matriz o componentes precursores que forman la matriz. En una modalidad preferida la matriz es una matriz de fibrina.

II. Métodos para incorporación y/o elaboración de factores bioactivos

En una modalidad preferida para la incorporación de un factor bioactivo, como PTH, o BMP o un péptido de fusión dentro de la matriz, el factor bioactivo se incorporará, física o químicamente dentro de la matriz durante su gelación. En caso de una matriz de fibrina, el Factor XIIIa es una transglutaminasa que se activa durante la coagulación a fibrina. Esta enzima formada naturalmente del Factor XIII por clivaje durante trombina o agregado adicionalmente a las soluciones precursoras de fibrina si se requieren concentraciones mayores, funciona para unir las cadenas de fibrina a cada unión vía amida, formada entre las cadenas laterales de glutamina y las cadenas laterales de lisina. La enzima también funciona para unir otros péptidos a la fibrina durante coagulación. Específicamente la secuencia NQEQVSPL (SEQ ID No: 2), se ha demostrado que funciona como un sustrato efectivo para el Factor XIIIa. En el caso de las matrices sintéticas el péptido de fusión debe ser un grupo funcional que es capaz de



reaccionar con un grupo funcional de los componentes precursores que forman la matriz sintética bajo condiciones fisiológicas en el cuerpo. Por ejemplo si la molécula precursora contiene grupos acrilato el péptido de fusión debe contener grupos tiol libre que reaccionan con el grupo acrilato en una reacción de adición del tipo Michael. Dependiendo de la naturaleza de la mezcla del factor bioactivo de un factor no modificado también es posible lograr una liberación sostenida de la matriz.

III. Métodos de aplicación

Las matrices complementadas se pueden formar in situ en la ubicación deseada luego de la inyección de los componentes precursores separados, o se pueden preformar y luego implantar dentro de la ubicación deseada. Dependiendo de la indicación de las matrices complementadas se aplica o inyecta en diferentes etapas de gelación. Si la matriz se inyecta dentro de los quistes óseos, es preferible aplicar justo después de la mezcla de las soluciones precursoras, es decir todavía en estado líquido. Si la inyección de la matriz complementada está en áreas de huesos no saludables que se afectan por la osteoporosis, ellas se inyectan preferiblemente en un estado pregelado. Las soluciones precursoras se mezclan y después de gelación (usualmente después de aproximadamente 30 seg a 2 min) el gel se inyecta a través de una boquilla gruesa dentro del área afectada en el hueso. Esto se hace para evitar el escape de una matriz todavía líquida dentro del torrente sanguíneo.

Para algunas de las indicaciones se puede desear ver la distribución del material en el área del hueso al que esta se aplica durante la inyección. En una modalidad

preferida, un agente de contraste de rayos x, preferiblemente uno que es soluble en el material de matriz, se agrega al material precursor de matriz.

Generalmente, los agentes de contraste se clasifican como agentes de contraste
5 iónico y no iónico. Los agentes de contraste no iónicos se prefieren, aunque los agentes de contraste iónicos también se pueden utilizar. Se prefieren los agentes de contraste de rayos X que contienen yodo.

Los agentes de contraste no iónicos preferidos incluyen yodixanol, yohexol,
10 yopamidol, iopentol, iopromida, iorneprol, iosimida, iotasul, iotrolan, yoversol, ioxilan, y metrizamida. El agente de contraste no iónico más preferido es yohexol (CAS No. 66108-95-0). Si el yohexol se agrega para visualizar el gel bajo fluoroscopia o rayos X, la matriz contiene preferiblemente 100 a 600 mg por
15 mililitro de la matriz o solución precursora que forma la matriz, más preferiblemente 250 a 500 mg por mililitro de la matriz de los componentes precursores que forman la matriz, más preferiblemente 300 a 450 mg por mililitro en la matriz o el componente precursor que forma la matriz.

Los agentes de contraste iónicos preferidos incluyen diatrizoato, iobenzamato,
20 iocarmato, iocetamato, iodamida, iodipamida, iodoxamato, ioglicato, ioglicamato, iopanoato, iofendilato, iopronato, ioserato, iotalamato, iotroxato, ioxaglato, ioxitalamato y metrizoato.

Los agentes de contraste están disponibles comercialmente y se pueden sintetizar
25 fácilmente, como lo conoce el experto en la técnica.

El monitoreo de los agentes de control se puede lograr con los métodos utilizados generalmente en la técnica, por ejemplo por formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), rayos X, o formación de imágenes por ultra sonido. Es bien conocido que los agentes de contraste funcionan al modificar las características de absorción de rayos X de los sitios corporales en los que ellos se distribuyen, al modificar los tiempos de relajación de los protones de agua y así son observables por vía de formación de imágenes de resonancia magnética, o al modificar la velocidad del sonido o la densidad en los sitios corporales en los que ellos se distribuyen. De acuerdo con la presente invención, se prefiere utilizar agentes de contraste que se puedan monitorear por formación de imagen de rayos X.

Como se describe aquí, la formulación de matriz complementada inyectada dentro del cuerpo en diferentes etapas de gelación pueden ser gel in situ o sobre el cuerpo. En otra modalidad la matriz complementada se puede formar al exterior del cuerpo y luego aplicar en la forma preformada. Con respecto a la clase de componente precursor utilizado, los componentes precursores se deben separar antes de aplicación de la mezcla al cuerpo para evitar la combinación o contacto con cada una bajo condiciones que permiten la polimerización o gelación de los componentes. Para evitar el contacto anterior para administración, se puede utilizar un kit que separa las composiciones de cada uno. Luego de mezclado bajo condiciones que permiten la polimerización, las composiciones forman una red tridimensional complementada de factor bioactivo. Dependiendo de los componentes precursores y sus concentraciones, la gelación puede ocurrir casi instantáneamente después de mezclado.

En una modalidad la matriz se forma a partir de fibrinógeno. El fibrinógeno, a través de una cascada de varias reacciones de geles para formar una matriz, cuando se ponen en contacto con trombina y una fuente de calcio a una temperatura y ph apropiados. Los tres componentes, el fibrinógeno, la trombina y la fuente de calcio, se deben almacenar separadamente. Sin embargo, mientras al menos uno de los tres componentes se mantenga separado, los otros dos componentes se pueden combinar antes de administración.

En una modalidad, el fibrinógeno se disuelve (que puede contener aprotinina adicionalmente para incrementar la estabilidad) en una solución amortiguadora en ph fisiológico (en un rango de ph 6.5 a 8.0, preferiblemente de ph 7.0 a 7.5) para formar una primer solución precursora y se almacena separadamente de una solución de trombina en un amortiguador de cloruro de calcio (por ejemplo rango de concentración de 40 a 50 mm). La solución amortiguadora para el fibrinógeno puede ser una solución amortiguadora de histidina en una concentración preferida de 50 mm que incluye adicionalmente NaCl en una concentración preferida de 150 mm o salina amortiguada TRIS (preferiblemente en una concentración de 33 mm).

