



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 342 707**

② Número de solicitud: 200900050

⑤ Int. Cl.:
C07K 14/51 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/32 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **31.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2010**

Fecha de la concesión: **31.05.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **10.06.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.06.2011

⑰ Titular/es: **Universidad de Málaga**
c/ Severo Ochoa, 4 (PTA)
29590 Campanillas, Málaga, ES
FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD Y CIBER-BBN

⑱ Inventor/es: **Arrabal García, Pilar María;**
Becerra Ratia, José;
Visser, Rick y
Cifuentes Rueda, Manuel

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I, procedimiento de obtención y aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I, procedimiento de obtención y aplicaciones.

La presente invención comprende la producción y aplicación de una proteína de fusión que consiste en una rhBMP-2 modificada para unirse específicamente a colágeno con un dominio de unión a colágeno derivado del factor de von Willebrand. La proteína de fusión resultante (rhBMP-2-CBD) presenta mayor afinidad por el colágeno, siendo esa unión muy estable en el tiempo, y reteniendo la actividad osteoinductiva, siendo capaz de inducir la formación de hueso nuevo incluso a concentraciones por debajo de las conocidas para la rhBMP-2 nativa. Además, en combinación con un transportador colagénico libre de ningún otro factor de crecimiento, como una esponja absorbible de colágeno, bajas concentraciones de rhBMP-2-CBD son capaces de inducir la formación de hueso nuevo cuando es implantada *in vivo*.

ES 2 342 707 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I, procedimiento de obtención y aplicaciones.

Sector de la técnica

La presente invención se enmarca dentro de áreas de conocimiento tales como la biología, la biotecnología, la ciencia de materiales, la farmacología, la medicina, la ingeniería o la nanotecnología entre otras. Sus aplicaciones van destinadas fundamentalmente a los sectores de la salud y la biomedicina, pudiéndose emplear en la mejora de tratamientos y terapias en medicina regenerativa de tejidos óseos.

Estado de la técnica

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son una familia de factores de crecimientos implicados en gran variedad de funciones durante el desarrollo y en la regeneración tisular [1]. Además del papel tan importante que ejercen en procesos no relacionados con el desarrollo óseo, las BMPs ejercen funciones únicas durante el desarrollo y regeneración del sistema esquelético [2], presentando algunas de ellas la capacidad exclusiva de inducir la formación de hueso ectópico cuando son implantadas en vertebrados adultos [3,4].

La reparación de defectos óseos y fracturas es uno de los mayores problemas clínicos y económicos en la sociedad actual, realizándose anualmente más de 3 millones de injertos óseos. A pesar de las buenas propiedades de los auto-injertos [5], la alta morbilidad asociada a esta; aproximación y la cantidad limitada de material que se puede obtener de cada donante, han propiciado el desarrollo de nuevos productos para la reparación del tejido óseo dañado o perdido [6-10].

Las BMPs recombinantes deben ser utilizadas en combinación con un material transportador para favorecer su retención en el lugar del implante [11,12], lo que además permite que la liberación de la proteína al medio extracelular sea más lenta. Dos de los transportadores más utilizados en la actualidad son la matriz ósea desmineralizada (DBM) y el colágeno. La DBM presenta buenas propiedades para la retención y liberación de las BMPs [13]. De hecho, la DBM, por sí sola, tiene la capacidad de inducir la formación de hueso ectópico debido a la gran cantidad y variedad de factores de crecimiento que retiene tras la desmineralización [14, 15, 16], los efectos biológicos observados no pueden ser atribuidos únicamente a la proteína de fusión; además, otros estudio sugieren que la DBM contiene proteínas que pueden bloquear parcialmente la actividad de las BMPs [17]. Por otro lado, los efectos locales de los implantes de DBM son impredecibles, pudiendo incluso ser rechazados tras un periodo de tiempo, como ocurre frecuentemente con los aloinjertos cuando se usan en las cirugías óseas.

Por el contrario, el colágeno es considerado en la actualidad como uno de los mejores materiales osteoconductores, dada su versatilidad, alta biocompatibilidad y baja inmunogenicidad. El primer producto aprobado por la FDA compuesto por una BMP recombinante humana (rhBMP) para el tratamiento de fusiones espinales y fracturas tibiales abiertas, consiste en una combinación de esponja absorbible de colágeno (ACS), como matriz transportadora, y rhBMP-2 (INFUSE[®], Medtronic, Minneapolis, MN, USA) o OP-1. Dado que la rhBMP-2 presenta baja afinidad natural por el colágeno, esta aproximación requiere el uso de altas dosis (miligramos) de BMPs [18, 19], lo cual no sólo puede tener efectos adversos colaterales, sino que eleva muchísimo el coste de estos tratamientos [20, 21].

Gracias a la tecnología de ADN recombinante, se han modificado muchas proteínas de interés terapéutico, con el fin de favorecer su unión a diversos biomateriales [22-24] y reducir la pérdida de moléculas efectivas, ya sea por difusión o por degradación enzimática, manteniéndolas en el lugar de aplicación a la concentración farmacológica adecuada. Una de estas modificaciones consiste en la producción de una proteína de fusión constituida por el factor de crecimiento de interés y un dominio de unión a colágeno procedente del factor de von Willebrand (vWF). Se ha demostrado que esta aproximación aumenta de manera efectiva la capacidad de unión de algunas proteínas a colágeno [25-29].

A pesar de que la producción de una rhBMP-2 modificada para favorecer su unión a colágeno ya ha sido abordada por otros autores [34, 35], todas esas proteínas han sido producidas con dominios adicionales para su purificación, y sus propiedades osteoinductoras sólo han sido demostradas en combinación con DBM. En particular, y en relación a secuencias adicionales que faciliten la purificación de proteínas, dichos dominios pueden inducir el desplegamiento de las proteínas a los que son añadidos, la pérdida de actividad de la proteína, e imposibilitar el uso de requerimientos para su aplicación terapéutica [37]. En particular, un dominio de histidinas (*His-tag*) puede alterar las características de unión de las proteínas recombinantes que lo incorporan [38, 39].

Descripción detallada de la invención

La BMP-2 es uno de los factores de crecimientos osteoinductores más potentes y además, ejerce múltiples funciones en otros muchos tejidos distintos al hueso. Por otro lado, el colágeno es la proteína más abundante de la matriz extracelular animal y es el único material osteoconductor que ha sido autorizado para su uso clínico, en combinación con BMP-2, para la reparación ósea. Dada su baja afinidad por el colágeno, la BMP-2 debe ser utilizada a concentraciones muy por encima de los niveles fisiológicos, lo cual puede tener efectos adversos colaterales, como la reabsorción

por parte de osteoclastos [20] o dar lugar a una osificación poco homogénea, lo cual tiene como consecuencia la pérdida de fuerza mecánica [21]. Una aproximación efectiva para aumentar y limitar la concentración local de proteína al lugar del implante, es aumentar la capacidad específica de unión de la BMP-2 al colágeno. En este sentido, algunos factores de crecimiento han sido ya modificados con dominios adicionales a unión al colágeno derivados del factor de von Willebrand [26, 28, 29, 33, 34], de colagenasa [22, 35], o de fibronectina [23, 36].

