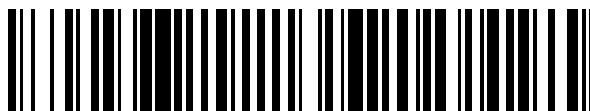


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 672**

51 Int. Cl.:

A61K 8/60 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

C07K 14/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2008 E 08707263 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2012 EP 2121142**

54 Título: **Uso del GDF-5 para el mejoramiento o el mantenimiento del aspecto dérmico**

30 Prioridad:

25.01.2007 EP 07001658

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

07.05.2013

73 Titular/es:

**BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON
PHARMAKA MBH (100.0%)
CZERNYRING 22
69115 HEIDELBERG, DE**

72 Inventor/es:

POHL, JENS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 402 672 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso del GDF-5 para el mejoramiento o el mantenimiento del aspecto dérmico

El presente invento se dirige a nuevos métodos y usos cosméticos de las composiciones que contienen proteínas de factores de crecimiento y de diferenciación. Dichas composiciones están diseñadas específicamente para optimizar la cantidad de elementos estructurales cruciales de tejidos de mamíferos para la conservación y el mejoramiento del aspecto del tejido dérmico.

La reducción de proteínas estructurales tales como un colágeno en diversos tejidos es un problema relacionado con la edad y/o el medio ambiente que aparece frecuentemente. En la piel, dichos cambios graduales o repentinos están acompañados típicamente por una disminución de la elasticidad, por un aumento de las arrugas faciales y por manchas hepáticas, por pérdida de brillo de la piel y por otras alteraciones indeseadas. Sobre el proceso se influye por diversos factores que incluyen los genéticos, irradiación con rayos UV (ultravioleta), los xenobióticos, estrés mecánico, cambios hormonales y procesos metabólicos (creación de sustancias reactivas tales como radicales, azúcares y aldehídos). Tomados en conjunto, todos estos factores conducen a alteraciones acumuladas de la estructura, la función y el aspecto de la piel. Como resultado de ello, la piel se envejece.

La influencia del medio ambiente, especialmente la irradiación solar con rayos UV, tiene una considerable importancia para el envejecimiento dérmico. Una piel fotoenvejecida aparece arrugada, laxa, gruesa, con una pigmentación irregular y manchas de color pardo. Unos estudios histológicos y ultraestructurales han revelado que una piel fotodañada está asociada con un espesor epidérmico aumentado, un perjuicio de la organización fibrilar del colágeno y de la elastina, y alteraciones de la organización del tejido conjuntivo. Un envejecimiento de la piel debido a una exposición a rayos UV se superpone a un envejecimiento cronológico de la piel. Históricamente, se ha considerado que el fotoenvejecimiento y el envejecimiento cronológico de la piel son unas entidades distintas. Sin embargo, una reciente evidencia indica que una piel envejecida cronológicamente e irradiada con rayos UV comparte importantes características moleculares, incluyendo unas alteradas rutas de transducción de señales, que favorecen la expresión de una metaloproteinasas (MMP), una degradación acrecentada y una síntesis disminuida de proteínas estructurales, y un daño para el tejido conjuntivo. Esta concordancia de mecanismos moleculares sugiere que una irradiación con rayos UV acelera muchos aspectos claves del proceso de envejecimiento cronológico en una piel humana. Incluso en unos individuos que no están expuestos a factores medioambientales excesivamente peligrosos, la cantidad de colágeno y de otras sustancias de andamio en la piel tiende a disminuir con la edad. Por ejemplo, la piel de un niño es rica en colágeno III que es responsable parcialmente de la blandura de la piel joven. Según se va decelerando el crecimiento del cuerpo, disminuye el contenido en la piel del colágeno del tipo III, mientras que el contenido del tipo I aumenta durante otro par de años. El colágeno del tipo I continua formándose hasta aproximadamente la edad de 35 años, cuando la piel alcanza el pico (máximo) de su resistencia mecánica. A la edad de los 60 años, todos los tipos de proteínas estructurales, tales como colágenos, elastina, fibrilinas y decorina, están significativamente por debajo de sus niveles de juventud. Por lo tanto, se acepta corrientemente que una reducción notable del nivel de fibras de proteínas en la dermis es el agente causante principal del envejecimiento de la piel.

El uso de cosméticos naturales o sintéticos para tratar el aspecto de la cara y la condición de la piel es corriente entre muchas culturas. En el pasado, se han desarrollado diversos métodos para la renovación dérmica, pero todos ellos tienen desventajas. Unos cosméticos suplementados con un colágeno y mucopolisacáridos tales como el ácido hialurónico para conferir humectación a la piel han sido explorados convencionalmente para impedir el envejecimiento de la piel. Desafortunadamente, ellos no pudieron alcanzar todavía un efecto suficiente para dicha finalidad. Puesto que el colágeno y otras proteínas estructurales no se absorben sustancialmente si se aplican extradérmicamente a la piel, estas composiciones no podrían aumentar la actividad de los fibroblastos y los queratinocitos. El ácido retinoico como un aditivo remodela a la piel lentamente pero a costa de una irritación y un enrojecimiento crónico/a. La melatonina y la vitamina C aumentan ambas el colágeno de la piel pero la piel necesita también aumentar su reconstrucción de elastina y de proteoglicanos que retienen el agua. Un daño controlado de la piel (por ejemplo exfoliaciones o descamaciones, dermoabrasión, rayos láser) trabaja bien solamente si hay una respuesta regenerativa vigorosa posterior a la terapia por parte de la piel dañada.

Con el fin de impedir que la piel se envejezca y/o para mantener/promover la salud, se desea por lo tanto explorar unos agentes que sean capaces de aumentar la producción de colágeno y de otros constituyentes principales para la dermis, los tejidos y los órganos. Los desarrollos más recientes de composiciones cosméticas (por ejemplo descritos en el documento de solicitud de patente de los EE.UU. US2002081324) utilizan proteínas de factores de crecimiento selectos tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y los factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I e IGF-II), que han sido eficaces para estimular la renovación de las células de la piel. Unos productos que contienen el factor de crecimiento de plantas N-furfuril-adenina (cinetina) recombinante, el factor de crecimiento epidérmico (ReVive Skincare) y el TGFβ recombinante (CRS, Topix Pharmaceuticals, NY, EE.UU.) ya se están comercializando.

A diferencia de las composiciones descritas con anterioridad para las finalidades antes mencionadas, los métodos y usos cosméticos del presente invento se refieren a unas proteínas que son idénticas a, o están relacionadas muy estrechamente con, el factor de crecimiento/diferenciación - 5 (GDF-5).

5 El GDF-5 (Hötten y colaboradores, 1994., *Biochem. Biophys Res. Commun.* 204, 646-652) es un agente morfógeno del que ya se ha mostrado que favorece la proliferación de células, la diferenciación celular y/o la formación de tejido en diversos tejidos. La proteína es conocida también como la proteína morfogenética MP52, la proteína morfogenética ósea BMP-14 o la proteína morfogenética derivada del cartílago (CDMP-1). El GDF-5 está estrechamente relacionado con el GDF-6 y el GDF-7. Estas tres proteínas forman un claro y distinto subconjunto de la superfamilia de TGF- β , presentando de esta manera unas propiedades biológicas comparables y un grado
10 extraordinariamente alto de identidad entre secuencias de aminoácidos (véase, por ejemplo, la cita de Wolfman y colaboradores 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330). Se ha demostrado repetidamente que los miembros del subconjunto de GDF-5/-6/-7 son unos agentes inductores y reguladores principalmente importantes del hueso y del cartílago (Cheng y colaboradores 2003, *J. Bone & Joint Surg.* 85A, 1544-1552; Settle y colaboradores 2003, *Developm. Biol.* 254, 116-130) así como del tendón/ligamento (Wolfman y colaboradores 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330). Todos los miembros de esta familia son sintetizados inicialmente como proteínas precursoras de mayor
15 tamaño, que subsiguientemente experimentan una disociación proteolítica junto a un racimo de residuos de carácter básico de aproximadamente 110-140 aminoácidos desde el extremo terminal de C, liberando la proteína madura terminal de C de esta manera algunas partes del prodominio terminal de N. Los polipéptidos maduros están relacionados estructuralmente y contienen un dominio bioactivo conservado que comprende seis o siete residuos de
20 cisteína canónicos, el cual es responsable del motivo "de nudo de cistina" tridimensional característico de estas proteínas. Las proteínas nativas relacionadas con el GDF-5 son unas moléculas homodiméricas y actúan principalmente mediante interacción con complejos de receptores específicos que se componen de cinasas de receptores de serina/treonina del tipo I y del tipo II. Las cinasas de receptores activan subsiguientemente a unas proteínas Smad y luego propagan las señales dentro del núcleo para regular la expresión de genes diana.

25 Aunque ha habido unos avances moderados en la especialidad, un tratamiento efectivo de una disminución relacionada con la edad y/o con el medio ambiente de componentes celulares estructurales en la piel sigue siendo un gran reto. Por lo tanto, un objeto del presente invento es el de proporcionar nuevos métodos y usos cosméticos que tengan como meta la conservación y el mejoramiento del aspecto del tejido dérmico.

Definiciones:

30 Con el fin de evitar malos entendidos y ambigüedades, algunos términos frecuentemente usados se definen y ejemplifican de la siguiente manera:

El término "dominio de nudo de cistina" tal como se usa en el presente contexto, significa la región de aminoácidos rica en cisteína bien conocida y conservada que está presente en las partes maduras de proteínas de la superfamilia de TGF-beta, tales como por ejemplo el GDF-5 humano y forma una estructura proteínica tridimensional conocida
35 como nudo de cistina. En este dominio, la localización respectiva de los residuos de cisteína unos con relación a los otros es importante y solamente se permite que varíe ligeramente con el fin de no perder la actividad biológica. Se ha demostrado que el dominio de nudo de cistina por sí sólo es suficiente para la función biológica de la proteína (Schreuder y colaboradores (2005), *Biochem Biophys Res Commun.* 329, 1076-86). Las secuencias de consenso para los dominios de nudos de cistina son bien conocidas en el estado de la técnica. De acuerdo con la definición
40 que aquí se da, el dominio de nudo de cistina de una proteína comienza con el primer residuo de cisteína que participa en el nudo de cistina de la respectiva proteína y termina con el residuo que sigue a la última cisteína que participa en el nudo de cistina de la respectiva proteína. Por ejemplo, el dominio de nudo de cistina de la proteína precursora del GDF-5 humano (SEQ ID NO: 1) se compone de los aminoácidos 400-501 (véase también la FIG.1).

45 El término "proteína relacionada con el GDF-5" tal como se usa en el presente contexto, significa cualquier proteína presente en la naturaleza o creada artificialmente que comprende un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de por lo menos un 60 % con el dominio de nudo de cistina de 102 aa (aminoácidos) del GDF-5, humano (aminoácidos 400-501 de SEQ ID NO: 1). Este término incluye unas proteínas que pertenecen al conjunto de las proteínas GDF-5, GDF-6 y GDF-7 procedentes de especies de vertebrados o mamíferos, así como unas
50 variantes recombinantes de las mismas, siempre y cuando que estas proteínas muestren el porcentaje de identidad antes mencionado con el dominio de nudo de cistina del GDF-5 humano. El valor limitador de 60 % es bien apropiado para separar miembros del conjunto de proteínas de GDF-5/-6/-7 así como ciertas variantes de las mismas con respecto de otras proteínas adicionales tales como otros GDF's y BMP's. Una comparación del dominio de nudo de cistina de 102 aa del GDF-5 humano, del GDF-6 humano y del GDF-7 humano (véase la FIG. 2) revela el alto grado de identidad de aminoácidos entre estas proteínas. El GDF-6 humano comparte 87 (85 %), y el GDF-7 humano comparte 83 (81 %), residuos idénticos con el dominio de nudo de cistina de GDF-5. Los respectivos dominios de moléculas de GDF-5/-6/-7 procedentes de otras especies de vertebrados y mamíferos que se han
55 identificado hasta ahora, también muestran unos muy altos porcentajes de identidad de por lo menos 75 % (entre 79 % y 99 %), cuando se comparan con el GDF-5 humano. En contraste, los GDF's y BMP's que no pertenecen al

subconjunto de GDF-5/-6/-7 presentan unos valores de identidad mucho más bajos, situados por debajo de 60 % (véase la FIG. 3).

5 La determinación de correspondientes posiciones de aminoácidos en secuencias de aminoácidos relacionadas, así como el cálculo de los porcentajes de identidad entre ellas, se pueden realizar con facilidad con la ayuda de algoritmos de alineación bien conocidos y opcionalmente de programas de ordenador que usan estos algoritmos. Por ejemplo, las identidades de aminoácidos en esta solicitud de patente (p.ej. la FIG. 2) se han calculado mediante alineación de secuencias con el programa libre (freeware) ClustalX (versión 1.81) con parámetros de defectos y subsiguiente recuento a mano de residuos idénticos. Los ajustes de defectos para la alineación por pares (lenta - exacta) son: para el parámetro de apertura de intersticio: 10,00; para el parámetro de extensión de intersticio 0,10; para la matriz de pesos de proteínas: Gonnet 250. El programa ClustalX es descrito con detalle en la cita de Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. (1997): la interfase de ventana de ClustalX: estrategias flexibles para una alineación de múltiples secuencias, ayudada por herramientas de análisis de la calidad. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882. El ClustalX es una interfase de ventana para el programa de alineación de secuencias múltiples ClustalW y está disponible por ejemplo de diversas fuentes, por ejemplo por una ftp anónima procedente de ftp-igbmc.u-strasbg.fr, ftp.emblheidelberg.de, ftp.ebi.ac.uk o a través de una descarga de la siguiente página web: <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>. El programa y el algoritmo de ClustalW se describen también con detalle en la cita de Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994): CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice [mejoramiento de la sensibilidad de la alineación progresiva de múltiples secuencias mediante ponderación de secuencias, penalidades de intersticios específicas para ciertas posiciones y elección de la matriz de pesos]. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

25 El término "composición cosmética" se refiere a composiciones o formulaciones no médicas que están diseñadas principalmente para mejorar la composición y/o la función de la piel mediante el suministro de nutrientes y/o de otras sustancias bioactivas. El objetivo principal de las composiciones cosméticas es aliviar el envejecimiento dérmico y el conseguir un aspecto más atractivo de la piel. Sin embargo, el término "composiciones cosméticas" comprende composiciones "cosmeceúticas" que son vendidas como cosméticos pero que no obstante incluyen unas cantidades comparativamente pequeñas de sustancias activas farmacéuticamente (véase la cita de Elsner, P., Maibach, H., coordinadores de edición. *Cosmeceuticals and active cosmetics* [composiciones "cosmeceúticas" y cosméticos activos] (2005). Boca Raton (FL): Taylor and Francis Group).

30 Los términos "dérmico", "células dérmicas" y "tejidos dérmicos" se refieren a células y tejidos que están presentes en la piel de un mamífero.

El término "coloide" se refiere a unas pequeñas partículas dispersadas en un líquido.

35 Los términos "formulación de micropartículas de lípidos" y "formulación de LMP" se refieren a unas microemulsiones homogéneas del tipo de aceite/agua que contienen pequeñas partículas esféricas que tienen un tamaño de partículas situado por debajo de 200 nm.

El término "solubilidad aumentada" en el contexto de las proteínas relacionadas con el GDF-5 se refieren a una estabilización de la proteína relacionada con el GDF-5 en sangre y/o soluciones acuosas a un pH comprendido entre 4,0 y 9,0. Esta estabilización se puede conseguir mediante la creación de una formulación líquida o emulsión acuosa estable, tal como las formulaciones coloidales de acuerdo con el invento.

40 El término "pH fisiológico" tal como se usa en el presente contexto, significa un pH situado dentro del intervalo de 4 a 8,5 y más preferiblemente dentro del intervalo de 5 a 7,5.

45 El término "actividad biológica" designa a la actividad de ciertos compuestos, incluyendo, p.ej. una proteína relacionada con el GDF-5 como se mide por el ensayo de la fosfatasa alcalina (ALP) *in vitro* corriente, p.ej. tal como se describe en el Ejemplo 2 o en la cita de Takuwa y colaboradores, (1989), *Am. J. Physiol.* 257, E797-E803). Unos apropiados linajes celulares, que se pueden usar en dicho ensayo de ALP, son p.ej. células ATDC-5 o MCHT 1/26.

Se ha encontrado ahora de modo sorprendente que unos métodos cosméticos que utilizan proteínas relacionadas con el GDF-5 se pueden usar eficientemente para estimular la síntesis de elementos estructurales de tejidos de mamíferos.

50 La piel de un mamífero es el órgano más grande del cuerpo y que siempre está cambiando, que contiene muchas células y estructuras especializadas. Ella está compuesta de tres capas primarias: la capa exterior o epidermis, que proporciona impermeabilización frente al agua y sirve como una barrera para una infección; la dermis, que sirve como una localización para los colgajos de piel; y la membrana de basamento, que separa a la epidermis con respecto de la dermis.

El principal tipo de célula que constituye la epidermis es el queratinocito. La capa de piel epidérmica no contiene vasos sanguíneos; es una barrera natural que es responsable de retener al agua en el cuerpo y de protegerlo con respecto a agentes químicos y patógenos perjudiciales. La epidermis se compone de cinco subcapas: "stratum basale", "stratum spinosum", "stratum granulosum", "stratum lícium" and "stratum corneum". En la capa de fondo (stratum basale = estrato basal) las células se dividen y empujan a las células ya formadas hacia el interior de capas más altas. La capa superior de la epidermis, que es el stratum corneum (= estrato córneo), está hecha de células de piel planas y muertas que se mudan cada dos días.