En una modalidad preferida, un kit que contiene una proteína de fusión, fibrinógeno, trombina, y una fuente de calcio. Opcionalmente, el kit puede contener una enzima de reticulación, tal como el Factor XIIIa. La proteína de fusión contiene un factor bioactivo, un dominio de sustrato para una enzima de reticulación y, opcionalmente, un sitio de degradación entre el dominio de sustrato y el factor bioactivo. La proteína de fusión puede estar presente en el fibrinógeno o la solución precursora de trombina. En una modalidad preferida la solución de precursor de fibrinógeno contiene la proteína de fusión.

104

Las soluciones se mezclan preferiblemente por un dispositivo de jeringa de dos vías, en el que ocurre la mezcla al deslizar los contenidos de ambas jeringas a través de una cámara de mezcla y/o aguja y/o mezclador estático.

- 5 En una modalidad preferida, el fibrinógeno y la trombina se almacenan separadamente en forma liofilizada. Cualquiera de los dos puede contener el factor bioactivo, que es preferiblemente una proteína de fusión. Antes de uso, el amortiguador TRIS o histidina se agrega al fibrinógeno, el amortiguador puede contener adicionalmente aprotinina. La trombina liofilizada se disuelve en solución
- 10 de cloruro de calcio. Posteriormente, el fibrinógeno y las soluciones de trombinas se colocan en contenedores separados/ frascos / cuerpos de jeringa y se mezclan por un dispositivo de conexión de dos vías, tal como una jeringa de dos vías. Opcionalmente, los contenedores/ frascos/ cuerpos de jeringa son bipartitos teniendo así dos cámaras separadas mediante una partición ajustable que es
- 15 perpendicular a la pared de cuerpo de la jeringa. Una de las cámaras contiene el fibrinógeno liofilizado o trombinas, mientras que la otra cámara contiene una solución amortiguada apropiada. Cuando se presiona el émbolo, la partición se mueve y libera el amortiguador dentro de la cámara de fibrinógeno para disolver el fibrinógeno. Una vez se disuelve el fibrinógeno y la trombina, ambos cuerpos de
- 20 jeringa bipartita se unen a un dispositivo conector de dos vías y el contenido se mezcla al deslizarlos a través de la aguja de inyección unida al dispositivo de conexión. Opcionalmente, el dispositivo de conexión contiene un mezclador estático para mejorar la mezcla de los contenidos.
- 25 En una modalidad preferida el fibrinógeno se diluye ocho veces y la trombina se diluye veinte veces antes de mezcla. Esta proporción resulta en un tiempo de gelación de aproximadamente un minuto.

es

En otra modalidad preferida, la matriz complementada se forma a partir de componentes de precursor sintético capaces de experimentar una reacción de adición Michael. En razón a que el componente precursor nucleofílico (el multi-tiol) solo reacciona con el componente multi- aceptor (el grupo insaturado conjugado) en ph básico, los tres componentes que tienen que ser almacenados separadamente antes de mezcla son: la base, el componente nucleofílico y el componente multi aceptor. El componente multi aceptor y el componente multi tiol se almacenan como soluciones en amortiguadores. Ambas composiciones pueden incluir el sitio de unión celular y adicionalmente la molécula bioactiva. Así la primer composición del sistema puede por ejemplo incluir la solución del componente nucleofílico y la segunda composición del sistema puede incluir la solución del componente multi aceptor. Cualquiera o ambas de las dos composiciones puede incluir la base. En otra modalidad, el multi aceptor y el multi tiol se pueden incluir como soluciones en la primera composición y la segunda composición puede incluir la base. La conexión y la mezcla ocurren en la misma vía como se describió previamente para el fibrinógeno. El cuerpo de jeringa bipartita es igualmente adecuado para los componentes precursores sintéticos. En cambio del Fibrinógeno y la trombina los componentes multi tiol y multi aceptor se almacenan en forma pulverizada en una de las cámaras y la otra cámara contiene el amortiguador básico.

Adicionalmente, otros componentes a parte de los ingredientes mencionados anteriormente se pueden incorporar en los sistemas de la presente invención, por ejemplo, un material que contiene un mineral de calcio, es decir una sustancia homogénea de ocurrencia natural que contiene iones de calcio tal como hidroxiapatita, se pueden utilizar.

106

Mientras la composición y los métodos se han descrito en términos de modalidades preferidas, será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a la composición, métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito aquí sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Bioactividad de PTH₁₋₃₄ y TGp1PTH₁₋₃₄

Péptido PTH₁₋₃₄ que muestra similar actividad al PTH₁₋₈₄ de longitud completa y proteínas de esta longitud se pueden sintetizar mediante métodos de síntesis de péptido de estado sólido estándar.

15

Todos los péptidos se sintetizan en resina sólida utilizando un sintetizador de péptido automatizado que utiliza química de 9- fluorenilmetiloxycarbonilo estándar.

Los péptidos se purifican por cromatografía c18 y se analizan utilizando cromatografía de base inversa por vía de HPLC para determinar la pureza así

20 como también espectroscopia de masa (MALDI) para identificar el peso molecular de cada producto. Utilizando este método, el PTH₁₋₃₄ así como también, el TG-pl-

PTH₁₋₃₄ (NQEQVSPLYKNRSVSSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF

(SEQ ID No: 12)). Y el TGPTH₁₋₃₄

(NQEQVSPLSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID No:

25 13)). Se sintetizan. El TGp1PTH₁₋₃₄ y TG PTH₁₋₃₄ difieren del PTH₁₋₃₄ en que este

comprende adicionalmente el dominio del sustrato del Factor XIIIa que se liga al

107

PTH₁₋₃₄ por vía de la secuencia pl degradable plasmin YKNR (SEQ ID No: 15) en caso del TGp1 PTH₁₋₃₄ y directamente en caso de TG PTH₁₋₃₄.

Para estudiar la bioactividad de los péptidos de fusión PTH, se establece un
5 ensayo de gen reportero. En este ensayo, un plásmido que contiene el gen reportero de luciferaza que se liga al promotor para el receptor de hormona paratiroide se transfecta en las células. Luego, si la célula se expone al PTH y el PTH posteriormente se une a su receptor en la célula, una cascada de señal, dirigida a través de niveles cAMP elevados, se inicia. A través de una regulación
10 de retroalimentación natural, esta conduce luego a una reducción de los niveles del receptor PTH. Como la reducción se dirige a través del promotor, esta también conduce luego a una reducción en la producción del gen reportero ligado. Utilizando este ensayo, la actividad del PTH₁₋₃₄ nativo así como también el TGP-pl-PTH₁₋₃₄ se estudian y comparan con un estándar internacional. Se observa que
15 ambas de estas moléculas muestran un nivel similar de actividad, como la reducción en la expresión del gen reportero para ambos es la misma, y este nivel de actividad es el mismo para el estándar internacional. Los resultados se muestran en la Figura 1.