La presente invención comprende la producción y aplicación de una proteína de fusión que consiste en una rhBMP-2 modificada para unirse específicamente a colágeno, con el fin de mejorar la reparación y formación de hueso. La proteína rhBMP-2 modificada comprendida en la presente invención ha sido modificada únicamente con un dominio de unión a colágeno, derivado del factor de von Willebrand. Para evitar errores en la formación de puentes disulfuro durante el proceso de repliegamiento *in vitro*, la Cys-7 que se encuentra en la secuencia original del decapeptido ha sido reemplazada por una metionina [26]. No se han añadido secuencias de purificación con el fin de evitar cualquier posible alteración en el factor de crecimiento como los ya comentado en el estado de la técnica [37, 38, 39].

Los resultados obtenidos evidencian que la proteína de fusión rhBMP-2-CBD presenta mayor afinidad por el colágeno, y demuestran que esa unión es muy estable durante un largo periodo de tiempo y retiene la actividad osteoinductiva, siendo capaz de inducir la formación de hueso nuevo incluso a concentraciones por debajo de las conocidas para la rhBMP-2 nativa. Además, en combinación con un transportador colagénico libre de ningún otro factor de crecimiento, como una esponja absorbible de colágeno, material aprobado por la FDA para su uso clínico en la inducción de hueso ectópico, bajas concentraciones de rhBMP-2-CBD son capaces de inducir la formación de hueso nuevo cuando es implantada *in vivo*.

Por todo ello, la presente invención supone una alternativa mejor y más segura al uso de rhBMP-2 nativa en su aplicación en medicina regenerativa de tejido óseo. De este modo, la proteína de fusión objeto de la misma (rhBMP-2-CBD) sería una buena candidata para su uso clínico, dado que podría utilizarse a menor concentración ya que permanecería retenida en el lugar de aplicación de manera más eficiente, y no sólo induce la formación de más hueso sino que este hueso es más maduro, según la cantidad y tamaño de las trabéculas, cavidades medulares y vasos sanguíneos observados; además, permite la producción de hueso nuevo utilizando concentraciones de proteína por debajo de la menor concentración osteoinductiva (460 ng) establecida por Wang y col. [9]. Por último, la formación de hueso nuevo, con osteocitos embebidos en una matriz mineralizada compacta, muestra que la rhBMP-2-CBD mantiene la capacidad osteoinductora de la BMP-2 nativa cuando se combina con otros materiales osteoconductores distintos al colágeno, como es la hidroxiapatita (HA).

Descripción de los dibujos

Figura 1.- Representación esquemática de la proteína de fusión rhBMP-2-CBD. El dominio de unión a colágeno constituido por el decapeptido WREPSFMALS es añadido al extremo N terminal de una proteína BMP-2 madura. La cisterna original es sustituida por una metionina. Una glicina adicional actúa como nexo.

Figura 2.- Análisis de la producción, renaturalización y purificación de la proteína de fusión rhBMP-2-CBD: (A) SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie. Línea 1, contenido proteína celular total de *E. coli* transformada con el vector pET17b-BMP-2-CBD, después de 4 h de inducción con 1 mM IPTG. Línea 2, proteínas insolubles y cuerpos de inclusión recuperados tras lavar en presencia de Tritón X-100. Línea 3, proteína rhBMP-2-CBD tras 72 h del repliegamiento *in vitro*. Línea 4, fracción libre de cromatografía de heparín-sefarosa. Línea 5, dímeros de rhBMP-2-CBD purificados mediante cromatografía de heparín-sefarosa. (B) *Western blot* con un anticuerpo anti-BMP-2. Línea 1, rhBMP-2 producida por células CHO (R&D Systems). Línea 2, dímeros purificados de rhBMP-2-CBD no reducida. Línea 3, rhBMP-2-CBD reducida.

Figura 3.- Propiedades de unión a colágeno de la proteína rhBMP-2-CBD: discos de colágeno son incubado con diferentes concentraciones de rhBMP-2 o rhBMP-2-CBD. Las moléculas unidas son detectadas usando un anticuerpo anti-BMP-2 después de 2 h (A) ó 7 días (B) lavando con PBST. Análisis densitométrico. Los datos representados son media \pm SD, usando una escala relativa (0-255) y n = 5; * p<0,001 frente a rhBMP-2.

Figura 4.- Actividad ALP inducida por rhBMP-2 y rhBMP-2-CBD en mioblastos de ratón C2C12. Las células son crecidas durante 72 h con 0, 50, 100, 200, 300, 500 ó 1000 ng/ml de cada factor de crecimiento. Los datos representados son media \pm SD y n = 5; * p<0,01.

Figura 5.- Formación de hueso ectópico *in vivo*: (A, B) esponjas de colágeno con 0,5 y 10 microgramos de rhBMP-2-CBD, respectivamente. (C, D) esponjas de colágeno con 0,5 y 10 microgramos de rhBMP-2, respectivamente. (E, F) implantes de HA con 10 microgramos rhBMP-2-CBD y 10 microgramos rhBMP-2, respectivamente. (G) implante de HA (control negativo). Asterisco: trabéculas de hueso maduro. Flechas: osteoblastos sintetizando nueva matriz osteoide. MC: células mesenquimáticas indiferenciadas. BM: médula ósea, v: vasos sanguíneos, m: músculo. HA: hidroxiapatita. Barra de escala = 100 μ m.

Figura 6.- Formación de hueso ectópico *in vivo* a concentraciones baja de proteína: (H) tinción de von Kossa de esponja de colágeno incubada con 400 ng de rhBMP-2-CBD, mostrando un nódulo mineralizado. (I) Petroleoquímica con anti-osteopontina y contratinción con hematoxilina del mismo implante, mostrando un núcleo de osteoblastos positivos embebidos en una abundante matriz osteoide. (J) A mayor aumento se pueden observar grupos de células

ES 2 342 707 B1

expresando osteopontina (preosteoblastos), todavía indistinguibles morfológicamente respecto de las células indiferenciadas de alrededor. Flechas: preosteoblastos expresando osteopontina. Barra. de escala = 30 μm en (H) e (I), 20 μm en (J).

5 Modos de realización de la invención

A continuación se procede a detallar el modo de realización de la invención, que comprende la: obtención de la invención, su caracterización funcional, y la evaluación de su aplicabilidad.

10 Producción de la proteína de fusión rhBMP-2-CBD

Células, proteínas recombinantes y anticuerpos

Las células de osteosarcoma humana U-2 OS (HTB-96) se obtienen de la ATCC (American Type Culture Collection). Las células mioblasto de ratón C2C12 (91031101) se obtienen de la ECACC (European Collection of Cell Cultures). La BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) producida por células CHO es suministrada por R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). El anticuerpo monoclonal anti-BMP-2 y el anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (HRP) son suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). El anticuerpo monoclonal anti-osteopontina es obtenido del Banco de Hibridomas (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA, USA). El anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón biotinilado es suministrado por Abcam (Cambridge, MA, USA).