La membrana de basamento es una capa de tejido delgada pero compleja que une a la epidermis y la dermis de la piel. Este complejo de anclaje se compone de los hemidesmosomas, los filamentos de anclaje y las fibrillas de anclaje. Él contiene varias capas tales como p.ej. la "lamina lucida", que comprende glicoproteínas (p.ej. laminina) y colágenos.

La dermis es la capa interna de la piel y se compone de tejido conjuntivo suelto. Aunque ella contiene también un cierto número de estructuras celulares, que incluyen vasos sanguíneos, nervios, folículos de pelos, músculo liso, glándulas y tejido linfático, la dermis es relativamente acelular. Una parte importante de su volumen es el espacio extracelular, que es llenado por una red organizada de macromoléculas entrecruzadas, que se denomina matriz extracelular (ECM).

Unos componentes principales de la ECM de la dermis y de otros tejidos son proteoglicanos (p.ej. decorina), mucopolisacáridos (p.ej. ácido hialurónico) y proteínas fibrosas tales como colágenos, elastina y fibrilinas. Las moléculas de proteoglicanos forman una "sustancia de fondo" similar a un gel, altamente hidratada, en la que están embebidas las proteínas fibrosas. El ácido hialurónico bloquea a la humedad y apoya la integridad estructural de la matriz extracelular. Las fibras de colágeno tanto refuerzan como ayudan a organizar a la matriz. Los colágenos del tipo I y del tipo III son los colágenos más corrientes que están presentes p.ej. en la ECM de tejidos dérmicos. Las moléculas de colágeno del tipo IV se ensamblan para dar una malla que constituye una parte principal de la lámina basal madura, una esterilla delgada de matriz extracelular especializada que está situada por debajo de todas las hojas y los tubos de células epiteliales. La lámina basal está sujeta al tejido conjuntivo subyacente por fibrillas de anclaje especializadas hechas de colágenos del tipo VII. El término "membrana de basamento" se usa con frecuencia para describir al material compuesto de la lámina basal y esta capa de fibrillas de colágeno. Unas fibras elásticas similares al caucho, que se componen de elastina y de glicoproteínas microfibrilares (p.ej. las fibrilinas-1 y -2) proporcionan la resiliencia de la matriz extracelular.

De acuerdo con los experimentos *in vivo* detallados y extensos descritos en los Ejemplos 1 y 2 de la presente solicitud, un aumento artificial de la concentración de GDF-5 en el tejido de piel de mamíferos tiene importantes implicaciones estructurales en el andamio de la ECM. Con mayor exactitud, se pueden observar p.ej. los siguientes importantes efectos:

- un fuerte aumento de prominentes proteínas de la matriz extracelular: colágeno del tipo I (FIG. 6), colágeno del tipo III (FIG. 7), colágeno del tipo IV (FIG. 16), elastina (FIG. 8), fibrilina-2 (FIG. 12) y decorina (FIG. 9);
- un importante aumento en la concentración de las proteínas de la membrana de basamento: colágeno del tipo IV (FIG. 10), colágeno del tipo VII (FIG. 11) y fibrilina-2 (FIG. 12);
- una manifiesta intensificación del marcador de diferenciación epidérmica loricrina (FIG. 13)
- un contenido aumentado de ácido hialurónico (FIG. 25)
- una reducción global del espesor epidérmico (FIG. 14)
- un considerable refuerzo de la membrana de basamento (FIG. 15).

Aunque los efectos mediados por el GDF-5 también se entrelazan de una manera sinérgica, es digno de hacer observar que cada alteración observada afecta individualmente a la composición de la ECM e inicia una discreta acción de regeneración sobre células dérmicas. El asunto del invento es definido en las presentes reivindicaciones. En una forma de realización del invento los métodos no terapéuticos y cosméticos divulgados que utilizan proteínas relacionadas con el GDF-5 se pueden usar para la prevención, la deceleración o la inversión de los procesos de envejecimiento dérmico, seleccionados entre un envejecimiento cronológico y un fotoenvejecimiento. El aumento en proteínas estructurales, mediado por factores de crecimiento, da lugar a la inversión de una multitud de efectos degenerativos. Se prefiere especialmente el mejoramiento o la prevención de las arrugas, el retardo del envejecimiento dérmico, el espesamiento de una membrana de basamento y/o la reducción del espesor epidérmico.

Para una mejor comprensión del contexto científico y del impacto del invento, se describe brevemente en lo sucesivo cierta bibliografía relevante que recopila las alteraciones relacionadas con la edad y el fotodaño (causado por la luz) en células dérmicas.

El proceso de envejecimiento de la piel se relaciona con un envejecimiento intrínseco/cronológico y con un fotoenvejecimiento. Ambos tipos de envejecimiento, un daño causado a la piel humana debido a una exposición repetida a la radiación ultravioleta (UV) procedente del sol (fotoenvejecimiento) y un daño que aparece a causa del transcurso del tiempo (envejecimiento cronológico), dan como resultado un cierto número de cambios en la estructura, las propiedades mecánicas y la función de la piel, conduciendo a fin de cuentas a la aparición de arrugas y a una importante reducción de la elasticidad de la piel. Son principales entre las alteraciones intracelulares

causadas por el envejecimiento cronológico y el fotoenvejecimiento unos niveles considerablemente más bajos de colágenos, decorina y otros componentes del tejido conjuntivo de la piel. Unos estudios han demostrado p.ej. que

- 5 - el colágeno del tipo I es reducido en un 58 % en una piel irradiada con rayos UV debido a una elaboración aumentada de las metaloproteinasas de matriz que degradan al colágeno y una disminución de la síntesis de colágenos (Fisher y colaboradores 1997: Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light [Patofisiología del envejecimiento prematuro de la piel inducido por luz ultravioleta]. N Engl J Med 337: 1419-1428). Una importante reducción del colágeno del tipo I es también típica de un envejecimiento cronológico, tal como se demuestra por una comparación de los fibroblastos dérmicos aislados a partir de la piel de individuos jóvenes (de 18 a 29 años) frente a individuos ancianos (de 80 años y más) (Varani y colaboradores 2006: Am J Pathol. 168, 1861-1868).
- 10 - se ha encontrado en estudios contra el envejecimiento que un importante aumento del colágeno del tipo III está vinculado con una marcada mejoría de la elasticidad de la piel y con una disminución de la profundidad de las arrugas (Schmidt y colaboradores 1996: Treatment of skin aging with topical estrogens [Tratamiento del envejecimiento de la piel con estrógenos tópicos]. Int J Dermatol. 35: 669-674).
- 15 - una piel portadora de arrugas, irradiada con rayos ultravioletas B, está caracterizada por un aumento de la actividad de degradación del colágeno del tipo IV (Inomata y colaboradores 2003: Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse [Posible implicación de las gelatinasas en el daño para la membrana de basamento y la formación de arrugas en un ratón depilado, crónicamente expuesto a rayos ultravioleta B]. J Invest Dermatol. 120,128-34).
- 20 - la expresión basal del gen del colágeno del tipo VII disminuye de una manera dependiente de la edad en los fibroblastos (Chen y colaboradores 1994: Type VII collagen gene expression by human skin fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of donor age and cytokine responses [La expresión del gen del colágeno del tipo VII por fibroblastos y queratinocitos de piel humana en cultivo: influencia de la edad del donante y las respuestas a citocinas]. J Invest Dermatol. 102, 205-209).
- 25 - una irradiación crónica con rayos UVB induce una pérdida de ácido hialurónico a partir de la dermis, contribuyendo de esta manera al fenotipo quieto y mudo de fibroblastos dérmicos (Dai y colaboradores 2007: Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases [Una irradiación crónica con rayos ultravioleta B provoca pérdida de ácido hialurónico a partir de la dermis de un ratón a causa de la regulación en sentido decreciente de las sintasas de ácido hialurónico]. Am J Pathol. 171, 1451-1461).
- 30 - el contenido de ácido hialurónico de la piel humana disminuye en individuos más ancianos (Poulsen y colaboradores 1982: Determination of hyaluronic acid, dermatan sulphate, heparan sulphate and chondroitin 4/6 sulphate in human dermis, and a material of reference [Determinación de ácido hialurónico, sulfato de dermatano, sulfato de heparano y sulfato de condroitina 4/6 en una dermis humana, y un material de referencia]. Scand J Clin Lab Invest. 42, 545-549).
- 35 - la degeneración de elastina es un prominente marcador histológico del envejecimiento cronológico de la piel (Mestre-Deharo y colaboradores 1991: Histologic signs of cutaneous aging [Signos histológicos de envejecimiento cutáneo]. Rev Fr Gynecol Obstet. 86, 425-432).
- 40 - los queratinocitos sintetizan fibrilina-2 y ensamblan microfibrillas convertidas en espuma concurrentemente con ua expresión de colágenos de la membrana de basamento. Estas observaciones sugieren que los queratinocitos coordinan el ensamble de estos distintos elementos estructurales y tienen importantes implicaciones para la remodelación de la piel (Haynes y colaboradores 1997: Keratinocytes express fibrillin and assemble microfibrils: implications for dermal matrix organization [Los queratinocitos expresan fibrilina y ensamblan a microfibrillas: implicaciones para la organización de la matriz dérmica]. Br J Dermatol. 137,17-23).
- 45 - una tinciones inmunológicas revelaron que la decorina es disminuida grandemente dentro de una zona dérmica fotodañada (Bernstein y colaboradores 1995: Differential expression of the versican and decorin genes in photoaged and sunprotected skin. Comparison by immunohistochemical and northern analyses [La expresión diferencial de los genes de versicano y decorina en una piel fotoenvejecida y protegida contra el sol. Una comparación por análisis inmunohistoquímicos y Northern]. Lab Invest. 72: 662-669).
- 50 - una comparación entre la piel de un conjunto de voluntarios más ancianos y de otro de voluntarios más jóvenes (Sauermaann y colaboradores 2002: Age related changes of human skin investigated with histometric measurement by confocal laser scanning microscopy in vivo [Los cambios relacionados con la edad de una piel humana investigada con medición histométrica por microscopía de barrido de láser confocal in vivo]. Skin Res Technol 8, 52-56) demuestra que el espesor epidérmico aumenta en tejidos cutáneos de individuos más ancianos, mientras que el espesor de la capa basal disminuye de una manera importante en este conjunto. Por lo tanto, parece que es razonable desarrollar unas composiciones cosméticas que sean capaces de detener o decelerar estos cambios del espesor relacionados con la edad.
- 55 - Tal como se describe en el presente contexto, una concentración aumentada de proteínas relacionadas con el GDF-5 en tejidos de piel humana es muy útil para generar los efectos deseados. Unos animales transgénicos con una sobreexpresión dérmica de GDF-5 tienen una membrana de basamento que es un 30 % más gruesa que con animales de tipo salvaje. El espesor epidérmico es reducido de manera importante (1-2 capas en comparación con 3-4 capas en el tipo salvaje).
- 60 -
- 65 -

Los resultados divulgados en esta solicitud de patente demuestran que la proteína de GDF-5 y/u otras proteínas estrechamente relacionadas son desde luego unas efectivas moduladoras de la composición de la ECM. Las concentraciones de sustancias tales como colágeno del tipo I, colágeno del tipo III, colágeno del tipo IV, colágeno del tipo VII, fibrilina-2, ácido hialurónico, elastina y decorina, se pueden alterar y aumentar de manera importante por aplicación de los métodos y de las composiciones que aquí se describen.

Las modificaciones estructurales descritas de la matriz extracelular pueden ser evocadas por proteínas que se presentan en la naturaleza o están diseñadas artificialmente, que están relacionadas muy estrechamente con el factor de crecimiento/diferenciación 5 humano (hGDF-5). El término "proteínas relacionadas con el GDF-5" incluye a unas proteínas funcionalmente similares que pertenecen al conjunto de las proteínas GDF-5, GDF-6 y GDF-7 de vertebrados así como de variantes recombinantes de las mismas. Debido a un grado extraordinariamente alto de identidad entre secuencias de aminoácidos (véase la FIG. 2), este conjunto de proteínas exhibe unas propiedades biológicas comparables. Una característica común de todas las proteínas relacionadas con el GDF-5 es la aparición de un dominio de nudo de cistina bioactivo con una identidad de aminoácidos de por lo menos un 60 % con el dominio de nudo de cistina de 102 aa del GDF-5 humano/SEQ ID NO: 1, que es suficiente para la función biológica de la proteína. Tal como puede observarse a partir de la FIG. 3, el valor limitador preferido de 60 % separa a miembros del conjunto de GDF-5/-6/-7 con respecto de los GDF's y BMP's relacionados más distantemente. Unas proteínas especialmente preferidas presentan unas identidades de aminoácidos de por lo menos 70 %, 80 % o 90 % con el dominio de nudo de cistina de 102 aa del GDF-5 humano.

Unos ejemplos no limitadores para proteínas relacionadas con el GDF-5 de vertebrados y mamíferos son proteínas precursoras y proteínas maduras del GDF-5 humano (divulgado como MP52 en el documento WO95/04819 y como GDF-5 humano en la cita de Hötten y colaboradores 1994, Biochem. Biophys Res. Commun. 204, 646-652), GDF-5/MP52 recombinante humano (rh) documento (WO96/33215), Arg de MP52 (documento WO97/06254); MP52's humanos de HMW (WO97/04095), CDMP-1 (documento WO96/14335), GDF-5 de ratón (*Mus musculus*) (documento de patente de los EE.UU. US 5.801.014), GDF-5 de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Sanyal y colaboradores 2000, Mol Biotechnol. 16, 203-210), GDF-5 de pollo (*Gallus gallus*) (nº de acceso al NCBI NP_989669), GDF-5 de rana africana de uñas (*Xenopus laevis*) (nº de acceso al NCBI AAT99303), GDF-5 monomérico (documentos WO 01/11041 y WO 99/61611), GDF-6/BMP-13 humanos (documento US 5.658.882), GDF-6 de ratón (nº de acceso al NCBI NP_038554), GDF-6/CDMP-2 (documento WO96/14335), GDF-7/BMP-12 humanos (documento US 5.658.882), GDF-7 de ratón (nº de acceso al NCBI AAP97721), GDF-7/CDMP-3 (documento WO96/143335). Están cubiertas por el invento también unas proteínas relacionadas con el GDF-5 que tienen mutaciones adicionales tales como sustituciones, adiciones y deleciones, siempre y cuando que éstas mutaciones adicionales no supriman completamente la actividad biológica de las proteínas. Algunas variantes preferidas son unas mutantes de las proteínas relacionadas con el GDF-5 que tienen una actividad biológica mejorada. Por ejemplo, uno o más residuos que normalmente están presentes en la proteína precursora del GDF-5 humano (véase la FIG. 1) están sustituidos en estas mutantes por otros aminoácidos: la arginina en la posición 438 de la proteína precursora del GDF-5 humano es reemplazada por glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina o asparagina; y/o la serina 439 es reemplazada por ácido aspártico, ácido glutámico, glicina o isoleucina; y/o la asparagina 445 es reemplazada por serina o treonina. En otra mutante de alta actividad, la metionina 453 y/o la metionina 456 son reemplazadas por alanina, valina o isoleucina. También tienen un interés especial las mutantes en las que la leucina 441 es reemplazada por prolina.

Las actividades biológicas de las proteínas relacionadas con el GDF-5 se pueden determinar fácilmente con la ayuda de sistemas de ensayos consagrados. Es sumamente útil y preferido un ensayo *in vitro* común conocido como el ensayo de la fosfatasa alcalina (ALP) (Takuwa y colaboradores 1989, Am. J. Physiol. 257, E797-E803), que se describe también en el Ejemplo 3. Se ha demostrado que las proteínas relacionadas con el GDF-5 aumentan la actividad de fosfatasa alcalina, por ejemplo en células ROB-C26 (Yamaguchi y colaboradores 1991, Calcif. Tissue Int. 49, 221-225) tal como se describe en el documento WO95104819, en células ATDC5 embrionarias (Banco de Genes de Riken, ROB 0565), en células estromales de ratón MCHT-1/26, y en células HPDL tal como se muestra en la cita de Nakamura y colaboradores 2003, J. Periodontal Res. 38,597-605.

Para los presentes métodos y usos cosméticos, las proteínas relacionadas con el GDF-5 pueden ser aplicadas en ambos tipos de composiciones cosméticas. La mayor parte de los procesos de administración requieren unas composiciones que tengan un valor casi fisiológico del pH. Desafortunadamente, el GDF-5 y las proteínas GDF-6 y GDF-7 estrechamente relacionadas presentan como característica un patrón no corriente de distribución de cargas en la superficie, que está asociado con una mala solubilidad a unos valores del pH situados entre pH 4 y pH 9. Aunque las proteínas relacionadas con el GDF-5 se pueden administrar por medio de soluciones acuosas que tienen un pH situado alrededor de o por debajo de 4, la vía más eficiente de solventar el problema de la solubilidad es la adhesión a un vehículo de fármaco coloidal específico con un tamaño de partículas muy pequeño. La interacción entre el factor de crecimiento y el vehículo microtexturado seleccionado impide eficientemente la coagulación deseada de la proteína a un pH ligeramente ácido/básico e incluso a un pH neutro.