20 Ejemplo 2: Liberación de PTH de una matriz de fibrina

Se hace una matriz de fibrina del kit TISSEEL® (Baxter AG; CH-8604 Volketswil/ZH) componentes precursores de fibrina. La composición se lista en la tabla 2. En la presencia de 0.1 µg/ml de PTH₁₋₃₄ o TG PTH₁₋₃₄ se agrega luego a
25 la trombina, y se mezcla para formar una concentración homogénea. El TGPTH₁₋₃₄ solo tiene una secuencia transglutaminasa en el terminal amino, sin un sitio de degradación. Así el TG PTH₁₋₃₄ solo se puede liberar por degradación de la matriz

de fibrina en si misma. Este péptido se sintetiza como se describió anteriormente en el ejemplo 1.

Para el primer ensayo de liberación, una matriz de fibrina de 50 μ l con 0.1 mg de PTH o TGPTH por ml de matriz de fibrina se incubaba a 37°C en 10 ml de amortiguador. Por lo tanto, la concentración de PTH o TGPTH en el amortiguador en el caso de una liberación total sería 0.5 μ g de PTH o TGPTH/ml de matriz de fibrina. Con el fin de comparar la estabilidad del PTH o TGPTH durante el ensayo, las muestras de PTH o TGPTH se diluyen directamente en el amortiguador a una concentración de 0.5 μ g PTH o TGPTH/ml de matriz de fibrina. Se prueban diferentes amortiguadores: agua destilada, solución salina amortiguada con fosfato, solución salina TRIS-amortiguada.

Se toman alícuotas en los días 0, 1, 2, 4 y 6 y se analizan por ELISA directo. Los resultados muestran que el PTH no es estable durante más de dos días en ninguno de los amortiguadores. Por lo tanto, no se puede hacer conclusión en los datos de liberación. La estabilidad del PTH ciertamente se afecta por su baja concentración y los amortiguadores no son óptimos.

El experimento de liberación se repite al utilizar un amortiguador de estabilización que contiene 50 mm de manitol en un amortiguador de 10 mm de sodio. Adicionalmente, el amortiguador se intercambia cada dos días con el fin de evitar cualquier degradación del péptido. La concentración de PTH o TGPTH se incrementa a 1 mg PTH o TGPTH/ ml de matriz de fibrina en una matriz de fibrina de 100 μ l y la incubación se alcanza en amortiguador de 1 ml. La concentración de PTH o TGPTH en el amortiguador en caso de una liberación total sería 100 μ g/ml de matriz de fibrina (doscientas veces más que el anterior). Como en el primer

experimento, las muestras clavadas (la misma cantidad de PTH o TGPTH disuelto en el amortiguador como control) se preparan para evaluar la estabilidad del PTH o TGPTH durante el experimento (100 µg/ml). Las muestras se recolectan cada dos a cuatro días (con un cambio de amortiguador) durante dos semanas y se
5 analizan por ELISA directo. Las muestras clavadas también se recolectan cada dos días. Los resultados muestran que bajo estas condiciones el PTH y el TGPTH son estables durante dos semanas.

Como se puede ver a partir de la Figura 2, la mayor liberación de la matriz de
10 fibrina se logra dentro de tres días. Casi el 60% del PTH y el 13% de TGPTH se liberan después de tres días. Estos datos demuestran la retención de PTH en la matriz de fibrina que es altamente mejorada por la adición de la secuencia TG.

**Ejemplo 3: Síntesis de una matriz de fibrina complementada que
15 comprende un péptido de fusión PTH**

La matriz de fibrina se forma partiendo del kit TISSEEL® (Baxter AG; CH-8604 Volketswil/ZH) que da una matriz de fibrina de 4 ml. TISSEEL® se produce a partir de plasma agrupado derivado de humano y el contenido de los ingredientes
20 activos puede variar de lote a lote dentro de rangos predefinidos. La tabla 2 lista las composiciones finales utilizadas.

Tabla 2: Composición final que comprende TISSEEL® y compuesto activo

Ingredientes	Dosis por 2 ml de gel
Jeringa 1	
Componente activo: Péptido de fusión PTH ₁₋₃₄ (TGp1 PTH ₁₋₃₄)	0.2 a 20 mg
Agentes de coagulación Fibrinógeno Otras proteínas Aprotinina (bovina) Albúmina humana Componentes de amortiguación Niacinamida L-Histidina Citrato de sodio Polisorbato 80 Agua para inyección	60-100 mg 2046-3409 KIE 9.1-18.2 mg 2.7-8.2 mg 9.1-22.7 mg 4.4-8.8 mg 0.6-1.7 mg A 1 ml
Jeringa 2	
Agentes de coagulación Trombina (humana) Componentes de amortiguación Cloruro de calcio Cloruro de sodio Proteína (albúmina de suero humana) Agua para inyección	2.5-6.5 I.U. 5.88±0.6 mg 3.5-5.5 mg 45-55 mg A 1 ml

El fibrinógeno se suspende en una solución con aprotinina, un inhibidor de
5 proteinasa serina que ayuda a reducir la fibrólisis para retener la integridad de la
matriz de fibrina. Esta solución se inserta dentro de una primera cámara de una
jeringa de dos etapas (jeringa 1). La trombina se suministra de manera separada
en solución de cloruro de calcio en una segunda cámara de jeringa de dos vías

LII

(jeringa 2). Sellantes de fibrina también contienen otros componentes de andamios de fibrina (tal como fibronectina de plasma, Factor XIIIa plasminógeno y albúmina humana). El TGp1- PTH₁₋₃₄ se formula en el componente de fibrinógeno para dar una concentración final en la matriz de 0.1 mg/ml a 10 mg/ml en la matriz. La
5 composición exacta utilizada se da en la tabla 2.

Cuando los componentes de trombina y fibrinógeno se mezclan en volúmenes iguales, ocurre un proceso de coagulación para formar fibrina, una matriz extra celular natural. Durante el proceso de gelación el TGp1- PTH₁₋₃₄ llega a reticular la
10 matriz. El proceso de coagulación tiene lugar durante 45-60 segundos que permite la inyección simultánea de líquidos a través de una punta mezcladora, en el defecto, en donde se solidifica el gel.

**Ejemplo 4: Tratamiento de lesiones quísticas subcondriales en caballos
15 utilizando PTH₁₋₃₄ reticulado para una matriz de fibrina inyectable**

Los quistes óseos subcondriales en caballos son una entidad clínica similar a los quistes óseos unicamerales en humanos y por lo tanto se han utilizado como un modelo para evaluar el potencial cicatrizante del PTH₁₋₃₄ reticulado para las
20 matrices de fibrina.

Se someten doce caballos (doce quistes) a cirugía por lo cual el contenido de quistes se remueve por legrado de drenaje. Los quistes se ubican en varias articulaciones en las patas delanteras así como también en la trasera.