Construcción de los vectores de expresión para rhBMP-2 y rhBMP-2-CBD

Se realiza la extracción del ARN total a partir de las células de osteosarcoma humano U-2 OS, las cuales se sabe que secretan BMPs [30]. El ADNc que codifica para la secuencia de la hBMP-2 se obtiene mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos:

30 sentido: 5'-TTTCTAGATGGACGCTCTTTCAATGGACG-3'

antisentido: 5'-TTGGTACCCTAGCGACACCCACAACCCTCC-3'

35 El ADNc obtenido se clona en el vector de expresión pBIISK (+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Los clones seleccionados se utilizan para amplificar la secuencia que codifica para el: dominio maduro de la BMP-2 humana, a la cual se añade la secuencia del CBD en el extremo amino (Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Ser) (figura 1). Para la rhBMP-2, el oligonucleónido sentido es 5'-TTCATATGCAAGCCAAACACAAACAGC-3'. Para la rhBMP-2-CBD, es 5'-TTCATATGTGGCGCGAACCAGCTTCATGGCTCTGAGCGGTGCAAGCCAAACACAAACAGC-3'. En ambos casos, el oligonucleótido antisentido es 5'-AGAATTCCTGTACTAGCGACACCCAC-3'. Ambos productos se clonan en el vector de expresión pET-17b (EMD Biosciences/Merck Chemicals, Darmstadt, Germany).

Expresión, replegamiento y purificación de rhBMP-2 y rhBMP-2-CBD

45 Las proteínas recombinantes rhBMP-2 y rhBMP-2-CBD se expresan en *E. coli*, se repliegan *in vitro*, y se purifican según el método previamente descrito [31, 32] con ligeras modificaciones. Brevemente, las construcciones obtenidas pET-17b-BMP-2 y pET-17b-BMP-2-CBD se utilizan para transformar células de la cepa de *E. coli* Rosetta™ (DE3). Los cultivos se realizan a 37°C y en agitación y la inducción de la expresión de proteína recombinante se realiza mediante la adición de 1 mM de IPTG. Tras 4 h de inducción, se recuperan las células mediante centrifugación y se aíslan los cuerpos de inclusión mediante homogenización, centrifugación y varios lavados en presencia de Tritón X-100. Los cuerpos de inclusión obtenidos se solubilizan con 6 M de guanidinio hidrocloreto (Gnd-HCl), y las proteínas rhBMP-2 y rhBMP-2-CBD se repliegan durante 72 h a 10°C en presencia de Gnd-HCl, ácido 2-(ciclohexylamino) ethanosulfónico (CHES) y glutatión reducido:oxidado (GSH:GSSG) en una proporción 2:1. Tras el replegamiento, las proteínas dimericas obtenidas rhBMP-2 y rhBMP-2-CBD se purifican mediante cromatografía de afinidad por heparina, utilizando columnas de heparin-sefaraosa HiTrap™ (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

60 La adición de 1 mM de IPTG a los cultivos de células *E. coli* Rosetta (DE3) transformadas con la construcción pET-17b-BMP-2-CBD, favorece un alto rendimiento en la expresión de una proteína insoluble de unos ~15 Kda, correspondiente al peso molecular esperado para los monómeros de rhBMP-2-CBD. El lavado de los extractos bacterianos con Tritón X-100 permite la obtención de la fracción insoluble de proteína constituida mayoritariamente por la forma de ~15 KDa, la cual se encuentra en forma de cuerpos de inclusión. Tras la solubilización de las proteínas con Gnd-HCl, se realiza el plegamiento de las mismas *in vitro* durante 72 h, lo que da lugar a los dímeros de rhBMP-2-CBD, con una eficiencia de 40%. Finalmente los homodímeros de rhBMP-2-CBD, de unos ~29 KDa, se purifican mediante cromatografía de afinidad por heparina, separándolos de los monómeros no dimerizados y del resto de proteínas contaminantes (figura 2A). El análisis mediante electroforesis y *Western blot* bajo condiciones reductoras y no-reductoras, usando un anticuerpo monoclonal anti-BMP-2, confirma que la proteína purificada es rhBMP-2-CBD (figura 2B). Mediante este método de producción el rendimiento obtenido es de 30 mg de rhBMP-2-CBD dimerica pura por

ES 2 342 707 B1

litro de cultivo bacteriano. Resultados parecidos se obtienen en el caso de la producción, plegamiento y purificación de rhBMP-2 (datos no mostrados).

Caracterización funcional

5

Afinidad de la rhBMP-2-CBD a esponjas de colágeno

La afinidad de la rhBMP-2 y de la rhBMP-2-CBD por el colágeno tipo I se analiza *in vitro*, estudiando la capacidad de unión a ACS mediante el método de Kitajima y col. [23] ligeramente modificado. Para ello, se utiliza esponja absorbible de colágeno (derivada de piel bovina, cedida por el Dr. ME Nimni; patente US 5374539), que es cortada en discos de 5 mm de diámetro y 1 mm de grosor, y se lava con PBST (tampón fosfato salino con 0,1% de Tween 20). A cada disco se añaden 50 μ l de muestra y se incuba a 37°C durante 2 h. Transcurrido el periodo de incubación las esponjas de colágeno se lavan con PBST y se inmuno tiñen con anti-BMP-2 y anti-IgG-HRP de ratón. La detección se realiza con el reactivo ECL (GE Healthcare). La cantidad de proteína unida a las esponjas de colágeno, se determina mediante densitometría, cuantificando la inmunorreactividad de las esponjas, utilizando el programa de software libre Image J (Rasband, WS., Image J, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) versión 1.38x. Para estudiar la estabilidad de la unión de la rhBMP-2-CBD, tras incubar las proteínas recombinantes durante 2 h a 37°C, las esponjas de colágeno se lavan en PBST durante 7 días antes de realizar la inmunotinción con anticuerpos.

En relación a la capacidad de unión a colágeno, mucha más cantidad de proteína rhBMP-2-CBD que rhBMP-2 permanece unida a las esponjas tras el lavado de 2 h en PBST (figura 3A). En lo que respecta a la estabilidad de la unión de ambas proteínas, en el caso de la rhBMP-2-CBD casi toda la proteína permanece unida a la esponja tras 7 días de lavado con PBST (figura 3B). Por el contrario, en el caso de la rhBMP-2, apenas queda proteína retenida en las esponjas tras este extenso lavado. Estos resultados demuestran que la rhBMP-2-CBD presenta mayor afinidad por el colágeno, siendo esta afinidad de más del doble que la proteína nativa a su mayor concentración (200 ng), y estable incluso después de un largo periodo de lavados.

