

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 405**

51 Int. Cl.:

**A61L 15/32** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61F 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2012 E 12729582 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2723408**

54 Título: **Vendaje para heridas biorresorbible**

30 Prioridad:

**22.06.2011 EP 11170971**

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

**30.06.2015**

73 Titular/es:

**BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR  
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON  
PHARMAKA GMBH (50.0%)  
Czernyring 22  
69115 Heidelberg, DE y  
CARL FREUDENBERG KG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PLÖGER, FRANK;  
REIBEL, DENIS;  
GRAFAREN, DIRK y  
NEUMÜLLER, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 539 405 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

Vendaje para heridas biorresorbible

La presente invención se refiere a nuevos tejidos no tejidos que contienen proteínas del factor de crecimiento y de diferenciación. Dichos tejidos se diseñan específicamente para acelerar los procesos de regeneración tisular y de curación de heridas de tejidos de mamíferos. Además, la invención proporciona vendajes para heridas, compresas e implantes que comprenden los nuevos tejidos no tejidos.

GDF-5 (Hötten et al. 1994, Biochem. Biophys Res. Commun. 204, 646-652) es un morfógeno que se ha mostrado que promueve la proliferación celular, la diferenciación y la formación de tejido en varios tejidos. La proteína es también conocida como proteína morfogénica MP52, proteína morfogenética ósea 14 (BMP-14) o proteína morfogenética 1 derivada de cartílago (CDMP-1). GDF-5 está estrechamente relacionada con GDF-6 y GDF-7. Estas tres proteínas forman un subgrupo distinto de la superfamilia TGF- $\beta$ , presentando así propiedades biológicas comparables y un grado extraordinariamente elevado de identidad de secuencia de aminoácidos (véase, por ejemplo, Wolfman et al. 1997, J. Clin. Invest. 100, 321-330). Todos los miembros de la familia se sintetizan inicialmente como proteínas precursoras más grandes que sufren subsiguientemente la escisión proteolítica en un racimo de restos básicos de aproximadamente 110-140 aminoácidos desde el término C, liberando así partes de la proteína madura C-terminal a partir del prodominio N-terminal. Los polipéptidos maduros están estructuralmente relacionados, y contienen un dominio bioactivo conservado que comprende seis o siete restos de cisteína canónicos que es responsable del motivo de "nudo de cistina" tridimensional característico de estas proteínas. Las proteínas relacionadas con GDF-5 nativas son moléculas homodímeras, y actúan principalmente a través de la interacción con complejos receptores específicos que están compuestos de serina/treonina cinasas receptoras de tipo I y tipo II. Las cinasas receptoras activan subsiguientemente proteínas Smad, que entonces propagan las señales al núcleo para regular la expresión del gen diana.

Se ha demostrado repetidamente que los miembros del subgrupo GDF-5/-6/-7 son principalmente inductores y reguladores importantes de hueso y cartílago (Cheng et al. 2003, J. Bone & Joint Surg. 85A, 1544-1552; Settle et al. 2003, Developm. Biol. 254, 116-130). GDF-5 es un factor de crecimiento natural en el sistema nervioso (véanse, por ejemplo, el documento WO 97/03188; Krieglstein et al., (1995) J. Neurosci Res. 42, 724-732; Sullivan et al., (1997) Neurosci Lett 233, 73-76; Sullivan et al. (1998), Eur. J. Neurosci 10, 3681-3688). Además, por ejemplo, es útil para la modulación del crecimiento tisular relacionado con la piel (documento WO 02/076494; Battaglia et al. 2002, Trans. Orthop. Res. Soc. 27, 584), y para la inducción de procesos angiogénicos (Yamashita et al. 1997, Exp. Cell Res. 235, 218-26).

Tras el descubrimiento de sus actividades inductivas de tejido únicas, las proteínas del factor de crecimiento tales como GDF-5 se han aplicado con éxito en la investigación terapéutica y en cirugía regenerativa, en la que promueven y ayudan al proceso de curación natural de diversos tejidos dañados, ya sea solas o en combinación con materiales de matriz específicos. Aunque se han desarrollado varias composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas relacionadas con GDF-5 maduras biológicamente activas (véase, por ejemplo, el documento WO96/33215), la formulación y manipulación de GDF-5 son no obstante todavía problemáticas debido a que la proteína madura tiende a interactuar con un par de materiales sólidos y muestra una mala solubilidad excepcional en condiciones fisiológicas. Un perfil de solubilidad dependiente del pH de GDF-5/MP52 madura (mostrado, por ejemplo, en el documento EP 1.462.126) revela que la proteína comienza a precipitar en disoluciones acuosas con un pH por encima de 4,25, y se hace casi insoluble entre pH 5 y pH 9.

Con el fin de curar heridas, se han desarrollado vendajes quirúrgicos similares a lociones y sólidos de diversas formas, tamaños y materiales, que se diseñan principalmente para asegurar el cierre de la herida en condiciones semiestériles. Varios de estos vendajes están hechos de materiales orgánicos tales como, por ejemplo, colágenos, mientras que otros dispositivos están compuestos de componentes sintéticos tales como, por ejemplo, polímeros termoplásticos amorfos. Algunos vendajes para heridas de la generación más avanzada presentan funciones de suministro de fármacos adicionales; son capaces de administrar sustancias bioactivas tales como antibióticos o citocinas tales como factor de crecimiento epidérmico (RGF) o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF/Becaplermin). Por ejemplo, PDGF manipulado genéticamente mediante ingeniería está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Regranex® como un gel tópico para curar heridas (0,01%) que ha sido aprobado para el tratamiento de úlceras de pie diabético que se extienden en el tejido subcutáneo o más allá.

El documento EP 1.872.804 describe un dispositivo de reparación del menisco biocompatible que comprende un almacén de material polimérico no tejido y una sustancia bioactiva tal como rhGDF-5. En el ejemplo 5, describe la preparación de armazones revestidos con rhGDF-5. Tanto en el caso de una sutura como un almacén no tejido revestido de colágeno, el producto respectivo está revestido con rhGDF-5. Para este fin, se colocaron suturas en disolución de revestimiento de rhGDF-5 durante una cierta cantidad de tiempo y subsiguientemente se secaron al aire, o rhGDF-5 se liofilizó en el almacén. De este modo, el documento EP 1.872.804 describe solamente estructuras de almacén que están revestidas con rhGDF-5 en la superficie.

Para los fines de curar heridas y de regeneración de otros tejidos, son especialmente deseables nuevos tejidos mediante los cuales las proteínas del factor de crecimiento y de diferenciación son suministradas al cuerpo humano.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención mejorar la capacidad de uso terapéutico de GDF-5 y proteínas relacionadas al proporcionar nuevos materiales y dispositivos para curar heridas.

5 Los vendajes biodegradables para heridas se describen en el documento EP 2.042.199. El vendaje para heridas descrito está hecho de un tejido no tejido que comprende fibras de una materia prima fibrosa, en el que las fibras incluyen al menos una sustancia biológicamente activa. Como sustancias biológicamente activas, se sugieren particularmente sustancias antimicrobianas o antibióticos.

10 Durante sus estudios para mejorar la capacidad de uso terapéutico de GDF-5 y proteínas relacionadas, los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendentemente que un tejido no tejido que comprende fibras de una materia prima fibrosa como se describe en el documento EP 2.042.199 es particularmente adecuado para suministrar proteínas del factor de crecimiento y de diferenciación al cuerpo humano. La combinación de GDF-5 y materiales no tejidos biorresorbibles mostró efectos inesperados beneficiosos para la aplicación de GDF-5. Los materiales no tejidos biodegradables proporcionaron un sustrato para GDF-5 que muestra una liberación incrementada de proteína madura en combinación con buenas propiedades de manipulación. Esta combinación permite controlar la administración de GDF-5 de manera local, y por lo tanto permite el efecto del factor de crecimiento en el sitio deseado de acción farmacológica. Además de este control espacial, se eluyen mayores rendimientos de GDF-5 bioactiva a partir del material no tejido biodegradable durante un período de tiempo deseado, por ejemplo varios días. Debido a la incorporación de GDF-5 en el tejido no tejido, se superan los efectos de la precipitación dependiente del pH, y se minimiza la interacción con materiales sólidos.

20 La materia objeto de la invención es por lo tanto un tejido no tejido que comprende fibras de una materia prima fibrosa que comprende polímeros biorresorbibles, incluyendo las fibras al menos una sustancia biológicamente activa que es una proteína relacionada con GDF-5, distribuida en las fibras.

Definiciones:

A fin de evitar malentendidos y ambigüedades, se definen y se ejemplifican algunos términos usados frecuentemente aquí según lo siguiente:

25 La expresión "dominio de nudo de cistina", como se usa aquí, significa la región de aminoácidos rica en cisteína bien conocida y conservada que está presente en las partes maduras de las proteínas de la superfamilia TGF-beta tales como, por ejemplo, GDF-5 humana, y forma una estructura proteica tridimensional conocida como nudo de cistina. En este dominio, la localización respectiva de los restos de cisteína entre sí es importante y solamente se permite que varíe ligeramente a fin de no perder la actividad biológica. Se ha demostrado que el dominio de nudo de cistina solo es suficiente para la función biológica de la proteína (Schreuder et al. (2005), *Biochem Biophys Res Commun.* 329, 1076-86). Las secuencias de consenso para los dominios del nudo de cistina son bien conocidas en el estado de la técnica. Según la definición definida aquí, el dominio de nudo de cistina de una proteína comienza con el primer resto de cisteína que participa en el nudo de cistina de la proteína respectiva, y termina con el resto que sigue a la última cisteína que participa en el nudo de cistina de la proteína respectiva. Por ejemplo, el dominio de nudo de cistina de la proteína precursora de GDF-5 humana (SEC ID NO: 2) consiste en los aminoácidos 400-501 (véase también la FIG. 1).

40 La expresión "proteína relacionada con GDF-5", como se usa aquí, significa cualquier proteína de origen natural o creada artificialmente que está relacionada muy estrechamente con el factor de crecimiento/diferenciación 5 humano (hGDF-5). El rasgo común de todas las proteínas relacionadas con GDF-5 es la aparición de un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de al menos 60% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana (aminoácidos 400-501 de SEC ID NO: 2), que es suficiente para la función biológica de la proteína. La expresión "proteínas relacionadas con GDF-5" incluye proteínas que pertenecen al grupo de proteínas GDF-5, GDF-6 y GDF-7 procedentes de especies de vertebrados o de mamíferos, así como sus variantes recombinantes, en tanto que estas proteínas muestren el porcentaje de identidad mencionado anteriormente con el dominio de nudo de cistina de GDF-5 humana. El valor limitante de 60% es muy adecuado para separar miembros del grupo de proteínas GDF-5/-6/-7, así como sus variantes, de otras proteínas tales como GDFs y BMPs relacionadas de forma más distante. Una comparación de los dominios de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana, GDF-6 humana y GDF-7 humana (véase la FIG. 2) revela el alto grado de identidad de aminoácidos entre estas proteínas. GDF-6 humana comparte 87 (85%) y GDF-7 humana comparte 83 (81%) restos idénticos con el dominio de nudo de cistina de GDF-5 humana. Los dominios respectivos de moléculas de GDF-5/-6/-7 procedentes de otras especies de vertebrados y de mamíferos que se han identificado hasta ahora también muestran porcentajes de identidad muy elevados de al menos 75% (entre 79% y 99%), cuando se comparan con GDF-5 humana. Por el contrario, las GDFs y BMPs que no pertenecen al subgrupo de GDF-5/-6/-7 presentan valores de identidad mucho menores, por debajo de 60% (véase la FIG. 3).