En principio, se pueden utilizar para composiciones cosméticas diversos vehículos coloidales conocidos en la especialidad. Unos vehículos apropiados se describen extensamente en la bibliografía (véase p.ej. Barrat y

colaboradores 2003: Colloidal drug carriers: achievements and perspectives [Vehículos de fármacos coloidales: logros y perspectivas]. Cell. mol. life sci. 60, 21-37). Sin embargo, a causa de la distribución anómala de cargas en la superficie del GDF-5, es aconsejable ensayar y seleccionar un material de vehículo coloidal que esté optimizado para la familia de GDF-5/GDF-6/GDF-7 de factores de crecimiento. Entre varios otros, unos vehículos coloidales presentemente usados son p.ej. liposomas, micelas mixtas, microemulsiones, micropartículas de lípidos (LMP) y nanopartículas poliméricas que seguidamente se caracterizan brevemente:

Los liposomas son unas estructuras muy simples que se componen de una o más bicapas lipídicas de lípidos anfífilos, por ejemplo fosfolípidos o colesterol. Los restos lipófilos de las bicapas son vueltos unos hacia otros y crean un entorno hidrófobo interno en la membrana. El tamaño de los liposomas varía desde 20 nm hasta unos pocos μm .

Las micelas mixtas son unas estructuras detergentes que se componen de sales biliares, fosfolípidos, tri-, di- y monoglicéridos, ácidos grasos, colesterol libre y micronutrientes solubles en grasas. Puesto que se conoce que los fosfolípidos de cadena larga forman bicapas cuando se dispersan en agua, la fase preferida de compuestos análogos de cadena corta es la fase micelar esférica. La interacción entre micelas y fármacos hidrófobos/lipófilos conduce a la formación de micelas mixtas (MM). En el cuerpo humano, ellas incorporan a compuestos hidrófobos con baja solubilidad en agua.

Las microemulsiones son unas mezclas líquidas isotrópicas estables y transparentes de un aceite, agua y un agente tensioactivo, frecuentemente en combinación con un agente tensioactivo concomitante. La fase acuosa puede contener sal(es) y/u otros ingredientes y el "aceite" puede ser realmente una compleja mezcla de diferentes hidrocarburos y olefinas. En contraste con las emulsiones ordinarias, las microemulsiones se forman al efectuar una simple mezcladura de los componentes y no requieren las condiciones de alta cizalladura que generalmente se usan para la formación de emulsiones ordinarias. Los dos tipos básicos de microemulsiones son el directo (aceite dispersado en agua, o/w) y el inverso (agua dispersada en un aceite, w/o).

Las micropartículas de lípidos pueden ser divididas en nanoesferas y microesferas de lípidos. Las microesferas son definidas generalmente como unas pequeñas partículas esféricas hechas de cualquier material, que tienen un tamaño de aproximadamente 0,2 a 100 μm . Unas esferas más pequeñas con un tamaño situado por debajo de 200 nm se denominan usualmente nanoesferas. Las microesferas de lípidos son unas microemulsiones homogéneas del tipo de aceite/agua similares a las emulsiones de grasas comercialmente disponibles. Ellas se producen por un proceso intensivo de sonicación (tratamiento con ultrasonidos) o por métodos de emulsionamiento a alta presión (métodos de trituración). Unas simples microesferas de lípidos consistentes en gotas microscópicas de aceites en una dispersión acuosa fueron investigadas en primer lugar para la nutrición por vía parenteral (Shenking A. World Rev. Nutr. Diet. 28, 1-111, 1978). También se han desarrollado unos sistemas basados en emulsiones acuosas de aceite de soja y una envoltura externa de lecitina (fosfatidilcolina) (Mizushima Y. Drugs Exptl. Res. XI (9), 595-600, 1985). La lecitina tensioactiva natural disminuye la tensión superficial del líquido, actuando de esta manera como agente emulsionante (Seki y colaboradores, J. Controlled Release 28, 352-353).

Las nanopartículas poliméricas sirven como vehículos para una amplia variedad de ingredientes. Los componentes activos pueden ser o bien disueltos en la matriz polimérica o atrapados o adsorbidos sobre las superficies de las partículas. Unos polímeros apropiados para la producción de nanopartículas orgánicas incluyen derivados de celulosas y poliésteres tales como un poli(ácido láctico), un poli(ácido glicólico) y sus copolímeros.

La creación y el ensayo de estos y otros vehículos de fármacos coloidales son un asunto rutinario que se puede hacer sin indebido gravamen. Sin embargo, los autores del invento han creado y comprobado ilustrativamente varios vehículos de fármacos coloidales en combinación con el GDF-5 (véanse los Ejemplos 4 y 5). De acuerdo con los ensayos, unas nanopartículas poliméricas (por ejemplo p.ej. la poli-(DL)-lactida PLA resomer® R202H, de Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania) son capaces de incorporar unas escalas medianas de proteínas relacionadas con el GDF-5 (hasta de 66 g/mg). Puesto que los cosméticos contienen usualmente unas cantidades de ingredientes activos más bajas que los agentes farmacéuticos, se consideró que las nanopartículas de esta clase eran unos vehículos apropiados para composiciones poliméricas. También unas microemulsiones del tipo de aceite en agua, que comprenden proteínas relacionadas con el GDF-5, glicerol y agentes emulsionantes, han sido creadas y ensayadas satisfactoriamente (véase el Ejemplo 4). Además, se diseñaron específicamente algunas formulaciones de micropartículas de lípidos (LMP's). De acuerdo con los resultados de los ensayos, las LMP's pueden transportar altas cantidades (hasta de 2,5 mg/ml) de GDF-5 a un pH fisiológico (pH 7). Por lo tanto, las micropartículas de lípidos son unos apropiados vehículos de proteínas relacionadas con el GDF-5.

Están disponibles numerosos lípidos y aceites naturales y sintéticos que se pueden usar como vehículos de lípidos en formulaciones coloidales tales como una formulación de LMP. Los lípidos y aceites sintéticos son recomendables debido a su pureza y sus propiedades químicas conocidas. Se pueden usar todas las clases de aceites/lípidos sintéticos, siempre y cuando que ellos sean biocompatibles, por ejemplo aceites o ésteres saturados sintéticos tales como palmitato de etilo, palmitato de isopropilo, miristatos de alquilo, tales como los de isopropilo, butilo y cetilo, estearato de hexilo, triglicéridos (p.ej. de los ácidos octanoicos o decanoicos, triglicéridos de cadena mediana tales como Miglyol® 812), ricinoleato de cetilo, octanoato de estearilo (aceite de purcelina) y un polisobuteno hidrogenado. Debido a su biocompatibilidad bien conocida y a otras características, son apropiados especialmente en la mayor parte de los casos unos aceites vegetales corrientes tales como p.ej. los aceites de semillas de algodón, de soja, de sésamo, de girasol, de alazor, de oliva, de aguacate, de cacahuete, de nuez, de almendra y de avellana. Los aceites más preferidos son aceite de oliva, aceite de soja y aceite de alazor, que han sido ensayados de una manera satisfactoria. Se pueden emplear similarmente otros aceites naturales.

Por lo demás, la formulación puede comprender un agente emulsionante. Se prefieren unos fosfolípidos tales como p.ej. fosfatidilserina, fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina, preferiblemente en un porcentaje total similar (± 25 por ciento p/p, p/v o v/v) [p = peso, v = volumen] como el vehículo de lípidos. Un agente emulsionante comercialmente disponible y ensayado satisfactoriamente es el Phospholipon®, una fracción de fosfolípidos de soja que comprende por lo menos un 80 % de fosfatidilcolina. Son posibles también otros agentes emulsionantes, p.ej. monoglicéridos destilados, mono- y diglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, ésteres orgánicos de monoglicéridos, ésteres de sorbitán de ácidos grasos, ésteres de propilen glicol de ácidos grasos, y ésteres de poliglicerol de ácidos grasos.

La concentración óptima del aceite y/o del agente emulsionante contribuye a la generación efectiva de micropartículas bioactivas de lípidos que contienen GDF-5. A título ilustrativo, los conjuntos de formulaciones de LMP de GDF-5 que contienen unas concentraciones bajas (de 5-15 mg/ml), intermedias (16-30 mg/ml) y altas (31-50 mg/ml) así como hasta de 100 mg/ml de un aceite y cantidades idénticas del agente emulsionante fosfatidilserina en un tampón de succinato se ensayaron en el sistema de ensayo ALP. Todas las formulaciones probaron ser bioactivas. Sin embargo, la actividad tenía un máximo en el conjunto intermedio (véase la FIG. 21). De acuerdo con estos resultados, las formulaciones de LMP pueden comprender unas concentraciones de un aceite y/o de agentes emulsionantes situadas en el intervalo comprendido entre 5 y 100 mg/ml. Las formulaciones de LMP preferidas para usarse de acuerdo con el invento comprenden unas concentraciones de un aceite y/o de agentes emulsionantes comprendidas entre 16 y 30 mg/ml. Se prefieren sumamente unas concentraciones comprendidas entre 20 y 25 mg/ml.

Las concentraciones de proteínas relacionadas con el GDF-5 en las composiciones destinadas a usarse de acuerdo con el invento deberán escogerse en dependencia del modo y del período de aplicación. Básicamente, las proteínas relacionadas con el GDF-5 son unas citocinas sumamente potentes que son capaces de producir efectos incluso en unas cantidades exiguas. Como se puede determinar fácilmente con la ayuda de diferentes sistemas de ensayos biológicos tales como p.ej. el ensayo de la fosfatasa alcalina que aquí se ha descrito, una concentración de 0,1 pg de GDF-5 por ml de la respectiva solución es suficiente para provocar acciones biológicas (véase la determinación de las dosis de acuerdo con la FIG. 20). Correspondientemente, se prefieren unas concentraciones bajas, que varían p.ej. desde 0,1 pg/ml hasta 1 ng/ml o menos, si las composiciones cosméticas del invento se administran repetidamente, por ejemplo en términos de cremas para la piel o la belleza aplicadas diariamente. Sin embargo, los máximos efectos se pueden conseguir con unas más altas concentraciones del factor de crecimiento. En el sistema de ensayo mostrado en la FIG. 20, son sumamente efectivos 1 - 100 ng/ml de GDF-5. Unos análisis de respuesta a la dosis independiente de la acción de GDF-5 utilizando una amplia gama de diluciones en serie (0,3 - 80 ng/ml, Farkas y colaboradores 1997, Neurosci. Lett. 236, 120-122) dieron unos resultados óptimos en una concentración de 20 ng de GDF-5 por ml. Unos modelos *in vivo* de piel (véanse p.ej. el Ejemplo 2/la Fig. 16), usan corrientemente unas altas dosis de 1 - 10 μ g/ml. Por lo tanto, en una forma preferida de realización del invento, las composiciones cosméticas contienen proteínas relacionadas con el GDF-5 en unas concentraciones comprendidas entre 0,1 pg/ml y 10 μ g/ml. Unas dosis totales preferidas de proteínas relacionadas con el GDF-5 en el caso de administraciones en una sola vez (p.ej. inyecciones) varían desde 10 ng hasta 10 μ g.

A causa de su pequeño tamaño y su buena biocompatibilidad, las composiciones se pueden administrar generalmente por una diversidad de rutas que son bien conocidas en la especialidad. Las composiciones cosméticas se pueden aplicar preferiblemente por vía tópica, subcutánea o transdérmica.

Las composiciones pueden comprender también otra(s) proteína(s) bioactiva(s) además de las proteínas relacionadas con el GDF-5. Se ha demostrado que un TGF- β aumenta el tamaño de una dermis regenerada y estabiliza a la unión dermoepitelial (Fitzpatrick y Rosen, J. Cosmet. Laser Ther, 5: 25-34 (2003)). Un cóctel (TNS Recovery Complex, de SkinMedica, Inc. Carlsbad, CA, EE.UU.) que contiene siete citocinas (VEGF, IL-6 y -8, HGF, PDGF- α , GCSF, y TGF- β 1) derivadas de fibroblastos de prepucio neonatal se ensayó en un estudio de centros múltiples. Una evaluación demostró una mejoría en la textura de la piel, y un arrugamiento disminuido (Rokhsar, C.K. y colaboradores., Dermatol. Surg. 31: 1166-1178 (2005)). El factor de crecimiento epidérmico recombinante (ReVive Skincare); y el factor de crecimiento de plantas N-furfuril-adenina (cinetina) se encuentran también en el mercado. Todas estas proteínas se pueden usar conjuntamente con las proteínas relacionadas con el GDF-5. Otras proteínas que actúan sinérgicamente si se combinan con proteínas relacionadas con el GDF-5, se divulgan en la bibliografía y en patentes, por ejemplo p.ej. en el documento WO 99/15191. Se prefieren las neurotrofinas, las proteínas de erizo y las proteínas de la familia de factores de crecimiento transformadores, incluyendo pero sin limitarse a los TGF-alfas, los TGF-betas, las activinas, los BMP's y los GDF's. Se prefiere especialmente una combinación con cualquiera de los EGF, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, NGF y/o GDNF.

Otros componentes aceptables en las composiciones son:

- retinoides (derivados de la (vitamina A) que preservan la integridad de las superficies mucosales/epiteliales;
- hidroxí ácidos (ácidos carboxílicos orgánicos clasificados además en hidroxí ácidos alfa (AHA) y hidroxí ácidos beta (BHA)) que aumentan la muda epidérmica, p.ej. ácido glicólico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido mandélico, ácido málico y ácido tartárico;

- antioxidantes que contrarrestan los efectos perjudiciales de los radicales libres, p.ej. vitamina C, vitamina E, pantenol, ácido lipoico, ubiquinona, niacinamida, dimetilaminoetanol, trampas de espín, melatonina, catalasa, glutatión, superóxido dismutasa, peroxidasa, glucopiranosidos, polifenoles, cisteína, alantoína, furfúril-adenina, ácido úrico y carnosina;
- 5 - agentes despigmentadores que alivian una hiperpigmentación, p.ej. N-acetil-4-S-cisteinilfenol, ácido kójico, arbutina, ácido azaleico, una composición de mora de papel, agentes de exfoliación química (resorcinol, ácido salicílico), la fórmula de Kligman, la fórmula de Pathak y la fórmula de Westerhof;
- productos botánicos, p.ej. camomila, ginseng, Gingko biloba, curcumina, glicirricina, capsaicina y aloe vera;
- glicosaminoglicanos que apoyan a una regeneración epidérmica, p.ej. el ácido hialurónico;
- 10 - agentes anticelulíticos que median en una lipólisis, p.ej. agentes estimuladores beta-adrenérgicos tales como teobromina, teofilina, aminofilina, cafeína, epinefrina y estimuladores adrenérgicos alfa 1 tales como yohimbina, piperoxano y fentolamina;
- enzimas tales como papaína y enzimas de reparación del ADN;
- hormonas, p.ej. estrógenos, progesterona, testosterona, y una hormona del crecimiento;
- 15 - agentes antimicrobianos, p.ej. triclosán, clorhexidina, povidona yodada, peróxido de hidrógeno, preparaciones contra la caspa y zinc piritiona;
- filtros químicos de rayos UV, p.ej. 3-benciliden alcanfor (3-BC) o 4-metil-benciliden alcanfor (4-MBC);
- por lo demás, tampones, agentes estabilizadores, agentes conservantes, agentes reductores, agentes quelantes antioxidantes, agentes que modifican la isotonicidad, desodorantes, anestésicos, adyuvantes y aditivos
- 20 acrecentadores de la solubilidad.

Estos son solamente unos ejemplos no limitadores de posibles aditivos, y un profesional experto en la especialidad puede añadir con facilidad otros excipientes que se encuentran en uso en preparaciones cosméticas o que son considerados generalmente como seguros.

- Se prefiere además que unas composiciones cosméticas que comprenden proteínas relacionadas con el GDF-5 se administren en formas típicas para productos dérmicos. Unas formulaciones consagradas y normalizadas que son bien conocidas en la especialidad, incluyen p.ej. formulaciones de micropartículas de lípidos, microemulsiones de los tipos de agua en aceite y de aceite en agua, lociones, geles, cremas, ungüentos, formulaciones de proyección de aerosoles, lápices de labios, emplastos, paquetes faciales, agentes para el baño, agentes de limpieza facial, detergentes para el baño, jabones para el baño, cremas solares, lociones solares, lociones autobronceadoras,
- 25 lociones para después de una exposición al sol, emulsiones del tipo de aceite en agua, emulsiones del tipo de agua en aceite, emulsiones w/o/w, emulsiones del tipo o/w/o y lociones lechosas.
- 30

- Las composiciones se pueden preparar bajo N₂ (gaseoso) usando unos tampones en los que se burbujea con N₂ (gaseoso) para eliminar el oxígeno disuelto, o por uso de un vacío para eliminar gases disueltos y para proteger a los componentes de lípidos y a la proteína relacionada con el GDF-5 con respecto de una oxidación.
- 35 Alternativamente, se pueden usar otros gases inertes tales como argón.