Actividad fosfatasa alcalina *in vitro*

La actividad biológica de las proteínas producidas rhBMP-2-CBD y rhBMP-2 se analiza *in vitro* mediante el ensayo de inducción de la actividad ALP en células C2C12. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse hacia el linaje osteogénico en presencia de BMP-2. Las células mioblasto de ratón C2C12 se cultivan en DMEM suplementado con suero fetal de ternera 10% (v/v) y glutamina 2 mM, a 37°C y en atmósfera de CO₂ (condiciones estándar). Para realizar el ensayo de fosfatasa alcalina (ALP), las células se siembran en una placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) a una densidad de 3x10⁴ células/pocillo en medio DMEM con 2% FBS, 2 mM L-glutamine y rhBMP-2 o rhBMP-2-CBD. Como control se utiliza proteína rhBMP-2 producida por células CHO. Tras 72 horas de cultivo, las células se lavan con PBS y la actividad ALP se mide utilizando el método del p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma Fast™ p-nitrophenyl phosphate tablets, Sigma-Aldrich).

La proteína de fusión rhBMP-2-CBD es capaz de inducir la actividad ALP en este tipo celular, de forma dosis dependiente, alcanzando valores similares a los obtenidos cuando se aplican las proteínas sin modificar rhBMP-2 producida en *E. coli* o producida por las células CHO (figura 4). No se observan diferencias significativas en ninguna de las concentraciones estudiadas. De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que la adición del dominio de unión al colágeno no afecta a la actividad biológica de la proteína *in vitro*.

45

Evaluación de la aplicabilidad de rhBMP-2-CBD

Formación de hueso ectópico *in vivo*

La actividad osteoinductora de la proteína de fusión producida, se analiza mediante el ensayo de inducción de hueso ectópico en rata, implantando junto al músculo dorsal, esponjas de colágeno incubadas con diferentes cantidades de rhBMP-2-CBD o rhBMP-2. El cuidado de los animales y los procedimientos utilizados, se realizan de acuerdo a la normativa internacional. En este estudio se utilizan ratas Wistar jóvenes (12 semanas). La ACS es cortada en disco de 5 mm de diámetro y 1 mm de grosor, que se incuban durante 2 h a 37°C con soluciones de proteína que contienen 0,4, 0,5, 10 μ g rhBMP-2-CBD, ó 0,4, 0,5, 10 μ g rhBMP-2. Los controles negativos se incubaron con solución vehículo. Se realizan tres réplicas de cada una de las condiciones. Los animales son anestesiados, se desinfecta la región con solución de etanol al 70% y se procede a afeitar la piel de la región dorsal. Tras realizar una incisión en la zona media dorsal se colocan tres implantes con proteína en un lado del músculo dorsal y tres implantes control en el músculo contralateral. En otro grupo experimental, se realizan implantes con HA (ProOsteon 500®) impregnadas con 10 μ g de rhBMP-2-CBD o rhBMP-2. Tras 28 días de implante, los animales son sacrificados y los implantes extraídos y disecados del tejido circundante. El material extraído se fija con formaldehído al 4% durante 18 h y se procesa para su inclusión en parafina. Se realizan secciones transversales de 10 μ m de grosor que se tiñen con hematoxilina-eosina (H-E). Los implantes que contenían 0,4 μ g de proteína se estudian, además, mediante tinción de von Kossa e inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-osteopontina y un anti-IgG de ratón marcado con biotina.

65

Tras cuatro semanas en el animal, los implantes extraídos aumentan de tamaño y presentan mayor dureza. El porcentaje de recuperación es del 100%, salvo en los controles negativos, implantados sin proteína recombinante, y

las esponjas impregnadas con 0,4 μg de rhBMP-2, que son reabsorbidos no encontrándose vestigio de material en el lugar de implantación. El estudio histológico realizado de las esponjas impregnadas con 0,5 y 10 μg de rhBMP-2-CBD, teñidas con H-E, muestra la formación de hueso nuevo que se extiende homogéneamente por todo el implante, invasión de gran cantidad de vasos sanguíneos y generación de una médula ósea aparente. Se observan numerosos osteocitos embebidos en la matriz mineralizada de apariencia trabecular. En la periferia de la formación ectópica, se localizan células mesenquimáticas indiferenciadas y osteoblastos, en contacto directo con el nuevo hueso formado, sintetizando nueva matriz osteoide (figura 5, A y B). En el caso de la rhBMP-2 los implantes también muestran la formación de hueso nuevo, pero de apariencia claramente diferente al anterior, con una matriz más desorganizada y menos compacta, pocas cavidades medulares y menor angiogénesis con pocos vasos sanguíneos y de menor calibre. Las células mesenquimales indiferenciadas se localizan no sólo en la periferia del nuevo tejido formado, sino también en el interior del implante entre la poca matriz ósea desorganizada (figura 5, C y D). Todas estas evidencias sugieren que el hueso ectópico producido por la rhBMP-2 es más inmaduro que el producido por la rhBMP-2-CBD.

Los implantes de HA, utilizados para comprobar la actividad de la rhBMP-2-CBD en combinación con un transportador no colagénico, teñidos con H-E, muestran la formación de hueso nuevo que tapiza las paredes de los poros de la HA, bastante compacto y con numerosos osteocitos embebidos en la matriz ósea, en asociación con un tejido medular. En este caso, no se observan diferencias entre la actividad osteoinductora de ambas proteínas en combinación con este transportador, lo cual demuestra que la adición del CBD no disminuye la actividad biológica de la BMP-2 cuando es combinada con otro material no colagénico (figura 5, E-G).

Los implantes con baja concentración de proteína, por debajo del límite efectivo, establecido por otros autores [9], sólo son recuperados en el caso de las esponjas de colágeno impregnadas con 400 ng de rhBMP-2-CBD. En este caso, la tinción con von Kossa pone de manifiesto la presencia de nódulos mineralizados de hueso nuevo en la región interna del implante (figura 6H). En estos nódulos, la inmunotinción con anti-osteopontina muestra grupos de osteoblastos que expresan este marcador temprano de la osteogénesis, embebidos entre abundante matriz osteoide (figura 6I). También pueden encontrarse pequeños grupos de preosteoblastos, entre las células mesenquimales indiferenciadas, característicos de la aparición de nuevos núcleos de osificación (figura 6J).