La determinación de las posiciones de aminoácidos correspondientes en secuencias de aminoácidos relacionadas, así como el cálculo de porcentajes de identidad, se puede llevar a cabo fácilmente con la ayuda de algoritmos de alineamiento bien conocidos y opcionalmente programas de ordenador que usan estos algoritmos. Por ejemplo, las

identidades de los aminoácidos en esta solicitud de patente (es decir, FIG. 2) se han calculado alineando secuencias con el programa de libre acceso ClustalX (Versión 1.81) con los parámetros por defecto, y contando subsiguientemente a mano los restos idénticos. Los ajustes por defecto para el alineamiento por parejas (lento-exacto) son: parámetro de apertura de espacio: 10,00; parámetro de extensión del salto 0,10; matriz de peso de proteínas: Gonnet 250. El programa ClustalX se describe con detalle en Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882. ClustalX es una interfaz de ventanas para el programa de alineamiento múltiple de secuencias ClustalW y está disponible, por ejemplo, de diversas fuentes, por ejemplo mediante ftp anónimo de ftp-igbmc.u-strasbg.fr, ftp.embl-heidelberg.de, ftp.ebi.ac.uk, o vía descarga de la siguiente página web: <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>. El programa y el algoritmo ClustalW también se describen con detalle en 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. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Las proteínas relacionadas con GDF-5 especialmente preferidas presentan identidades de aminoácidos de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana.

Los ejemplos no limitantes de proteínas relacionadas con GDF-5 de vertebrados y de mamíferos son precursores y proteínas maduras de GDF-5 humana (descrita como MP52 en el documento WO95/04819, y como GDF-5 humana en Hötten et al. 1994, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 204, 646-652), GDF-5/MP52 humana recombinante (rh) (documento WO96/33215), MP52 Arg (documento WO97/06254); MP52s humana HMW (documento WO97/04095), CDMP-1 (documento WO96/14335), GDF-5 de ratón (*Mus musculus*) (documento US 5.801.014), GDF-5 de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Sanyal et al. 2000, *Mol Biotechnol.* 16, 203-210), GDF-5 de pollo (*Gallus gallus*) (nº de acceso NCBI NP\_989669), GDF-5 de la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*) (nº de acceso NCBI AAT99303), GDF-5 monomérica (documentos WO 01/11041 y WO 99/61611), GDF-6/BMP-13 humana (documento US 5.658.882), GDF-6 de ratón (nº de acceso NCBI NP\_038554), GDF-6/CDMP-2 (documento WO96/14335), GDF-7/BMP-12 humana (documento US 5.658.882), GDF-7 de ratón (nº de acceso NCBI AAP97721), GDF-7/CDMP-3 (documento WO96/14335). También están cubiertas por la invención las proteínas relacionadas con GDF-5 que tienen mutaciones adicionales tales como sustituciones, adiciones y supresiones, en tanto que estas mutaciones adicionales no supriman la actividad de la proteína biológica. Algunas variantes preferidas son mutantes de proteínas relacionadas con GDF-5 con actividad biológica mejorada. Por ejemplo, uno o más restos que están normalmente presentes en la proteína precursora de GDF-5 humana (véase la FIG. 1) están sustituidos en estos mutantes por otros aminoácidos: la arginina en la posición 438 del precursor de GDF-5 humana se sustituye por glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina o asparaginas; y/o serina 439 se sustituye por ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, leucina, o isoleucina; y/o asparagina 445 se sustituye por serina o treonina. En otro mutante de actividad elevada, metionina 453 y/o metionina 456 se sustituyen por alanina, valina, o isoleucina. Son de especial interés los mutantes en los que leucina 441 se sustituye por prolina.

El término "variante", como se usa aquí, significa cualquiera de los siguientes polipéptidos:

- a) fragmentos biológicamente activos de una proteína, preferiblemente que comprende al menos el dominio de nudo de cistina;
- b) constructos proteicos biológicamente activos que contienen secuencias adicionales (con o sin añadir funciones biológicas) en exceso con respecto a la secuencia original de la proteína, o constructos que contienen sustituciones de aminoácidos;
- c) cualquier combinación de a) y b).

La expresión "actividad biológica" representa la actividad de compuestos, incluyendo, por ejemplo, una proteína relacionada con GDF-5, según se mide mediante el ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) in vitro habitual, por ejemplo como se describe en el ejemplo 8 o en Takuwa et al. (1989), *Am. J. Physiol.* 257, E797-E803). Las estirpes celulares adecuadas que se pueden usar en tal ensayo de ALP son, por ejemplo, células ATDC-5 o MCHT 1/26.

El tejido no tejido de la presente invención puede tener diferentes formas, configuraciones, estilos o diseños. Por ejemplo, el tejido no tejido puede ser un vendaje para heridas, compresa para heridas, implante o tampón.

La materia objeto de la invención es un tejido no tejido que comprende:

- fibras de una materia prima fibrosa que comprende polímeros biorresorbibles y/o biocompatibles, incluyendo las fibras al menos una sustancia biológicamente activa, que está distribuida en las fibras, en las que la sustancia biológicamente activa es una proteína relacionada con GDF-5, que es una proteína que comprende un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de al menos 60% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana según los aminoácidos 400-501 de SEC ID NO:2.

Opcionalmente, la proteína relacionada con GDF-5 adicional puede estar presente en las fibras.

Se ha encontrado sorprendentemente que las proteínas relacionadas con GDF-5, a pesar de su hidrofobia

relativamente elevada, se pueden incorporar en el interior de las fibras. Incluso las proteínas relacionadas con GDF-5 no glicosiladas se pueden incorporar sorprendentemente bien en fibras de una materia prima fibrosa que comprende polímeros biorresorbibles y/o biocompatibles.

5 Mediante la incorporación de proteínas relacionadas con GDF-5 en la parte interna de las fibras, se incrementa la estabilidad de la proteína. La proteína está especialmente protegida si las fibras se someten subsiguientemente a un proceso de esterilización, por ejemplo usando radiación  $\gamma$ . Debido a su posición en la parte interna de la fibra, la proteína también está protegida frente a la degradación por proteasas. Además, se incrementa la capacidad de almacenamiento a largo plazo. Especialmente a mayores temperaturas como por ejemplo a temperatura ambiente, la capacidad de almacenamiento de la proteína mejora en comparación con fibras que incluyen la proteína relacionada con GDF-5 en su superficie. Además, seleccionando polímeros apropiados para la materia prima, se puede controlar la liberación de proteínas relacionadas con GDF-5 de la parte interna de las fibras, por ejemplo para una liberación rápida de la sustancia activa o una liberación más lentamente.

10 Según la invención, las materias primas fibrosas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en polímeros naturales, polímeros sintéticos y polímeros derivados de materias primas fósiles. Estos materiales pueden estar cada uno modificados o sin modificar.

“Polímeros naturales” en términos de la presente invención son aquellos que derivan de fuentes biológicas tales como material vegetal, animal, fúngico o a base de bacterias. La expresión incluye polímeros post-tratados y químicamente modificados. Según una realización preferida de la invención, los polímeros naturales se seleccionan del grupo que consiste en polipéptidos, polisacáridos, polihidroxiésteres y polinucleótidos.

20 Particularmente adecuados son polímeros naturales como los polipéptidos como colágeno, gelatina, fibrina, caseína, o los polisacáridos dextrano, celulosa, almidón, quitina, quitosano, ácido hialurónico y alginato, así como polímeros sintéticos como polilactida (PLA), poliglicolida (PGA), policaprolactona (PCL), así como cualquier combinación de los mismos.

25 Según una realización preferida de la invención, el tejido no tejido es “biorresorbible”. Esto significa que el tejido no tejido se degrada dentro o sobre el cuerpo. Tales materiales preferiblemente no tienen que ser eliminados después de la resorción completa, y a menudo son particularmente muy compatibles con el cuerpo.

30 Materiales “biocompatibles”, en términos de la presente invención, son materiales que son capaces de realizar una respuesta hospedante apropiada en una aplicación específica. Tales materiales provocan preferiblemente poca o ninguna respuesta inmunitaria en un organismo dado, o pueden ser capaces de integrarse con un tipo celular o tejido particular.

En una realización preferida adicional, el tejido no tejido es biorresorbible o/y biocompatible.

35 Los polímeros biodegradables o biorresorbibles son por ejemplo alginatos de algas, polisacáridos naturales como dextrano, polímeros de almidón y celulosa de plantas, polímeros de animales como colágeno, gelatina, quitina, caseína, polidepsipéptidos, polímeros bacterianos como polihidroxiéster, particularmente polihidroxiésteres y polihidroxiésteres, polímeros sintéticos a base de aceites vegetales como por ejemplo ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poliamida y poliuretano, así como también polímeros de materias primas fósiles como poli- $\epsilon$ -caprolactona, polialcohol vinílico, poliéster, polisuccinato de etileno y polioxalato de etileno, poliesteramida, y polidioxanona.

40 Adicionalmente, las sustancias insolubles se pueden dispersar en la matriz polimérica. Para este fin, las sustancias especialmente inorgánicas, tales como partículas de hidroxiapatita o/y fosfato tricálcico  $\beta$ , mostraron ser adecuadas.

Los tejidos según la invención son materiales no tejidos. Preferiblemente, estos están no comprimidos.

45 El diámetro de las fibras se puede establecer en una distribución estrecha por medio de un método de hilado por rotación como se describe en el documento EP 2.042.199. Se pueden producir fibras que tienen un diámetro de media de 0,1-500  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 3-300  $\mu\text{m}$ , e incluso más preferiblemente de 5-100  $\mu\text{m}$ , cuyas fibras forman una red parcial entre sí. La distribución estrecha del diámetro de las fibras permite una estructura homogénea y estable del tejido no tejido sin medidas de unión adicionales caras, y al mismo tiempo permite la liberación controlada de una sustancia bioactiva como GDF-5 (que está distribuida homogéneamente sobre o en el interior de las fibras).

50 Algunas fibras podrían estar retorcidas o entrelazadas entre sí, o podrían tener una estructura retorcida. Los retorcimientos o entrelazamientos promueven adicionalmente la resistencia y el comportamiento del estiramiento del tejido no tejido.

55 Algunas fibras se podrían entrelazar entre sí, y podrían formar uno o más haces de fibras. Mediante los entrelazamientos de fibras individuales, éstas se combinan en haces de fibras y se podrían desplazar reversiblemente unas con respecto a otras. Como resultado de esto, es posible estirar el tejido no tejido sin destruirlo. Debido al estiramiento, las fibras individuales son de hecho sometidas a tracción y se desplazan con

respecto a otras fibras. Los retorcimientos y entrelazamientos promueven incluso el retorno de las fibras a su posición antes del estiramiento. Por lo tanto, el tejido no tejido muestra una estabilidad dimensional elevada incluso en el estado húmedo.

5 Los tejidos se podrían modificar, ya sea por medios químicos, radiación o tratamientos físicos, tales como tratamientos deshidrotermales (DHT), a fin de alterar las características del tejido. Tal modificación podría implicar la reticulación de las fibras o polímero a fin de controlar características del tejido tales como estabilidad, degradación o biorresorción.