- Tal como se demuestra en el Ejemplo 1 conjuntamente con las FIG. 4 - 15, otro método efectivo para llevar a cabo el invento consiste en usar un enfoque transgénico. Puesto que las estrategias de terapia génica requieren la transferencia de un material genético a células diana, un asunto adicional del presente invento es el uso de un ácido nucleico que codifica una proteína relacionada con el GDF-5 dentro del contexto del presente invento. El ácido nucleico puede ser una secuencia de ADN y/o una secuencia de ARN, siempre y cuando que una proteína relacionada con el GDF-5, como aquí se define, sea obtenible a partir de este ácido nucleico al realizar una expresión. Unos tripletes de bases que codifican aminoácidos y la degeneración del código genético se conocen generalmente. En el presente Ejemplo 1, se realizó un experimento transgénico de acuerdo con una estrategia originalmente publicada por Greenhalgh y colaboradores (Oncogene 8 (1993), 2145-2157) y Sellheyer y colaboradores (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90 (1993), 5237-5241). En el Ejemplo descrito se usa un promotor específico para la piel (promotor 1 de queratina humana). Aunque es preferido el uso de promotores específicos para la piel, se pueden emplear similarmente otros promotores. Como una cosa natural, se pueden utilizar también otras estrategias de transferencia de genes y otros vectores que se conocen en la técnica. Muchos de estos vectores de transferencia de genes están basados en unos virus de ARN y ADN modificados (que se derivan a partir de retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus, poxvirus y otros) y han sido seleccionados como vehículos de suministro de genes a causa de su aptitud para suministrar eficientemente genes ajenos asociados con una eficiente expresión de genes. Unos vectores víricos se emplean en más de un 70 % de las pruebas de terapias génicas clínicas por todo el mundo. Unas estrategias de ingeniería genética basadas en virus, actuales y emergentes, para el suministro de moléculas terapéuticas se debaten en la cita de Mancheno-Corvo y colaboradores 2006: Viral gene therapy [Terapia génica con virus]. Clin Transl Oncol. 8, 858-67. Sin embargo, también se pueden usar vectores no víricos y técnicas de transferencia, p.ej. vehículos catiónicos (véase Pietersz y colaboradores 2006: Structure and design of polycationic carriers for gene delivery [Estructura y diseño de vehículos policatiónicos para el suministro de genes]. Mini Rev Med Chem. 6, 1285-1298), electroporación o liposomas (Miyazaki y colaboradores 2006: Gene transfer using nonviral delivery systems [Transferencia de genes usando sistemas de suministro no víricos]. Perit Dial Int. 26, 633-640).
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Los siguientes Ejemplos no limitadores, conjuntamente con las figuras y los protocolos de secuencias están destinados a ilustrar adicionalmente el invento.

La SEQ ID NO:1 muestra la secuencia de proteínas de la precursora de GDF-5 humana.

La SEQ ID NO:2 muestra la secuencia de ADN de la precursora de GDF-5 humana.

- 5 La SEQ ID NO:3 muestra la secuencia de proteínas de 120 aa de un GDF-5 humano maduro. Si se produce por vía recombinante, la proteína puede consistir alternativamente en 119 aa, comenzando de esta manera con el segundo aa (prolina) de la SEQ ID NO:3.

10 La SEQ ID NO:4 muestra la secuencia de proteínas de 120 aa de un GDF-5 monomérico humano maduro. La proteína puede consistir alternativamente en 119 aa comenzando de esta manera con el segundo aa (prolina) de la SEQ ID NO:4.

FIGURAS

La FIG. 1 muestra particularidades adicionales de la proteína precursora de GDF-5 humana de acuerdo con la SEQ ID NO:1:

- 15 pre-prodominio de aa 001-381 (letras negritas)
péptido de señal de aa 001-027 (en negrita y subrayado)
parte de proteína madura de aa 382-501
dominio de nudo de cistina de aa 400-501 (subrayado).

20 La FIG. 2 muestra una comparación del dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humano (SEQ ID NO:1), del GDF-6 humano (secuencia 2 procedente del documento de patente US 5.658.882) y del GDF-7 humano (secuencia 26 procedente del documento de patente US 5.658.882). Los residuos de aminoácidos que son idénticos en la totalidad de las tres moléculas se resaltan en negro.

La FIG. 3 muestra una tabla con las identidades de secuencias de dominios de nudos de cistina de varios BMP's y GDF's conocidos con el dominio de nudo de cistina del GDF-5 humano.

25 La FIG. 4 es un diagrama esquemático de la construcción artificial genética básica del Ejemplo 1 que se compone de una casete de promotor 1 de queratina humana de 7 kb, que contiene un cuadro de lectura abierto de GDF-5 humano (hMP52).

La FIG. 5 es un mapa del vector transgénico pHK1-MP52 de acuerdo con el Ejemplo 1.

30 La FIG. 6 muestra unas imágenes de inmunofluorescencia representativas que reproducen visualmente la cantidad y la distribución del colágeno del tipo I en la ECM de ratones de tipo salvaje y que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras a partir de la piel dorsal de ratones con una edad de 6 meses. El colágeno I está empaquetado más densamente en la matriz extracelular de animales transgénicos. Una evaluación semi-cuantitativa de la intensidad de tinción apoya a un aumento global importante (aprox. 10 - 20 %) de la deposición de colágeno I.

35 La FIG. 7 muestra imágenes de inmunofluorescencia representativas que reproducen visualmente la cantidad y la distribución del colágeno del tipo III en la ECM de ratones de tipo salvaje y que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras a partir de la piel dorsal de ratones con una edad de 5 meses. El colágeno III está empaquetado más densamente en la matriz extracelular de animales transgénicos. Una evaluación semi-cuantitativa de la intensidad de tinción apoya a un aumento global importante (aprox. 8 - 15 %) de la deposición de colágeno I.

40 La FIG.8 muestra imágenes de inmunofluorescencia representativas que reproducen visualmente la cantidad y la distribución de elastina en la ECM de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. Se deposita significativamente más cantidad de elastina en tejidos cutáneos de animales transgénicos.

45 La FIG. 9 muestra imágenes de inmunofluorescencia representativas que reproducen visualmente la cantidad y la distribución de decorina en la ECM de ratones de tipo salvaje y que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1. La decorina es un elemento estructural asociado con el colágeno de la matriz extracelular. Se tomaron muestras a partir de la piel ventral de ratones con una edad de 11 meses. La evaluación de la intensidad de tinción indica que está presente una cantidad considerablemente más alta de decorina en la piel de animales transgénicos.

La FIG.10 muestra imágenes de inmunofluorescencia representativa que reproducen visualmente la cantidad de colágeno del tipo IV en las membranas de basamento de ratones de tipo salvaje y que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. Los resultados demuestran un espesamiento notable de las membranas de basamento en muestras de piel de animales transgénicos. La deposición del colágeno IV es manifiestamente aumentada en membranas de basamento de ratones transgénicos.

La FIG. 11 muestra unas imágenes de inmunofluorescencia representativas que reproducen visualmente la cantidad de colágeno del tipo VII en las membranas de basamento de ratones de tipo salvaje y que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. La piel de animales transgénicos comprende unas membranas de basamento más gruesas con unas concentraciones elevadas del colágeno VII.

La FIG. 12 muestra unas imágenes de inmunofluorescencia representativas que reproducen visualmente la cantidad y la distribución de fibrilina-2 en muestras de piel de ratones de tipo salvaje y que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. La fibrilina-2 está situada predominantemente en membranas de basamento y también es un componente de la ECM. Las membranas de animales transgénicos están caracterizadas por unas concentraciones importantemente más altas de fibrilina-2, especialmente en las membranas de basamento.

La FIG. 13 muestra imágenes de inmunofluorescencia representativas que reproducen visualmente la cantidad de loricrina en muestras de piel de ratones de tipo salvaje y que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. La loricrina es un importante marcador de la diferenciación epidérmica tardía. Tal como se indica por una señal de fluorescencia más fuerte en la epidermis de animales transgénicos, el GDF-5 actúa manifiestamente como un factor de diferenciación en tejidos dérmicos con profundos efectos sobre proteínas estructurales y otros componentes de células.

La FIG.14 muestra imágenes de microscopía electrónica representativas que documentan los cambios de espesor dérmico inducidos por el GDF-5 en ratones transgénicos de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. Mientras que están presentes de tres a cuatro capas de células epidérmicas en animales de tipo salvaje, las muestras dérmicas de ratones que sobreexpresan el GDF-5 comprenden solamente 1-2 capas epidérmicas.

La FIG. 15 reproduce visualmente imágenes de microscopía electrónica representativas que muestran el espesamiento inducido por el GDF-5 de membranas de basamento en muestras de piel de animales transgénicos de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. Los resultados indican que las membranas de basamento de ratones que sobreexpresan el GDF-5 (con "lamina lucida" [ll] y "lamina densa" [ld]) son más gruesas en aproximadamente un 30 % que en animales del tipo salvaje.

La FIG. 16 muestra imágenes de inmunofluorescencia representativas que documentan el aumento inducido por el GDF-5 de manera dependiente de la dosis del colágeno del tipo IV en la piel de ratones de acuerdo con el Ejemplo 2. La imagen izquierda superior muestra un ratón con un GDF-5 trasplantado que contiene un vehículo de gel (cubierto con un sombrero de silicona) de acuerdo con el Ejemplo 2. Se observaron importantes alteraciones epiteliales dependientes de la dosis a las tres semanas después de la administración de 1 ó 10 µg de GDF-5. Una neovascularización así como una formación acrecentada de diversos componentes celulares estructurales (p.ej. imagen: colágeno IV) se reprodujeron visualmente mediante técnicas clásicas de inmunofluorescencia.

La FIG. 17 muestra el esquema de síntesis general de nanopartículas poliméricas (por el método de la doble emulsión) que se describe en el Ejemplo 4.

La FIG. 18 muestra una imagen tomada en un microscopio electrónico de reflexión (REM) de nanopartículas poliméricas de Resomer® R202H de acuerdo con el Ejemplo 4.

La FIG. 19 demuestra el efecto de un tratamiento con ultrasonidos que es obligatorio en la producción de composiciones de micropartículas de lípidos (LMP) de acuerdo con el Ejemplo 4. Unas muestras (imagen superior) que contenían 22,93 µl de aceite de oliva (21,1 mg), un peso igual de fosfatidilserina y 956 µl de un tampón de succinato 50 mM (pH 4,25) fueron tratadas con ultrasonidos durante 1 hora. Después del tratamiento con ultrasonidos, la emulsión previamente lechosa (imagen superior) se volvió transparente con un color ámbar cuando se mantuvo frente a la luz (imagen inferior), indicando que las esferas de la emulsión se estaban volviendo más pequeñas y alcanzaron el diámetro esperado de aproximadamente 50 nm.

La FIG. 20 muestra los resultados de un estudio de determinación de la dosis *in vitro* de GDF-5 (promoción de la supervivencia celular). El GDF-5 es efectivo a lo largo de todo el intervalo de concentraciones ensayadas (de 0,1 pg/ml a 100 ng/ml).

La FIG. 21 muestra una comparación de las actividades biológicas de tres conjuntos de formulaciones de micropartículas de lípidos de GDF-5 que comprenden diferentes concentraciones de fosfatidilserina y de aceite de oliva (bajo/ conjunto 1: 5-15 mg/ml, representado en la Figura 3 por 8,44 mg/ml, intermedio/ conjunto 2: 16-30 mg/ml, representado por 21,1 mg/ml, alto/ conjunto 3: 31-50 mg/ml; representado por 42,2 mg/ml). Los conjuntos fueron ensayados en el sistema de ensayo de ALP de acuerdo con el Ejemplo 3. OD = densidad óptica.

La FIG. 22 muestra los resultados de la separación por tamaños de proteínas por medio de un SDS-PAGE de acuerdo con el Ejemplo 5. Unos gránulos de LMP con el GDF-5 encapsulado fueron calentados durante 10 min a 80 °C para solubilizar a los lípidos. Solamente son visibles muy pocos productos de degradación, demostrando de esta manera la estabilidad de la proteína GDF-5. Las pistas desde la izquierda a la derecha son: 1: proteína marcadora, 3-5: patrón de referencia de GDF-5 5 µg, 0,25 µg y 0,025 µg, 7-9: muestras de LMP de GDF-5 (5 µg cada una).

La FIG. 23 muestra un esquema general de una célula (celda) de penetración para la averiguación de la absorción dérmica y la penetración percutánea de composiciones cosméticas de acuerdo con el Ejemplo 5.

La FIG. 24 demuestra la estructura y la organización generales de una piel humana.

La FIG. 25 muestra imágenes de inmunofluorescencia representativas que documentan el elevado contenido de ácido hialurónico (mancha roja, p.ej. flecha) como una sustancia que fija agua en la matriz extracelular de animales que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. En comparación con ratones del tipo salvaje, una evaluación cuantitativa de la intensidad de tinción indica una concentración importantemente más alta (aprox. 20 - 30 %) de ácido hialurónico en la piel de ratones transgénicos, aumentando por lo tanto considerablemente el contenido de humedad de la piel.

La FIG. 26 muestra una tinción con elastina según van Gieson de muestras de piel de animales transgénicos de tipo salvaje y que sobreexpresan el GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 1 (véase p.ej. Garvey, Winsome y colaboradores (1991): (una tinción de Van Gieson Elástica de Verhoff modificada. J. Histotech. 14, (2), 113-114). Se tomaron las muestras de la piel dorsal de ratones con una edad de 11 meses. Están presentes predominantemente unos altos números de fibras elásticas en las muestras transgénicas, que aparecen como varillas de color negro azulado (véanse las flechas).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Alteraciones de la estructura de la piel *in vivo*

Este conjunto de experimentos, que utilizan un modelo *in vivo* de ratón transgénico, se diseñó para determinar si una concentración intracelular aumentada de proteínas relacionadas con el GDF-5 es útil para aumentar el contenido de componentes estructurales cruciales de la ECM tales como p.ej. colágenos, fibrilinas, elastina y decorina. Las concentraciones de estas sustancias de andamio disminuyen durante la vida, por ejemplo como resultado de un envejecimiento, un fotodaño o diversos trastornos.

Siguiendo la estrategia usada por Greenhalgh y colaboradores (Oncogene 8 (1993), 2145-2157) y por Sellheyer y colaboradores (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90 (1993), 5237-5241), se crearon unas construcciones genéticas artificiales para la sobreexpresión de GDF-5 humano (MP52) en el compartimento basal proliferativo de la epidermis. La construcción artificial básica (FIG. 4) se compone de un cuadro de lectura abierto (ORF) de GDF-5 humano (hMP52) que fue colocado de manera dirigida dentro de un casete de promotor de queratina 1 humana (HK1) de 7 kb usando unos sitios de restricción por BamHI y ClaI creados artificialmente. Subsiguientemente, un fragmento EcoRI del promotor HK1 que comprendía el ORF de GDF-5 (hMP52) fue clonado dentro de un vector plasmídico y dio como resultado el vector transgénico pHK1-MP52 (FIG. 5).

Una construcción transgénica artificial HK1-GDF-5 fue amplificada y aislada a partir del plásmido pHK1-MP52 por medio de una digestión con HpaI y AatII. El fragmento de 8,2 kb fue luego purificado, filtrado usando una columna de micro-centrifugación (Ultrafree-MC, de Millipore) y diluido a una concentración de 5 ng/µl en un tampón para microinyección. Unas ratonas hembras con una edad de 3 semanas (raza CB6F1/de Charles River Laboratories) fueron superovuladas y apareadas con ratones C57BL6 machos (de Charles River Laboratories). Los oocitos de CB6F2 fertilizados resultantes fueron recogidos desde el oviducto de ratonas hembras taponadas, y cultivados hasta que fuesen visibles dos pronúcleos claros despejados. La construcción transgénica artificial fue microinyectada dentro de los pronúcleos masculinos y unos embriones inyectados fueron cultivados durante una noche hasta llegar a la etapa de dos células. 263 embriones en la etapa de dos células fueron luego implantados dentro del oviducto de madres en crianza pseudoembarazadas a los 0,5 días después del coito. En total se identificaron tres animales transgénicos desposados. Los resultados de la microinyección de ADN revelaron que 3 de 40 (7,5 %) animales tenían integrado el ADN transgénico, un dato que es compatible con la tasa de éxito estadística de 5-25 % de esta tecnología. Cada uno de los animales transgénicos desposados fueron cruzados con ratones de tipo salvaje

ensayándolos en cuanto a la transmisión del linaje de gérmenes. Entre la generación F1, los ratones transgénicos podrían ser identificados mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los ratones transgénicos muestran un reducido revestimiento con pelos e importantes cambios en la estructura de la piel pero no grandes anomalías del comportamiento (FIG. 6 - 15). Unas secciones criogénicas de piel dorsal o ventral de animales F1 con una edad de 5 y 11 meses se examinaron mediante técnicas clásicas de inmunofluorescencia y de microscopía electrónica.

Unas secciones criogénicas de piel revelaron un fuerte aumento de prominentes componentes de la matriz extracelular tales como colágeno del tipo I (FIG. 6), colágeno del tipo III (FIG. 7), elastina (FIG. 8 y FIG. 26), fibrilina-2 (FIG. 12) y decorina (FIG. 9), un claro y distinto aumento en la concentración de las proteínas de membranas de basamento, colágeno del tipo IV (FIG. 10), colágeno del tipo VII (FIG. 11) y fibrilina-2 (FIG. 12), una intensificación del marcador de diferenciación epidérmica loricrina (FIG. 13), una reducción global del espesor epidérmico (FIG. 14), un reforzamiento considerable de la membrana de basamento (FIG. 15) y un contenido aumentado de ácido hialurónico (FIG. 25).

Ejemplo 2: Ensayo de trasplante de superficies insertadas en matriz *in vivo*

Con el objetivo de estudiar los efectos de la proteína GDF-5 administrada directamente a tejidos dérmicos, se usó un ensayo de trasplante de superficies insertadas en matriz. Dicho brevemente, unos soportes de gel fueron cargados con diferentes cantidades (en 10 animales cada vez con 1 µg/ml o 10 µg/ml) de GDF-5 humano recombinante. Una zona circular de piel fue extirpada desde el dorso de ratones desprovistos de inmunidad y fue cubierta con gasa provista de vaselina. Subsiguientemente, unos soportes de gel que contenían GDF-5 se montaron entre 2 anillos, se cubrieron con un sombrero de silicona y se trasplantaron sobre fascias musculares del dorso (FIG. 16). A las 1 hasta 4 semanas después del trasplante, se tomaron muestras de la dermis y se examinaron mediante técnicas citohistoquímicas.