30 Bibliografía

- [1] **Hogan BL**. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6(4):432-438.
- [2] **Nakase T, Yoshikawa H**. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab* 2006; 24(6):425-433
- [3] **Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al**. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(6):2220-2224
- [4] **Volek-Smith H, Urist MR**. Recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP) induced heterotopic bone development *in vivo* and *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211(3):265-272
- [5] **Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE**. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006; 10(1):7-19
- [6] **Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K**. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 1988; 234:250-254
- [7] **Lewandrowski KU, Gresser JD, Wise DL, Trantol DJ**. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials* 2000;21(8):757-764.
- [8] **Bucholz RW**. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop* 2002; 395:44-52
- [9] **Rush SM**. Bone graft substitutes: osteobiologics. *Clin Podiatr Med Surg* 2005; 22(4):619-630
- [10] **Minamide A, Yoshida M, Kawakami M, Yamasaki S, Kojima H, Hashizume H, et al**. The use of cultured bone marrow cells in type I collagen gel and porous hydroxyapatite for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine* 2005; 30(10):1134-1138
- [11] **Lindholm TS, Gao TJ**. Functional carriers for bone morphogenetic proteins. *Ann Chir Gynaecol Suppl* 1993; 207:3-12
- [12] **Seeherman H, Wozney JM**. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(3):329-345

ES 2 342 707 B1

- [13] **Peel SA, Hu ZM, Clokie CM.** In search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system: *in vitro* studies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg* 2003; 14(3):284-291
- 5 [14] **Blum B, Moseley J, Miller L, Richelsoff K, Haggard W.** Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* 2004; 27(1 Suppl): 161-165
- [15] **Kale AA, Di Cesare PE.** Osteoinductive agents. Basic science and clinical applications. *Am J Orthop* 1995; 24(10):752-761
- 10 [16] **Hartman EH, Pikkemaat JA, Van Asten JJ, Vehof JW, Heerschap A, Oyen WJ, et al.** Demineralized bone matrix-induced ectopic bone formation in rats: *in vivo* study with follow-up by magnetic resonance imaging, magnetic resonance angiography, and dual-energy X-ray absorptiometry. *Tissue Eng* 2004; 10(5-6):747-754
- 15 [17] **Behnam K, Murray SS, Brochmann EJ.** BMP stimulation of alkaline phosphatase activity in pluripotent mouse C2C12 cells is inhibited by dermatopontin, one of the most abundant low molecular weight proteins in demineralized bone matrix. *Connect Tissue Res.* 2006; 47(5):271-277
- [18] **Geiger M, Li RH, Friess W.** Collagen sponges for bone regeneration with rh-BMP2. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(12):1613-1629
- 20 [19] **Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, et al.** Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88(6):1258-1265
- 25 [20] **Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno N, Yasuda H, et al.** Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology* 2001; 142(8):3656-3662
- 30 [21] **Sciadini MF, Johnson KD.** Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 2000; 18(2):289-302
- [22] **Nishi N, Matsushita O, Yuube K, Miyanaka H, Okabe A, Wada F.** Collagen-binding growth factors: production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(12):7018-7023
- 35 [23] **Kitajima T, Terai H, Ito Y.** A fusion protein of hepatocyte growth factor for immobilization to collagen. *Biomaterials* 2007; 28:1989-1997
- 40 [24] **Ishikawa T, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Tono K, Iwaguro H, et al.** Establishment of a functionally active collagen-binding vascular endothelial growth factor fusion protein *in situ*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(9): 1998-2004
- [25] **Takagi J, Asai H, Saito Y.** A collagen/gelatin-binding decapeptide derived from bovine propeptide of von Willebrand factor. *Biochemistry* 1992; 31:8530-8534
- 45 [26] **Tuan TL, Cheung DT, Wu LT, Yee A, Gabriel S, Han B, et al.** Engineering, expression and renaturation of targeted TGF-Beta fusion proteins. *Connect Tissue Res* 1996; 34:1-9
- [27] **Hall FL, Kaiser A, Liu L, Chen ZH, Hu J, Nimni ME, et al.** Design, expression, and renaturation of a lesion-targeted recombinant epidermal growth factor-von Willebrand factor fusion protein: efficacy in an animal model of experimental colitis. *Int J Mol Med* 2000; 6:635-643
- 50 [28] **Andrades JA, Wu LT, Hall FL, Nimni ME, Becerra J.** Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. *Growth Factors* 2001; 18:261-275
- 55 [29] **Han B, Perelman N, Tang B, Hall F, Shors EC, Nimni ME.** Collagen-targeted BMP3 fusion proteins arrayed on collagen matrices or porous ceramics impregnated with Type I collagen enhance osteogenesis in a rat cranial defect model. *J Orthop Res* 2002; 20:747-755
- 60 [30] **Anderson HC, Hsu HH, Raval P, Hunt TR, Schwappach JR, Morris DC, et al.** The mechanism of bone induction and bone healing by human osteosarcoma cell extracts. *Clin: Orthop Relat Res* 1995; 313:129-134.
- [31] **Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A, et al.** Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2002; 94:185-194
- 65

ES 2 342 707 B1

[32] **Vallejo LF, Riñas U.** Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnol Bioeng* 2004; 85:601-609

5 [33] **Han B, Hall FL, Nimni ME.** Refolding of a recombinant collagen-targeted TGF-beta2 fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 1997; 11 (2): 169-78

10 [34] **Chen B, Lin H, Zhao Y, Wang B, Zhao Y, Liu Y, Liu Z, Dai J.** Activation of demineralized bone matrix by genetically engineered human bone morphogenetic protein-2 with a collagen binding domain derived from von Willebrand factor propolypeptide. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 80 (2):428-34

15 [35] **Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W, Dai J.** Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007; 28 (6): 1027-35

20 [36] **Ishikawa T, Terai H, Kitajima T.** Production of a biologically active epidemial growth factor fusion protein with high collagen affinity. *J Biochem.* 2001; 129(4): 627-33

25 [37] **Jones C, Patel A, Griffin S, Martin J, Young P, O'Donnell K, Silverman C, Porter T, Chaiken I.** Current Trends in Molecular Recognition and Bioseparation. *J Chromatogr.* 1995; A 707:3-22

30 [38] **Gaberc-porekar V, Menart V, Jevsevar S, Vidensek A, Stalc A.** Histidines in affinity tags and surface clusters for immobilized metal-ion affinity chromatography of trimeric tumor necrosis factor α . *J Chromatogr.* 1999; A 852:117-128