La proteína relacionada con GDF-5 puede estar distribuida homogéneamente en las fibras. Como resultado de esto, se puede establecer una liberación gradual de la proteína relacionada con GDF-5 con un efecto duradero.

10 La proteína relacionada con GDF-5 puede estar presente en las fibras al nivel de nanoescala. Estructuras de nanoescala se entiende que significan regiones de cualquier morfología que tienen dimensiones en el intervalo nanométrico, al menos en una dirección en el espacio. Como resultado de esto, la proteína relacionada con GDF-5 adquiere una elevada movilidad. Una proteína relacionada con GDF-5 presente al nivel de nanoescala muestra una reactividad particularmente elevada. Además, el tejido no tejido libera la proteína relacionada con GDF-5 muy fácilmente al medio que entra en contacto con ella. En este sentido, el tejido no tejido se distingue por una capacidad de liberación elevada con respecto a la proteína relacionada con GDF-5.

20 Según otra realización de la invención, la proteína relacionada con GDF-5 adicional se puede distribuir sobre las fibras. Esto permite la pulverización de un tejido no tejido con la proteína relacionada con GDF-5 a fin de asegurar la liberación rápida al cuerpo humano. Se prefiere particularmente que la proteína relacionada con GDF-5 esté presente tanto en el interior como sobre las fibras.

En una realización preferida de la presente invención, la proteína relacionada con GDF-5 se incorpora en el tejido no tejido en combinación con vehículos adecuados, estabilizantes u otros suplementos, como se describe aquí más abajo.

25 Al menos una parte de las fibras puede estar en forma de nanofibras. Un tejido no tejido de esta forma se puede obtener particularmente ligero y delgado.

El tejido no tejido puede tener una estructura de poros abiertos que tiene una permeabilidad al aire entre 0,01 y 100 l/min. x cm<sup>2</sup>, determinándose este parámetro según DIN 9237. Tal tejido no tejido es particularmente adecuado como material de vendaje, puesto que permite a la piel liberar humedad y respirar.

30 La producción del tejido no tejido de la invención se efectúa preferiblemente según un método de hilado por rotación como se describe, por ejemplo, en el documento EP 2.042.199. Para la ejecución del método de hilado por rotación, se usa preferiblemente un dispositivo o un recipiente como se describe en la solicitud de patente alemana DE 102.005.048.939.

35 Los tejidos no tejidos de la invención que incluyen una proteína relacionada con GDF-5 son particularmente adecuados para uso en el sector médico, puesto que son muy fácilmente modificables con respecto a la estructura del tejido y a la composición del material. De este modo, otra realización de la presente invención es un tejido no tejido, preferiblemente un vendaje para heridas, compresa para heridas o implante, que comprende un tejido no tejido según la invención.

40 En general, el tejido de la presente invención se puede aplicar en todas las situaciones en las que son útiles el almacenamiento y/o suministro de las formas recombinante y de tipo salvaje de GDF-5, mencionadas anteriormente, en combinación con dispositivos hechos de un tejido no tejido que comprende fibras de una materia prima fibrosa que comprende polímeros biorresorbibles. De este modo, la presente invención se puede usar para facilitar la regeneración de diversos tejidos y órganos. Por ejemplo, se considera que GDF-5 es un promotor muy eficaz de la formación ósea y de cartilago, así como de la formación de tejido conjuntivo (véanse, por ejemplo, el documento WO 95/04819, Hötten et al. 1996, Growth Factors 13, 65-74; Storm et al. 1994, Nature 368, 639-643; Chang et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 28227-28234) y de la formación de la adhesión del tejido conjuntivo (documento (EP 0.831.884).

45 En este contexto, GDF-5 es útil para aplicaciones relativas a las uniones entre elementos esqueléticos (véase, por ejemplo, Storm y Kingsley 1996, Development 122, 3969-3979). Un ejemplo para tejido conjuntivo es tendón y ligamento (Wolfman et al. 1997, J. Clin. Invest. 100, 321-330; Aspenberg y Forslund 1999, Acta Orthop Scand 70, 51-54; documento WO 95/16035). La proteína es útil para la reparación del menisco y espinal/disco intervertebral (Walsh et al. 2004, Spine 29, 156-63) y aplicaciones de fusión espinal (Spiro et al. 2000, Biochem Soc Trans. 28, 362-368). GDF-5 se puede aplicar beneficiosamente en aplicaciones dentales (dentales y periodontales) (véanse, por ejemplo, documento WO 95/04819; documento WO 93/16099; Morotome et al. 1998, Biochem Biophys Res Comm 244, 85-90) tal como la regeneración de dentina o ligamento periodontal. GDF-5 es también útil en la reparación de heridas de cualquier tipo. También es beneficiosa para promover el crecimiento tisular en el sistema neuronal y la supervivencia de por ejemplo neuronas dopaminérgicas. En este contexto, GDF-5 se puede usar para tratar trastornos neurodegenerativos como por ejemplo enfermedad de Parkinson y posiblemente también enfermedad de Alzheimer o tejidos de la corea de Huntington (véanse, por ejemplo, documento WO 97/03188; Krieglstein et al., (1995) J. Neurosci Res. 42, 724-732; Sullivan et al., (1997) Neurosci Lett 233, 73-76; Sullivan et al.

(1998), Eur. J. Neurosci 10, 3681-3688). GDF-5 permite mantener la función nerviosa o retener la función nerviosa en tejidos ya dañados. Por lo tanto, se considera que GDF-5 es un factor neurotrófico generalmente aplicable. También es útil para enfermedades del ojo, en particular retina, córnea y nervio óptico (véanse, por ejemplo, documento WO 97/03188; You et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 296-311), para el crecimiento del cabello y el tratamiento y diagnóstico de trastornos relacionados con la piel (documento WO 02/076494; Battaglia et al. 2002, Trans. Orthop. Res. Soc. 27, 584), y para la inducción de angiogénesis (Yamashita et al. 1997, Exp. Cell Res. 235, 218-26).

Como tal, una indicación preferida en la que se puede aplicar la presente invención es la curación de heridas. La invención es especialmente adecuada para facilitar el tratamiento de quemaduras, lesiones de la piel, daños de la piel o injertos de piel, heridas diabéticas y úlceras diabéticas, por ejemplo úlcera de pie diabético.

Otros ejemplos no limitantes en los que se puede aplicar la presente invención son la prevención o terapia de enfermedades asociadas con daño óseo y/o del cartílago o que afectan a enfermedad ósea y/o de cartílago, o generalmente situaciones en las que es deseable la formación de cartílago y/o hueso o para la función espinal, prevención o terapia de tejido dañado o enfermo asociado con tejido conjuntivo, incluyendo tendón y/o ligamento, tejido periodontal o dental, incluyendo implantes dentales, tejido neuronal, incluyendo tejido del SNC, y situaciones neuropatológicas, tejido del sistema sensorial, hígado, páncreas, tejido cardíaco, vaso sanguíneo, renal, uterino y tiroideo, membranas mucosas, endotelio, epitelio, para la promoción o inducción de crecimiento de nervios, regeneración tisular, angiogénesis, inducción de proliferación de células progenitoras y/o células de la médula ósea, para el mantenimiento de un estado de proliferación o diferenciación para el tratamiento o conservación de tejido o células para el trasplante de órganos o de tejidos, para la integridad del forro gastrointestinal, para el tratamiento de alteraciones en la fertilidad, anticoncepción o embarazo. Las enfermedades relativas a órganos sensoriales como el ojo también se han de incluir en la indicación preferida de la composición farmacéutica según la invención. Como enfermedades neuronales, nuevamente se pueden mencionar como ejemplos las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer.

Las actividades biológicas de proteínas relacionadas con GDF-5 se pueden determinar fácilmente con la ayuda de sistemas de ensayo consolidados. El más útil y preferido es un ensayo *in vitro* habitual conocido como ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) (Takuwa et al. 1989, Am. J. Physiol. 257, E797-E803). Se ha demostrado que las proteínas relacionadas con GDF-5 incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina, por ejemplo en células ROB-C26 (Yamaguchi et al. 1991, Calcif. Tissue Int. 49, 221-225) como se describe en el documento WO95/04819, en células ATDC5 embrionarias (Riken Gene Bank, ROB 0565), en células MCHT-1/26 estrómicas de ratón, y en células HPDL como se muestra en Nakamura et al. 2003, J. Periodontal Res. 38,597-605.

Las concentraciones de proteínas relacionadas con GDF-5 en las composiciones de la invención se deberían de escoger dependiendo del modo y período de aplicación. Básicamente, las proteínas relacionadas con GDF-5 son citocinas muy potentes que son capaces de provocar efectos incluso en cantidades exiguas. Como es fácilmente determinable con la ayuda de diferentes sistemas de ensayos biológicos tales como por ejemplo el ensayo de la fosfatasa alcalina descrito aquí, una concentración de 0,1 pg de GDF-5 por ml de la disolución respectiva es suficiente para provocar acciones biológicas. En consecuencia, se prefieren concentraciones bajas, es decir, que oscilan de 0,1 pg/ml a 1 ng/ml o menos, si las composiciones de la invención se administran repetidamente. Sin embargo, son logrables efectos máximos con concentraciones mayores del factor de crecimiento de 1-100 ng/ml. Un análisis de respuesta frente a la dosis dependiente de la acción de GDF-5 que utiliza un amplio intervalo de diluciones en serie (0,3-80 ng/ml, Farkas et al. 1997, Neurosci. Lett. 236, 120-122) dio resultados óptimos a una concentración de 20 ng de GDF-5 por ml. Los modelos de piel *in vivo* usan habitualmente dosis elevadas de 1-10 µg/ml. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, las composiciones de la invención contienen proteínas relacionadas con GDF-5 en concentraciones de entre 0,1 pg/ml y 10 µg/ml. Las dosis totales preferidas de proteínas relacionadas con GDF-5 en el caso de administraciones de una sola vez oscilan desde 10 ng hasta 10 µg.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a ingredientes y componentes adicionales descritos aquí.

Además, los tejidos pueden comprender lípidos naturales y sintéticos. Se pueden usar todos los tipos de aceites/lípidos naturales y sintéticos, en tanto que sean biocompatibles, por ejemplo aceites sintéticos o ésteres saturados tales como palmitato de etilo, palmitato de isopropilo, miristatos de alquilo tales como aquellos de isopropilo, butilo y cetilo, estearato de hexilo, triglicéridos (por ejemplo de ácidos octanoico o decanoico, triglicéridos de cadena media tales como Miglyol® 812), ricinoleato de cetilo, octanoato de estearilo (aceite de purcelina) y poliisobuteno hidrogenado, o aceites naturales tales como por ejemplo aceite de semilla de algodón, de haba de soja, de sésamo, de girasol, de alazor, de oliva, de aguacate, de cacahuete, de nuez, de almendra y de avellana.

Los tejidos también pueden comprender agentes emulsionantes, por ejemplo fosfolípidos tales como fosfatidilserina, fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina, monoglicéridos destilados, mono- y diglicéridos, ésteres de ácido acético con monoglicéridos, ésteres orgánicos de monoglicéridos, ésteres de sorbitán con ácidos grasos, ésteres de propilenglicol con ácidos grasos y ésteres de poliglicerol con ácidos grasos.