25 La composición del ejemplo 3 contiene volúmenes iguales de trombina y fibrinógeno que se inyectan en el SCL junto con el TGp1 PTH₁₋₃₄ en

concentraciones finales de 10, 1 y 0.4 mg/ml y se le permite polimerizar in situ. Un volumen promedio de 2 ml de matriz complementada se utiliza para llenar los defectos, con volúmenes que varían de 0.2-5 ml de matriz complementada. La edad de los caballos varía de dos meses a once años. Luego se desarrolla en 2, 4, 5 6 y 12 meses postoperatorivamente investigando radio gráficamente así como también la curación clínica.

La administración intralesional resulta en muy buena curación del SCL. Todos los caballos analizados, mostraron progreso significativo en curación clínica y 10 radiográfica. La curación radiográfica se refleja por una mayor densidad del contenido quístico una reducción en tamaños de quistes y ocurre 2-6 meses postoperatorivamente con una tendencia a curación más rápida en concentraciones menores de PTH ₁₋₃₄. Casi todos los caballos cicatrizan clínicamente después de solo 2-4 meses de postoperatorio, y muestran así ninguna cojera.

15 Estos resultados son especialmente tan exitosos que la curación se alcanza en caballos adultos con una edad de tres años o más, conocidos por llevar un pronóstico particularmente malo para la regeneración ósea.

20 Concentraciones de 0.4 a 10 mg/ml han mostrado ser efectivos con una tendencia de curación mejor en concentraciones más bajas.

Los tratamientos con la matriz complementada que contienen dosis menores de TGp1 PTH ₁₋₃₄ (0.1 mg/ml) también han mostrado promover la curación de SCL.

Tabla 3: Información general de paciente y localización del SCL

No Interno	Raza	Sexo	Edad	Ubicación del SCL
1	Inländer	Yegua	1 año	Primera falange/articulación, frontal izquierda
2	Inländer	Yegua	10 años	Articulación caña/menudillo, frontal derecho
3	Württemberg	Yegua	11 años	Radio, derecho
5	Pinto	Yegua	3 años	Articulación rótula/ babilla, derecha
7	Vollblut	Yegua	3 años	Articulación hueso sesamoide/menudillo, frontal derecho
12	Oldenburger	Yegua	3 años	Articulación hueso sesamoide/babilla, frontal izquierdo
13	Inländer	Yegua	3 años	Articulación fémur/ babilla, derecha
15	Inländer	Yegua	2 meses	Articulación osteomielitis fémur/ babilla, derecha
16	Inländer	Caballo castrado	2 meses	Articulación osteomielitis fémur/ babilla, derecha
18	Araber	Caballo castrado	5 años	Articulación caña/ menudillo, frontal izquierda
19	Inländer	Semental	3 años	Articulación caña/ menudillo, frontal derecha
20	Inländer	Caballo castrado	9 años	Hueso calcáneo, articulación corvejón, derecha

5

Tabla 4: Grado de cojera antes y durante tratamiento

No interno	TGp1 PTH ₁₋₃₄ en matriz de fibrina [mg/ml]	Curación clínica (grado de cojera)				
		Antes de tratamiento	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses
2	10	3	2	Curado	Curado	Curado
1	1	3-4	1	Curado	-	Curado
3	1	2	Curado	Curado	-	-
5	1	3	Curado	-	Curado	
7	1	2	1	Curado	-	
19	1	1	Curado	Curado		
12	0.4	3	Curado	Curado	-	

114

13	0.4	2	Curado	-		
15	0.4	5	2	-	Curado	
16	0.4	4	1			
18	0.4	1	Curado			
20	0.4	3	-	1		

Curado= No existe cojera
- = Sin visita de control

La cojera se gradúa utilizando el criterio establecido en la tabla 5.

5

Tabla 5: Grado de cojera y criterio de correspondencia

Grado de cojera	Criterio
1- menor, no claro	Cojera sin consistencia aparente: sin cojera al caminar, solo irregular al trotar.
2- menor, claro	Cojera aparentemente consistente bajo circunstancias especiales: sin cojera al caminar, cojera en cada etapa al trote
3- medio	Cojera consistentemente aparente: cojera clara al caminar y trotar
4-grado de cojera alto	Cojera severa
5- grado de cojera más alto	Sin cojera

Ejemplo 5: Modelo de hueso trabecular de conejo

10

Con el fin de estudiar el potencial para la fibrina- TGp1PTH para inducir el engrosamiento intra óseo de hueso trabecular se estabiliza un modelo de conejo. 150 µl de varias dosis de TGp1PTH en fibrina se inyecta en el fémur distal de 16 conejos blancos de Nueva Zelanda. Los conejos se anestesian y se exponen los cóndilos femorales. Se perfora un hueco pequeño a través del hueso cortical en el interior del cóndilo y el material se introduce en el hueso a través de una aguja 22G conectada a una jeringa de 1 ml. Las dosis tratadas son 0, 0.1, 0.4, y 1.0 mg

15

de TGp1 PTH₁₋₃₄ / ml de matriz de fibrina con la pata opuesta de cada conejo que es un control no tratado. Después de ocho semanas los animales se sacrifican y los cóndilos femorales se someten a μ CT para evaluar la densidad ósea luego de tratamiento. La densidad ósea se incrementa aproximadamente al 10% luego del

5 tratamiento con 1 mg de TGp1 PTH₁₋₃₄ / ml de matriz de fibrina.

Ejemplo 6: Pruebas de manejo, visualización y monitoreo de fibrina radio opaca inyectada en hueso ovino

10 Con el fin de visualizar el flujo de una matriz de fibrina dentro del hueso bajo el fluoroscopio y rayos X un agente de contraste basado en yodo, yohexol se incorpora en la matriz de fibrina. 600-800 mg de yohexol se disuelven en la solución precursora de trombina para dar una concentración final de 300-400 mg/ml de yohexol por matriz de fibrina. Un rango de trombina en la composición

15 precursora de trombina se ensaya (4-10 U/ml). Los otros componentes de la matriz de fibrina son como se describen en la tabla 2.

Una prueba de gelación muestra que las mayores concentraciones de trombina se requieren para formar el gel. Ambos componentes se inyectan como líquidos

20 simultáneamente en la vértebra de la oveja y en el fémur distal por vía de una jeringa dual y una aguja colocada en el hueso y permitir polimerizar in situ. El gel puede ser claramente visualizado utilizando rayos X y fluoroscopia.

Ejemplo 7: Fibrina pre- polimerizada inyectada en el hueso ovino, pruebas

25 **de visualización y manejo**

Con el fin de visualizar y probar el manejo de una matriz de fibrina prepolimerizada dentro del hueso bajo fluoroscopio y rayos X, un agente de contraste basado en yodo, yohexol se incorpora en el gel. 600-800 mg de yohexol se disuelven en el amortiguador de dilución de trombina para dar una concentración final de 300-400

5 mg/ml de yohexol en matriz de fibrina. El precursor de trombina se agrega a la solución de amortiguador – yohexol en una concentración de 75 U/ml de solución amortiguadora. Los otros componentes de la matriz de fibrina son como se describen en la tabla 2.