Se observaron importantes alteraciones epiteliales dependientes de la dosis a las 3 semanas después de la aplicación de 1 ó 10 µg de GDF-5 (FIG. 16). Una neovascularización así como una formación aumentada de componentes celulares estructurales (colágenos I, IV, VII, fibrilinas, elastina, decorina, ácido hialurónico) se reprodujeron visualmente mediante técnicas clásicas de inmunofluorescencia. En resumen, la administración directa de GDF-5 a tejidos cutáneos evocó efectos comparables como la sobreexpresión de GDF-5 en una piel de ratón transgénico (Ejemplo 1).

Ejemplo 3: Ensayo con fosfatasa alcalina (ALP) de una actividad biológica

La actividad biológica de proteínas relacionadas con el GDF-5 y de formulaciones coloidales de las mismas se puede determinar fácilmente con ayuda de sistemas de ensayo consagrados. Es sumamente útil y preferido el ensayo de la fosfatasa alcalina (ALP) común (Takuwa y colaboradores 1989, Am. J. Physiol. 257, E797-E803). En este sistema de ensayo *in vitro*, la actividad biológica de factores de crecimiento relacionados con el GDF-5 se mide después del cultivo concomitante de diferentes concentraciones de proteínas con células osteogénicas/condrogénicas. El GDF-5 y proteínas relacionadas con un potencial osteo-/condrogénico aumenta la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) en estas células, p.ej. en células ATDC-5, ROB-C26 o MCHT-1/26. La actividad de ALP en estos materiales lisados de células se determina mediante un ensayo colorimétrico. La reacción está basada en la hidrólisis del fosfato de p-nitrofenilo (PNPP) para dar p-nitro-fenol, que se vuelve visible en condiciones alcalinas como el anión del p-nitro-fenol de color amarillo. La meta fue medir la actividad de las formulaciones de LMP ensayadas por comparación con la actividad de ALP obtenida con concentraciones conocidas del patrón de referencia de GDF-5.

En un ensayo de la ALP normalizado, se incubaron durante una noche 1×10^4 células de células ATDC-5 o MCHT1/26 en placas de 96 pocillos en un medio de cultivo de células (alfa-MEM, penicilina/estreptomicina, L-glutamina 2 mM, FCS (suero de ternero fetal) al 10 %) a 37°C, CO₂ al 5 %, saturado con H₂O. Al día siguiente, las células fueron estimuladas con las proteínas relacionadas con el GDF-5 o con formulaciones de las mismas durante 72 horas con unas concentraciones indicadas de ligandos. Subsiguientemente, las células fueron lavadas con una PBS (solución salina tamponada con fosfato). Una lisis celular se realizó en 100 µl de un tampón de lisis alcalina 1 (glicina 0,1 M, pH 9,6, NP-40 al 1, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM) durante 1 h a la temperatura ambiente. Luego se añadieron 100 µl de tampón de lisis alcalina 2 (glicina 0,1 M, pH 9,6, NP-40 al 1, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM + 2 mg/ml de PNPP). Las placas fueron incubadas a 37°C, CO₂ al 5 %, saturado con H₂O. La reacción de ALP fue detenida después de esto con 100 µl de 30 g/l de NaOH y finalmente se midió la densidad óptica con un lector automático de microplacas a 405 nm tomando en consideración la resta del valor en vacío.

Ejemplo 4: Desarrollo de formulaciones coloidales de carácter básico de GDF-5 para uso en composiciones cosméticas

Unas apropiadas formulaciones de GDF-5 se pueden preparar usando diferentes vehículos de fármacos coloidales. Unas composiciones de carácter básico que comprenden vehículos coloidales pueden comprender p.ej. nanopartículas poliméricas y micropartículas de lípidos que se pueden preparar de la siguiente manera:

A. Nanopartículas poliméricas

Se ensayaron múltiples nanopartículas poliméricas como vehículos de fármacos coloidales para el GDF-5, p.ej. resomers® (de Boehringer Ingelheim, Alemania) con diferentes composiciones y pesos moleculares: los resomers® de PLA R202H y R202S (poli-(DL)-lactida), los resomers® de PLGA RG502, RG502H, RG503H y RG504H (poli-(DL)-lactida-co-glicolida)). Como disolvente general de carácter ácido para el GDF-5 se usó HCl 10 mM, los agentes emulsionantes investigados fueron un poli(alcohol vinílico) (PVA), el poloxamer188 (P188) y una poli(vinilpirrolidona) (PVP). La síntesis de nanopartículas se llevó a cabo con el método de la doble emulsión en condiciones estériles de acuerdo con la FIG. 17 (p.ej. fase w1 = 500 µg de proteína en 142,1 µl de HCl 10 mM, fase w2 = 160 mg de un agente emulsionante en 30 ml de agua, fase o = 40 mg de un polímero en 3,1 ml de cloruro de metileno). Se crearon unas emulsiones por tratamiento con ultrasonidos durante 40 s (segundos) (w1/o) y 2 min (minutos) (w1/o/w2), respectivamente. Después de una eliminación del disolvente orgánico por vaporización, se produjeron una precipitación del polímero y una subsiguiente encapsulación de la proteína. El tamaño de partículas se determinó con la ayuda de un microscopio electrónico. Unas partículas de Resomer® R202H (FIG. 18) combinadas con el agente emulsionante poli(alcohol vinílico) o poloxamer188 dieron los mejores resultados en lo concerniente a la morfología de las partículas y a la carga con proteínas. El tamaño medio de partículas cargadas con GDF-5 fue de aproximadamente 320 nm, y la concentración media de fármaco fue de 66 µg por mg de partículas. Debido a la carga relativamente baja con proteínas, se consideró que las nanopartículas orgánicas ensayadas eran unos apropiados vehículos de fármacos para composiciones cosméticas que comprendían proteínas relacionadas con el GDF-5, puesto que los cosméticos contienen unas cantidades comparativamente bajas de ingredientes activos.

B. Composiciones de micropartículas de lípidos

Son especialmente apropiadas para finalidades dérmicas ciertas formulaciones de lípidos. Se crearon varias composiciones de micropartículas de lípidos (LMP) y se ensayaron como vehículos de fármacos coloidales para composiciones cosméticas que comprendían proteínas relacionadas con el GDF-5.

1. Composiciones de LMP que comprenden aceites naturales (vegetales) naturales

Por ejemplo, 22,93 µl de aceite de oliva (21,1 mg) se combinaron con un igual peso de fosfatidilserina dentro de un microtubo para centrifuga de 1,5 ml de capacidad. Se añadieron 956 µl de un tampón de succinato 50 mM, de pH 4,25, para llevar el volumen total a 1 ml. La mezcla fue sometida a vórtice durante 30 segundos y colocada en un baño de hielo y etanol para mantener a la temperatura constantemente en 4°C. La muestra fue tratada con ultrasonidos durante una hora con una salida de potencia media de 22 vatios en un ciclo de servicio de 25 % con un período de ciclo de 20 segundos. Después de 1 hora, la emulsión apareció transparente con un color ámbar cuando se mantuvo en presencia de la luz, indicando que las esferas de emulsión se estaban volviendo más pequeñas y habían alcanzaron el diámetro esperado de aproximadamente 50 nm (FIG. 19). En este punto, la mezcla de LMP fue transferida con una pipeta a un microtubo para centrifuga que contenía 2,5 mg de la proteína GDF-5 liofilizada. La muestra fue tratada con vórtice hasta que la proteína se volvió solubilizada. La introducción de la proteína causó que la mezcla se volviese opaca, indicando una rotura parcial de las LMP. La mezcla de LMP fue luego tratada con ultrasonidos en las mismas condiciones durante 45 minutos adicionales, restaurando la previa transparencia. En este punto, la mezcla de micropartículas de lípidos fue sometida a vórtice en un bajo ajuste mientras que se añadía NaOH 0,5 M en incrementos de 10 µl hasta que se hubiera alcanzado el pH de 7,0. El pH se midió colocando una pequeña cantidad de una solución sobre una tira para medir el pH. En algunos casos, las soluciones fueron filtradas adicionalmente a través de un filtro de 0,2 µm. El contenido de proteínas de las micropartículas de lípido cargadas con el GDF-5 se determinó a través del ensayo del ácido bicinonínico (BCA) (Smith, P.K. y colaboradores (1985), Anal. Biochem. 150, 76-85). La concentración de GDF-5 era del orden esperado (alrededor de 2,5 mg/ml).

No se observó ninguna precipitación durante la valoración indicando que la composición de micropartículas de lípidos era apropiada para transportar altas cantidades de GDF-5 (hasta de 2,5 mg/ml) incluso a un pH neutro. Como consecuencia, las LMP's ensayadas fueron consideradas como vehículos de fármacos apropiados para composiciones cosméticas que comprendían proteínas relacionadas con el GDF-5.

2. Composiciones de LMP que comprenden triglicéridos

Ejemplo de composición:	Myglyol® 812	0,95 g
	Phospholipon® 80	0,925 g
	Tampón de citrato de pH 4,25	6,7 ml
	GDF-5 (4,4 mg/ml)	0,227 ml
	NaOH 0,5 M	1 ml
	Agua	hasta 10 ml

5 Se combinaron triglicéridos (p.ej. Myglyol® 812), agentes emulsionantes (p.ej. Phospholipon® 80) y un tampón de citrato y se sometieron a vórtice durante 30 s en 3.000 rondas por minuto). La muestra fue tratada con ultrasonidos durante una hora con una salida de potencia media de 22 vatios y enfriamiento continuo en un baño de hielo. En este punto, se añadió una solución de GDF-5 a la mezcla de LMP. Luego la muestra se trató con vórtice y con ultrasonidos en las mismas condiciones durante una hora adicional. La mezcla de micropartículas de lípidos fue tratada con vórtice en un bajo ajuste, mientras que se añadía NaOH 0,5 M en incrementos de 10 µl hasta que se alcanzó el pH de 7,0.

3. Composición de LMP sin ninguna fase oleosa

Ejemplo de composición:	Phospholipon® 80	0,925 g
	Tampón de citrato de pH 4,25	7,7 ml
	GDF-5 (4,4 mg/ml)	0,227 ml
	NaOH 0,5 M	1 ml
	Agua	hasta 10 ml

10

Instrucciones de producción: véanse las composiciones de LMP que comprenden triglicéridos.

C. Microemulsiones

Ejemplo de composición:	Isoestearato de glicerilo	0,05 g
	Phospholipon® 80	0,05 g
	Isoceteth-20	0,25 g
	Miristato de isopropilo	0,15 g
	Glicerol	0,5 g
	Tampón de citrato de pH 4,25	7,7 ml
	GDF-5 (4,4 mg/ml)	0,227 ml
	NaOH 0,5 M	1 ml
	Agua	hasta 10 ml

15

Se creó una microemulsión del tipo w/o (agua dispersada en un aceite) de la siguiente manera: Se combinaron (el isoestearato de glicerilo, el Phospholipon® 80, el Isoceteth-20 y el miristato de isopropilo) y se agitaron lentamente (a 300 rondas por minuto) a 100°C para formar una fase de lípidos. Los compuestos solubles en agua (glicerol, un tampón de citrato y una solución de factor de crecimiento) se combinaron por separado. Después de haber enfriado hasta la temperatura ambiente, la mezcla soluble en agua fue añadida a la fase de lípidos en pequeñas porciones. Se consiguió una distribución homogénea mediante agitación adicional.

20 **Ejemplo 5: Ensayo de formulaciones coloidales de GDF-5**

La actividad biológica de formulaciones coloidales de GDF-5 de acuerdo con el Ejemplo 4 se ensayó por medio de unos ensayos clásicos con fosfatasa alcalina como se describe p.ej. en el Ejemplo 3. De acuerdo con los resultados de los ensayos, todas las formulaciones coloidales (nanopartículas poliméricas, micropartículas de lípidos y microemulsiones) presentaron como característica una considerable bioactividad relacionada con el GDF-5. Además, el ensayo de integridad de GDF-5 encapsulado se comprobó mediante métodos de HPLC de fase inversa y de SDS-PAGE.

30 Con el fin de comparar las formulaciones de LMP con GDF-5 con un patrón de referencia de GDF-5 y obtener información acerca de una posible conglomeración o degradación, se usó un análisis común por RP-HPLC (cromatografía de líquido en fase inversa) de formulaciones de LMP de GDF-5, que separa a las moléculas de acuerdo con su polaridad. La cromatografía tuvo lugar en una fase estacionaria (columna: Vydac C18, 5 µm, fase 218TP52, proteína y péptido) y una fase móvil bajo alta presión. La elución de la proteína y de las impurezas potenciales durante la cromatografía se consiguió por medio de un gradiente de la fase móvil desde polar (0,15 % de ácido trifluoroacético en agua con 35 % de acetonitrilo) hasta menos polar (0,15 % de ácido trifluoroacético en agua con 100 % de acetonitrilo). Para el análisis por RP-HPLC las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 13.000 xg. Los materiales sobrenadantes fueron diluidos con 0,15 % de TFA en 35 % de acetonitrilo. Las muestras fueron centrifugadas de nuevo y los materiales sobrenadantes fueron aplicados a la RP-HPLC. No se pudo detectar GDF-5 en el material sobrenadante, indicando que el GDF-5 había sido completamente inmovilizado y envuelto por los lípidos.

40

Para la detección de la degradación potencial de proteínas, unos gránulos de micropartículas con el GDF-5 encapsulado fueron calentados durante 10 min a 80°C, con el fin de solubilizar a los lípidos y fueron elaborados adicionalmente mediante una SDS-PAGE. La separación por tamaños de la proteína (véase FIG. 22) mostró solamente muy pocos productos de degradación y una integridad de la mayor parte de la proteína GDF-5.

Finalmente, se realizó un satisfactorio ensayo de penetración con el fin de evaluar la absorción dérmica de las composiciones del invento que contenían GDF. Diversas técnicas para la averiguación de la absorción dérmica y la penetración percutánea han sido desarrolladas. Por motivos éticos, dicho ensayo debería realizarse con muestras de piel extirpadas por medio de ensayos *in vitro* consagrados. El siguiente protocolo *in vitro* clásico para la absorción dérmica y la penetración percutánea de composiciones diseñadas para una administración tópica única o repetida, ha sido desarrollado por W. Diembeck y H.-J. Duesing de Beiersdorf AG, Alemania. Este y otros sistemas de ensayo que utilizan los principios bosquejados en la "nueva propuesta de pautas de guía de la OECD en una absorción percutánea *in vitro* de agentes químicos" se describen también en la cita de Diembeck y colaboradores 1999: Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients [pautas de guía de ensayos para la averiguación *in vitro* de la absorción dérmica y de la penetración percutánea de ingredientes cosméticos]. Food and Chemical Technology 37, 191-205.

Los experimentos se llevan a cabo en la piel dorsal no hervida de cerdas hembras seleccionadas (con una edad de aproximadamente 130 días y un peso de aproximadamente 100 kg). La piel dorsal fresca (aproximadamente 30 x 40 cm) se corta en tiras de aproximadamente 10 x 40 cm. La mayor parte de la capa de grasa subcutánea es retirada y la piel es enjuagada con agua de grifo moderadamente caliente. Un punzón circular con un diámetro interno de 5 cm se usa para cortar discos de piel que se acoplan dentro de las células de penetración. Los discos se colocan en bolsas de material plástico puestas en vacío y se almacenan a -20°C hasta el uso. Las muestras de ensayo se mezclan con sustancias de ensayo marcadas radiológicamente y se mezclan a fondo. Un material suficientemente marcado debería proporcionar una actividad específica de aproximadamente 0,4 Mbq/mg. Unos discos de piel derretidos son frotados en seco con lana de algodón.

La piel se monta sobre el compartimiento para receptor de una célula de penetración (véase la FIG. 23) con el lado epidérmico hacia arriba, y la cámara para donante se sujetó en su sitio. La muestra de ensayo se aplica sobre el lado de piel epidérmica y se distribuye uniformemente dentro de la zona de aplicación circular (diámetro 2,5 cm) de la célula de penetración. Después de 24 horas, se termina el experimento de adsorción/penetración. Los experimentos se llevan a cabo usualmente en triplicado. Las muestras analíticas se preparan de la siguiente manera:

La célula de penetración superior se coloca dentro de 15 ml de un disolvente apropiado que es capaz de solubilizar a la sustancia ensayo fuera de la emulsión y retirar los residuos que están adheridos al vidrio. Se añade una parte alícuota de 1 ml a 10 ml de un cóctel de escintilación para análisis radiológicos. Después de haber retirado el disco de piel desde la célula de penetración inferior, aproximadamente 5 ml de un fluido receptor son introducidos con pipeta dentro de un matraz. El lado de fondo del disco de piel y la célula de penetración inferior se lavan en cada caso con 1 ml de agua destilada, que luego se añade al fluido receptor. El matraz es llenado hasta 10 ml con agua destilada. Una parte alícuota de 1 ml se añade a 10 ml de un cóctel de escintilación para análisis radiológicos. La muestra de ensayo en exceso es retirada desde la superficie de la piel y transferida a un vial de escintilación.

La capa córnea (estrato córneo) es desprendida desde la piel tratada con una cinta adhesiva (TesaFilm tipo 4129, anchura 25 mm, de Beiersdorf, Alemania). Las tiras son colocadas dentro de viales de escintilación. La epidermis y la dermis son separadas por calor colocando las muestras de piel, con el lado epidérmico hacia abajo, bajo ligera presión sobre una placa caliente a 80°C durante 45 segundos. La epidermis es desprendida desde la dermis con una espátula y solubilizada en 2 ml de Soluene (de Packard). Después de haber enfriado a la temperatura ambiente, se añaden 10 ml de un cóctel de escintilación a la solución de epidermis. El borde duro externo de la dermis, que no contiene la sustancia de ensayo, es separado por corte y desechado. La restante dermis es cortada en trozos y disuelta en 12 ml de Soluene (de Packard) durante 24 horas. Después de haber enfriado hasta la temperatura ambiente, se añaden 10 ml de un cóctel de escintilación a 1 ml de una solución de dermis.