Otra proteína o proteínas bioactivas, además de las proteínas relacionadas con GDF-5, también pueden ser parte de los tejidos de la invención. Se ha mostrado que TGF-β incrementa el tamaño de dermis regenerada y estabiliza la

unión dermoepitelial (Fitzpatrick y Rosen, J. Cosmet. Laser Ther, 5: 25-34 (2003)). Un cóctel (TNS Recovery Complex, SkinMedica, Inc. Carlsbad, CA, USA) que contiene siete citocinas (VEGF, IL-6 y -8, HGF, PDGF- $\alpha$ , GCSF, y TGF- $\beta$ 1) derivadas de fibroblastos de prepucio neonatal se ensayó en un estudio multicéntrico. La evaluación mostró mejora en la textura de la piel, y menor número de arrugas (Rokhsar, C.K. et al., Dermatol. Surg. 31: 1166-1178 (2005)). El factor de crecimiento epidérmico recombinante (ReVive Skincare) y el factor de crecimiento vegetal N-furfuriladenina (quinetina) también están en el mercado. Todas estas proteínas se pueden usar junto con las proteínas relacionadas con GDF-5 de la invención. Otras proteínas que actúan sinérgicamente si se combinan con proteínas relacionadas con GDF-5 se describen en la bibliografía/patentes, por ejemplo en el documento WO 99/15191. Se prefieren neurotrofinas, proteínas hedgehog y proteínas de la familia del factor de crecimiento transformante, incluyendo, pero sin limitarse a, TGF-alfas, TGF-betas, activinas, BMPs y GDFs. Se prefiere especialmente una combinación con una cualquiera de EGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, NGF y/o GDNF.

Otros componentes aceptables en los tejidos son:

- Retinoides (derivados de vitamina A) que conservan la integridad de las superficies mucosales/epiteliales;
- Hidroxiácidos (ácidos carboxílicos orgánicos clasificados además en alfa-hidroxiácidos (AHA) y beta-hidroxiácidos (BHA)) que potencian el desprendimiento epidérmico, es decir, ácido glicólico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido mandélico, ácido málico, y ácido tartárico;
- Antioxidantes que contrarrestan los efectos dañinos de radicales libres, es decir, vitamina C, vitamina E, pantenol, ácido lipoico, ubiquinona, niacinamida, dimetilaminoetanol, trampas de espín, melatonina, catalasa, glutatión, superóxido dismutasa, peroxidasa, glucopiranosidos, polifenoles, cisteína, alantoina, furfuriladenina, ácido úrico, y carnosina;
- Agentes despigmentantes que alivian la hiperpigmentación, es decir, N-acetil-4-S-cisteinimilfenol, ácido kójico, arbutina, ácido azaleico, compuesto de la morera del papel, agentes exfoliantes químicos (resorcinol, ácido salicílico), fórmula de Kligman, fórmula de Pathak, y fórmula de Westerhofs;
- Sustancias botánicas, es decir, camomila, ginseng, ginkgo biloba, curcumina, glicirricina, capsaicina, y aloe vera;
- Glucosaminoglicanos que apoyan la regeneración epidérmica, es decir, ácido hialurónico;
- Anticelulíticos que median la lipólisis, es decir, estimulantes beta-adrenérgicos tales como teobromina, teofilina, aminofilina, cafeína, epinefrina, y estimulantes alfa1-adrenérgicos tales como yohimbina, piperoxano, y fentolamina;
- Hormonas, es decir, estrógenos, progesterona, testosterona, y hormona del crecimiento;
- Agentes antimicrobianos, es decir, triclosán, clorhexidina, povidona yodada, peróxido de hidrógeno, preparaciones anticropa, cinc piritiona;
- Filtros químicos de la radiación UV, es decir, 3-benciliden alcanfor (3-BC) o 4-metilbenciliden alcanfor (4-MBC);
- Además, tampones, estabilizantes, conservantes, agentes reductores, agentes quelantes antioxidantes, agentes que modifican la isotonicidad, desodorantes, anestésicos, adyuvantes, y aditivos que potencian la solubilidad.

Estos son solamente ejemplos no limitantes de posibles aditivos, y un trabajador experto en la técnica puede añadir fácilmente otros excipientes que están actualmente en uso que son considerados generalmente como seguros. Para más información sobre métodos para formular una composición farmacéutica y la selección de sustancias farmacéuticamente aceptables, por favor véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (luth ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), Wang et al. (1980), J. Parent. Drug Assn. 34 (6): 452-462 (1980); Wang et al. (1988), J. Parent. Sci. and Tech. 42: 4-26; Lachman et al. (1968), Drug and Cosmetic Industry 102(1): 36-38, 40 y 146-148; y Akers (1988) J. Parent. Sci. and Tech. 36 (5): 222-228.

Preferiblemente se eluye entre 1% y 100% de la sustancia biológicamente activa desde el tejido no tejido durante 3 a 7 días en contacto con fluidos corporales, plasma, medios o disolución tampón. Lo más preferible, se libera entre 10% y 100% de la sustancia bioactiva en condiciones fisiológicas (tampón PBS, suero fetal de ternera al 10%, 37°C).

Las siguientes figuras, ejemplos y protocolos de secuencias están destinadas a ilustrar adicionalmente la invención.

SEC ID NO: 1 muestra la secuencia de ADN, y SEC ID NO: 2 muestra la secuencia proteica del precursor de GDF-5 humana.

SEC ID NO: 3 muestra la secuencia de ADN, y SEC ID NO: 4 muestra la secuencia proteica de la GDF-5 monómera madura humana.

## Figuras

La FIG. 1 muestra características adicionales de la proteína precursora de GDF-5 humana según SEC ID NO: 2:

aa 001-381 pre-prodominio (letras en negrita)

5 aa 001-027 péptido señal (negrita y subrayado)

aa 382-501 parte de la proteína madura

aa 400-501 dominio de nudo de cistina (subrayado)

10 La FIG. 2 muestra una comparación de los dominios de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana (SEC ID NO: 2), GDF-6 humana (secuencia 26 de la patente U.S. nº 5.658.882) y GDF-7 humana (secuencia 2 de la patente U.S. nº 5.658.882). Los restos de aminoácidos que son idénticos en las tres moléculas están resaltados por bordes.

La FIG. 3 muestra una tabla con las identidades de secuencia de dominios de nudo de cistina de varias BMPs y GDFs conocidas con el dominio de nudo de cistina de GDF-5 humana.

15 La FIG. 4 muestra una imagen de microscopio de un material no tejido de gelatina/ácido hialurónico esterilizado mediante radiación gamma con rhGDF-5 (barra de la escala 200  $\mu$ m).

FIG. 5: muestra una imagen de microscopio de un material no tejido de gelatina/hidroxiapatita esterilizado mediante radiación gamma (barra de escala 200  $\mu$ m).

20 La FIG. 6 muestra la actividad biológica de GDF-5 liberada de materiales no tejidos de liberación rápida de gelatina, gelatina/ácido hialurónico y gelatina/colágeno I. La actividad biológica de GDF-5 se midió usando un ensayo de actividad de fosfatasa alcalina sobre células MCHT1/26 estrómicas de ratón como se describe en el ejemplo 1. Las células MCHT1/26 se estimularon con 4,8-1200 ng/ml de GDF-5 disuelta en HCl 10 mM (curva patrón).

25 La liberación de GDF-5 desde los materiales no tejidos se analizó colocando los materiales no tejidos directamente sobre células MCHT1/26 y paralelamente con medio acondicionado, producido mediante liberación de GDF-5 en medio de cultivo celular durante 3 días a 37°C. La actividad de ALP se midió mediante la conversión de p-nitrofenolfosfato a p-nitrofenolato a 405 nM. Los datos son valores promedio de tres medidas independientes.

30 La tabla adjunta muestra las concentraciones calculadas de GDF-5 liberada (ng/ml) a partir de los materiales no tejidos correspondientes, y la recuperación de GDF-5 dada en %. Para el cálculo, se supuso que se liberaron completamente 2  $\mu$ g de GDF-5 revestida sobre materiales no tejidos en 160  $\mu$ l de medio de cultivo celular; esto corresponde a una concentración de GDF-5 de 12500 ng/ml (valor de liberación de 100% para el ensayo con materiales no tejidos estudiados directamente sobre las células). En el caso de la cuantificación del medio acondicionado sobre las células, 40  $\mu$ l de medio de cultivo celular liberado corresponde a una concentración de GDF-5 de 2500 ng/ml (valor de liberación de 100% para el ensayo con medio de cultivo celular acondicionado estudiado sobre las células).

40 La FIG. 7 muestra la actividad biológica de GDF-5 liberada de materiales no tejidos de liberación lenta de polivinilpirrolidona, polióxido de etileno y gelatina/hidroxiapatita. La actividad biológica de GDF-5 se midió usando un ensayo de actividad de fosfatasa alcalina sobre células MCHT1/26 estrómicas de ratón como se describe en el ejemplo 1. Las células MCHT1/26 se estimularon con 4,8-1200 ng/ml de GDF-5 disuelta en HCl 10 mM (curva patrón).

45 La liberación de GDF-5 desde los materiales no tejidos se analizó colocando los materiales no tejidos directamente sobre células MCHT1/26 y paralelamente con medio acondicionado, producido mediante liberación de GDF-5 en medio de cultivo celular durante 3 días a 37°C. La actividad de ALP se midió mediante la conversión de p-nitrofenolfosfato a p-nitrofenolato a 405 nM. Los datos son valores promedio de tres medidas independientes.

50 La tabla adjunta muestra las concentraciones calculadas de GDF-5 liberada (ng/ml) a partir de los materiales no tejidos correspondientes, y la recuperación de GDF-5 dada en %. Para el cálculo, se supuso que se liberaron completamente 2  $\mu$ g de GDF-5 revestida sobre materiales no tejidos en 160  $\mu$ l de medio de cultivo celular; esto corresponde a una concentración de GDF-5 de 12500 ng/ml (valor de liberación de 100% para el ensayo con materiales no tejidos estudiados directamente sobre las células). En el caso de la cuantificación del medio acondicionado sobre las células, 40  $\mu$ l de medio de cultivo celular liberado corresponde a una concentración de GDF-5 de 2500 ng/ml (valor de liberación de 100% para el ensayo con medio de cultivo celular acondicionado estudiado sobre las células).

La FIG. 8 muestra la actividad biológica y recuperación de GDF-5 liberada a partir de materiales no tejidos antes y después de la esterilización mediante radiación gamma. La actividad biológica se midió usando un ensayo de actividad de fosfatasa alcalina sobre células MCHT1/26 estrictas de ratón. La recuperación de GDF-5 liberada a partir de materiales no tejidos se cuantificó mediante ELISA de sándwich específico para GDF-5. La liberación de GDF-5 a partir de los materiales no tejidos se analizó colocando materiales no tejidos en medio de cultivo celular durante 24 horas a 37°C. Una cantidad igual de GDF-5 sin material no tejido se incubó en medio de cultivo celular en condiciones idénticas, y sirvió como control positivo. La actividad de ALP se midió mediante la conversión de p-nitrofenolfosfato en p-nitrofenolato a 405 nm. Los datos son valores promedio de al menos tres medidas independientes. Para el ELISA, la recuperación de GDF-5 se cuantificó mediante la cantidad de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante unida al anticuerpo secundario biotinilado. La detección se llevó a cabo mediante conversión enzimática del sustrato dihidrocloruro de tetrametilbencidina, seguido de fotometría a 450 nm.