- 10 Una prueba de gelación muestra que existe una formación rápida de la matriz luego de mezclar los componentes precursores que comprende los componentes de fibrinógeno y trombina. Ambas soluciones precursoras se inyectan como líquidos simultáneamente en una tercera jeringa con una rosca y se permiten polimerizar completamente. El agente de contraste que contiene la matriz se
- 15 introduce en la vértebra ovina a través de una aguja grande colocada en el hueso. El gel se puede visualizar claramente utilizando rayos X y fluoroscopia.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una formulación que comprende un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de un PTH y un BMP y una fusión de péptido que comprende un PTH o BMP en un primer dominio, y un dominio de sustrato reticulable covalentemente en un segundo dominio, y una composición capaz de formar una matriz en un sitio en el hueso en necesidad del tratamiento, para la fabricación de un medicamento para tratar localmente áreas de hueso no saludables.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido de fusión se liga covalentemente a la matriz durante su formación.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la composición capaz de formar una matriz es inyectable.

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las áreas óseas no saludables se seleccionan del grupo que consiste de áreas afectadas por osteoporosis, quistes óseos y tumores óseos.

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el péptido de fusión comprende adicionalmente un sitio de degradación entre el primer y el segundo dominio.

6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el PTH se selecciona del grupo que consiste de PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₂₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ y PTH₁₋₂₅.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el PTH es PTH₁₋₃₄.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde
5 el BMP es BMP 2 o BMP 7.
9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde
el segundo dominio del péptido de fusión comprende un dominio de
sustrato transglutaminasa.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el dominio de sustrato
transglutaminasa es un dominio del sustrato de Factor XIIIa.
11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde
15 la composición capaz de formar una matriz comprende fibrinógeno,
trombina, y una fuente de calcio.
12. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde
la matriz se forma por una reacción de adición del tipo Michael entre una
20 primera molécula precursora que comprende n grupos nucleofílicos y
una segunda molécula precursora que comprende m grupos
electrofílicos, en donde n y m son al menos dos y la suma de n+m es al
menos 5.
- 25 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde los grupos
electrofílicos son grupos conjugados insaturados y los grupos
nucleofílicos se seleccionan del grupo que consiste de tioles y aminas.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde los componentes precursores son polietilenglicoles funcionalizados.

5 15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 143, en donde el segundo dominio del péptido de fusión comprende al menos una cisteína.

10 16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la composición capaz de formar una matriz comprende más de un componente, y en donde la formulación se suministra en un kit en el que al menos uno de los componentes de la composición capaz de formar una matriz se almacena separadamente de los otros componentes de la composición.

15 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el kit comprende adicionalmente una enzima de reticulación.

20 18. Una formulación que comprende

i) una composición capaz de formar una matriz bajo condiciones fisiológicas;

25 ii) un PTH, un BMP o un péptido de fusión que comprende al menos dos dominios en donde el primer dominio comprende un PTH o BMP y el segundo dominio comprende un dominio de sustrato reticulable; y

iii) un agente de contraste.

19. La formulación de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el PTH es PTH₁₋₃₄.

20. La formulación de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, en donde la composición capaz de formar una matriz comprende fibrinógeno, trombina, y una fuente de calcio.

21. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en donde la composición capaz de formar una matriz comprende una primer molécula precursora que comprende n grupos nucleofílicos y una segunda molécula precursora que comprende m grupos electrofílicos, en donde n y m son al menos dos y la suma de n+m es al menos 5.

22. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en donde el agente de contraste se selecciona del grupo que consiste de yodixanol, yohexol, yopamidol, iopentol, iopromida, iorneprol, yosimida, yotasul, iotrolan, yoversol, yoxilan, y metrizamida.

23. La formulación de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el agente de contraste es yohexol.

24. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 o 23, en donde la composición capaz de formar una matriz comprende más de un componente, y en donde la formulación es suministrada en un kit en el que al menos uno de los componentes de la composición

capaz de formar una matriz se almacena separadamente de los otros componentes de la composición.

25. Una matriz complementada que comprende una matriz de material natural o sintético, un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de un PTH y un BMP y un agente de contraste.

26. La matriz complementada de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la matriz complementada se forma de una composición capaz de formar una matriz y un péptido de fusión, que comprende el factor bioactivo en un primer dominio, y un dominio de sustrato reticulable covalentemente en un segundo dominio.

27. La matriz complementada de acuerdo con la reivindicación 25 o 26, en donde el PTH se selecciona del grupo que consiste de PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₂₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ y PTH₁₋₂₅.

28. La matriz complementada de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el PTH es PTH₁₋₃₄.

29. La matriz complementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en donde el BMP es BMP 2 o BMP 7.

30. La matriz complementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en donde el segundo dominio de la proteína de fusión comprende un dominio de sustrato transglutaminasa.

222

31. La matriz complementada de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el dominio de sustrato transglutaminasa es un dominio de sustrato de Factor XIIIa.

5 32. La matriz complementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, en donde el material de matriz comprende fibrina.

10 33. La matriz complementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde el material de matriz se forma por una reacción de adición del tipo Michael entre una primer molécula que comprende n grupos nucleofílicos y una segunda molécula precursora que comprende m grupos electrofílicos, en donde n y m son al menos dos y la suma de $n+m$ es al menos 5.

15

34. Un kit que comprende fibrinógeno, trombina, una fuente de calcio, un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de PTH y un BMP y un agente de contraste.

RESUMEN:

- 5 Un método de tratamiento local de defectos óseos específicos tal como osteoporosis o quistes óseos que comprenden la etapa de la administración local de una formulación que comprende un péptido de fusión que contiene un primer dominio que comprende PTH o BMP 2 o BMP 7, y un segundo dominio que comprende un dominio de sustrato reticulable covalentemente; y un material
- 10 adecuado para formar una matriz biodegradable adecuada para crecimiento celular o crecimiento interno, en donde el péptido de fusión se liga covalentemente con la matriz. En una modalidad, la matriz contiene uno o más agentes de contraste, y se forma preferiblemente en la ausencia de un factor de crecimiento. La matriz se puede utilizar en el tratamiento de quistes llenos de fluido tal como
- 15 quistes Tarlov, quistes de ovario, quistes aracnoides, quistes óseos aneurismales o quistes hepáticos.