La radiactividad de todas las muestras se mide con un contador de escintilación en líquido del tipo LSC3801 (de Beckman Instruments). La radiactividad en todas las muestras es usada para calcular la radiactividad total no absorbida (superficie de la piel y superficie celular superior) y la radiactividad absorbida (capa córnea, epidermis, dermis, fluido receptor). La suma de estos valores (radiactividad recuperada total) se normalizó a 100 %. Los porcentajes de radiactividad, en la superficie, en la capa córnea, etc., se volvieron a calcular como porcentajes de la radiactividad total normalizada para proporcionar información acerca de la distribución de la sustancia de ensayo aplicada (la no absorbida frente a la absorbida). La suma de las radiactividades absorbidas normalizadas se ajustó a 100 % y los datos de la capa córnea, de la epidermis, de la dermis y del fluido receptor se volvieron a calcular como porcentajes de la radiactividad absorbida normalizada para proporcionar información acerca de la distribución de la sustancia de ensayo dentro de la piel.

Se realizaron unos experimentos de permeación satisfactorios adicionales usando muestras de piel humana separadas por calor desde un donante de piel en celdas de difusión de Franz estáticas (superficie de piel 3 cm²). Se aplicaron 300 µl de las formulaciones tópicas (soluciones). Las muestras se tomaron en 3 momentos (puntos de tiempo) durante un período de estudio de 48 h. Todos los ensayos se realizaron en triplicado por cada formulación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método cosmético, no terapéutico, para la prevención, deceleración o inversión de procesos de envejecimiento dérmico, seleccionados entre el conjunto que consiste en un envejecimiento cronológico y un fotoenvejecimiento, en donde la composición de la matriz extracelular (ECM) de un mamífero es alterada por uso de una o más proteína(s) relacionada(s) con el GDF-5 y/o uno o más ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) dicha(s) proteína(s), en donde una proteína relacionada con el GDF-5 es cualquier proteína presente en la naturaleza o creada artificialmente que comprende un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de por lo menos un 60% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa del GDF-5 humano (aminoácidos 400-501 de la SEQ ID NO: 1).
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que es aumentado el contenido en la ECM de una sustancia seleccionada entre el conjunto que consiste en colágeno del tipo I, colágeno del tipo III, colágeno del tipo IV, colágeno del tipo VII, las fibrilinas-1 y -2, ácido hialurónico, elastina y decorina.
- 15 3. El método de una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, estando dicho método caracterizado además porque comprende una administración por vía tópica, transdérmica o subcutánea de una composición que contiene uso de una o más proteína(s) relacionada(s) con el GDF-5 y/o uno o más ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) dicha(s) proteína(s).
- 20 4. Un uso cosmético, no terapéutico, de una composición que comprende uso de una o más proteína(s) relacionada(s) con el GDF-5 y/o uno o más ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) dicha(s) proteína(s), en el que una proteína relacionada con el GDF-5 es cualquier proteína presente en la naturaleza o creada artificialmente que comprende un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de por lo menos un 60% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa del GDF-5 humano (aminoácidos 400-501 de la SEQ ID NO: 1) para el mejoramiento y/o el mantenimiento del aspecto dérmico, seleccionado entre
- 25 a) mejoría o prevención de las arrugas,
b) retardo del envejecimiento dérmico,
c) espesamiento de una membrana de basamento, y
d) reducción del espesor epidérmico.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la concentración de dicha proteína relacionada con el GDF -5 en la composición está situada entre 0,1 µg/ml y 10 µg/ml.
- 30 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en el que dicha proteína relacionada con el GDF-5 es una proteína GDF-5 de mamífero y/o una variante de la misma, en donde dicha variante significa un fragmento biológicamente activo de una proteína GDF-5, una construcción artificial de proteína biológicamente activa, que contiene secuencias adicionales en exceso con respecto a la secuencia original de la proteína GDF-5 o cualquier combinación de las mismas.
- 35 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 6, en el que dicha composición comprende un GDF-5 humano maduro o un GDF-5 humano maduro recombinante (aminoácidos 1-120 o 2-120 de la SEQ ID NO: 3) o un GDF-5 humano monomérico recombinante (aminoácidos 1-120 o 2-120 de la SEQ ID NO: 4).
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 7, en el que la composición comprende un vehículo de fármaco coloidal.
- 40 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha composición comprende nanopartículas poliméricas y/o micropartículas de lípidos.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 9, en el que dicha composición es administrada por vía tópica, transdérmica o subcutánea.
- 45 11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 10, en el que dicha composición es administrada en una forma que se selecciona entre el conjunto que consiste en una loción, un gel, una crema, un ungüento, una formulación de atomización de aerosol, en lápiz de labios, un parche o emplasto, un paquete facial, un agente para el baño, un agente de limpieza facial, un detergente para el baño, un jabón para el baño, una crema solar, una loción solar, una loción para después de una exposición al sol, una loción autobronceadora, una microemulsión, una emulsión del tipo de aceite en agua, una emulsión del tipo de agua en aceite, una emulsión del tipo w/o/w, una emulsión del tipo o/w/o o una loción lechosa.
- 50 12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 11, en el que dicha composición comprende además por lo menos un ingrediente seleccionado entre el conjunto que consiste en ácido hialurónico, un retinoide, un antioxidante, un alfa-hidroxiácido, un péptido, un factor de crecimiento, un agente conservante, una fragancia o perfume, un aceite, un alcohol, un éster graso, una sustancia de filtro de rayos UV y una vitamina.

1 MRLPKLITFL LMYLAWLDLE FICTVLGAPD IGQRPOGTRP GLAKAEAKER PPLARNVTRP
61 GGHSYGGAT KANARAKGAT GOTGILTQPK KDEPKLPPR PGGEPKPGH PPQTRQATAR
121 TVTPKQDLP GKAPKAGSV PSSFLLKAR EPGPREPKE PFRPPITPB EYMLSIYRTL
181 SDADRRGNS SVKLEAGLAN TITSFIDKQ DDRGPVVKQ RIVEDISALE KDGLGAEIR
241 ILRKPSPDTA KPAAPGGRA AQKLSSCP GRQASLDV RSVPGLDGSG WEVFDIWKLF
301 RNFKNSAQIC LELEAWERGR AVDLRGLGFD RAARQVHEKA LFLVEGRTRK RDLEFNEIKA
361 RSGQDDKTVY EYLESQRKR RAPLATROGK RPSKNLKARC SRKALHVNEK DMGWDWIIA
421 PLEYEAHFCE GLCEFPILRSH LEPTNHAVIQ TLMNSMDPES TPPTCCVPTR LSPISILFID
481 SANNVVKQY EDMVESCCG R

FIG. 1

```

hgdf-6 : CSKKPLHVNFEKELGMDDMIIAPLPEYEAHCEGVCDPEPIRSHLEPTNHAIIQTMNSMDPGSTPEPSCCVETKLPPISTIYIDAANNV : 87
hgdf-7 : CSRKPLHVDKELGMDDMIIAPLPEYEAHCEGLCDPEPIRSHLEPTNHAIQTMNSMAEDAAASCCVFAKLSPISTIYIDAANNV : 87
hgdf-5 : CSRKALHVNFEKELGMDDMIIAPLPEYEAHCEGLCDPEPIRSHLEPTNHAVIQTMNSMDPESTPEPTCCVPTRLSPISILFIDSAANNV : 87

hgdf-6 : YKQYEDMNVVBSGGCR
hgdf-7 : YKQYEDMNVVBAAGCR
hgdf-5 : YKQYEDMNVVBSGGCR

```

FIG. 2

% de identidad entre secuencias con el dominio de nudo de cistina de GF5 humano

Secuencia	% de identidad	Residuos idénticos
GDF-5 Homo	100	102/102
GDF-5 Mus	99	101/102
GDF-6 Mus	86	88/102
GDF-6 Homo	85	87/102
GDF-6 Xenopus	84	86/102
GDF-6 Bos	83	85/102
GDF-7 Homo	81	83/102
GDF-7 Macaca	80	82/102
GDF-7 Mus	80	82/102
BMP-4	57	58/102
Vg-1	52	53/102
DPP	52	53/102
BMP-5	52	53/102
BMP-9	51	52/102
BMP-10	51	52/102
BMP-8A	51	51/102
BMP-6	51	52/102
BMP-7	51	52/102
GDF-3	49	50/102
60A	48	49/102
BMP-8B	48	49/102
BMP-3A	47	48/103
GDF-9B	45	46/102
BMP-3B	43	44/103
GDF-8	37	38/102
GDF-12	37	38/104
GDF-11	36	37/102
GDF-9	32	33/102

FIG. 3

Construcción artificial transgénica:

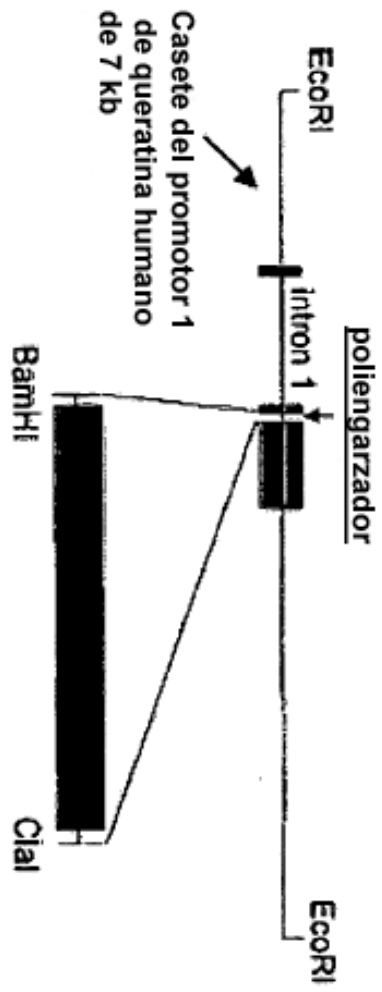


FIG. 4

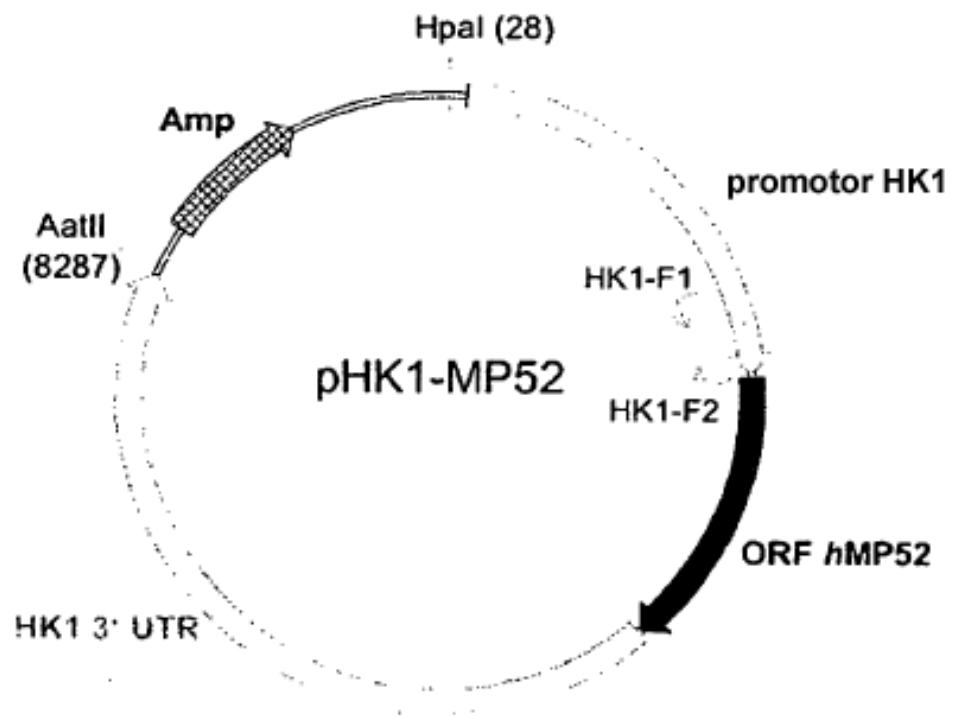
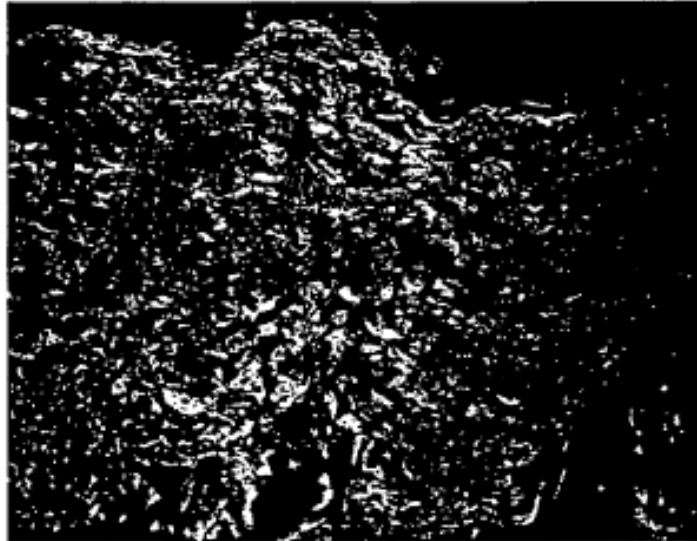


FIG. 5

Colágeno I (proteína estructural de la ECM)

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)

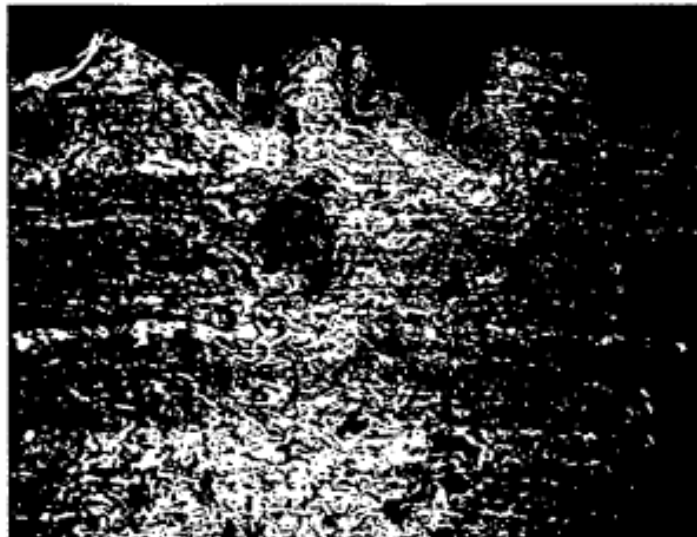


FIG. 6

Colágeno III (proteína estructural de la ECM)

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)



FIG. 7

Elastina (proteína estructural de la ECM)

TIPO SALVAJE



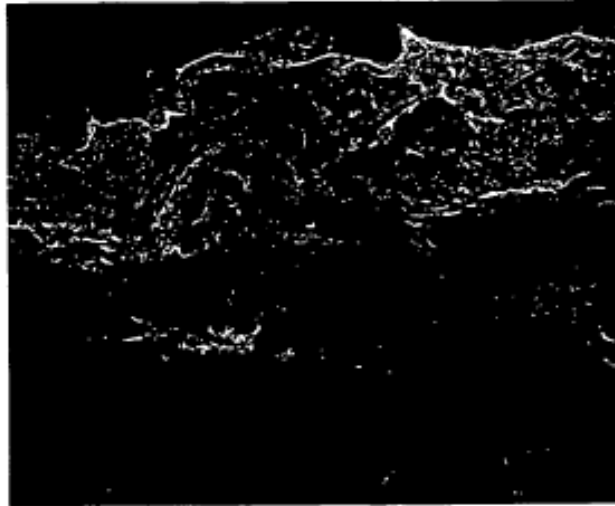
TRANSGÉNICO (SOBREENPRESIÓN DE GDF-5)



FIG. 8

Decorina (proteína estructural de la ECM, asociada con el colágeno)

TIPO SALVAJE



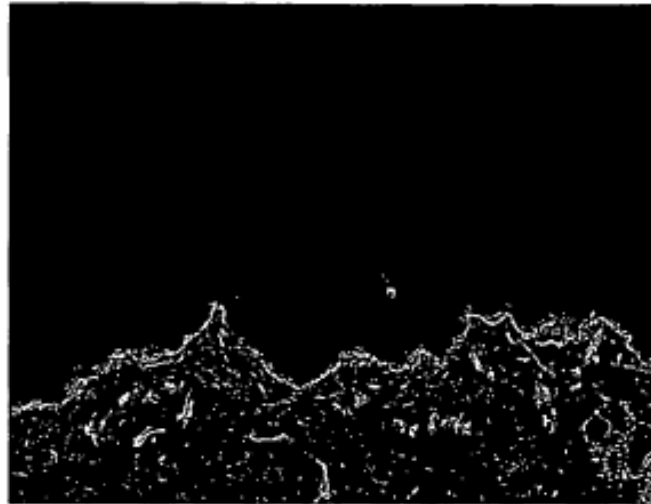
TRANSGÉNICO (SOBREENPRESIÓN DE GDF-5)



FIG. 9

Colágeno IV (componente de la membrana de basamento)

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)