La tabla muestra la actividad biológica calculada, medida mediante el ensayo de actividad de ALP, dada en % (el valor de OD del control positivo se ajustó a 100%). Para los datos de ELISA, la tabla muestra la recuperación de GDF-5 a partir del material no tejido, dada en %. Para el cálculo, se supuso que se liberaron completamente 200 ng de GDF-5 incorporada en el material no tejido en 200 µl de medio de cultivo celular; esto corresponde a una concentración de GDF-5 de 1000 ng/ml (valor de 100%).

La FIG. 9 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de GDF-5 esterilizada incorporada en materiales no tejidos almacenados a temperatura ambiente, 4°C y -80°C durante un período de tiempo de 1 día hasta 3 meses. El día 0 es el punto de comienzo del estudio de estabilidad. La estabilidad de GDF-5 se investigó midiendo la recuperación de GDF-5 liberada a partir de materiales no tejidos esterilizados, mediante ELISA de sándwich específico para GDF-5. La liberación de GDF-5 desde los materiales no tejidos se analizó colocando materiales no tejidos en medio de cultivo celular durante 24 horas a 37°C. Se transfirió una cantidad definida de medio de liberación al sistema de ELISA, en el que la recuperación de GDF-5 se cuantificó mediante la cantidad de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante unida al anticuerpo secundario biotinilado. La detección se llevó a cabo mediante conversión enzimática del sustrato dihidrocloruro de tetrametilbencidina, seguido de fotometría a 450 nm. La tabla muestra la recuperación de GDF-5 a partir de material no tejido dada en %, calculada a partir de GDF-5 liberada.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Materiales no tejidos que muestran un perfil de liberación rápida de GDF-5

Los materiales no tejidos que muestran liberación rápida de GDF-5 que consisten en gelatina pura, gelatina y ácido hialurónico, o gelatina y colágeno I se produjeron según lo siguiente:

Se preparó una disolución acuosa al 22,5% (p/p) de gelatina PIGSKIN tipo A (Gelita AG, Eberbach, Alemania) mezclando gelatina y agua. Esta mezcla se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente para que se hinchara. Después, la disolución de gelatina se trató durante una hora con ultrasonidos a 60°C y se calentó hasta 80°C. La disolución permaneció a 80°C durante 2 horas, y se enfrió nuevamente hasta 60°C. Dependiendo de la composición de material no tejido deseada, se mezclaron en la disolución 12,5% (peso por peso de gelatina) de ácido hialurónico (cristalhyal, Soliance, Francia) o gel de colágeno I (DM04, Devro Medical, Australia), y se agitó con una espátula durante un minuto a fin de disolver o dispersar. La disolución a base de gelatina se alimentó mediante una bomba de jeringuilla en el dispositivo de hilado descrito en el documento DE 10 2005 048 939 A.

En el caso de incorporación del factor de crecimiento en los filamentos, la disolución de GDF-5 (1200 µg/ml de tampón de acetato de sodio 5 mM) se mezcló directamente en la disolución antes de pasar al recipiente del dispositivo de hilado. El recipiente se calentó hasta 50°C y se hizo girar a 3500 rpm. Debido a la fuerza centrípeta, el material líquido se expulsó como chorros de líquido desde los orificios, y se formaron fibras. Estas fibras se estiraron mediante un mecanismo de succión debajo del recipiente del dispositivo de hilado, y se recogieron como material no tejido. Los materiales no tejidos se recogieron y se perforaron hasta el tamaño de muestra final (3 X 3 mm). Se obtuvieron muestras no tejidas que presentan liberaciones rápidas de GDF-5, que después se esterilizaron mediante radiación gamma (dosis de radiación 25 kGy).

La liberación de GDF-5 a partir de las muestras no tejidas se midió usando un ensayo de actividad de fosfatasa alcalina (ALP) sensible a GDF-5 en células MCHT1/26 estrictas de ratón (Hoechst Japan Ltd., Kawagoe, Japón). Las propiedades de liberación y la compatibilidad celular de los materiales no tejidos se ensayaron a) directamente en las células y b) con medio acondicionado. Para la producción del medio acondicionado, las muestras no tejidas se incubaron durante tres días a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en 200 µl de medio de cultivo celular (alfa-MEM suplementado con L-glutamina 2 mM y 10% de suero fetal de ternera) sin células. Tras el período de incubación, el medio acondicionado y las muestras no tejidas se analizaron en células MCHT1/26.

Se colocaron células MCHT1/26 a 4,5 x 10<sup>3</sup> células por pocillo en placas de 96 multipocillos en medio de cultivo celular (alfa-MEM, (Sigma, Taufkirchen, Alemania) suplementado con L-glutamina 2 mM, (Invitrogen, Karlsruhe,

Alemania) y 10% de suero fetal de ternera (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Después de 24 h, las células se incubaron con 40  $\mu$ l de medio de liberación acondicionado suplementado con 120  $\mu$ l de medio de cultivo celular reciente. En paralelo, las muestras no tejidas se colocaron directamente sobre las células con 160  $\mu$ l de medio de cultivo celular. Después de 72 h, las células se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se extrajeron con tampón 1 de fosfato alcalino, que contiene 1% de Nonidet P40, 0,1 M de glicina pH 9,6 (Sigma, Taufkirchen, Alemania), 1 mM de  $MgCl_2$  y 1 mM de  $ZnCl_2$  (Merck, Darmstadt, Alemania). Para lograr la lisis celular a conciencia, las células se incubaron 15-18 h a 37°C. La actividad de la enzima fosfatasa alcalina se evaluó con 10 mM de fosfato de p-nitrofenilo (Pierce, Bonn, Alemania) como sustrato en 0,1 M de glicina pH 9,6, 1 mM de  $MgCl_2$  y 1 mM de  $ZnCl_2$ . Después de una incubación durante 30 min. a 37°C, la absorbancia se midió con un lector de microplacas automático (Tecan Spectra Rainbow, TECAN, Crailsheim, Alemania) a 405 nM bajo consideración de resta del valor del blanco. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Todas las muestras no tejidas se toleraron bien por la estirpe celular marcadora MCHT1/26. Los materiales no tejidos con GDF-5 mostraron liberación rápida con material de gelatina, de 22% cuando las muestras no tejidas se colocaron directamente sobre las células y de 10% para medio acondicionado. Para la combinación no tejida gelatina/ácido hialurónico, la liberación de GDF-5 directamente en las células fue 36%, y con medio acondicionado la liberación fue 32%. Para la combinación no tejida gelatina/colágeno I, la liberación de GDF-5 directamente en las células fue 54%, y con el medio acondicionado la liberación fue 55%.

Tales muestras que presentan liberación rápida de GDF-5 se pueden usar para la curación de heridas, neuroprotección y angiogénesis, ya que se liberan dosis elevadas del factor de crecimiento activo en el entorno de la herida durante los primeros tres días.

### **Ejemplo 2: Materiales no tejidos que muestran un perfil de liberación lenta de GDF-5**

Los materiales no tejidos que muestran una liberación lenta de GDF-5 que consisten en polivinilpirrolidona (A.), polióxido de etileno (B.) o gelatina e hidroxiapatita (C.) se produjeron según lo siguiente.

En primer lugar, se prepararon las disoluciones precursoras líquidas.

A.) Se introdujeron 40 g de polivinilpirrolidona (Kollidon F 90, BASF AG., Alemania) en un vaso de precipitados y se añadió un agitador magnético y 160 g de agua. Después, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y se calentó hasta 80°C. Finalmente, la disolución se trató durante una hora con ultrasonidos antes de que se volviese a enfriar hasta 60°C.

B.) Se disolvieron 15 g de polióxido de etileno (peso molecular 1000 kDa, BASF AG., Alemania) en 185 g de agua a temperatura ambiente, y se calentó hasta 60°C.

C.) Se preparó una disolución acuosa al 22,5% (p/p) de gelatina PIGSKIN tipo A mezclando gelatina y agua. Esta mezcla se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente a fin de hincharla. Después, la disolución de gelatina se trató durante una hora con ultrasonidos a 60°C. Se mezclaron 2,5% de nanopartículas de hidroxiapatita (número de producto 677418, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Alemania) (peso por peso de gelatina) en la disolución usando una espátula. Después, la mezcla se calentó hasta 80°C y permaneció durante 2 horas a esta temperatura antes de que se enfriase de nuevo hasta 60°C.

Las disoluciones o dispersiones se alimentaron mediante una bomba de jeringuilla en el dispositivo de hilado descrito en el documento DE 10 2005 048 939 A. En el caso de la incorporación del factor de crecimiento en los filamentos, la disolución de GDF-5 (1200  $\mu$ g/ml de tampón de acetato de sodio 5 mM) se mezcló directamente en la disolución antes de entrar en el recipiente del dispositivo de hilado. El recipiente se calentó hasta 60°C y se hizo girar a 4500 rpm. Debido a la fuerza centrípeta, el material líquido se expulsó como chorros de líquido desde los orificios, y se formaron fibras. Estas fibras se estiraron mediante un mecanismo de succión debajo del recipiente del dispositivo de hilado, y se recogieron como material no tejido. Los materiales no tejidos se recogieron y se perforaron hasta el tamaño de 3 X 3 mm. Se obtuvieron muestras no tejidas que muestran liberaciones lentas de GDF-5, que después se esterilizaron mediante radiación gamma (dosis de radiación 25 kGy).

La medida de las muestras no tejidas con GDF-5 se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1. La liberación de GDF-5 a partir de las muestras no tejidas se midió usando un ensayo de actividad de fosfatasa alcalina sobre células MCHT1/26 estrictas de ratón. Las propiedades de liberación y la compatibilidad celular de los prototipos no tejidos se ensayaron a) directamente en las células y b) con medio acondicionado. Los resultados para las muestras no tejidas de liberación lenta polivinilpirrolidona, polióxido de etileno y gelatina/hidroxiapatita se muestran en la Figura 7.

Los materiales no tejidos con GDF-5 mostraron liberación lenta con polivinilpirrolidona (PVP) de 1% cuando las muestras no tejidas se colocaron directamente sobre las células, y de 12% para el medio acondicionado. Para el material no tejido polióxido de etileno (PEO), la liberación de GDF-5 directamente sobre las células fue 1%, y con el medio acondicionado la liberación fue 6%. Para la combinación no tejida gelatina/hidroxiapatita, la liberación de GDF-5 directamente sobre las células fue 5%, y con el medio acondicionado la liberación fue 19%.

Tales muestras que presentan liberación lenta de GDF-5 se pueden usar para la regeneración ósea o de cartílago ya

que solamente se liberan durante los primeros tres días cantidades pequeñas del factor de crecimiento activo.

### **Ejemplo 3: La tecnología no tejida protege GDF-5 incorporada frente a las condiciones de esterilización desestabilizantes**

5 Se investigó la influencia de la esterilización sobre la estabilidad de GDF-5 incorporada en material no tejido. Por lo tanto, la recuperación y la actividad biológica de GDF-5 incorporada en materiales no tejidos se ensayó antes y después del proceso de esterilización. Para este fin, se produjeron materiales no tejidos con GDF-5 incorporada como se describe en el ejemplo 1. De forma breve, se mezcló una disolución de GDF-5 de 200 µg/ml de tampón de acetato de sodio 5 mM en una mezcla de gelatina/colágeno I, dando materiales no tejidos de 200 ng de GDF-5/3 x 3 mm. Los materiales no tejidos se perforaron hasta un tamaño de muestra de 3 x 3 mm, y se esterilizaron mediante radiación gamma (dosis de radiación 25 kGy).