124

FIG. 1

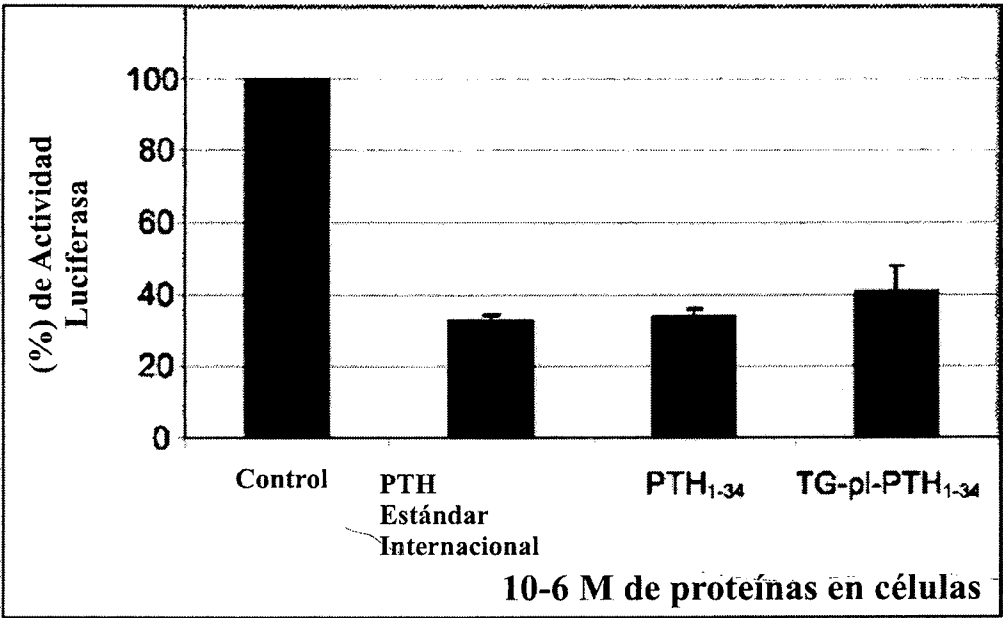
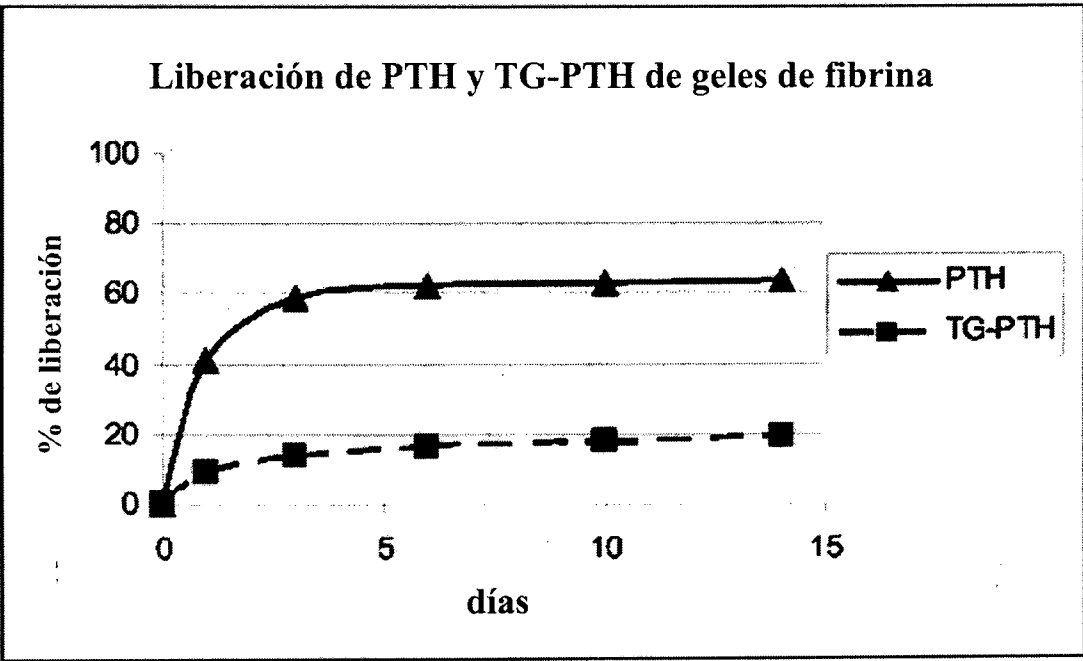


FIG. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/050070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/18 A61K38/29 A61L24/00 A61P19/00 A61P19/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/187232 A1 (HUBBELL JEFFREY A ET AL) 2 October 2003 (2003-10-02)	1-11, 15, 16
Y	see claims, paragraphs [0054] and [0084], examples 5-8.	1-34
X	WO 03/052091 A (EIDGENOSSISCH TECHNISCHE HOCHSCHULE ZURICH; UNIVERSITAT ZURICH; HUBBEL) 26 June 2003 (2003-06-26)	1-17
Y	cited in the application	
Y	see claims and examples	1-34
Y	WO 2004/071543 A (SYNTHES AG CHUR; SYNTHES ; BISIG, ADRIAN; BOHNER, MARC; SCHNEIDER, ERI) 26 August 2004 (2004-08-26)	18-34
	see abstract and claims	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2006

Date of mailing of the international search report

21/06/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Merckling-Ruiz, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/050070

126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003187232 A1	02-10-2003	NONE	
WO 03052091 A	26-06-2003	AU 2002358272 A1 BR 0215192 A CA 2470419 A1	30-06-2003 26-04-2005 26-06-2003
WO 2004071543 A	26-08-2004	AU 2003203316 A1 BR 0317809 A CA 2516113 A1 EP 1592463 A1 JP 2006513760 T	06-09-2004 29-11-2005 26-08-2004 09-11-2005 27-04-2006

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PKUO003WO	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/EP2006/050070	International filing date (day/month/year) 06.01.2006	Priority date (day/month/year) 06.01.2005
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K38/18		
Applicant Kuros Biosurgery AG		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>4</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 2006-06-16	Date of completion of this report 03.05.2007	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer MERCKLING-RUIZ, V Telephone No. +49 89 2399-8590 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/050070

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-43 as originally filed

Claims, Numbers

1-30 filed with telefax on 24.04.2007

Drawings, Figures

1 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/050070

129

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>18-30</u>
	No: Claims	<u>1-17</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-30</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-30</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

1. Reference is made to the following documents :

- D1: US 2003/187232 A1 (HUBBELL JEFFREY A ET AL) 2 October 2003 (2003-10-02)
D2: WO 03/052091 A (EIDGENOSSISCH TECHNISCHE HOCHSCHULE ZURICH;
UNIVERSITAT ZURICH; HUBBEL) 26 June 2003 (2003-06-26) cited in the
application
D3: WO 2004/071543 A (SYNTHES AG CHUR; SYNTHES ; BISIG, ADRIAN;
BOHNER, MARC; SCHNEIDER, ERI) 26 August 2004 (2004-08-26)

Regarding point V

2. D1 discloses fusion proteins comprising :

- a) a first domain comprising a bioactive factor,
- b) a second domain comprising a substrate domain for a crosslinking enzyme, and
- c) a degradation site between the first and the second domain.