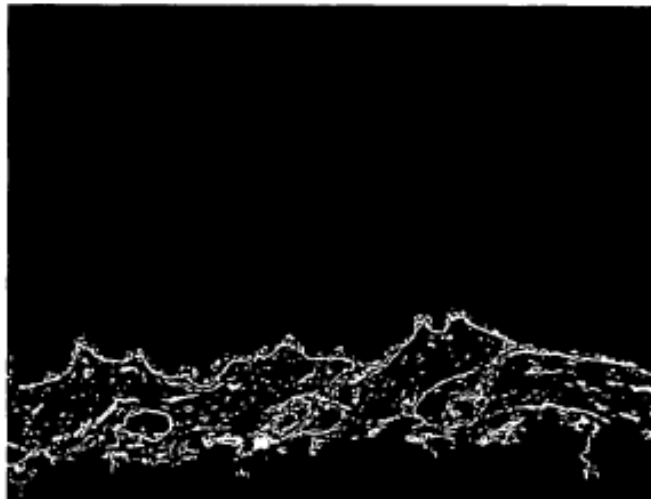
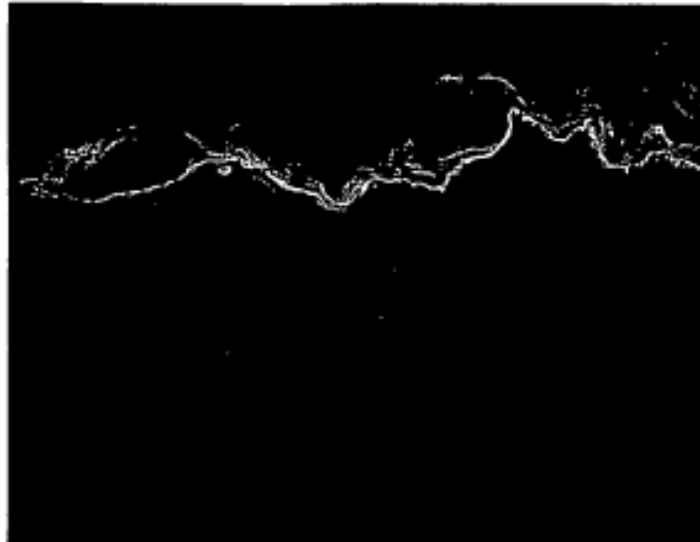


FIG. 10

Colágeno VII (componente de la membrana de basamento)

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)

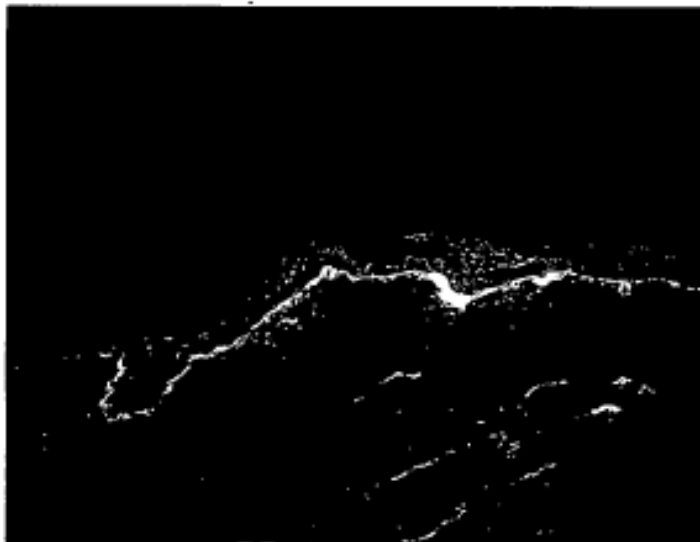


FIG. 11

Fibrilina 2 (componente de la membrana de basamento / de la ECM)

TIPO SALVAJE



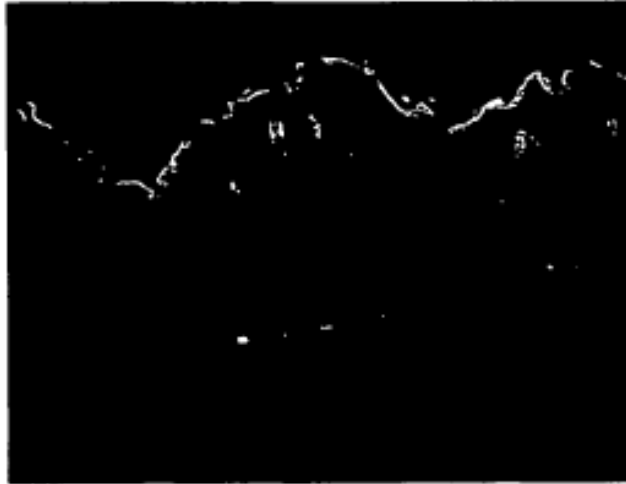
TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)



FIG. 12

Loricrina (marcador de la diferenciación epidérmica tardía)

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)

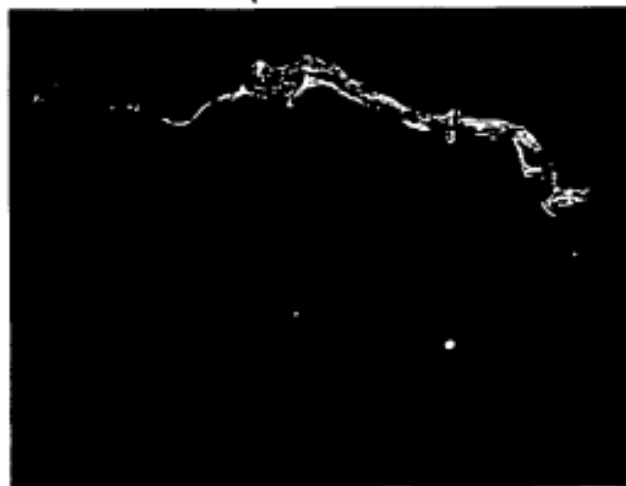
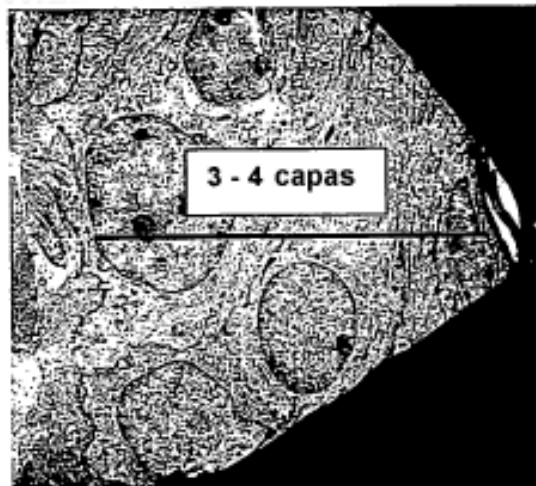


FIG. 13

Espesor / diferenciación epidérmico(a)

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREENPRESIÓN DE GDF-5)

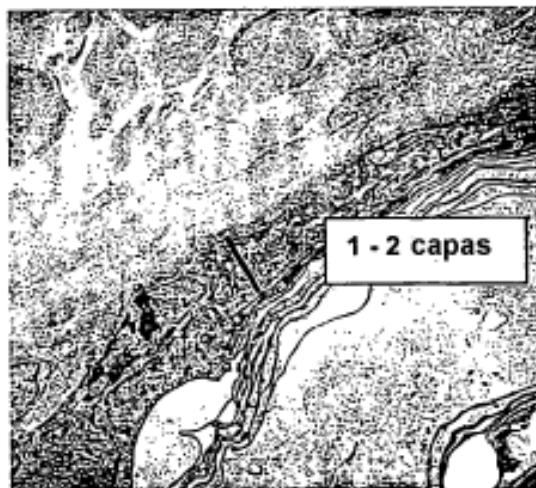
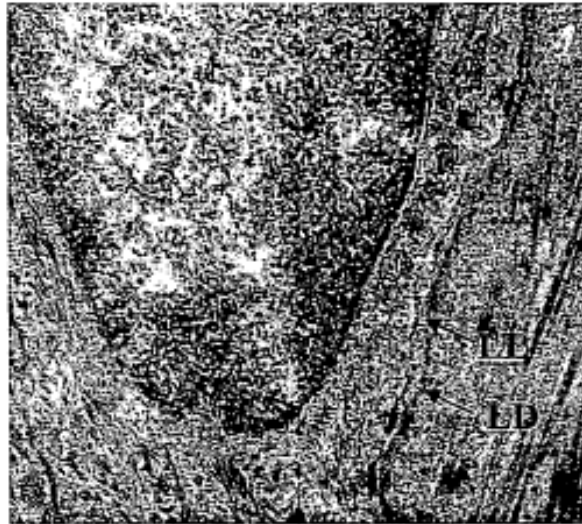


FIG. 14

Membrana de basamento (espesor)

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)

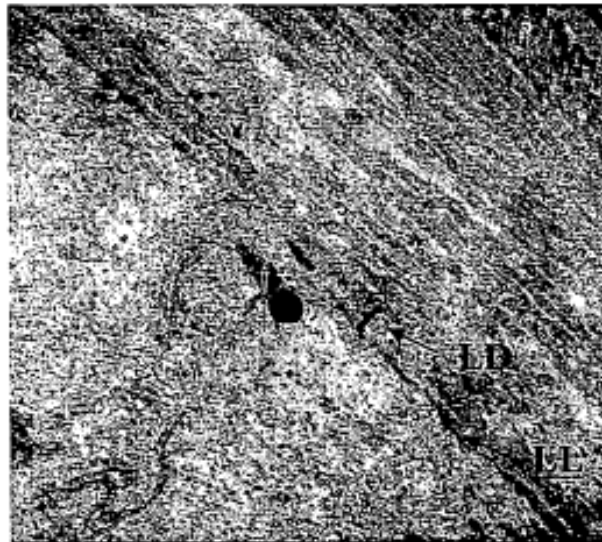


FIG. 15

**Experimentos de administración / dosificación de rhGDF-5
(Marcador: Colágeno IV)**

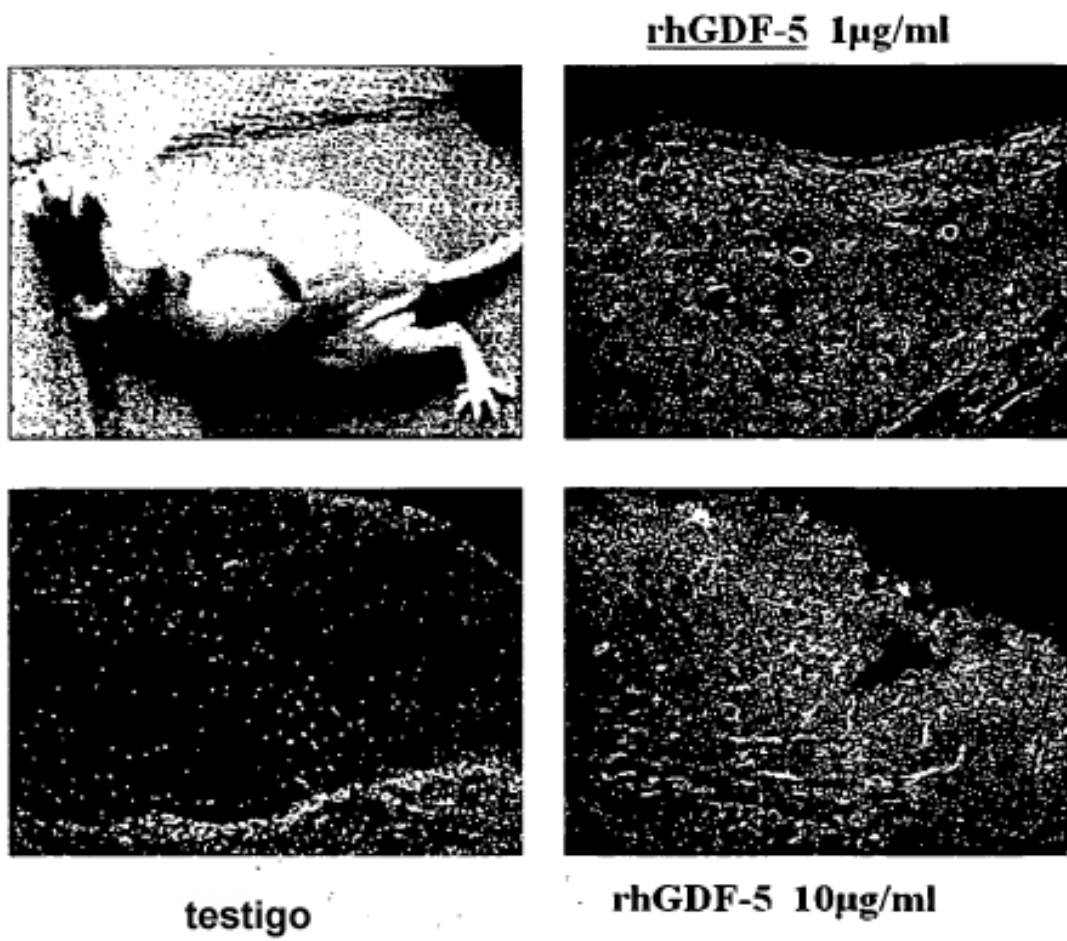


FIG. 16

Síntesis de nanopartículas: Esquema general

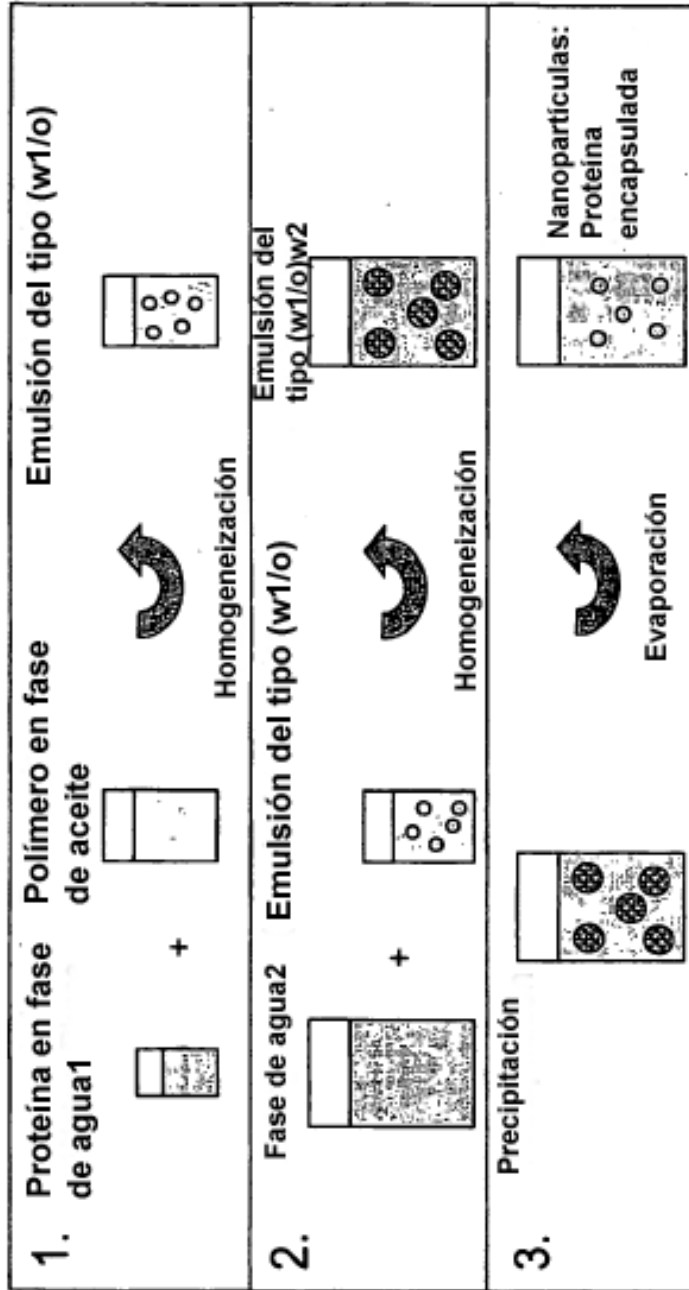


FIG. 17

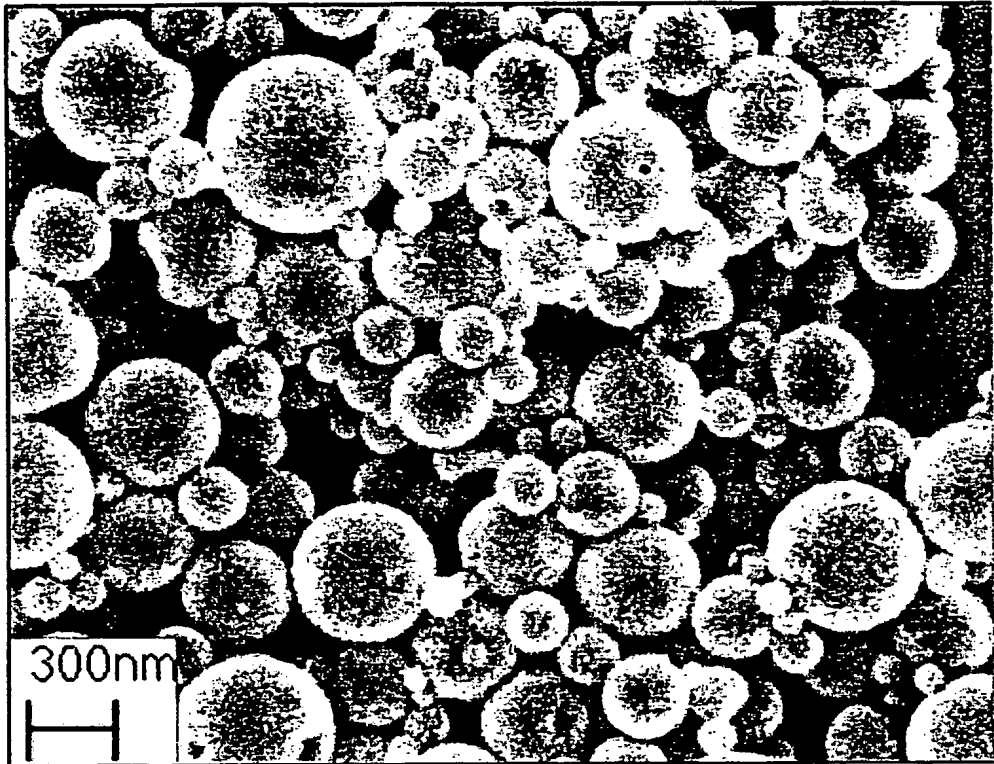


FIG. 18

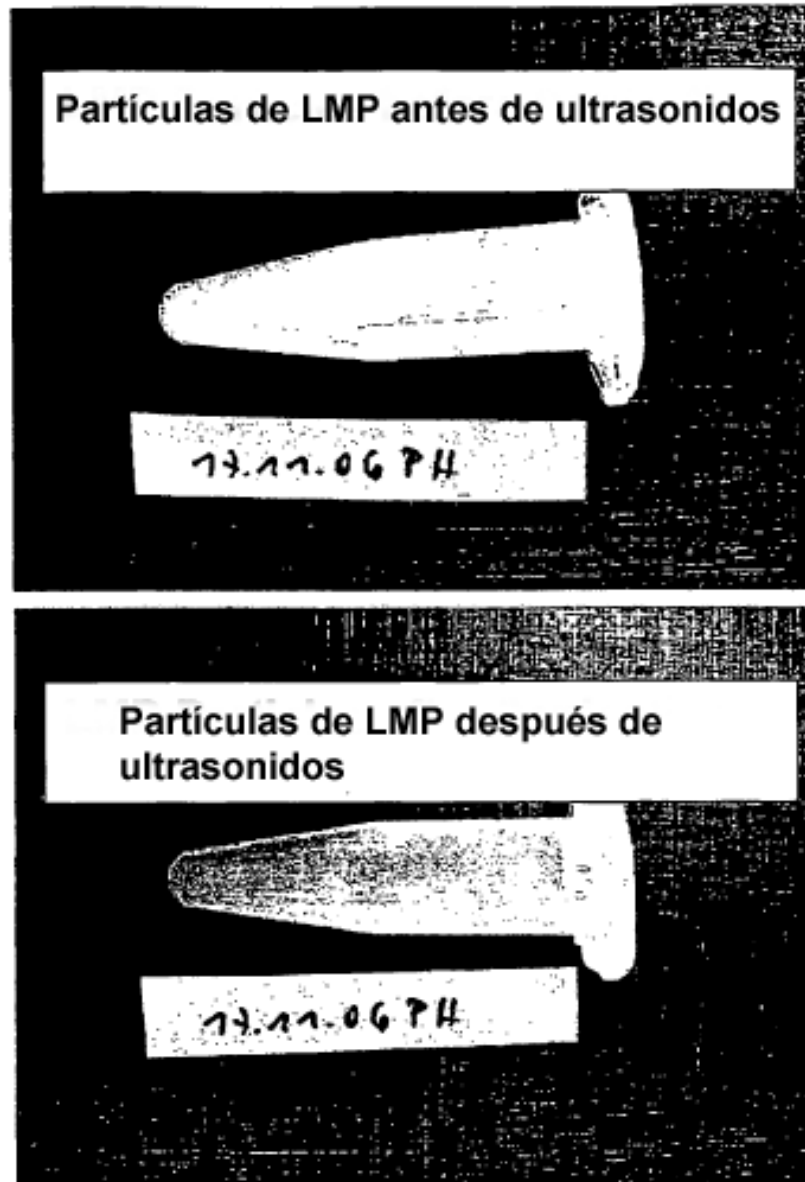


FIG. 19

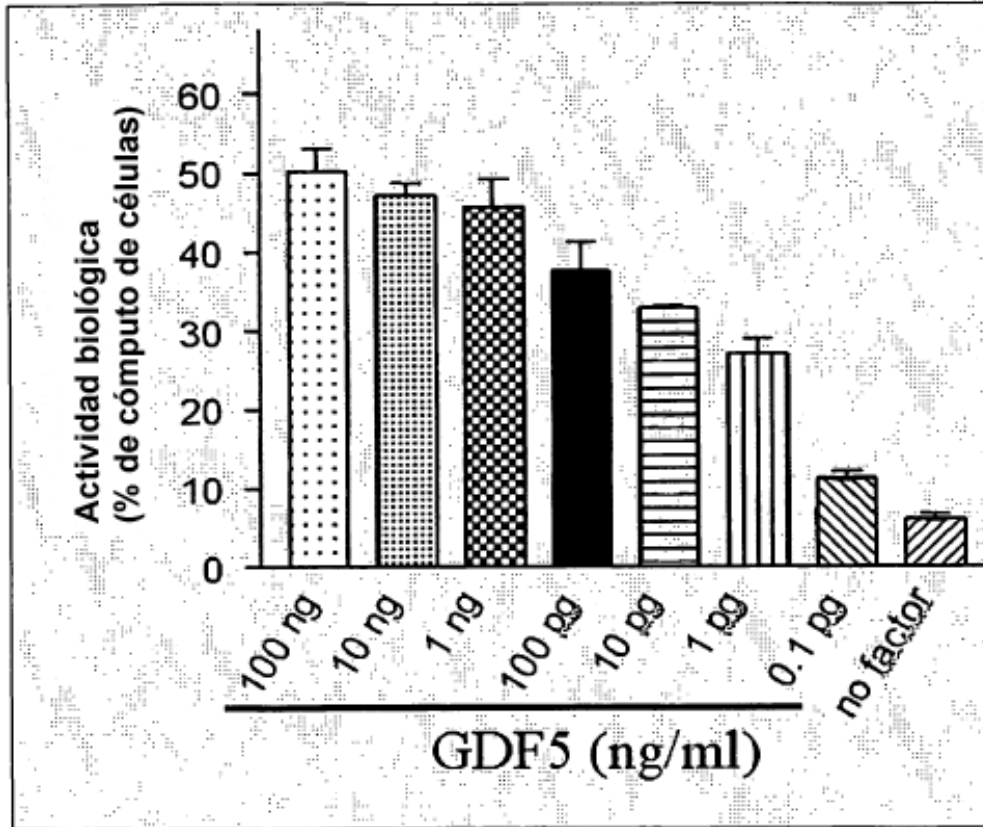


FIG. 20

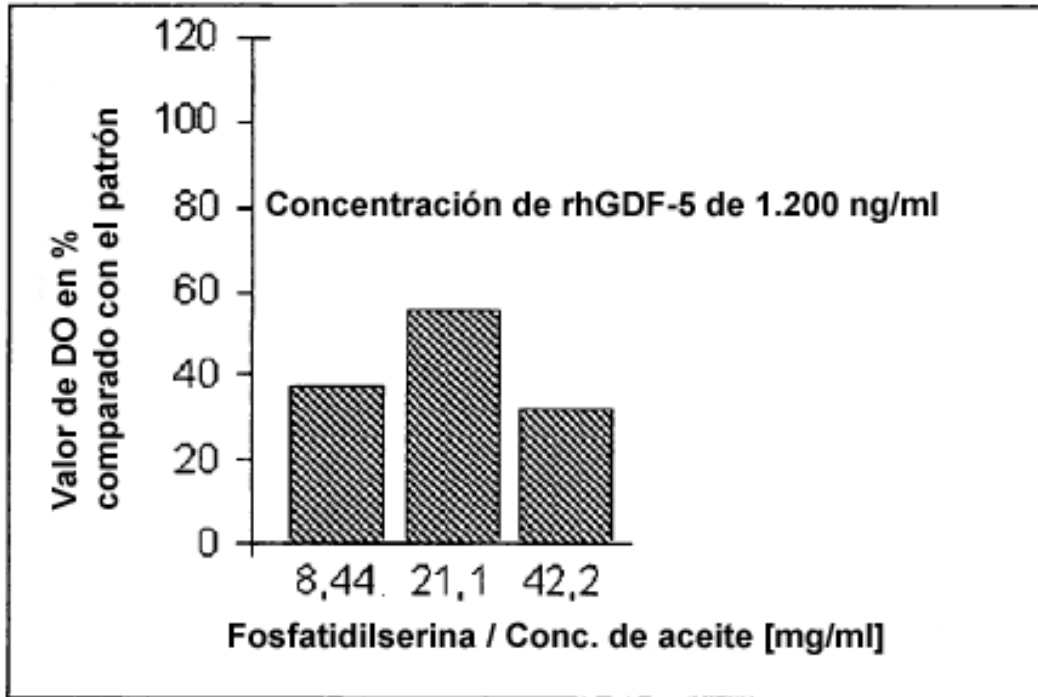


FIG. 21

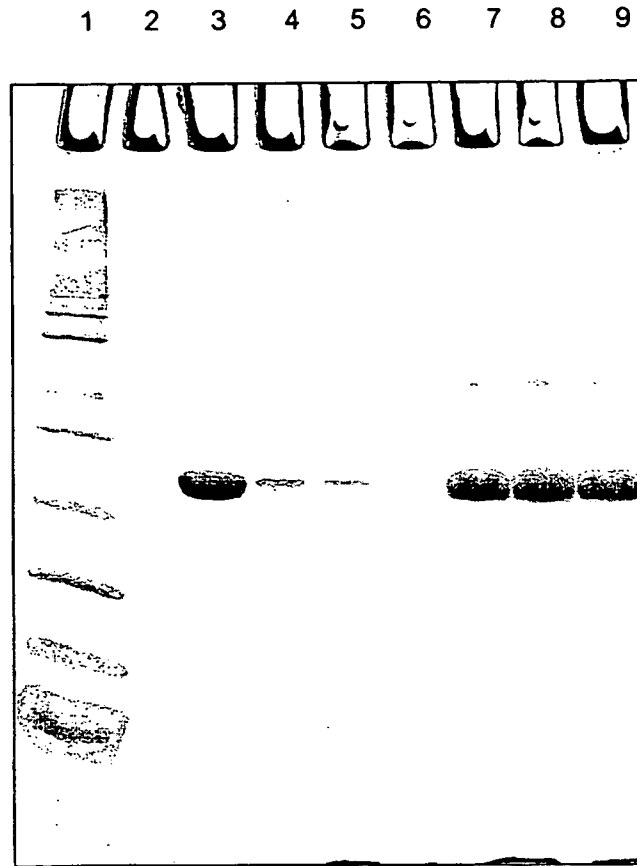


FIG. 22

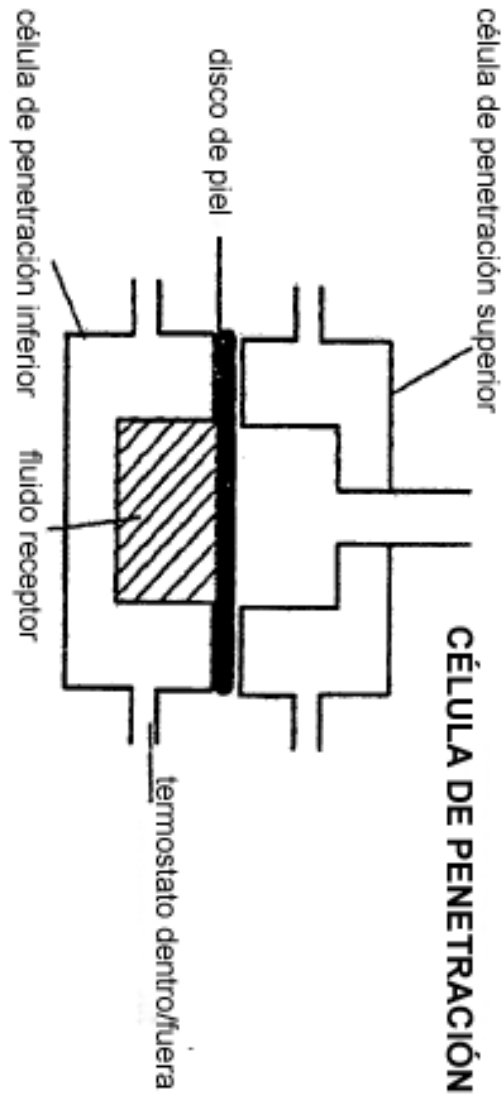


FIG. 23

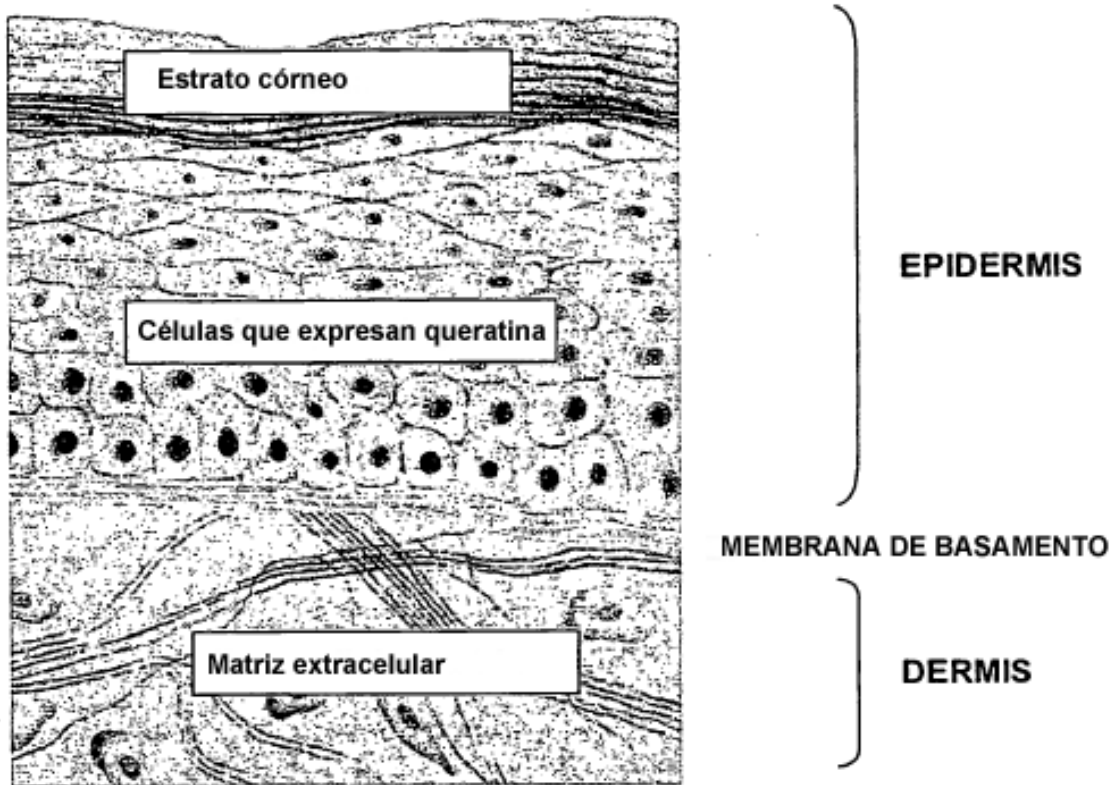
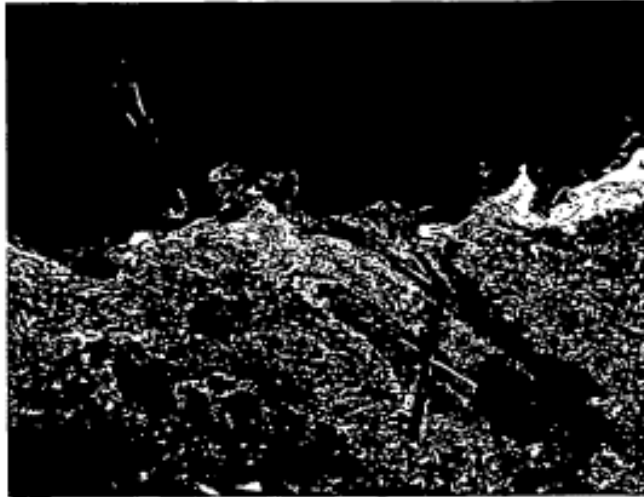


FIG. 24

Ácido hialurónico

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)

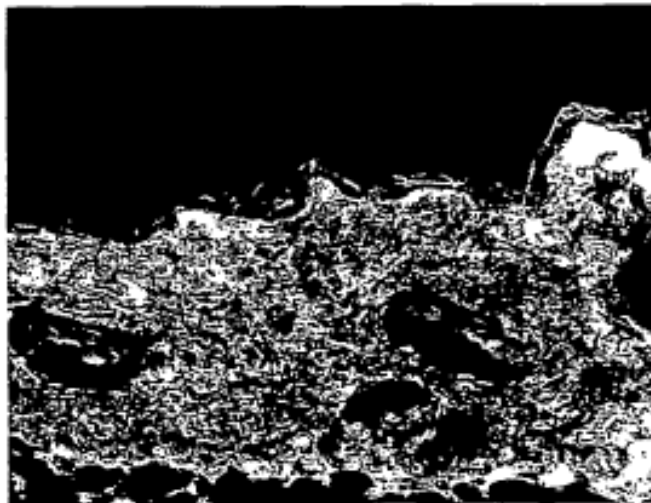


FIG. 25

Elastina (fibras elásticas)

TIPO SALVAJE



TRANSGÉNICO (SOBREEXPRESIÓN DE GDF-5)



FIG. 26