La recuperación de GDF-5 liberada a partir de los materiales no tejidos se cuantificó mediante ELISA, y la actividad biológica de GDF-5 se midió mediante la inducción de fosfatasa alcalina (ensayo de actividad de ALP).

15 La medida de la bioactividad de GDF-5 de los materiales no tejidos no esterilizados y esterilizados, usando el ensayo de ALP, se describe en el ejemplo 1. La cantidad de GDF-5 liberada de materiales no tejidos antes y después de la esterilización se cuantificó según lo siguiente: los materiales no tejidos con GDF-5 incorporada se incubaron durante 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en 200 µl de medio de cultivo celular (alfa-MEM suplementado con L-glutamina 2 mM y 10% de suero fetal de ternera). Como control positivo, se incubaron 200 ng de GDF-5 sin material no tejido, en condiciones idénticas. Tras el período de incubación, el medio de liberación y el control positivo se diluyeron 1:2500 y 1:4000 y se transfirieron a un ELISA de sándwich específico para GDF-5 (Biopharm, Heidelberg, Alemania) El ELISA se basa en dos anticuerpos monoclonales para GDF-5. La enzima estreptavidina-peroxidasa de rábano picante se unió al anticuerpo secundario biotinilado. La detección se llevó a cabo mediante conversión enzimática del sustrato dihidrocloruro de tetrametilbencidina, que se determinó mediante fotometría a 450 nm. Las muestras de liberación con GDF-5 y el control positivo se cuantificaron usando una serie de ensayos de patrones de GDF-5 que oscilan desde 50 hasta 500 pg/ml. Los resultados se muestran en la Figura 8.

25 Tras la esterilización con radiación gamma (dosis de radiación 25 kGy) de materiales no tejidos con GDF-5 incorporada, más del 95% de GDF-5 fue biológicamente activa, demostrado mediante el ensayo de actividad de ALP sobre células MCHT1/26. Además, la recuperación de GDF-5 incorporada a partir de material no tejido tras la esterilización fue 95%, cuantificado mediante el método de ELISA específico para GDF-5.

### **Ejemplo 4: GDF-5 incorporada en materiales no tejidos muestra estabilidad a largo plazo a temperaturas de almacenamiento bajas y altas**

30 Se investigó la influencia de la duración del almacenamiento y de la temperatura del almacenamiento sobre la estabilidad de GDF-5 incorporada en material no tejido. Los materiales no tejidos con GDF-5 incorporada se almacenaron a temperatura ambiente, 4°C y -80°C durante un período de tiempo hasta 3 meses.

35 A fin de ensayar la estabilidad de GDF-5 incorporada en materiales no tejidos, las muestras no tejidas se prepararon en el día 0 y se almacenaron a temperatura ambiente, a 4°C y a -80°C. Después de un período de almacenamiento de 1 día, 3 días, 2 semanas, 4 semanas, y 3 meses, las muestras de las condiciones de temperatura respectivas se analizaron para determinar la estabilidad mediante el método de ELISA.

40 Los materiales no tejidos con GDF-5 incorporada se produjeron como se describe en el ejemplo 1. De forma breve, una disolución de GDF-5 de 200 µg/ml de tampón de acetato de sodio 5 mM se mezcló en una mezcla de gelatina/colágeno I, dando materiales no tejidos de 200 ng de GDF-5/3 x 3 mm. Los materiales no tejidos se perforaron hasta un tamaño de muestra de 3 x 3 mm, y se esterilizaron mediante radiación gamma (dosis de radiación 25 kGy). La estabilidad de GDF-5 se analizó midiendo la recuperación de la GDF-5 activa liberada a partir de los materiales no tejidos en el medio de cultivo celular. Los materiales no tejidos con GDF-5 incorporada se incubaron durante 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en 200 µl de medio de cultivo celular (alfa-MEM suplementado con L-glutamina 2 mM y 10% de suero fetal de ternera). Tras el período de incubación, el medio de liberación se diluyó 1:2500 y 1:4000 y se transfirió a un ELISA de sándwich específico para GDF-5 (Biopharm, Heidelberg, Alemania). Las muestras de liberación con GDF-5 se cuantificaron usando una serie de ensayos de patrones de GDF-5 que oscilan de 50 a 500 pg/ml. Los resultados para el ELISA se muestran en la Figura 9.

50 La recuperación de GDF-5 de materiales no tejidos esterilizados en el día 0 (punto de comienzo del estudio de estabilidad) fue mayor de 90%. La estabilidad de GDF-5 incorporada en materiales no tejidos fue casi idéntica para las condiciones de temperatura investigadas (temperatura ambiente, 4°C y -80°C). Tras un período de almacenamiento de 3 meses a temperatura ambiente, no se pudo observar pérdida de estabilidad.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen Entwicklung von Pharmaka mbH

55 <120> Vendaje para heridas biorresorbible

ES 2 539 405 T3

<130> 50148P EP

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

5 <211> 2703

<212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (640)..(2142)

<223> precursor de GDF-5

<400> 1

```

ccatggcctc gaaagggcag cggtgatttt tttcacataa atatatcgca cttaaatgag      60
tttagacagc atgacatcag agagtaatta aattggtttg ggttgaatt ccgtttccaa      120
ttcctgagtt caggtttgta aaagattttt ctgagcacct gcaggcctgt gagtgtgtgt      180
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtga agtattttca ctggaaagga ttcaaaacta      240
gggggaaaaa aaaactggag cacacaggca gcattacgcc attcttcctt cttggaaaaa      300
tccctcagcc ttatacaagc ctccttcaag ccctcagtca gttgtgcagg agaaaggggg      360
cggttggctt tctcctttca agaacgagtt attttcagct gctgactgga gacggtgcac      420
gtctggatac gagagcattt cactatggg actggataca aacacacacc cggcagactt      480
caagagtctc agactgagga gaaagccttt ccttctgctg ctactgctgc tgccgctgct      540
tttgaaagtc cactcctttc atggtttttc ctgccaaacc agaggcacct ttgctgctgc      600
cgctgttctc tttggtgtca ttcagcggct ggccagagg atg aga ctc ccc aaa      654
                               Met Arg Leu Pro Lys
                               1           5

ctc ctc act ttc ttg ctt tgg tac ctg gct tgg ctg gac ctg gaa ttc      702
Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp Leu Asp Leu Glu Phe
                               10           15           20

atc tgc act gtg ttg ggt gcc cct gac ttg ggc cag aga ccc cag ggg      750
Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly Gln Arg Pro Gln Gly
                               25           30           35

acc agg cca gga ttg gcc aaa gca gag gcc aag gag agg ccc ccc ctg      798
Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys Glu Arg Pro Pro Leu
                               40           45           50

gcc cgg aac gtc ttc agg cca ggg ggt cac agc tat ggt ggg ggg gcc      846
Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser Tyr Gly Gly Gly Ala
                               55           60           65

```

ES 2 539 405 T3

acc aat gcc aat gcc agg gca aag gga ggc acc ggg cag aca gga ggc Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr Gly Gln Thr Gly Gly 70 75 80 85	894
ctg aca cag ccc aag aag gat gaa ccc aaa aag ctg ccc ccc aga ccg Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys Leu Pro Pro Arg Pro 90 95 100	942
ggc ggc cct gaa ccc aag cca gga cac cct ccc caa aca agg cag gct Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro Gln Thr Arg Gln Ala 105 110 115	990
aca gcc cgg act gtg acc cca aaa gga cag ctt ccc gga ggc aag gca Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala 120 125 130	1038
ccc cca aaa gca gga tct gtc ccc agc tcc ttc ctg ctg aag aag gcc Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe Leu Leu Lys Lys Ala 135 140 145	1086
agg gag ccc ggg ccc cca cga gag ccc aag gag ccg ttt cgc cca ccc Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu Pro Phe Arg Pro Pro 150 155 160 165	1134
ccc atc aca ccc cac gag tac atg ctc tcg ctg tac agg acg ctg tcc Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ser 170 175 180	1182
gat gct gac aga aag gga ggc aac agc agc gtg aag ttg gag gct ggc Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val Lys Leu Glu Ala Gly 185 190 195	1230
ctg gcc aac acc atc acc agc ttt att gac aaa ggg caa gat gac cga Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys Gly Gln Asp Asp Arg 200 205 210	1278
ggt ccc gtg gtc agg aag cag agg tac gtg ttt gac att agt gcc ctg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe Asp Ile Ser Ala Leu 215 220 225	1326
gag aag gat ggg ctg ctg ggg gcc gag ctg cgg atc ttg cgg aag aag Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg Ile Leu Arg Lys Lys 230 235 240 245	1374
ccc tcg gac acg gcc aag cca gcg gcc ccc gga ggc ggg cgg gct gcc Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly Gly Gly Arg Ala Ala 250 255 260	1422
cag ctg aag ctg tcc agc tgc ccc agc ggc cgg cag ccg gcc tcc ttg Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg Gln Pro Ala Ser Leu 265 270 275	1470
ctg gat gtg cgc tcc gtg cca ggc ctg gac gga tct ggc tgg gag gtg Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Gly Trp Glu Val 280 285 290	1518
ttc gac atc tgg aag ctc ttc cga aac ttt aag aac tcg gcc cag ctg Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys Asn Ser Ala Gln Leu 295 300 305	1566
tgc ctg gag ctg gag gcc tgg gaa cgg ggc agg gcc gtg gac ctc cgt Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg Ala Val Asp Leu Arg 310 315 320 325	1614
ggc ctg ggc ttc gac cgc gcc gcc cgg cag gtc cac gag aag gcc ctg	1662