The preferred bioactive factor is PTH, preferred second domains contain TG or Factor XIIIa substrate domain, a preferred degradation site is cleaved by plasmin (see claims 1-12). Also claimed are a kit comprising a fusion protein as defined above and a composition capable of forming a matrix (fibrinogen, thrombin and a calcium source, see claim 13), and a matrix comprising such a fusion protein, preferably comprising fibrin (see claims 26-31). Examples 7 and 8 describe fibrin matrices comprising TGpIP₁₋₃₄, TGPTH₁₋₃₄ or TGpIBMP2 and their use for treating bone defect.

D2 discloses fusion proteins comprising :

- a) a first domain comprising PTH, and
- b) a second domain comprising a crosslinkable substrate domain (see claim 1).

Preferred substrate domains and enzyme degradation sites are also disclosed as in D1 (see claims 2-12), as well as kits and matrices comprising said fusion protein (claims 11-18). In addition, synthetic matrices are also disclosed, in a preferred embodiment matrices containing PEG (claims 16-18). Examples 1-5 describe fibrin matrices or synthetic matrices including TGPTH or TGpIP₁₋₃₄.

D3 describes a bone substitute material containing a contrast agent (see abstract and claims).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2006/050070

- 2.1 Although the medical use "for treating non-healthy bone area" (in claim 1) may be defined in the application as excluding fractures and bone lesions (page 12 §4 of the description), this definition is not contained in claim 1. The claims should be self-supported with no need for special interpretation, so that "treating non-healthy bones" in claim 1 has the meaning generally accepted in the technical field. A skilled person would understand fractures and bone defects or lesions to be within the scope of claim 1.

The subject-matter of claims 1-11 and 15-17 is anticipated by D1 and D2.

Since D3 does not disclose any hydrogel matrix (it is limited to hard bone cement), the subject-matter of claims 12-14 is not anticipated by D3. However, D2 discloses the embodiment wherein the matrix is formed by a Michael type addition reaction, and in a preferred embodiment the matrix contains PEG (see claims 16-18). Present claims 12-14 are not novel over D2.

- 2.2 Claims 18-30 are new because there is no disclosure in the prior art of a composition comprising a matrix composition as defined in claim 1, and additionally containing a contrast agent.

3. The technical problem solved by claims 18-30 is to provide an alternative composition for treating bone defect.

Either D1 or D2 can be regarded as the closest prior art. The difference between the composition of claims 18-30 and the compositions of D1 or D2 is the additional presence of a contrast agent. The technical effect brought about by the contrast agent is to allow to monitor the distribution of the composition during injection in the bone area (see page 32 §2 of the application). The addition of a contrast agent for monitoring the administration of a composition to a bone is known in the art (see D3) and is also part of the general knowledge of a skilled person. This feature is not sufficient to impart an inventive step to claims 18-30.

Although there seems to be a technical prejudice against the addition of a contrast agent to a fibrin-based matrix (see Haemostasis, 1995, cited by the Applicant), independent claims 18 and 23 are not restricted to fibrin-based matrix. They also encompass matrices manufactured with a nucleophilic precursor molecule and an electrophilic precursor molecule (which indeed is a very broad definition encompassing a lot of possible polymers). There is no technical prejudice against the use of a contrast agent in matrices

132

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2006/050070

falling under this definition, and the application itself does not demonstrate any technical effect achieved with a matrix other than fibrin-based. Inventive step cannot be acknowledged.

133

Claims

1. Use of a formulation comprising a bioactive factor selected from the group consisting of a PTH and a BMP or a fusion peptide comprising a PTH or BMP in a first domain, and a covalently crosslinkable substrate domain in a second domain, and a composition capable of forming a hydrogel matrix at a site in bone in need of treatment, for the manufacture of a medicament for locally treating non-healthy bone areas.
2. Use according to claim 1, wherein the fusion peptide is covalently linked to the matrix during its formation.
3. Use according to claim 1 or 2, wherein the composition capable of forming a matrix is injectable.
4. Use according to any of claims 1 to 3, wherein the non-healthy bone areas are selected from the group consisting of bone areas affected by osteoporosis, bone cysts and bone tumours.
5. Use according to any of claims 1 to 4, wherein the fusion peptide further comprises a degradation site between the first and the second domain.
6. Use according to any of claims 1 to 5, wherein the PTH is selected from the group consisting of PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₂₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ and PTH₁₋₂₅.
7. Use according to claim 6, wherein the PTH is PTH₁₋₃₄.
8. Use according to any of claims 1 to 7, wherein the BMP is BMP 2 or BMP 7.
9. Use according to any of claims 1 to 8, wherein the second domain of the fusion peptide comprises a transglutaminase substrate domain.
10. Use according to claim 9, wherein the transglutaminase substrate domain is a Factor XIIIa substrate domain.

134

11. Use according to any of claims 1 to 10, wherein the composition capable of forming a matrix comprises fibrinogen, thrombin, and a calcium source.
12. Use according to any of claims 1 to 11, wherein the matrix is formed by a Michael type addition reaction between a first precursor molecule comprising n nucleophilic groups and a second precursor molecule comprising m electrophilic groups, wherein n and m are at least two and the sum $n+m$ is at least five.
13. Use according to claim 12, wherein the electrophilic groups are conjugated unsaturated groups and the nucleophilic groups are selected from the group consisting of thiols and amines.
14. Use according to claim 12, wherein the precursor components are functionalized polyethylene glycols.
15. Use according to any of claims 1 to 14, wherein the second domain of the fusion peptide comprises at least one cysteine.
16. Use according to any of claims 1 to 15, wherein the composition capable of forming a matrix comprises more than one component, and wherein the formulation is provided in a kit in which at least one of the components of the composition capable of forming a matrix is stored separately from the other components of the composition.
17. Use according to claim 16, wherein the kit further comprises a crosslinking enzyme.
18. A formulation comprising
 - i) a composition capable of forming a matrix under physiological conditions chosen from the group consisting of a composition comprising fibrinogen, thrombin and a calcium source; and/or a composition comprising a first precursor molecule comprising n nucleophilic groups and a second precursor molecule comprising m electrophilic groups, wherein n and m are at least two and the sum $n+m$ is at least five;

135

- ii) a PTH, aBMP or a fusion peptide comprising at least two domains wherein the first domain comprises a PTH or BMP and the second domain comprising a crosslinkable substrate domain; and
 - iii) a contrast agent.
19. The formulation according to claim 18, wherein the PTH is PTH₁₋₃₄.
20. The formulation according to any of claims 18 to 19, wherein the contrast agent is selected from the group consisting of iodixanol, iohexol, iopamidol, iopentol, iopromide, iorneprol, iosimide, iotasul, iotrolan, ioversol, ioxilan, and metrizamide.
21. The formulation according to claim 20, wherein the contrast agent is iohexol.
22. The formulation according to any of the claims 18 or 21, wherein the composition capable of forming a matrix comprises more than one component, and wherein the formulation is provided in a kit in which at least one of the components of the composition capable of forming a matrix is stored separately from the other components of the composition.
23. A supplemented matrix comprising a natural or synthetic matrix material, a bioactive factor selected from the group consisting of a PTH and a BMP and a contrast agent, wherein the matrix material is chosen from the group consisting of a matrix material comprising fibrin; and/or a matrix material formed by a Michael type addition reaction between a first precursor molecule comprising n nucleophilic groups and a second precursor molecule comprising m electrophilic groups, wherein n and m are at least two and the sum n+m is at least five.
24. The supplemented matrix according to claim 23, wherein supplemented matrix is formed from a composition capable of forming a matrix and a fusion peptide, comprising the bioactive factor in a first domain, and a covalently crosslinkable substrate domain in a second domain.