35 [39] **Hang Q, Woods L, Feiss M, Catalano CE.** Cloning, expression, and biochemical characterization of hexahistidine-tagged terminase proteins. *J Biol Chem.* 1999; 274:15305-15314.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I **caracterizada** porque dicha proteína ha sido modificada únicamente con un dominio de unión a colágeno, derivado del factor de von Willebrand, que consiste en un decapeptido en el que la Cys-7 que se encuentra en la secuencia original del mismo ha sido reemplazada por una metionina, y no comprende ninguna secuencia adicional que facilite su purificación.
2. Proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según la reivindicación anterior **caracterizada** porque presenta mayor afinidad por el colágeno que la proteína rhBMP-2 nativa, porque su unión a colágeno es estable en el tiempo, y porque retiene la actividad osteoinductiva.
3. Proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según la reivindicación anterior **caracterizada** porque es capaz de inducir la formación de hueso nuevo a concentraciones por debajo de las conocidas para la proteína rhBMP-2 nativa, y porque no sólo induce la formación de más hueso que la rhBMP-2 nativa sino que este hueso es más maduro.
4. Método de obtención de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- a. Extracción de ARN total a partir de células que secreten BMPs;
 - b. Amplificación mediante RT-PCT usando los oligonucleótidos específicos 5'-TTTCTAGATGGACGCTCTTT CAATGGACG-3' y 5'-TTGGTACCCTAGCGACACCCACAACCCTCC-3' (sentido y antisentido, respectivamente);
 - c. Clonación del ADNc obtenido en un vector de expresión, transformación de *E. coli*, y selección de clones;
 - d. Amplificación de la secuencia que codifica para el dominio maduro de la BMP-2, a la cual se añade la secuencia del CBD en el extremo amino, a partir de los clones seleccionados usando los oligonucleótidos específicos 5'-TTCATATGTGGCGCGAACCGAGCTTCATGGCTCTGAGCGGTGCAAGCCAAACACAAACAGC-3' y 5'-AGAATTCCTGTACTAGCGACACCCAC-3' (sentido y antisentido, respectivamente);
 - e. Clonación del producto resultante en un vector de expresión, y expresión de la proteína rhBMP-2-CBD en *E. coli*;
 - f. Aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión, y replegamiento de las proteínas rhBMP-2-CBD;
 - g. Purificación de rhBMP-2-CBD mediante cromatografía de afinidad por heparina.
5. Método de obtención de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según la reivindicación anterior **caracterizado** porque rhBMP-2-CBD es clonada en un vector de expresión inducible por IPTG.
6. Método de obtención de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5 **caracterizado** porque las *E. coli* transformadas con rhBMP-2-CBD clonada en un vector de expresión son *E. coli* Rosetta (DE3).
7. Método de obtención de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 **caracterizado** porque el aislamiento de los cuerpos de inclusión comprende varios lavados en presencia de Tritón X-100, y porque la solubilización de las proteínas contenidas en los cuerpos de inclusión comprende el uso de guanidinio hidrocloreuro (Gnd-HCl).
8. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque dicha proteína se combina con un transportador colagénico libre de ningún otro factor de crecimiento apto para uso clínico.
9. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el transportador colagénico es una esponja absorbible de colágeno.
10. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 para la preparación de un producto farmacéutico de aplicación en medicina regenerativa de tejido óseo.

ES 2 342 707 B1

11. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque dicha proteína se combina con un material osteoconductor distinto al colágeno.

5 12. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el material osteoconductor distinto al colágeno es hidroxiapatita.

10 13. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I conforme a cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 para la preparación de un producto farmacéutico de aplicación en medicina regenerativa de tejido óseo.

15 14. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I obtenida conforme a cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 **caracterizado** porque dicha proteína se combina con un transportador colagénico libre de ningún otro factor de crecimiento apto para uso clínico.

20 15. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el transportador colagénico es una esponja absorbible de colágeno.

16. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 para la preparación de un producto farmacéutico de aplicación en medicina regenerativa de tejido óseo.

25 17. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I obtenida conforme a cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 **caracterizado** porque dicha proteína se combina con un material osteoconductor distinto al colágeno.

30 18. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el material osteoconductor distinto al colágeno es hidroxiapatita.

35 19. Uso de una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) con un dominio de unión específico a colágeno tipo I según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18 para la preparación de un producto farmacéutico de aplicación en medicina regenerativa de tejido óseo.

40

45

50

55

60

65

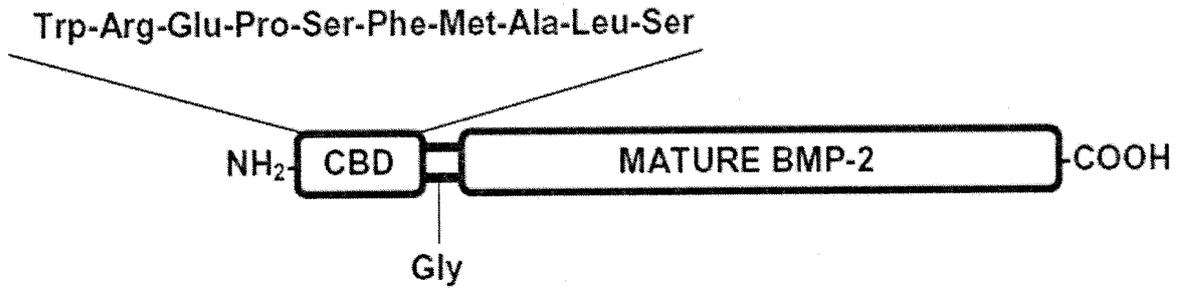


Figura 1

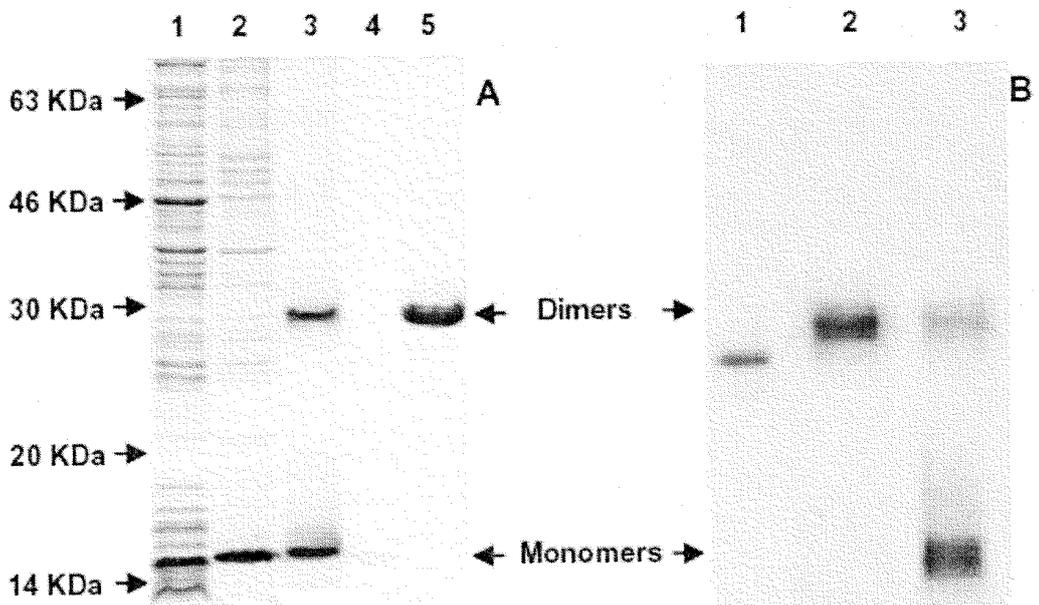


Figura 2

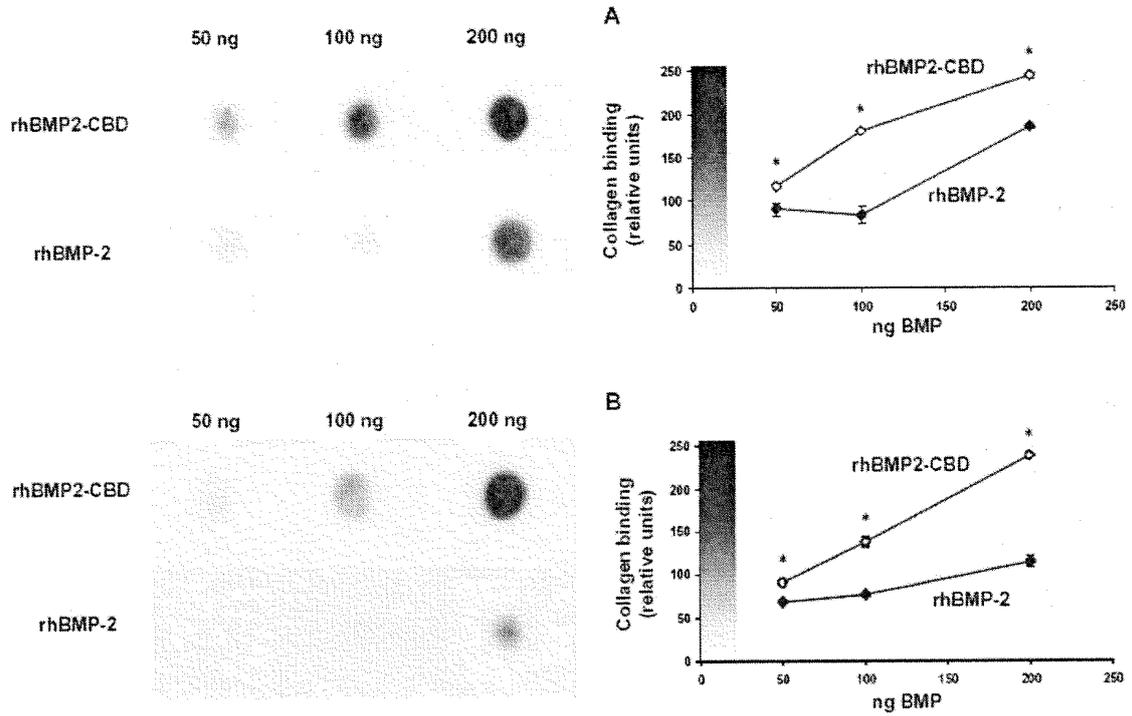


Figura 3

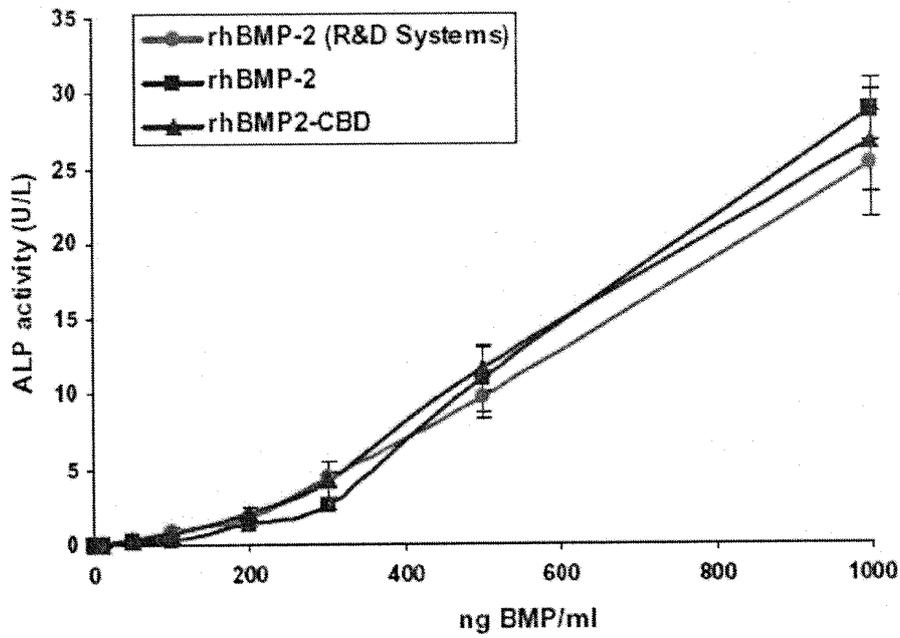


Figura 4

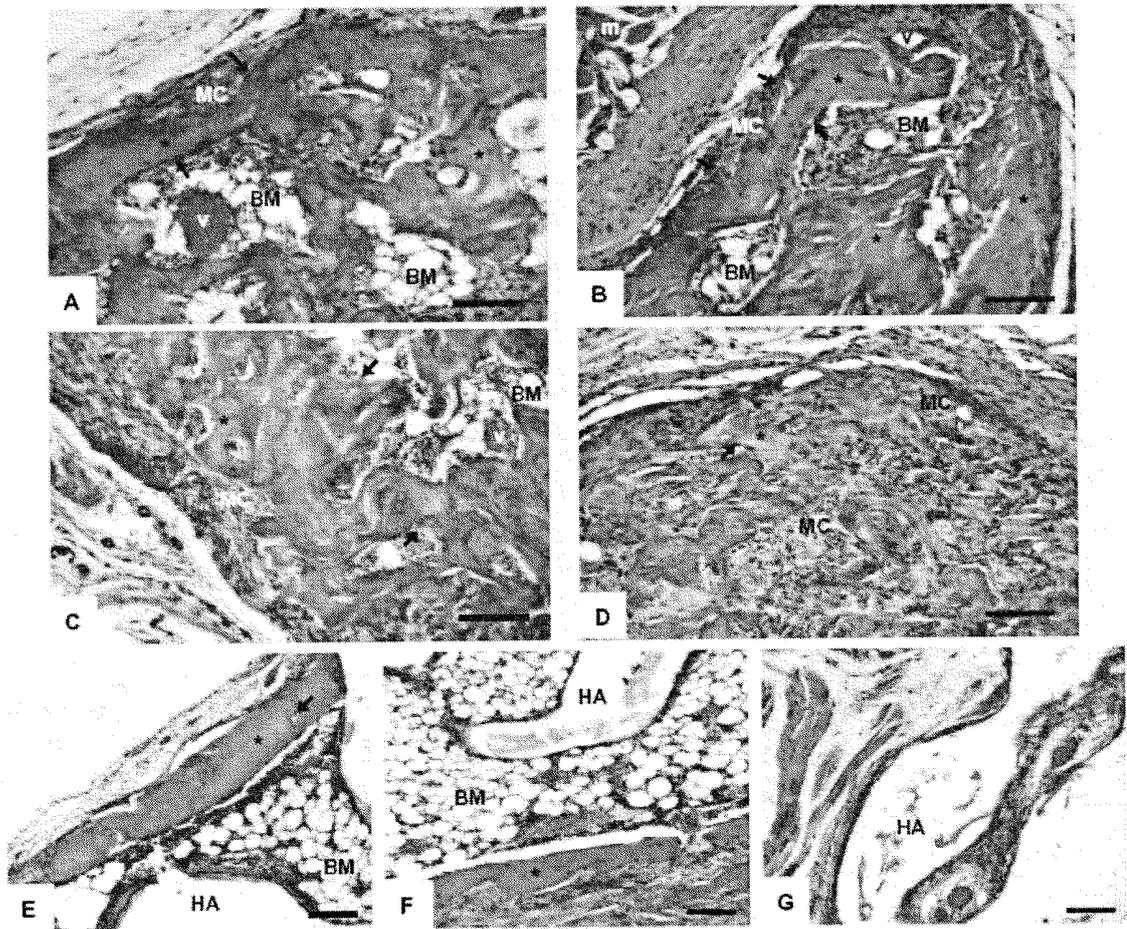


Figura 5

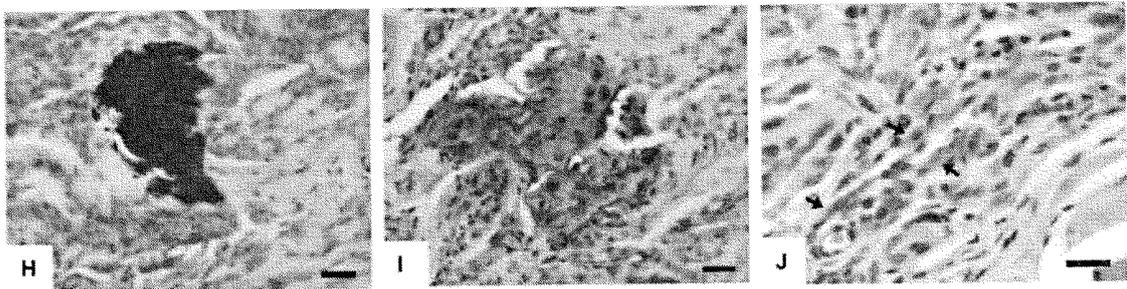


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 707

② Nº de solicitud: 200900050

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BECERRA, J. et al. "Engineering recombinant growth factors: a tool for in vitro mesenchymal cell commitment". INT.J.DEV.BIOL. 2001. Vol. 45 (S1); páginas S107-S108; todo el documento, especialmente figuras.	1-19
Y	CHEN, B. et al. "Activation of demineralized bone matrix by genetically engineered human bone morphogenetic protein-2 with a collagen binding domain derived from von Willebrand factor propolypeptide". JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, PART A. 2007. Vol. 80A, N.º. 2, páginas 428-434; figura 1.	1-19
Y	WO 0242331 A1 (UNIVERSIDAD DE MALAGA) 30.05.2002, figura 1B.	1-7
Y	US 5374539 A (NIMNI, M.E.) 20.12.1994, todo el documento.	8-10, 14-16
Y	WO 9817330 A1 (MCKAY, W.) 30.04.1998, reivindicaciones.	11-13, 17-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.06.2010

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/51 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/32 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-19	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-19	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

Consideraciones:

La invención consiste en una proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2) a la que se ha unido en el extremo amino terminal, un dominio de unión específico a colágeno tipo I (CBD) derivado del CBD del factor von Willebrand. La proteína híbrida, se combina con una esponja de colágeno o con hidroxiapatita para formar un material que se utiliza en medicina regenerativa del tejido óseo.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BECERRA, J. et al. "Engineering recombinant growth factors: a tool for in vitro mesenchymal cell commitment". INT.J.DEV.BIOL. 2001. Vol. 45 (S1); páginas S107-S108; todo el documento, especialmente figuras.	- -
D02	CHEN, B. et al. "Activation of demineralized bone matrix by genetically engineered human bone morphogenetic protein-2 with a collagen binding domain derived from von Willebrand factor propolypeptide". JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, PART A. 2007. Vol. 80A, N°. 2, páginas 428-434; figura 1.	- -
D03	WO 0242331 A1	30-05-2002
D04	US 5374539 A	20-12-1994
D05	WO 9817330 A1	30-04-1998

Observaciones sobre documentos:

El documento D01, publicación de los inventores de la presente solicitud, describe la obtención de distintos factores de crecimiento, entre los que se encuentran las proteínas BMP-2 y BMP-7, unidos al decapeptido derivado del CBD del factor von Willebrand utilizado en la invención y que se ilustra en la Fig. 1. Se mencionan los ensayos de adición de dominios de colágeno e hidroxiapatita a las proteínas de la familia de proteínas morfogenéticas de hueso BMP-2, 4, 6 y 7.

El documento D02, describe una proteína híbrida igual que la de la invención, en la que el decapeptido CBD del factor von Willebrand, tiene una C en la posición de la M. La proteína resultante se utiliza, unida, a una matriz de hueso desmineralizado, para favorecer la regeneración de huesos.

El documento D03, es una patente de los solicitantes, en la que utilizan el dominio de unión a colágeno que se utiliza en la invención, para incluir un CBD en el factor de crecimiento de fibroblastos básico, que se utiliza para favorecer la cicatrización de las heridas.

El documento D04, describe la esponja de colágeno que se utiliza en la invención.

El documento D05, describe el uso de la hidroxiapatita como material osteoconductor.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD

Las características de las reivindicaciones 1-19 ya son conocidas en el estado de la técnica. El documento D01, describe la unión del CBD modificado del factor von Willebrand a la proteína BMP-2, su obtención por técnicas de ADN recombinante y su unión posterior a matrices de colágeno e hidroxiapatita. Por lo tanto las reivindicaciones 1-19, no son nuevas a la vista del estado de la técnica conocido y no cumplen los requisitos del Art. 6 de la LP.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Las características de la invención han sido empleadas por separado para el mismo fin en varios documentos. El documento D02, describe un compuesto prácticamente igual al de la invención (la sustitución de una C por una M, que ya ha sido previamente descrita en el documento D03) resulta obvia para un experto en la materia y no supone una mejora en lo ya descrito, que implique actividad inventiva. El documento D03, describe también el resultado de unir el compuesto de la invención a una matriz desmineralizada de colágeno. En la presente solicitud, esta matriz es sustituida por una esponja de colágeno libre de cualquier factor de crecimiento, que ha sido previamente descrita en el documento D04. Para un experto en la materia, la sustitución de la matriz desmineralizada por la esponja ya conocida, resulta obvia.

Hoja adicional

La invención, describe el uso de la proteína híbrida de la invención, unida a hidroxiapatita. El documento D05, describe el uso de la hidroxiapatita como material combinado a proteínas morfogenéticas de hueso, incluida la BMP-2, para su uso en implantes dentales. No se menciona en la presente invención, que la proteína híbrida obtenida contenga un dominio de unión a hidroxiapatita, que produzca una unión a hidroxiapatita de la proteína BMP-2, que suponga una actividad inventiva sobre lo ya conocido en el estado de la técnica. Por lo tanto, a la vista de los documentos D02-D05, el objeto de las reivindicaciones 1-19, no implica actividad inventiva y dichas reivindicaciones no cumplen los requisitos del Art. 8 de la LP.