ES 2 539 405 T3

Gly	Leu	Gly	Phe	Asp	Arg	Ala	Ala	Arg	Gln	Val	His	Glu	Lys	Ala	Leu	
				330					335					340		
ttc	ctg	gtg	ttt	ggc	cgc	acc	aag	aaa	cgg	gac	ctg	ttc	ttt	aat	gag	1710
Phe	Leu	Val	Phe	Gly	Arg	Thr	Lys	Lys	Arg	Asp	Leu	Phe	Phe	Asn	Glu	
			345					350					355			
att	aag	gcc	cgc	tct	ggc	cag	gac	gat	aag	acc	gtg	tat	gag	tac	ctg	1758
Ile	Lys	Ala	Arg	Ser	Gly	Gln	Asp	Lys	Thr	Val	Tyr	Glu	Tyr	Leu		
		360					365					370				
ttc	agc	cag	cgg	cga	aaa	cgg	cgg	gcc	cca	ctg	gcc	act	cgc	cag	ggc	1806
Phe	Ser	Gln	Arg	Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ala	Thr	Arg	Gln	Gly	
	375					380					385					
aag	cga	ccc	agc	aag	aac	ctt	aag	gct	cgc	tgc	agt	cgg	aag	gca	ctg	1854
Lys	Arg	Pro	Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	Ala	Arg	Cys	Ser	Arg	Lys	Ala	Leu	
390					395					400				405		
cat	gtc	aac	ttc	aag	gac	atg	ggc	tgg	gac	gac	tgg	atc	atc	gca	ccc	1902
His	Val	Asn	Phe	Lys	Asp	Met	Gly	Trp	Asp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	
			410						415					420		
ctt	gag	tac	gag	gct	ttc	cac	tgc	gag	ggg	ctg	tgc	gag	ttc	cca	ttg	1950
Leu	Glu	Tyr	Glu	Ala	Phe	His	Cys	Glu	Gly	Leu	Cys	Glu	Phe	Pro	Leu	
			425					430					435			
cgc	tcc	cac	ctg	gag	ccc	acg	aat	cat	gca	gtc	atc	cag	acc	ctg	atg	1998
Arg	Ser	His	Leu	Glu	Pro	Thr	Asn	His	Ala	Val	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	
		440					445					450				
aac	tcc	atg	gac	ccc	gag	tcc	aca	cca	ccc	acc	tgc	tgt	gtg	ccc	acg	2046
Asn	Ser	Met	Asp	Pro	Glu	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Cys	Cys	Val	Pro	Thr	
	455					460					465					
cgg	ctg	agt	ccc	atc	agc	atc	ctc	ttc	att	gac	tct	gcc	aac	aac	gtg	2094
Arg	Leu	Ser	Pro	Ile	Ser	Ile	Leu	Phe	Ile	Asp	Ser	Ala	Asn	Asn	Val	
470					475					480					485	
gtg	tat	aag	cag	tat	gag	gac	atg	gtc	gtg	gag	tcg	tgt	ggc	tgc	agg	2142
Val	Tyr	Lys	Gln	Tyr	Glu	Asp	Met	Val	Val	Glu	Ser	Cys	Gly	Cys	Arg	
			490						495					500		
tagcagcact	ggcctctgt	cttcctgggt	ggcacatccc	aagagcccct	tcctgcactc											2202
ctggaatcac	agaggggtca	ggaagctgtg	gcaggagcat	ctacacagct	tgggtgaaag											2262
gggattccaa	taagcttgct	cgctctctga	gtgtgacttg	ggctaaaggc	ccccttttat											2322
ccacaagttc	ccctggctga	ggattgctgc	ccgtctgctg	atgtgaccag	tggcaggcac											2382
aggtccaggg	agacagactc	tgaatgggac	tgagtcccag	gaaacagtgc	tttccgatga											2442
gactcagccc	accattttctc	ctcacctggg	ccttctcagc	ctctggactc	tcctaagcac											2502
ctctcaggag	agccacaggt	gccactgcct	cctcaaatca	catttggtgcc	tgggtgacttc											2562
ctgtccctgg	gacagttgag	aagctgactg	ggcaagagtg	ggagagaaga	ggagagggct											2622
tggatagagt	tgaggagtgt	gaggctgtta	gactgttaga	tttaaatgta	tattgatgag											2682
ataaaaagca	aaactgtgcc	t														2703

<210> 2

<211> 501

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 2

ES 2 539 405 T3

Met Arg Leu Pro Lys Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp  
1 5 10 15

Leu Asp Leu Glu Phe Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly  
20 25 30

Gln Arg Pro Gln Gly Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys  
35 40 45

Glu Arg Pro Pro Leu Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser  
50 55 60

Tyr Gly Gly Gly Ala Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr  
65 70 75 80

Gly Gln Thr Gly Gly Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys  
85 90 95

Leu Pro Pro Arg Pro Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro  
100 105 110

Gln Thr Arg Gln Ala Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu  
115 120 125

Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe  
130 135 140

Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu  
145 150 155 160

Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu  
165 170 175

Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val  
180 185 190

Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys  
195 200 205

Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe  
210 215 220

Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg  
225 230 235 240

ES 2 539 405 T3

Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly  
 245 250 255

Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg  
 260 265 270

Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly  
 275 280 285

Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys  
 290 295 300

Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg  
 305 310 315 320

Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val  
 325 330 335

His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp  
 340 345 350

Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr  
 355 360 365

Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu  
 370 375 380

Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys  
 385 390 395 400

Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp  
 405 410 415

Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu  
 420 425 430

Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val  
 435 440 445

Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr  
 450 455 460

Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp  
 465 470 475 480

Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu  
 485 490 495

Ser Cys Gly Cys Arg  
 500

<210> 3

<211> 360

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 539 405 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<223> GDF-5 monómera madura humana

5 <400> 3

gca cca cta gca act cgt cag ggc aag cga ccc agc aag aac ctt aag Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys 1 5 10 15	48
gct cgc tgc agt cgg aag gca ctg cat gtc aac ttc aag gac atg ggc Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly 20 25 30	96
tgg gac gac tgg atc atc gca ccc ctt gag tac gag gct ttc cac tgc Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys 35 40 45	144
gag ggg ctg tgc gag ttc cca ttg cgc tcc cac ctg gag ccc acg aat Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn 50 55 60	192
cat gca gtc atc cag acc ctg atg aac tcc atg gac ccc gag tcc aca His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr 65 70 75 80	240
cca ccc acc gcc tgt gtg ccc acg cga ctg agt ccc atc agc atc ctc Pro Pro Thr Ala Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu 85 90 95	288
ttc att gac tct gcc aac aac gtg gtg tat aag cag tat gag gac atg Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met 100 105 110	336
gtc gtg gag tcg tgt ggc tgt agg Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg 115 120	360

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 539 405 T3

Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys  
1 5 10 15

Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly  
20 25 30

Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys  
35 40 45

Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn  
50 55 60

His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr  
65 70 75 80

Pro Pro Thr Ala Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu  
85 90 95

Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met  
100 105 110

Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg  
115 120

<210> 5

<211> 102

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

<223> dominio de nudo de cistina de GDF-6

10 <400> 5

Cys Ser Lys Lys Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp  
1 5 10 15

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly  
20 25 30

Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala  
35 40 45

Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr Pro Pro  
50 55 60

Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile  
65 70 75 80

Asp Ala Gly Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val  
85 90 95

Glu Ser Cys Gly Cys Arg  
100

<210> 6

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

<223> dominio de nudo de cistina de GDF-7

<400> 6

```

Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp
1          5          10          15
Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly
          20          25          30
Leu Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala
          35          40          45
Ile Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala
          50          55          60
Ser Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile
65          70          75          80
Asp Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val
          85          90          95
Glu Ala Cys Gly Cys Arg
          100
    
```

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un tejido no tejido que comprende:
 

5                    fibras de una materia prima fibrosa que comprende polímeros biorresorbibles y/o biocompatibles, incluyendo las fibras al menos una sustancia biológicamente activa, que está distribuida en las fibras, en las que la sustancia biológicamente activa es una proteína relacionada con GDF-5, que es una proteína que comprende un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de al menos 60% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana según los aminoácidos 400-501 de SEC ID NO:2.
2. El tejido no tejido de la reivindicación 1, en el que la proteína biológicamente activa se distribuye adicionalmente en las fibras.
- 10   3. El tejido no tejido según la reivindicación 2, en el que la proteína relacionada con GDF-5 comprende un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana.
- 15   4. El tejido no tejido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la materia prima fibrosa se selecciona del grupo que consiste en polímeros naturales, polímeros sintéticos, y polímeros derivados de materias primas fósiles, cada uno de los cuales puede estar modificado o no modificado, y sus combinaciones.
- 20   5. El tejido no tejido según la reivindicación 4, en el que los polímeros naturales se seleccionan del grupo que consiste en péptidos como colágeno, gelatina, fibrina, caseína, o polisacáridos como dextrano, celulosa, almidón, quitina, quitosano, alginato y ácido hialurónico, o polinucleótidos, así como polímeros sintéticos como polilactida (PLA), poliglicolida (PGA), policaprolactona (PCL), polivinilpirrolidona (PVP), polióxido de etileno (PEO), polietilenglicol (PEG), polihidroxiésteres, o sus combinaciones.
- 25   6. Un tejido no tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se dispersa una sustancia en los filamentos.
7. El tejido no tejido según la reivindicación 6, en el que la sustancia dispersa se selecciona del grupo de sustancias inorgánicas como hidroxapatita y/o fosfato tricálcico  $\beta$ .
- 30   8. El tejido no tejido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tejido no tejido es producible o se produce mediante un método de hilado por rotación.
9. El tejido no tejido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que al menos algunas de las fibras están retorcidas entre sí, entrelazadas entre sí, y tienen una estructura retorcida, preferiblemente en el que al menos algunas de las fibras están entrelazadas entre sí y forman al menos un haz de fibras.
- 35   10. El tejido no tejido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que al menos algunas de las fibras son nanofibras.
11. El tejido no tejido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el tejido incluye una estructura de poro abierto que tiene una permeabilidad al aire entre 0,01 y 100 l/min\*cm<sup>2</sup>.
- 40   12. El tejido no tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que al menos 10% de la sustancia biológicamente activa se eluye en 3 a 7 días en condiciones fisiológicas (tampón PBS, 10% de suero fetal de ternera, 37°C).
- 45   13. El tejido no tejido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la curación mejorada de heridas que incluyen úlceras diabéticas y otras úlceras, quemaduras, lesiones de la piel y/o injertos de piel, para la inducción de crecimiento de nervios o prevención de muerte neuronal, para la promoción de angiogénesis, para la inducción de proliferación de células progenitoras y/o células de la médula ósea; para el mantenimiento de un estado de proliferación o diferenciación para el tratamiento o conservación de tejido o células para el trasplante de órganos o de tejidos, para el tratamiento de trastornos degenerativos relacionados con las uniones a elementos esqueléticos y/o para reparación del menisco y/o espinal/disco intervertebral.
- 50   14. El tejido no tejido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la promoción de regeneración tisular, seleccionándose dicho tejido del grupo que consiste en tejido de la piel, tejido conjuntivo, hueso, cartílago, unión de tejido conjuntivo, tendón, ligamento, disco de la médula espinal/intervertebral, menisco, tejido dental, dentina, ligamento periodontal, cabello, tejidos del sistema sensorial, hígado, páncreas, tejido cardíaco, vaso sanguíneo, renal, uterino y de la tiroides, membranas mucosas, endotelio, epitelio o tejido neural.
15. Un vendaje para heridas, una compresa para heridas o implante, que comprende un tejido no tejido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

```

1   mrlpkltfl   lwylawdle   fictvlgapd
lgqrpqgtrp glakaeaker pplarnvfrp
61  gghsygggat  nanarakggt  gqtggltqpk
kdepkklppr pggpepkpgh ppqtrqatar
121 tvtpkgqlpg  gkappkagsv  pssfllkkar
egppprepke pfrpppitph eymlslyrtl
181 sdadrkggms  svkleaglan  titsfidkqg
ddrgpvvrkq ryvfdisale kdgligaelr
241 ilrkkpsdta  kpaapgggra  aqlklsscps
grqpaslldv rsvpgldgsg wevfdiwklf
301 rnfknsaqlc  leleawergr  avdlrglgfd
raarqvheka lflvfgrtkk rdldffneika
361 rsgqddktvy  eylfsqrrkr  raplatrqgk
rpsknlkarc srkalhvnfk dmqwdwiia
421 pleyefhce glcefplrsh leptnhavig
tlmnsmdpes tpptccvptr lspisilfid
481 sannvvykqy edmvvescqc r

```

FIG. 1

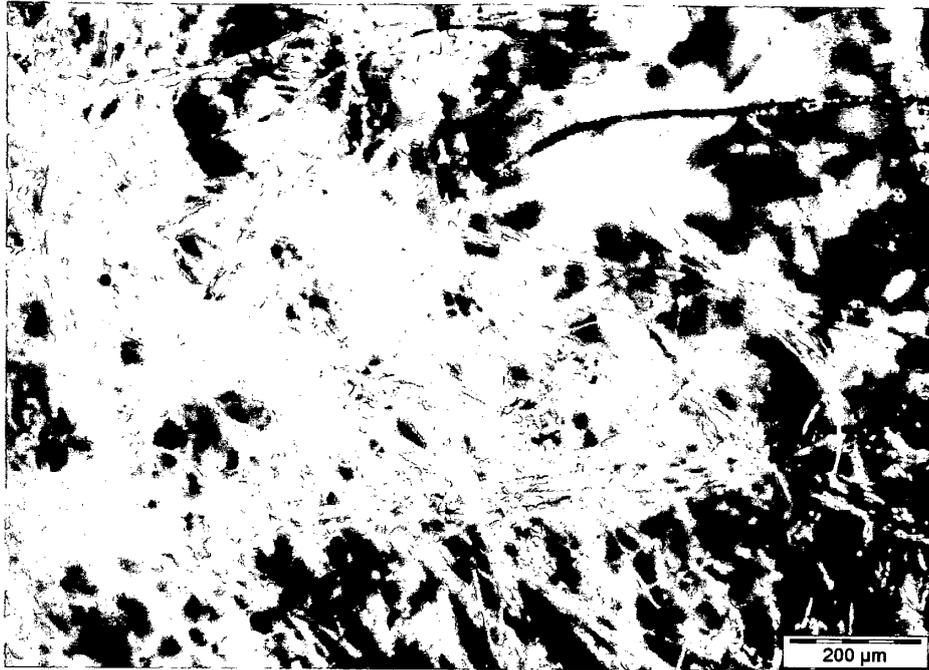
```
hgde-6 : CSKRPLHVNFERELSMDDMIITAVLBNBYHCEGVCEDEFLRSHLEPTNHAIITQTL  
hgde-7 : CSRKPLHYDPERELSMDDMIITAVLBNBYHCEGVCEDEFLRSHLEPTNHAIITQTL  
hgde-5 : CSRRAALHVNFERDMSEMLLMIILAELEVEAFHCEGVCEDEFLRSHLEPTNHAVITQTL  
  
hgde-6 : LKQLEDMVVESSCGCR  
hgde-7 : LKQLEDMVVESSCGCR  
hgde-5 : LKQLEDMVVESSCGCR
```

Fig. 2

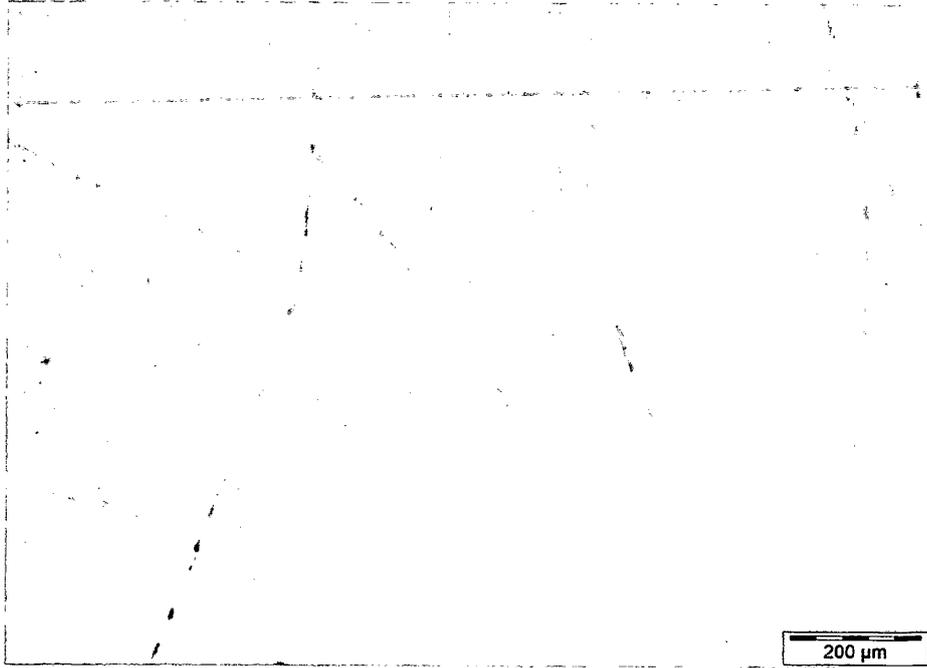
ES 2 539 405 T3

Secuencia	% de identidad	Restos 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-7 Homo	81	83/102
GDF-7 Mus	80	82/102
BMP-2A	57	58/102
BMP-2B	57	58/102
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
BMP-8B	48	49/102
BMP-3A	47	48/103
GDF-9B	45	46/102
BMP-3B	43	44/103
GDF-8	37	38/103

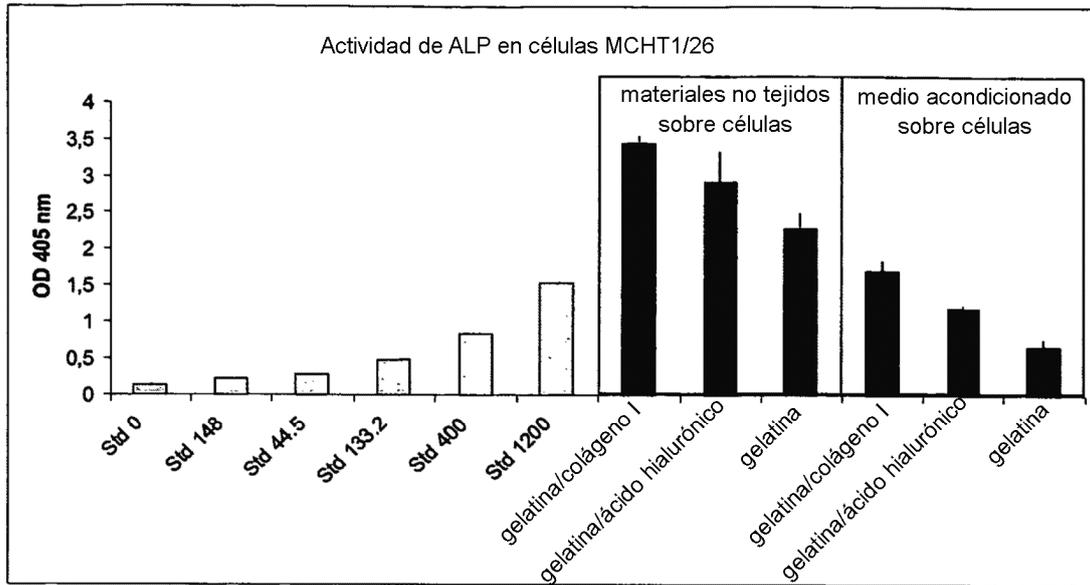
Fig. 3



**Fig. 4**

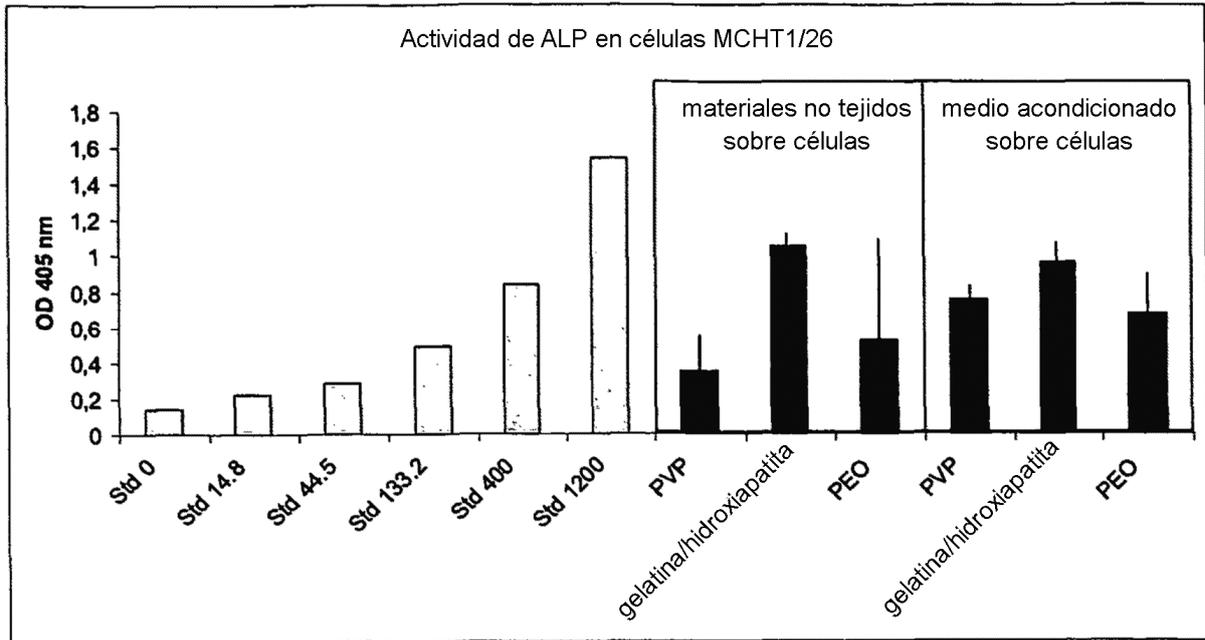


**Fig. 5**



materiales no tejidos	concentración [ng/ml]	liberación [%]	aplicación
gelatina/colágeno 1	6691	54	materiales no tejidos directamente sobre las células
gelatina/ácido hialurónico	4495	36	
gelatina	2688	22	
gelatina/colágeno 1	1382	55	medio acondicionado sobre las células
gelatina/ácido hialurónico	798	32	
gelatina	266	10	

Fig. 6



materiales no tejidos	concentración [ng/ml]	liberación [%]	aplicación
PVP	64	1	materiales no tejidos directamente sobre las células
gelatina/hidroxiapatita	582	5	
PEO	141	1	
PVP	289	12	medio acondicionado sobre las células
gelatina/hidroxiapatita	471	19	
PEO	152	6	

Fig. 7

# ES 2 539 405 T3

			ensayo de ALP		ELISA	
			actividad biológica [%]	actividad biológica media [%]	recuperación [%]	recuperación media [%]
antes	de	la	87,1 a 99,8	93±10	98,2 a 94,3	96 ± 10
esterilización						
después	de	la	90,8 a 92,6	92+10	84,2 a 95,3	90 ± 10
esterilización						

Fig. 8

Tiempo de almacenamiento	Temperatura de almacenamiento	ELISA
		recuperación media [%]
día 0	temperatura ambiente	>90
1 día	temperatura ambiente	>90
1 día	4°C	>70
1 día	-80°C	>80
3 días	temperatura ambiente	>80
3 días	4°C	>80
3 días	-80°C	>90
2 semanas	temperatura ambiente	>60
2 semanas	4°C	>70
2 semanas	-80°C	>60
4 semanas	temperatura ambiente	>75
4 semanas	4°C	>70
4 semanas	-80°C	>70
3 meses	temperatura ambiente	>90

Fig. 9