25. The supplemented matrix according to claim 23 or 24, wherein the PTH is selected from the group consisting of PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₂₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ and PTH₁₋₂₅.
26. The supplemented matrix according to claim 27, wherein the PTH is PTH₁₋₃₄.
27. The supplemented matrix according to any of claims 25 to 28, wherein the BMP is BMP 2 or BMP 7.
28. The supplemented matrix according to any of claims 26 to 29, wherein the second domain of the fusion peptide comprises a transglutaminase substrate domain.
29. The supplemented matrix according to claim 30, wherein the transglutaminase substrate domain is a Factor XIIIa substrate domain.
30. A kit comprising fibrinogen, thrombin, a calcium source, a bioactive factor selected from the group consisting of PTH and a BMP and a contrast agent.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS
PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

REIVINDICACIONES CORREGIDAS

1. Uso de una formulación que comprende un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de un PTH y un BMP y una fusión de péptido que comprende un PTH o BMP en un primer dominio, y un dominio de sustrato reticulable covalentemente en un segundo dominio, y una composición capaz de formar una matriz en un sitio en el hueso en necesidad del tratamiento, para la fabricación de un medicamento para tratar localmente áreas de hueso no saludables.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido de fusión se liga covalentemente a la matriz durante su formación.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la composición capaz de formar una matriz es inyectable.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las áreas óseas no saludables se seleccionan del grupo que consiste de áreas afectadas por osteoporosis, quistes óseos y tumores óseos.
5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el péptido de fusión comprende adicionalmente un sitio de degradación entre el primer y el segundo dominio.
6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el PTH se selecciona del grupo que consiste de PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₂₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ y PTH₁₋₂₅.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el PTH es PTH₁₋₃₄.

8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde
5 el BMP es BMP 2 o BMP 7.

9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde
el segundo dominio del péptido de fusión comprende un dominio de
sustrato transglutaminasa.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el dominio de sustrato
transglutaminasa es un dominio del sustrato de Factor XIIIa.

11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde
15 la composición capaz de formar una matriz comprende fibrinógeno,
trombina, y una fuente de calcio.

12. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde
la matriz se forma por una reacción de adición del tipo Michael entre una
20 primera molécula precursora que comprende n grupos nucleofílicos y
una segunda molécula precursora que comprende m grupos
electrofílicos, en donde n y m son al menos dos y la suma de n+m es al
menos 5.

13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde los grupos
25 electrofílicos son grupos conjugados insaturados y los grupos
nucleofílicos se seleccionan del grupo que consiste de tioles y aminas.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde los componentes precursores son polietilenglicoles funcionalizados.

5 15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 143, en donde el segundo dominio del péptido de fusión comprende al menos una cisteína.

10 16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la composición capaz de formar una matriz comprende más de un componente, y en donde la formulación se suministra en un kit en el que al menos uno de los componentes de la composición capaz de formar una matriz se almacena separadamente de los otros componentes de la composición.

15 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el kit comprende adicionalmente una enzima de reticulación.

20 18. Una formulación que comprende

25 i) una composición capaz de formar una matriz bajo condiciones fisiológicas seleccionadas del grupo que consiste de una composición que comprende fibrinógeno, trombina y una fuente de calcio; y/o una composición que comprende una primer molécula precursora que comprende n grupos nucleofílicos y una segunda molécula precursora que comprende m grupos electrofílicos, en donde n y m son al menos dos y la suma de n+m es al menos 5;

102
07-80236

541

- ii) un PTH, un BMP o un péptido de fusión que comprende al menos dos dominios en donde el primer dominio comprende un PTH o BMP y el segundo dominio comprende un dominio de sustrato reticulable; y
- iii) una agente de contraste.

5

19. La formulación de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el PTH es PTH₁₋₃₄.

10

20. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, en donde el agente de contraste se selecciona del grupo que consiste de yodixanol, yohexol, yopamidol, iopentol, iopromida, iorneprol, yosimida, yotasul, iotrolan, yoversol, yoxilan, y metrizamida.

15

21. La formulación de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el agente de contraste es yohexol.

20

22. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 o 21, en donde la composición capaz de formar una matriz comprende más de un componente, y en donde la formulación se suministra en un kit en el que al menos uno de los componentes de la composición capaz de formar una matriz se almacena separadamente de los otros componentes de la composición.

25

23. Una matriz complementada que comprende una matriz de material natural o sintético, un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de un PTH y un BMP y un agente de contraste, en donde el material de matriz se selecciona del grupo que consiste de un material

de matriz que comprende fibrina; y/o un material de matriz formado por una reacción de adición del tipo Michael entre una primer molécula precursora que comprende n grupos nucleofílicos y una segunda molécula precursora que comprende m grupos electrofílicos, en donde n y m son al menos dos y la suma de n+m es al menos 5.

24. La matriz complementada de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la matriz complementada se forma de una composición capaz de formar una matriz y un péptido de fusión, que comprende el factor bioactivo en un primer dominio, y un dominio de sustrato reticulable covalentemente en un segundo dominio.

25. La matriz complementada de acuerdo con la reivindicación 23 o 24, en donde el PTH se selecciona del grupo que consiste de PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₂₈, PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₃₁ y PTH₁₋₂₅.

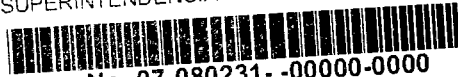
26. La matriz complementada de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el PTH es PTH₁₋₃₄.

27. La matriz complementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en donde el BMP es BMP 2 o BMP 7.

28. La matriz complementada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en donde el segundo dominio del péptido de fusión comprende un dominio de sustrato transglutaminasa.

29. La matriz complementada de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el dominio de sustrato transglutaminasa es un dominio de sustrato de Factor XIIIa.
- 5 30. Un kit que comprende fibrinógeno, trombina, una fuente de calcio, un factor bioactivo seleccionado del grupo que consiste de PTH y un BMP y un agente de contraste.

15
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-080231- -00000-0000

Fecha: 2007-08-06 16:31:08 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 61,635
FECHA : JULIO 31 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63769915	31/07/2007	55,200,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010 16023-841-001-5



No. 07-080231- -00000-0000

Fecha: 2007-08-06 16:31:08 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia