



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 362 772**

② Número de solicitud: 200931268

⑤ Int. Cl.:
C08G 18/04 (2006.01)
C08G 71/00 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **24.12.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.07.2011

⑰ Solicitante/s: **Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC)** (Titular al 50%)
c/ Melchor Fernández Almagro, 3
28029 Madrid, ES
Institut Químic de Sarrià Cets Fundació Privada (IQS) (Titular al 40%) y
Universitat Ramon Llul (Titular al 10%)

⑱ Inventor/es: **Cifuentes, Anna;**
Ramírez Martínez, Juan Carlos;
González de la Peña, Manuel Ángel;
Borros Gómez, Salvador;
Horna Tomás, David y
Bernad Miana, Antonio

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Superficie bioactiva capaz de modificar genéticamente células o tejidos biológicos y su uso.**

㉕ Resumen:

Superficie bioactiva capaz de modificar genéticamente células o tejidos biológicos y su uso.

Superficie bioactiva que comprende: una matriz polimérica, un complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica, y un vector de transferencia génica unido al complejo conector, donde el compuesto del complejo se une covalentemente al vector de transferencia mediante un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo, y al uso de dicha superficie bioactiva para transferir un ácido nucleico a una célula. La presente invención también se refiere a un dispositivo implantable caracterizado porque presenta al menos una parte de su superficie recubierta con dicha superficie bioactiva, al uso de dicho dispositivo para transferir un ácido nucleico a una célula, a un método para transferir un ácido nucleico a una célula y a un kit para llevar a cabo dicho método.

ES 2 362 772 A1

DESCRIPCIÓN

Superficie bioactiva capaz de modificar genéticamente células o tejidos biológicos y su uso.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y la biomedicina. Específicamente, la presente invención se refiere a una superficie bioactiva que comprende: una matriz polimérica, un complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica, y un vector de transferencia génica unido al complejo conector, donde el compuesto del complejo se une covalentemente al vector de transferencia mediante un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo, y al uso de dicha superficie bioactiva para transferir un ácido nucleico a una célula. La presente invención también se refiere a un dispositivo implantable caracterizado porque presenta al menos una parte de su superficie recubierta con dicha superficie bioactiva y al uso de dicho dispositivo implantable para transferir un ácido nucleico a una célula. Asimismo, la presente invención se refiere a un método para transferir un ácido nucleico a una célula y a un kit para llevar a cabo dicho método.

15

Estado de la técnica anterior

La transferencia génica tiene un elevado potencial terapéutico, tanto en terapia génica como en ingeniería de tejidos, siendo además de gran utilidad en investigación. El factor limitante en el desarrollo de las aplicaciones basadas en la transferencia génica es la falta de sistemas eficaces para introducir el material genético en las células. Para que la transferencia génica sea efectiva el ácido nucleico debe ser transportado hasta las células diana sin que se degrade, ser internalizado en dichas células, escapar a los sistemas de degradación intracelular, ser transportado al núcleo para su transcripción, y finalmente ser traducido a proteína. Así como el uso de vectores virales o no virales facilita la superación de muchas de las barreras intracelulares en el proceso de transferencia génica, el uso de biomateriales permite solventar los problemas asociados al transporte del material genético hasta las células diana.

25

La transferencia génica dependiente de sustrato, también denominada transfección reversa, se basa en la inmovilización de vectores virales o no virales en una superficie que permite la adhesión celular. Esta estrategia permite disminuir la degradación del material genético e incrementar la concentración de vector efectiva, de esta manera es necesaria una cantidad menor de ácido nucleico, con la consiguiente reducción de la toxicidad celular. Por otra parte, combinando la inmovilización del vector con un patrón de superficie se obtiene una herramienta que permite regular espacialmente el proceso de transferencia génica.

30

La inmovilización del material genético que se quiere transferir puede ser inespecífica o específica. Algunos biomateriales permiten la adsorción de vectores de transferencia génica directamente sobre la superficie; en este caso los vectores interactúan con dichos biomateriales mediante mecanismos no específicos tales como interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals. Alternativamente, pueden introducirse interacciones específicas mediante grupos funcionales en el vector y el polímero, tales como avidina-biotina o anticuerpo-antígeno.

40

Hidrogeles de colágeno y ácido hialurónico que presentan en su superficie neutravidin son capaces de unir complejos de ADN y del polímero catiónico polietilenoimina biotinilada (Segura *et al.* Biomaterials. 2005 May; 26(13): 1575-1584). El sistema avidina-biotina también se ha empleado para la inmovilización de vectores adenovirales en soportes de quitosano (Hu *et al.* J Gene Med. 2008 October; 10(10): 1102-1112). De manera similar, se ha descrito la inmovilización de adenovirus en geles de colágeno tipo I modificados con avidina empleando para ello un anticuerpo biotinilado específico contra adenovirus (Levy *et al.* Gene Ther. 2001 May; 8(9):659-67). Asimismo, se han inmovilizado adenovirus mediante anticuerpos específicos unidos directamente a películas de poliuretano (Stachelek *et al.* Gene Ther. 2004 Jan; 11(1):15-24). Es importante destacar que dispositivos implantables basados en estrategias de inmovilización específica se han empleado para transferencia génica *in vivo* (Levy *et al.* Gene Ther. 2001 May; 8(9):659-67; Klugherz *et al.* Hum Gene Ther. 2002 Feb 10; 13(3):443-54; Abrahams *et al.* Stroke. 2002 May; 33(5):1376-82).

50

Sea cual sea la estrategia empleada para la inmovilización de vectores de transferencia génica, debe existir un equilibrio entre la inmovilización del vector y la internalización celular. El biomaterial empleado debe ser adecuado para la adhesión celular y además mantener el vector de transferencia génica unido a la superficie, pero permitiendo la internalización celular del material genético. Si la unión es demasiado débil los vectores no serán retenidos en la superficie del biomaterial para su presentación a las células; por el contrario, si la inmovilización de los vectores es demasiado fuerte, la internalización del material genético puede verse seriamente disminuida.

55

En conclusión, la enorme potencialidad de aplicaciones que la transferencia génica en terapia génica e ingeniería de tejidos se ve seriamente limitada por la falta de sistemas eficaces, seguros y controlados de transferencia génica. La inmovilización del material genético en biomateriales es una estrategia que permite mejorar la eficacia y la seguridad, así como el control espacio-temporal del proceso de transferencia génica, siempre y cuando exista un equilibrio óptimo entre la inmovilización del material genético y su internalización celular.

65

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a una superficie bioactiva, que proporciona un sistema eficaz, seguro y controlado de transferencia génica. Esta superficie bioactiva de la invención comprende:

- a) una matriz polimérica,
- b) un complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica (a), y
- c) un vector de transferencia génica unido al complejo conector,

donde el compuesto del complejo (b) se une covalentemente al vector de transferencia mediante un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo, y al uso de dicha superficie bioactiva para transferir un ácido nucleico a una célula.

La presente invención también se refiere a un dispositivo implantable caracterizado porque presenta al menos una parte de su superficie recubierta con dicha superficie bioactiva y al uso de dicho dispositivo implantable para transferir un ácido nucleico a una célula. Asimismo, la presente invención se refiere a un método para transferir un ácido nucleico a una célula y a un kit para llevar a cabo dicho método.

Los inventores emplearon matrices de poliestireno cuya superficie había sido previamente modificada mediante la unión covalente con pentafluorofenil metacrilato (PFM). El tratamiento de la superficie de las matrices con PFM demostró ser efectivo para lograr la unión a la misma de partículas infectivas que contienen grupos aminos, en particular partículas lentivirales y adenovirales. Estas placas tratadas con PFM y dichas partículas son capaces de transducir genéticamente células humanas de manera más efectiva que las mismas partículas adsorbidas de forma inespecífica a placas que no habían sido tratadas con dicha molécula.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una superficie bioactiva (de aquí en adelante, superficie bioactiva de la invención) que comprende:

- a) una matriz polimérica,
- b) un complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica (a), y
- c) un vector de transferencia génica unido al complejo conector,

donde el compuesto del complejo (b) se une covalentemente al vector de transferencia mediante un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo.

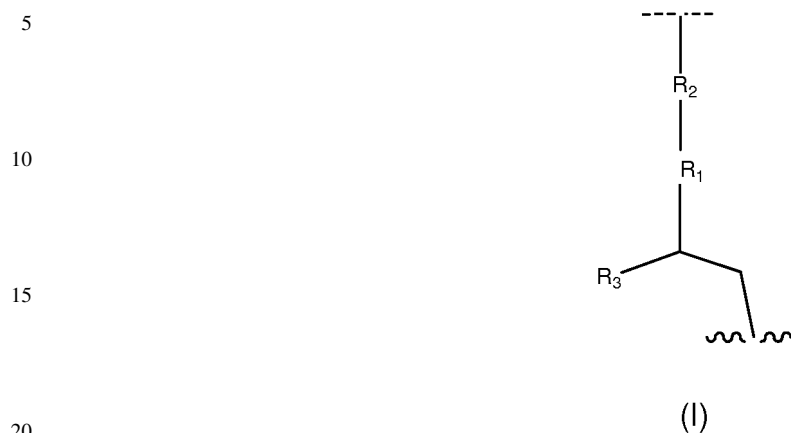
Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “superficie bioactiva” se refiere a cualquier superficie de un material con la capacidad de transferir una biomolécula a una célula. Preferiblemente, dicha biomolécula es un ácido nucleico. Así, en una realización preferida, este término se refiere a cualquier superficie de un material que tiene la capacidad de modificar genéticamente células o tejidos biológicos; la superficie bioactiva es, por tanto, un complejo de transferencia génica.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, se entiende por “matriz polimérica” cualquier material compuesto biocompatible, biodegradable o no, formado por fibras, partículas, o filamentos incrustados durante su fase resinosa o maleable. Preferiblemente, la matriz polimérica de la superficie bioactiva de la invención se selecciona de la lista que comprende: poliestireno, policarbonato, poli(etilencarbonato), polietileno, poliolefinas, poli(diól citrato), poli fumarato, poli lactidos, poli caprolactona, poli acrilamidas, poli siloxanos, poliésteres, poliamidas, copolímeros de glicólico/láctico, poliuretano o cualquier combinación de los mismos. En una realización más preferida, la matriz polimérica de la superficie bioactiva de la invención comprende poliestireno.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “complejo conector” se refiere a un compuesto capaz de unir el vector de transferencia génica a la matriz polimérica mediante la formación de un enlace covalente tanto con la matriz polimérica como con el vector de transferencia. El complejo conector de la superficie bioactiva de la invención comprende al menos un compuesto que contiene un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo anclado a la superficie de la matriz polimérica.

ES 2 362 772 A1

Preferiblemente el compuesto unido a la matriz tiene la siguiente fórmula (I):



donde:

25 R₁ es un radical que existe o no y si existe se selecciona de un grupo que comprende un alquilo (C₁-C₆), alquenilo (C₁-C₆), cicloalquilo o arilo; preferiblemente R₁ no existe.

30 R₂ es un grupo carboxilo (-COO-), amino (-NH-), éter (-O-) o isocianato (-CON-), preferiblemente R₂ es un grupo carboxilo,

R₃ es un hidrógeno, un alquilo(C₁-C₆) o un alqueno(C₁-C₆), preferiblemente R₃ es un hidrógeno o un grupo metilo,

----- representa la unión del compuesto de fórmula (I) al vector de transferencia génica, y

35 ~~~~~ representa la unión del compuesto de fórmula (I) a la matriz polimérica.

40 El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

45 El término “alquenilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1- propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales alquenilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

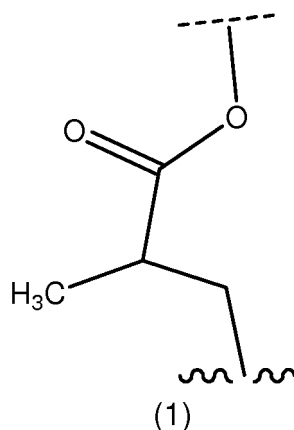
50 “Cicloalquilo” se refiere, en la presente invención, a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que sólo consiste en átomos de carbono e hidrógeno, tal como ciclopentilo, ciclohexilo o adamantilo y que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos tales como alquilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

55 El término “arilo” se refiere en la presente invención a un radical fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. El radical arilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como alquilo, haloalquilo, aminoalquilo, dialquilamino, hidroxilo, alcoxilo, fenilo, mercapto, halógeno, nitro, ciano y alcoxicarbonilo.

60

65

Preferiblemente el compuesto de fórmula (I) es



20 Donde: ----- y ~~~~~ se han descrito anteriormente. Preferiblemente este compuesto (1) proviene de PFM (pentafluoropentil metacrilato).

25 En una realización preferida, el compuesto unido covalentemente a la matriz polimérica se une al vector de transferencia mediante un grupo carboxilo. En una realización preferida, el compuesto unido covalentemente a la matriz se une al vector de transferencia mediante un grupo amino. En una realización preferida, el compuesto unido covalentemente a la matriz polimérica se une al vector de transferencia mediante un grupo isocianato. En una realización preferida, el compuesto unido covalentemente a la matriz se une al vector de transferencia mediante un grupo hidroxilo.

30 Además, el complejo conector puede comprender una molécula seleccionada de la lista que comprende: azúcar, péptido, lípido o cualquier combinación de los mismos y donde dicha molécula se encuentra entre el vector de transferencia génica y el grupo carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo del compuesto unido covalente a la matriz polimérica, preferiblemente esta molécula se encuentra entre el grupo R2 del compuesto de fórmula general (I) y el vector de transferencia génica. Por tanto, el compuesto de fórmula general (I) y una de las moléculas comprenderían el complejo conector.

35 Por tanto, en otra realización preferida, el complejo conector unido a la superficie de la matriz polimérica se puede unir al vector de transferencia mediante una molécula seleccionada de la lista que comprende: azúcar, péptido, lípido o cualquiera de sus combinaciones.

40 De esta forma, el complejo conector de la superficie bioactiva de la invención puede comprender el compuesto que contiene un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo anclado a la matriz polimérica, preferiblemente un precursor de PFM (pentafluorofenil metacrilato), y al menos un compuesto seleccionado de la lista que comprende: un azúcar, un péptido, un lípido o cualquier combinación de los mismos.

45 Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “vector” o “vector de transferencia génica” se refiere a cualquier sistema empleado para introducir un ácido nucleico exógeno en el interior de una célula. El vector de transferencia debe contener al menos un grupo reactivo por el que pueda reaccionar con el complejo conector, bien con el compuesto anclado a la superficie de la matriz polimérica, bien con otro compuesto que pueda formar parte del complejo conector, como por ejemplo, pero sin limitarnos, un azúcar, un péptido o un lípido. En una realización preferida, el vector de transferencia génica contiene un grupo reactivo por el que puede reaccionar con el compuesto anclado en la matriz polimérica como por ejemplo, pero sin limitarnos, un grupo amino o un grupo carboxilo. Por tanto, en una realización preferida, el vector de transferencia génica de la superficie bioactiva de la invención comprende al menos un grupo amino o un grupo carboxilo. Por ejemplo, cuando el compuesto anclado, o unido covalentemente, a la superficie de la matriz polimérica es el PFM, el vector de transferencia génica puede reaccionar con el PFM si contiene un grupo amino. Por tanto, en una realización más preferida, el vector de transferencia génica de la superficie bioactiva de la invención comprende al menos un grupo amino.

60 Existen numerosos vectores virales y no virales que son conocidos en el estado de la técnica. Vectores virales apropiados para poner en práctica la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: vectores adenovirales, vectores adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores alfavirales, vectores herpesvirales, vectores derivados de poxvirus y vectores derivados de coronavirus. Vectores no virales apropiados para poner en práctica la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: poliaminas, péptidos, polipéptidos, proteínas, dendrímeros, complejos lípido/poliamina y nanopartículas inorgánicas ingenierizadas para contener grupos amino. El vector de transferencia génica de la superficie bioactiva de la invención puede ser viral o no viral. Por tanto, en una realización preferida, el vector de transferencia génica de la superficie bioactiva de la invención se selecciona de la

lista que comprende: complejo ácido nucleico-poliamina, complejo ácido nucleico-péptido, complejo ácido nucleico-polipéptido, complejo ácido nucleico-proteína, complejo ácido nucleico-dendrímero, complejo ácido nucleico-lípido-poliamina, complejo ácido nucleico-nanopartícula inorgánica modificada, vector adenoviral, vector adenoasociado, vector retroviral, vector lentiviral, vector alfaviral, vector herpesviral, vector derivado de poxvirus o vector derivado de coronavirus.

En una realización preferida, el vector de transferencia génica de la superficie bioactiva de la invención es un vector no viral. En una realización más preferida, el vector de transferencia génica no viral de la superficie bioactiva de la invención es un complejo nucleoproteico, es decir, un complejo formado por un ácido nucleico y un compuesto peptídico o polipeptídico capaz de facilitar la entrada del complejo en la célula y de promover la función biológica del ácido nucleico.

En otra realización preferida, el vector de transferencia génica de la superficie bioactiva de la invención es un vector viral. En una realización más preferida, el vector de transferencia génica viral de la superficie bioactiva de la invención es un vector lentiviral, es decir, una partícula lentiviral modificada para reducir o eliminar su virulencia, así como para contener el ácido nucleico que se desea transferir y para aumentar la eficiencia de dicha transferencia. En otra realización más preferida, el vector de transferencia génica viral de la superficie bioactiva de la invención es un vector adenoviral, es decir, una partícula adenoviral modificada para reducir o eliminar su virulencia, así como para contener el ácido nucleico que se desea transferir y para aumentar la eficiencia de dicha transferencia.

Por tanto, en una realización preferida, la superficie bioactiva de la invención comprende una matriz polimérica y un vector de transferencia génica, preferiblemente un vector adenoviral o un vector lentiviral, donde dicho vector de transferencia se encuentra unido a la superficie de dicha matriz polimérica mediante un complejo conector que comprende al menos una molécula de PFM unida a la superficie de la matriz polimérica de la invención.

La superficie bioactiva de la invención puede emplearse bien para fabricar total o parcialmente un dispositivo implantable o bien para recubrir total o parcialmente un dispositivo implantable.

Por tanto, un segundo aspecto de la invención se refiere a un dispositivo implantable, de aquí en adelante “dispositivo implantable de la invención”, caracterizado porque presenta al menos una parte de su superficie recubierta con la superficie bioactiva de la invención.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “dispositivo implantable” se refiere a un dispositivo que puede ser aplicado a la superficie del cuerpo de un animal, preferiblemente un humano, o que puede ser insertado en el interior del cuerpo del animal o del humano.

En una realización preferida, el dispositivo implantable de la invención se selecciona de la lista que comprende: stent, prótesis ortopédica, membrana biocompatible, polímero poroso, parche, hilo de sutura, cápsula y partícula.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de la superficie bioactiva de la invención o del dispositivo implantable de la invención para transferir un ácido nucleico a una célula que entre en contacto con la superficie bioactiva de la invención.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “ácido nucleico” se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Por tanto, el ácido nucleico puede ser un ácido desoxirribonucleico, como, por ejemplo, pero sin limitarse, ADN de cadena doble, ADN de cadena simple o ADN circular, o un ácido ribonucleico, como por ejemplo, ARN de interferencia. Preferiblemente, el ácido nucleico es ADN, más preferiblemente, ADN de cadena doble, y aún más preferiblemente, ADN de cadena doble circular.

La superficie bioactiva de la invención o el dispositivo implantable de la invención se puede emplear para transferir un ácido nucleico a una célula procariota o eucariota. En una realización preferida, la superficie bioactiva de la invención o el dispositivo implantable de la invención se usan para transferir un ácido nucleico, preferiblemente ADN, a una célula eucariota. En una realización más preferida, la superficie bioactiva de la invención o el dispositivo implantable de la invención se usan para transferir un ácido nucleico, preferiblemente ADN, a una célula animal. En una realización aún más preferida, la superficie bioactiva de la invención o el dispositivo implantable de la invención se usan para transferir un ácido nucleico, preferiblemente ADN, a una célula humana.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para transferir un ácido nucleico a una célula (de aquí en adelante, “método primero de la invención”) que comprende poner en contacto la superficie bioactiva de la invención o el dispositivo implantable de la invención con dicha célula.

El método primero de la invención se puede emplear para transferir un ácido nucleico a una célula procariota o eucariota. En una realización preferida, el método primero de la invención es un método para transferir un ácido nucleico, preferiblemente, ADN, a una célula eucariota. En una realización más preferida, el método primero de la invención es un método para transferir un ácido nucleico, preferiblemente, ADN, a una célula animal. En una realización aún más preferida, el método primero de la invención es un método para transferir un ácido nucleico, preferiblemente, ADN, a una célula humana.

ES 2 362 772 A1

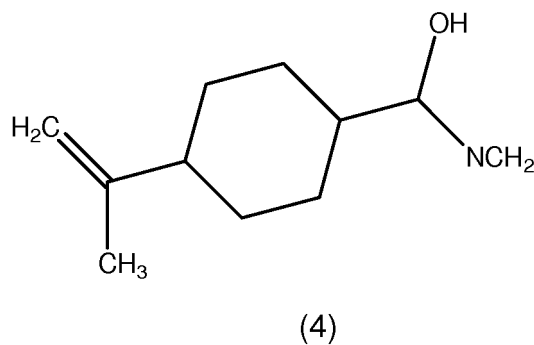
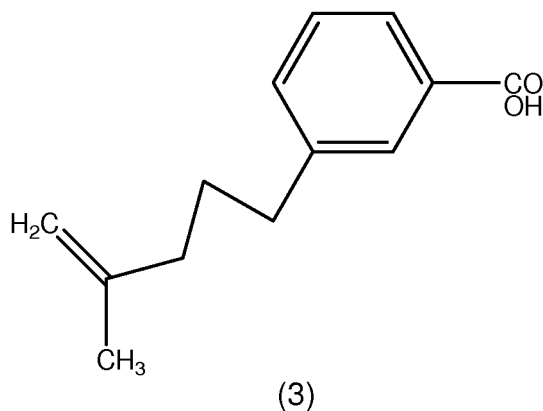
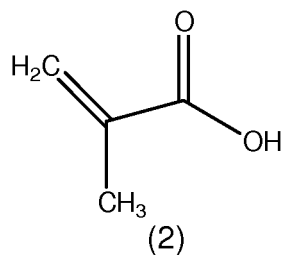
Un quinto aspecto de la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método primero de la invención (de aquí en adelante "kit primero de la invención") que comprende:

- a) una matriz polimérica,
- b) un complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica (a), que contiene un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo; y
- c) al menos un elemento necesario para la formación de un vector de transferencia génica.

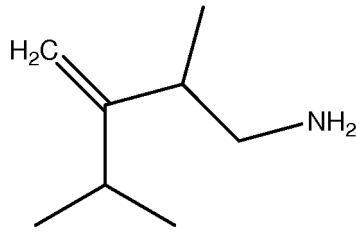
donde el compuesto del complejo (b) se une covalentemente al vector de transferencia mediante un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo.

En una realización preferida, la matriz polimérica del kit primero de la invención se selecciona de la lista que comprende: poliestireno, policarbonato, poli(etilenocarbonato), polietileno, poliolefinas, poli(diól citrato), poli fumarato, poli lactidos, poli caprolactona, poli acrilamidas, poli siloxanos, poliésteres, poliamidas, copolímeros de glicólico/láctico, poliuretano o cualquier combinación de los anteriores. En una realización más preferida, la matriz polimérica del kit primero de la invención comprende poliestireno.

En una realización preferida, el complejo conector comprende un compuesto que se selecciona de la lista que comprende:



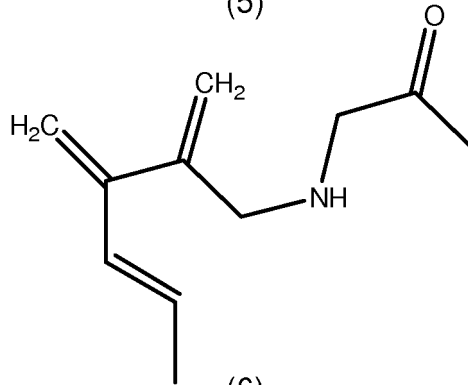
5



10

(5)

15



20

25

(6)

30 Un sexto aspecto de la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método primero de la invención (de aquí en adelante “kit segundo de la invención”) que comprende:

- a) la superficie bioactiva de la invención o el dispositivo implantable de la invención, y
- 35 b) al menos un elemento necesario para la formación de un vector de transferencia génica.

40 Los elementos que son necesarios para la formación de un vector de transferencia génica dependen del tipo de vector de transferencia génica y son conocidos en el estado de la técnica.

En una realización preferida, el kit primero o segundo de la invención comprende al menos un elemento necesario para la formación de un vector de transferencia génica seleccionado de la lista que comprende: poliamina, péptido, polipéptido, proteína, dendrímero, lípido-poliamina, nanopartícula inorgánica modificada y plásmido que codifica una proteína de la cápsida/envuelta de un vector viral. Preferiblemente, dicho vector viral se selecciona de la lista que comprende vector adenoviral, vector adenoasociado, vector retroviral, vector lentiviral, vector alfaviral, vector herpesviral, vector derivado de poxvirus o vector derivado de coronavirus.

50 En una realización preferida, el kit primero o segundo de la invención comprende al menos un elemento necesario para la formación de un complejo nucleopeptídico. Ejemplos de elementos necesarios para la formación de un complejo nucleopeptídico son, pero sin limitarnos, polilisina, péptidos fusogénicos, proteínas fusogénicas o complejos lípido-péptido.

55 En una realización preferida, el kit primero o segundo de la invención comprende al menos un elemento necesario para la formación de un vector lentiviral. Ejemplos de elementos necesarios para la formación de un vector lentiviral son, pero sin limitarnos, plásmidos codificando las proteínas de la cápsida de HIV, de FIV, o de EIAV; plásmidos codificando envueltas virales de toxicidad y/o inmunogenicidad reducidas, y con tropismo adecuado al tipo celular que se desee modificar, como por ejemplo, pero sin limitarnos, VSV-G, RD114, proteínas de la envuelta de LCMV, de RRV, de filovirus, lisovirus, o virus de la rabia; plásmidos codificando otras proteínas lentivirales, incluyendo aquellas que le otorguen a las partículas lentivirales una naturaleza replicativa o no replicativa, y también aquellas que les otorguen una naturaleza integrativa o no integrativa.

65 En una realización preferida, el kit primero o segundo de la invención comprende al menos un elemento necesario para la formación de un vector adenoviral. Ejemplos de elementos necesarios para la formación de un vector adenoviral son, por ejemplo, pero sin limitarnos, plásmidos que codifiquen las proteínas de la cápsida de adenovirus tipo 2 ó tipo 5. Dichas proteínas podrían estar modificadas para aumentar o limitar su tropismo o para reducir su inmunogenicidad y/o toxicidad.

ES 2 362 772 A1

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un método para elaborar la superficie bioactiva de la invención (de aquí en adelante, "método segundo de la invención"), que comprende poner en contacto:

- una matriz polimérica que comprende un complejo conector unido covalentemente a su superficie mediante un compuesto que contiene un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo y
- un vector de transferencia génica,

en condiciones que permitan la unión del vector de transferencia génica a dicho complejo conector. Preferiblemente, dicho complejo conector, comprende al menos un compuesto de fórmula general (I), que se describe anteriormente, y más preferiblemente un precursor de PFM anclado a la superficie de la matriz polimérica.

En una realización preferida, el método segundo de la invención comprende poner en contacto la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector con el vector de transferencia génica a una temperatura de entre 20 y 40°C durante un periodo de tiempo de entre 5 minutos y 24 horas. En una realización más preferida, el método segundo de la invención comprende poner en contacto la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector con el vector de transferencia génica a una temperatura de entre 30 y 37°C durante un periodo de tiempo de entre 30 y 60 minutos.

En una realización más preferida, para favorecer la unión del vector de transferencia génica a la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector se centrifuga el vector de transferencia génica sobre la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector.

Preferiblemente, dicha centrifugación se realiza a una velocidad de entre 100 y 20.000 x g y, más preferiblemente, a una velocidad de entre 1.000 y 3.000 x g. Preferiblemente, dicha centrifugación se realiza a una temperatura de entre 20 y 40°C y durante un periodo de tiempo de entre 5 minutos y 24 horas. Más preferiblemente, dicha centrifugación se realiza a una temperatura de entre 30 y 37°C y durante un periodo de tiempo de entre 30 y 60 minutos.

En otra realización más preferida, para favorecer la unión del vector de transferencia génica a la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector se somete a la matriz que presenta unido a su superficie el complejo conector a una presión negativa. Preferiblemente, dicha presión es de entre -10^{-4} y -10^{-1} mBar, y más preferiblemente de entre $-9 \cdot 10^{-3}$ y $-9 \cdot 10^{-2}$ mBar. Preferiblemente, dicha presión negativa se ejerce a una temperatura de entre 20 y 40°C y durante un periodo de tiempo de entre 5 minutos y 24 horas. Más preferiblemente, dicha presión negativa se ejerce a una temperatura de entre 30 y 37°C y durante un periodo de tiempo de entre 30 y 60 minutos.

En otra realización más preferida, para favorecer la unión del vector de transferencia génica a la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector, se somete a la matriz a una combinación de centrifugación y presión negativa. Preferiblemente, dicha presión es de entre -10^{-4} y -10^{-1} mBar, y más preferiblemente de entre $-9 \cdot 10^{-3}$ y $-9 \cdot 10^{-2}$ mBar. Preferiblemente, dicha centrifugación se realiza a una velocidad de entre 1.000 y 20.000 x g y, más preferiblemente, a una velocidad de entre 1.000 y 3.000 x g. Esta combinación se ejerce a una temperatura de entre 20 y 40°C y durante un periodo de tiempo de entre 5 minutos y 24 horas. Más preferiblemente, dicha combinación se aplica a una temperatura de entre 30 y 37°C y durante un periodo de tiempo de entre 30 y 60 minutos.

En una realización preferida del método segundo de la invención, la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector, se obtiene al poner dicho complejo conector en contacto con dicha matriz polimérica en condiciones que permitan la unión covalente de la matriz polimérica al compuesto del complejo conector. En una realización preferida, la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector, se obtiene mediante un método seleccionado de la lista que comprende: deposición química, polimerización, polimerización por plasma e iCVD (*initiated chemical vapor deposition*).

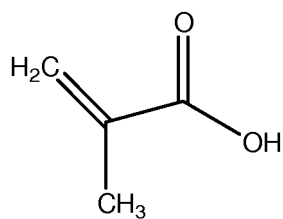
En una realización preferida del método segundo de la invención, la matriz polimérica que presenta unido a su superficie el complejo conector que comprende al menos un compuesto que contiene un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo, preferiblemente PFM, se obtiene:

- a) activando la matriz polimérica mediante plasma frío, y
- b) pasando una corriente del complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica obtenida del paso (a) que contiene un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo, preferiblemente PFM.

ES 2 362 772 A1

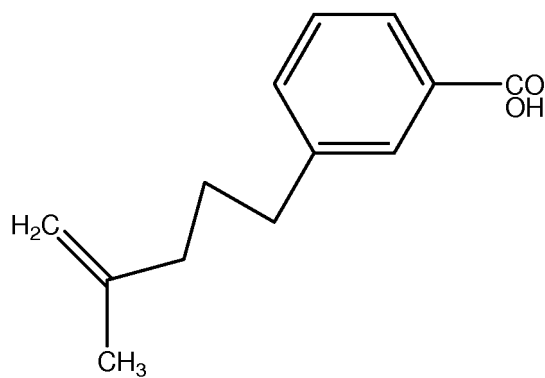
En otra realización preferida, el complejo conector comprende un compuesto que se selecciona de la lista que comprende los compuesto (2) a (6) anteriormente descritos:

5



10

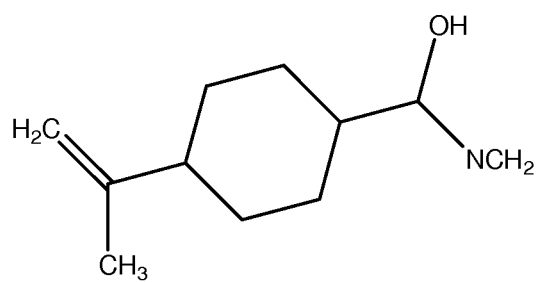
15



20

25

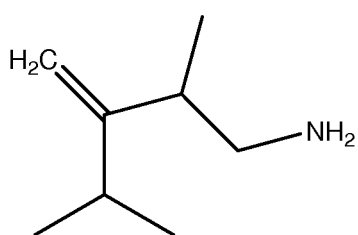
30



35

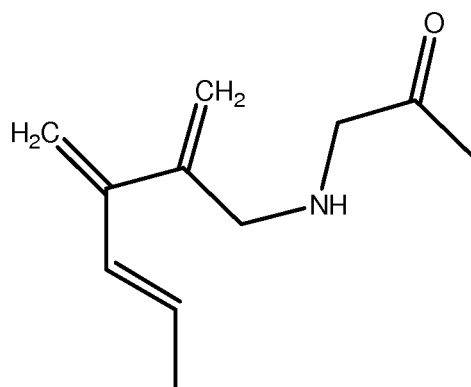
40

45



50

55



60

65

Según otra realización preferida, el complejo conector además comprende una molécula seleccionada de la lista que comprende azúcar, péptido, lípido o cualquier combinación de los mismos, donde dicha molécula se puede unir al compuesto que contiene el complejo conector antes o después de su unión covalente a la matriz polimérica.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra la reacción del grupo amino con el PFM.

15 Figura 2. (a) Estructura de una partícula lentiviral (b) Estructura del dominio extramembranoso de la VSV-g, proteína de la envuelta de las partículas lentivirales pseudotipadas, la cual reaccionará con el PFM.

Figura 3. Muestra una microfotografía de fluorescencia de placas de cultivo celular (TC) no tratadas (a) y tratadas con PFM (b).

20

Figura 4. Muestra imágenes de AFM de las partículas lentivirales depositadas en placas TC tras una incubación de 30 minutos. Se realizaron dos lavados diferentes, uno con PBS, donde se ven las sales, y otro con agua destilada. El control negativo es la placa TC sin modificar.

25 Figura 5. Muestra imágenes de AFM de partículas lentivirales depositadas en placas TC con o sin modificar con PFM tras una incubación de 3 horas. El lavado se hizo con agua destilada.

Figura 6. Muestra imágenes de AFM de partículas lentivirales depositadas en placas petri (PD) tras una incubación de 3 horas. El lavado se hizo con agua destilada.

30

Figura 7. Muestra microfotografías de la expresión de proteína fluorescente verde (GFP) en células humanas (HEK-293) crecidas sobre placas TC recubiertas de partículas lentivirales (codificando GFP) mediante el método de la invención en presencia y en ausencia de centrifugación. El tiempo de incubación fue de 60 minutos.

35 Figura 8. Muestra el análisis mediante citometría de flujo de las células de la figura 7. El control positivo corresponde a células infectadas por el procedimiento convencional (incubación con partículas lentivirales en suspensión).

Figura 9. a) Placas recubiertas con Amino-PEG. b) Placas recubiertas con lentivirus.

40 Figura 10. Muestra la transducción de células humanas mediante partículas lentivirales depositadas en diferentes superficies. El control corresponde a células transducidas mediante el método convencional.

Figura 11. Muestra la transducción lentiviral de células humanas en placa TC tratada, mitad con PFM mitad sin PFM, con la correspondiente imagen realizada con el AFM.

45

Figura 12. Muestra la transducción de células por partículas adenovirales y complejos DNA-lipofectamina depositados en placas TC mediante el método de la invención.

Ejemplos

50

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

55

Ejemplo 1

Transferencia genética con vectores lentivirales

60 Se empleó poliestireno como matriz polimérica; concretamente se emplearon dos tipos de placas de cultivo fácilmente disponibles: placas Petri de poliestireno sin tratar (*Petri Dishes*, PD) y placas de cultivo celular (*Tissue Culture*, TC).

65 La superficie de las placas se trató con plasma frío para introducir mediante injerto (*grafting*), pentafluorofenil metacrilato (PFM) Las placas tratadas con PFM estaban ya preparadas para reaccionar con un vector de expresión génica que tuviera un grupo amino (Figura 1).

ES 2 362 772 A1

Dada la naturaleza proteica de las partículas infectivas (lentivirus, adenovirus, etc), éstas tienen un alto contenido de grupos amino, por lo que pueden reaccionar con la superficie tratada.

5 Por ejemplo, en el caso de las partículas lentivirales (Figura 2a), la adhesión a la superficie se realiza a través de la proteína de la envuelta, que concretamente es la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-g, Figura 2b), la cual posee una gran cantidad de grupos amino libres por donde poder reaccionar.

10 Para visualizar las partículas sobre la superficie se utilizó el microscopio de fuerzas atómicas (AFM) mediante el cual se pudo ver la diferencia de las partículas adheridas en superficies tratadas con PFM y superficies sin tratar. En el caso de la eficiencia de la transducción, se analizó mediante la introducción de un gen reportero que codificaba la proteína verde fluorescente (GFP) cuya expresión se pudo detectar por microscopía de fluorescencia y citometría (la citometría, además, permitió cuantificar la eficiencia de transducción).

1.1 Recubrimiento de la matriz polimérica con PFM

15 *Objetivo*

Obtener placas de poliestireno modificadas químicamente mediante la unión de PFM.

20 *Método*

Se empleó poliestireno como matriz polimérica; concretamente se emplearon dos tipos de placas de cultivo fácilmente disponibles: placas Petri de poliestireno sin tratar (*Petri Dishes*, PD) y placas comerciales de cultivo celular (*Tissue Culture*, TC).

25 Las placas fueron expuestas a plasma frío de Ar para introducir mediante “grafting” el PFM. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. Se introdujeron en el reactor de plasma las placas de cultivo (TC o PD).
- 30 2. Se aplicó vacío en el reactor hasta una presión aproximada de 6×10^{-3} mBar. Una vez alcanzada esta presión, se aplicó un plasma de Ar con una potencia de 40w durante 5 minutos.
- 35 3. Una vez transcurrido este tiempo, se hizo pasar durante 15 minutos una corriente de PFM, para introducirlo en la superficie de las placas.

Para confirmar que las placas estaban bien recubiertas con PFM, se hicieron reaccionar con isotiocianato de fluoresceína (FTSC) (que puede visualizarse mediante microscopía de fluorescencia). Esto se realizó mediante un ensayo de impresión por micro-contacto (*micro-contact printing*) que consistió en utilizar dos tampones hechos de polidimetilsiloxano (PDMS) con el mismo logotipo (IQS/CNM), previamente sumergidos en una disolución de FTSC 0,5 mM durante 1 h. Los tampones se depositaron suavemente sobre las placas; uno sobre una placa tratada con PFM y el otro sobre una placa sin PFM.

45 Después de lavar con agua durante 30min, las placas se observaron bajo el microscopio de fluorescencia. Las placas tratadas con PFM mostraban claramente el dibujo IQS/CNM formado por las moléculas de FTSC (Figura 3), lo cual confirmaba que las placas TC y PD estaban recubiertas con el PFM y éste reaccionó con el FTSC.

1.2. Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

50 *Objetivo*

Visualizar las partículas infectivas en las superficies de cultivo a través de AFM, para poder evaluar la eficiencia de los distintos tratamientos.

55 *Método*

Se utilizaron placas TC y PD, con los siguientes tratamientos:

- 60 • Placas mitad PFM/mitad no PFM.
- Placas enteras con PFM.
- 65 • Placas enteras sin PFM.

ES 2 362 772 A1

Todas las placas se trataron de la misma forma, variando el tiempo de exposición de las partículas virales. El procedimiento fue el siguiente:

- 5 - Se preparó, por cada placa, una dilución en PBS de partículas lentivirales con un título de 10^7 unidades de transducción (UT)/ml, en un volumen de 1 ml.
- Se añadió la suspensión de partículas sobre las placas y se incubó a temperatura ambiente durante diferentes tiempos, con agitación orbital (30 rpm).
- 10 - Se retiró el medio y se lavó 5 veces con PBS ó 3 veces con agua miliQ.
- Se cortaron los bordes de las placas para poder introducir las en el AFM.
- Por último, se pasó Ar por la superficie para eliminar los restos de polvo y partículas no adheridas.

15

Se realizaron los siguientes experimentos:

- Placas mitad PFM/mitad no PFM:
 - 20 ○ Lentivirus 30 minutos de exposición con agitación orbital.
- Placas enteras con PFM:
 - 25 ○ Lentivirus 3 horas de exposición con agitación orbital.

25

Resultados

30 - Experimento 1: *Placas TC con lentivirus x 30 minutos*

30

En todos los casos podemos ver que la superficie con PFM contiene lo que, por su tamaño (150-200 nm), parecen ser partículas lentivirales. Si se observa detenidamente, se puede ver que existe en algunas zonas una altura de hasta los 400 nm, lo cual podría indicar la agregación de las partículas en estas zonas. Por el contrario, en la parte donde no había PFM, prácticamente no hay partículas mayores de 30 nm.

35

- Experimento 2: *Placas TC con Lentivirus x 3 horas*

Los resultados (Figura 5) demuestran un aumento significativo en la cantidad de partículas en la superficie con respecto a las del experimento 1. El tamaño de las partículas también es mayor en algunos casos, lo que puede indicar un mayor grado de agregación de las partículas. Al hacer un *zoom* se observa una mayor distribución de partículas. En el caso de los controles negativos, se observan unas pocas partículas, lo cual indica una cierta afinidad por la superficie hidrofílica.

40

45 - Experimento 3: *Placas PD con lentivirus x 3 horas*

45

En este caso se aprecia una gran diferencia entre unas superficies y otras (Figura 6). La cantidad de partículas adheridas a la superficie es elevada con respecto a los experimentos anteriores. Si comparamos, se ven diferencias muy claras entre las placas con PFM y las placas sin PFM. Al igual que en los experimentos anteriores, parece que existe una agregación significativa de las partículas. A diferencia de los experimentos anteriores, la superficie sin PFM es hidrofóbica, por lo que las proteínas no tienden a adherirse por interacciones hidrofílicas.

50

1.3. *Modificación genética in vitro de células humanas con vectores lentivirales*

55 • Experimento 1

Objetivo

En este primer experimento se trató de ver la diferencia entre una placa TC y una placa TC tratada con PFM. Además se buscaba también mejorar la difusión de las partículas lentivirales para que pudieran reaccionar con el PFM mediante centrifugación.

60

65

ES 2 362 772 A1

Método

Los experimentos que se realizaron fueron los siguientes:

	PFM	No PFM
TC	Muestra 1	-----
PD Centrifugada	Muestra 2	-----
TC	-----	Muestra 3

Los materiales empleados fueron:

- Células: (HEK-293T 4 x 10⁵ células/placa)
- Stock de partículas lentivirales: LV-ZS Green/ApoCi sh4 (2 x 10⁷ UT/ml)

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se añadieron a la placa las partículas lentivirales (500 μ l de una dilución 1:3 del stock), y se incubaron durante 30 minutos en la incubadora a 37°C ó 60 minutos en la centrifugadora a 3000 Xg, según correspondiera.
- Se lavó con medio de cultivo celular (DMEM/10% FBS) X 5 veces.
- Se lavó con 400 ml de medio de cultivo durante 10 minutos con agitación orbital.
- Se sembraron las células y se introdujo la placa en el incubador.
- Tras 48 h, se observaron las células al microscopio de fluorescencia y se analizaron mediante citometría de flujo para detectar expresión de GFP.

Resultados

Los resultados muestran una gran diferencia entre las placas tratadas con PFM y las no tratadas (Figura 7). Al cuantificar el nivel de transducción mediante citometría de flujo (Figura 8), las placas tratadas con PFM sin centrifugación demuestran ser unas 4 veces más eficaces que las no tratadas, mientras que en las tratadas con centrifugación el nivel de transducción fue del orden de 15 veces más. Estos resultados demuestran que la eficacia obtenida con las placas tratadas con PFM es muy superior a la actividad residual debida a la unión inespecífica no covalente de las partículas a la superficie hidrofílica.

● Experimento 2

Objetivo

Evaluar la eficacia de transferencia genética en placas tratadas con PFM en comparación con superficies de similar hidrofobicidad a las tratadas con PFM, pero no reactivas.

Método

Se utilizaron las siguientes superficies (Figura 9):

- Tratadas con PFM y bloqueadas con amino-PEG (APEG).
- Placas TC sin tratar con PFM.
- Placas con PFM recubiertas de virus.

ES 2 362 772 A1

Los experimentos que se realizaron fueron los siguientes:

	PFM	No PFM
5		
	PD	Muestra 1
10		-----
	PD-APEG	Muestra 2

15	Centrifugada (PD)	Muestra 3

20	TC	-----
		Muestra 5

Los materiales empleados fueron:

- Células que se utilizaron: HEK-293 (4x10⁵ células/placa).
- Stock de partículas lentivirales: LV-ZSGreen/ApoCi sh4 (2 x 10⁷ UT/ml).

Previo al tapizado con los lentivirus, se realizó el bloqueo de las placas que se utilizarán como controles negativos. Para ello se añadió 1 ml de una disolución de amino-PEG 10 mM sobre una placa PD recubierta con PFM, y se incubó toda la noche con agitación orbital. A la mañana siguiente se lavo con agua miliQ. Para realizar el tapizado con lentivirus se siguió el mismo protocolo descrito en el experimento 1, aunque en este caso no se analizaron las células mediante citometría.

Resultados

Los resultados obtenidos (Figura 10) mostraron una vez más que las placas tratadas con PFM son capaces de transducir mayor cantidad de células que las placas que no han sido tratadas con dicha molécula. Además, esto queda claramente demostrado al comparar las placas PD con PFM con las APEG, en las cuales no se detecta prácticamente expresión alguna de GFP. En el caso de la centrifugación, se observó también un gran incremento en la transducción en placas PD PFM, con respecto a las placas TC utilizadas para la centrifugación.

• Experimento 3

Objetivo

Demostrar la modificación genética selectiva de células humanas *in vitro* mediante contacto con superficies tratadas sólo en una parte con el método de la invención.

Método

Se tapizó una placa TC, la mitad con PFM y la otra sin PFM y se realizó el experimento con el protocolo habitual (suspensión viral durante 30 minutos a 37°C).

Resultados

En la Figura 11 se muestra que las células adheridas a la superficie donde estaba el PFM expresaron selectivamente el gen reportero (GFP), mientras que las adheridas a la parte donde no había PFM no fueron transducidas en una proporción significativa.

Ejemplo 2

Transferencia genética empleando partículas adenovirales

Objetivo

Evaluar la eficacia de transferencia genética en placas tratadas con PFM mediante la infección con Adenovirus.

ES 2 362 772 A1

Método

Los materiales empleados fueron:

- 5 ○ Células: Hek-293T (4 x 10⁵ células/placa).
- Stock de partículas adenovirales: AdGFP (2 x 10⁹ UT/ml)

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 10 ○ Se añadieron a la placa las partículas adenovirales (500 µl de una dilución 1:3 del stock), y se incubaron durante 30 minutos en la incubadora a 37°C.
- Se lavó con medio de cultivo celular (DMEM/10% FBS) X 5 veces.
- 15 ○ Se lavó con 400 ml de medio de cultivo durante 10 minutos con agitación orbital.
- Se sembraron las células y se introdujo la placa en el incubador.
- 20 ○ Tras 48 h, se observaron las células al microscopio de fluorescencia.

Resultados

25 Los resultados (figura 12) muestran que se produjo una modificación génica de las células, ya que se pudo ver un elevado porcentaje de expresión de GFP en las mismas en el microscopio de fluorescencia.

Ejemplo 3

30 *Transferencia genética empleando complejos ADN-lipofectamina*

Objetivo

35 Evaluar la eficacia de transferencia genética en placas tratadas con PFM mediante la transfección con el agente de transfección comercial lipofectamina (Lipofectamine™, Invitrogen).

Método

Los materiales empleados fueron:

- 40 ○ Células: HEK-293T 4 x 10⁵ (células/placa)
- Lipofectamine™2000 (Invitrogen), preparada y en concentraciones según indica el fabricante.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 45 ○ Se añadieron a la placa los complejos con lipofectamina (500 µl de una dilución 1:3 del stock), y se incubaron durante 30 minutos en la incubadora a 37°C.
- 50 ○ Se lavó con medio de cultivo celular (DMEM/10% FBS) X 5 veces.
- Se lavó con 400 ml de medio de cultivo durante 10 minutos con agitación orbital.
- Se sembraron las células y se introdujo la placa en el incubador.
- 55 ○ Tras 48 h, se observaron las células al microscopio de fluorescencia.

Resultados

60 Los resultados (figura 12) muestran células infectadas mediante este método. A través del microscopio de fluorescencia se vio la expresión de GFP.

65

REIVINDICACIONES

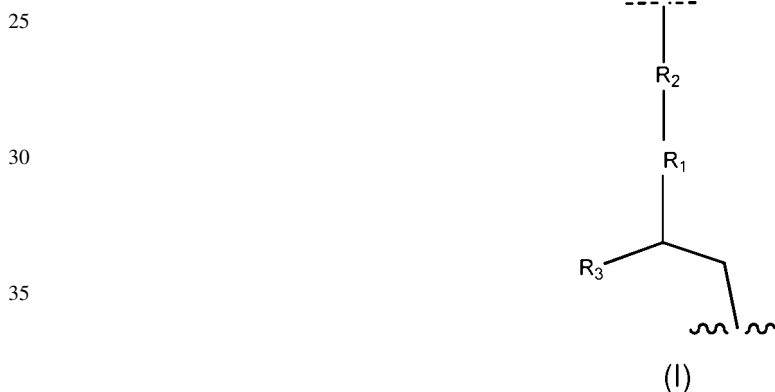
1. Superficie bioactiva que comprende:

- 5 a) una matriz polimérica,
 b) un complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica (a), y
 10 c) un vector de transferencia génica unido al complejo conector (b), donde el compuesto del complejo (b) se une covalentemente al vector de transferencia mediante un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo.

15 2. Superficie bioactiva según la reivindicación 1, donde el compuesto unido a la matriz está unido al vector de transferencia mediante un grupo carboxilo.

20 3. Superficie bioactiva según la reivindicación 1, donde el compuesto unido a la matriz está unido al vector de transferencia mediante un grupo amino.

4. Superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto unido a la matriz, tiene la siguiente fórmula (I):



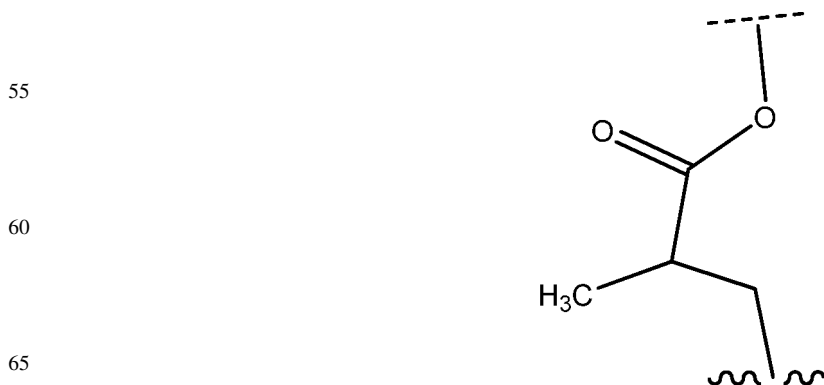
40 donde

R₁ es un radical que existe o no y si existe se selecciona de un grupo que comprende un alquilo (C₁-C₆), alqueno (C₁-C₆), cicloalquilo o arilo;

45 R₂ es un grupo carboxilo (-COO-), amino (-NH-), éter (-O-) o isocianato (-CON-), o

R₃ es un hidrógeno, un alquilo(C₁-C₆) o un alqueno(C₁-C₆).

50 5. Superficie bioactiva según la reivindicación 4, donde el compuesto de fórmula (I) es:



ES 2 362 772 A1

6. Superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el complejo conector comprende además una molécula seleccionada de la lista que comprende: azúcar, péptido, lípido o cualquier combinación de los mismos y donde dicha molécula se encuentra entre el vector y el grupo carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo del compuesto unido covalente a la matriz polimérica.

7. Superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la matriz polimérica se selecciona de la lista que comprende: poliestireno, policarbonato, poli(etilenocarbonato), polietileno, poliolefinas, poli(di-ol citrato), poli fumarato, poli lactidos, poli caprolactona, poli acrilamidas, poli siloxanos, poliésteres, poliamidas, copolímeros de glicólico/láctico, poliuretano o cualquier combinación de los mismos.

8. Superficie bioactiva según la reivindicación 7, donde la matriz polimérica es poliestireno.

9. Superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el vector de transferencia génica comprende al menos un grupo amino o carboxilo.

10. Superficie bioactiva según la reivindicación 9, donde el vector de transferencia génica comprende al menos un grupo amino.

11. Superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el vector de transferencia génica se selecciona de la lista que comprende: complejo ácido nucleico-poliamina, complejo ácido nucleico-péptido, complejo ácido nucleico-polipéptido, complejo ácido nucleico-proteína, complejo ácido nucleico-dendrímero, complejo ácido nucleico-lípido-poliamina, complejo ácido nucleico-nanopartícula inorgánica modificada, vector adenoviral, vector adenoasociado, vector retroviral, vector lentiviral, vector alfaviral, vector herpesviral, vector derivado de poxvirus o vector derivado de coronavirus.

12. Superficie bioactiva según la reivindicación 11 donde el vector de transferencia génica es un vector lentiviral.

13. Superficie bioactiva según la reivindicación 11 donde el vector de transferencia génica es un vector adenoviral.

14. Dispositivo implantable **caracterizado** porque presenta al menos una parte de su superficie recubierta con una superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Dispositivo implantable según la reivindicación 14 donde dicho dispositivo se selecciona de la lista que comprende: stent, prótesis ortopédica, membrana biocompatible, polímero poroso, parche, hilo de sutura, cápsula y partícula.

16. Uso de la superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o del dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 para transferir un ácido nucleico a al menos una célula que entre en contacto con dicha superficie bioactiva.

17. Uso según la reivindicación 16 donde la célula es una célula eucariota.

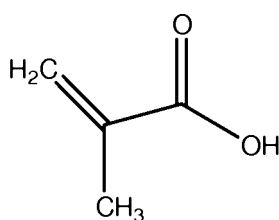
18. Método para transferir un ácido nucleico a una célula que comprende poner en contacto la superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o del dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 con dicha célula.

19. Método según la reivindicación 18 donde la célula es una célula eucariota.

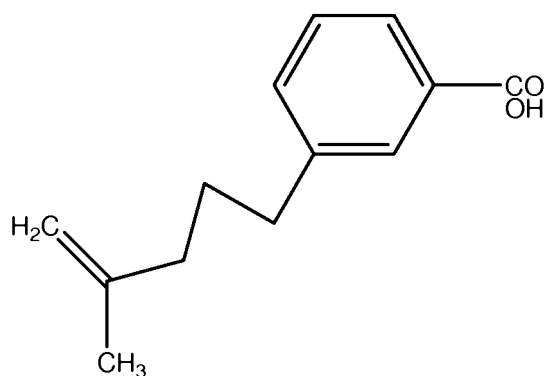
20. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19 que comprende:

- a) una matriz polimérica,
- b) un complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica (a), y
- c) al menos un elemento necesario para la formación de un vector de transferencia génica.

21. Kit según la reivindicación 20 donde el complejo conector comprende un compuesto que se selecciona de la lista que comprende:

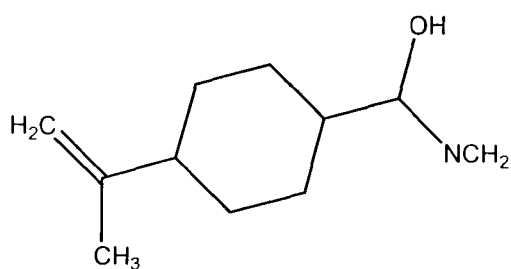


5



10

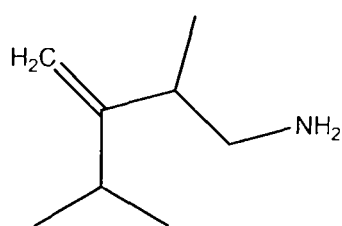
15



20

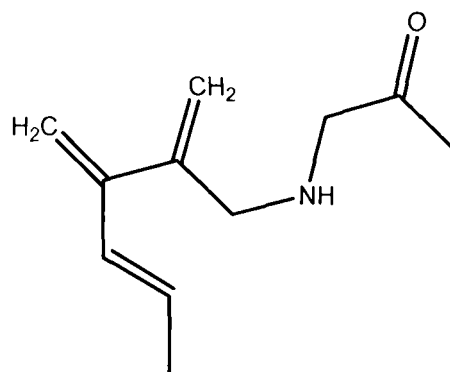
25

30



35

40



45

50

55

22. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19 que comprende:

60

- a) la superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o el dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, y
- b) al menos un elemento necesario para la formación de un vector de transferencia génica.

65

23. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, donde el elemento necesario para la formación del vector de transferencia génica se selecciona de la lista que comprende: poliamina, péptido, polipéptido, proteína, dendrímero, lípido-poliamina, nanopartícula inorgánica modificada y plásmido que codifica una proteína de la envuelta de un vector viral.

ES 2 362 772 A1

24. Método para elaborar la superficie bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende poner en contacto:

una matriz polimérica que comprende un complejo conector unido covalentemente a su superficie mediante un compuesto que contiene un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo y un vector de transferencia génica.

25. Método según la reivindicación 24, donde la matriz polimérica se pone en contacto con el vector de transferencia génica a una temperatura de entre 20 y 40°C durante un periodo de tiempo de entre 5 minutos y 24 horas.

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, donde se centrifuga el vector de transferencia génica sobre la matriz polimérica.

27. Método según la reivindicación 25, donde se centrifuga el vector de transferencia génica sobre la matriz polimérica a una velocidad de entre 100 y 20.000 x g.

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde se somete a la matriz polimérica a una presión negativa.

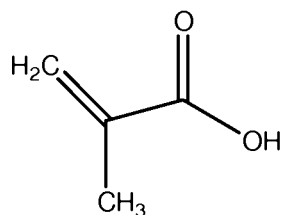
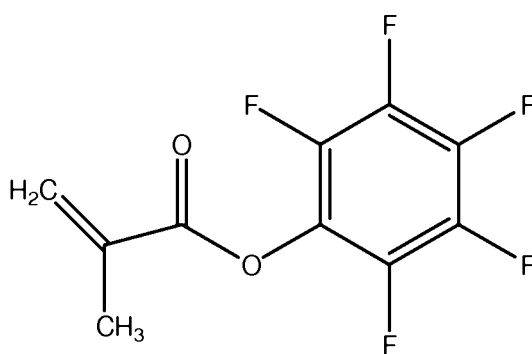
29. Método según la reivindicación 24, donde se somete a la matriz polimérica a una presión negativa de entre -10^{-4} y -10^{-1} mBar.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29 donde la matriz polimérica se obtiene mediante un método seleccionado de la lista que comprende: deposición química, polimerización, polimerización por plasma e iCVD.

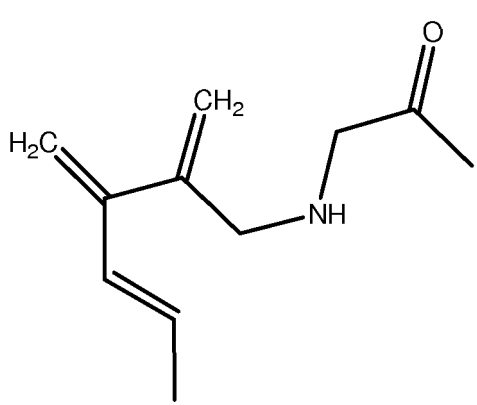
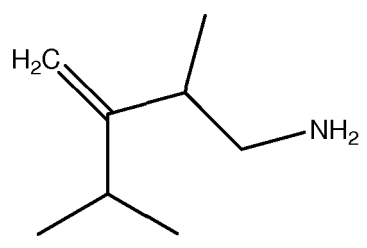
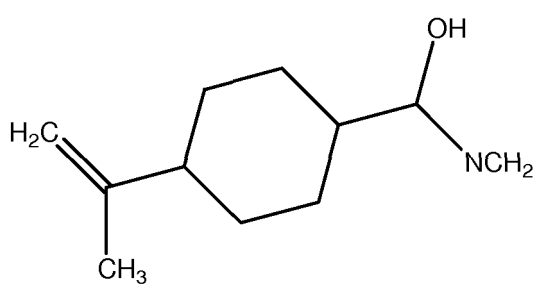
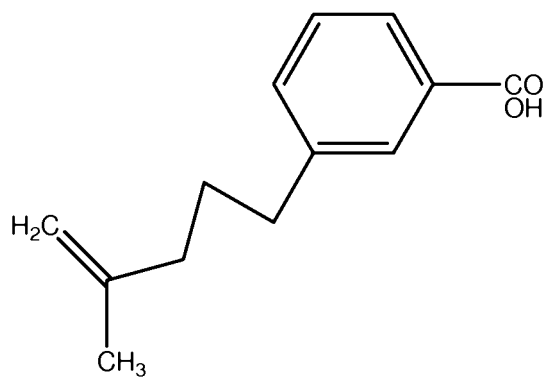
31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28 donde la matriz polimérica se obtiene:

- activando la matriz polimérica mediante plasma frío, y
- pasando una corriente del complejo conector que comprende al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica obtenida del paso (a).

32. Método según cualquiera de las reivindicaciones anterior donde el complejo conector comprende un compuesto que se selecciona de la lista que comprende:



5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60



33. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32, donde el complejo conector además comprende una molécula seleccionada de la lista que comprende azúcar, péptido, lípido o cualquier combinación de los mismos.

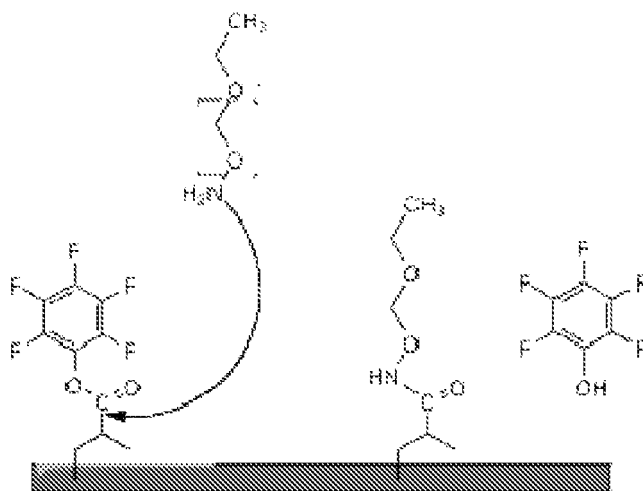


FIG. 1

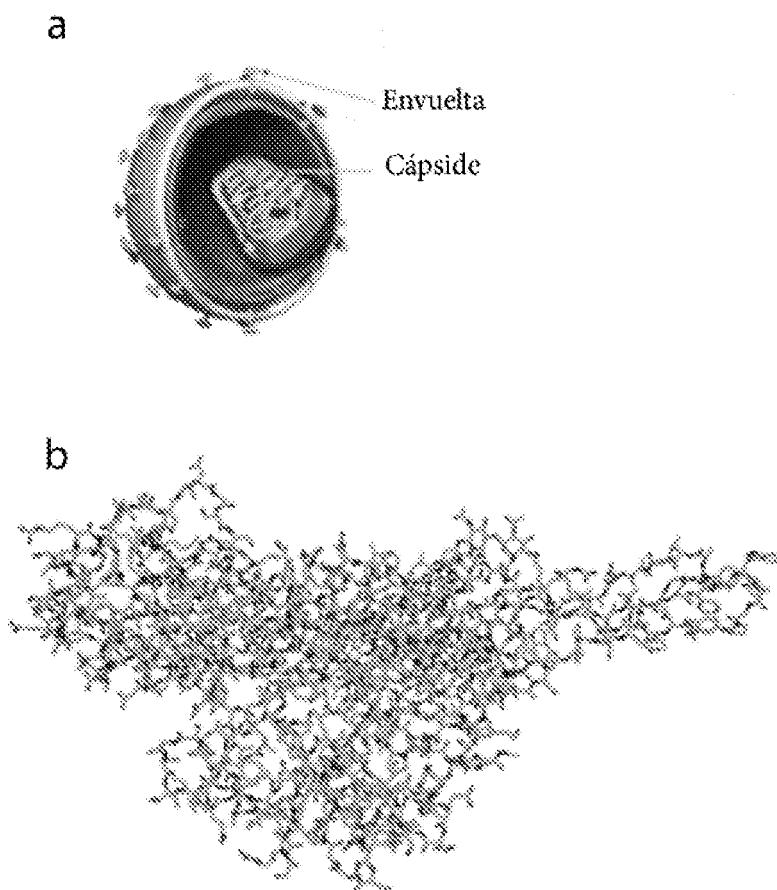


FIG. 2

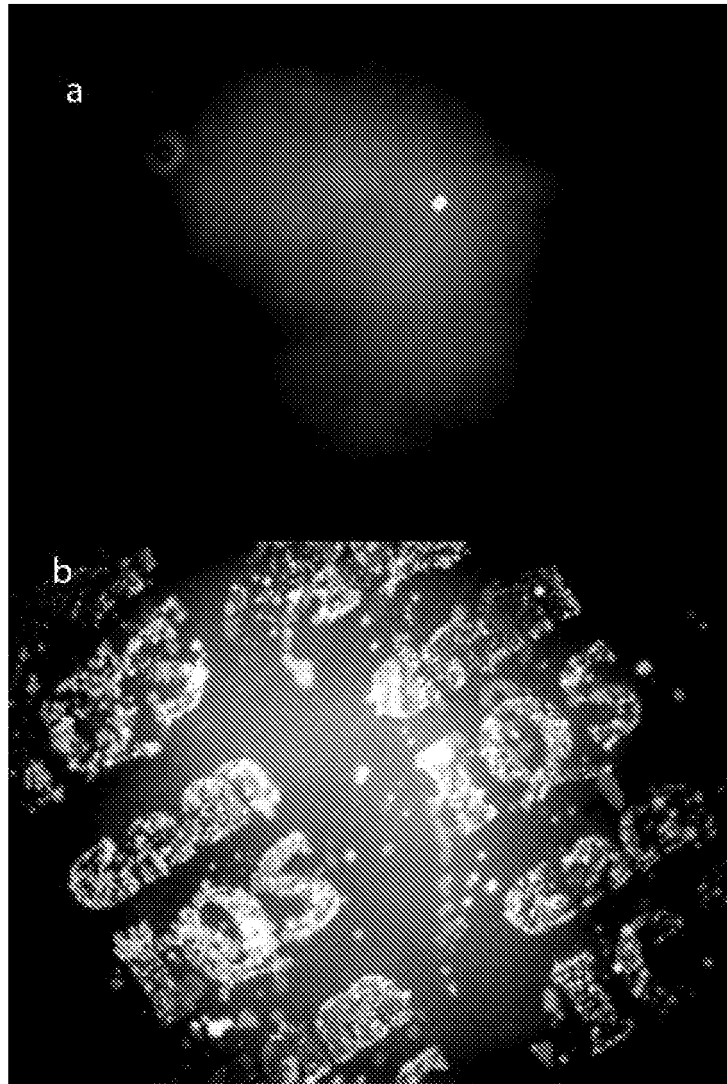


FIG. 3

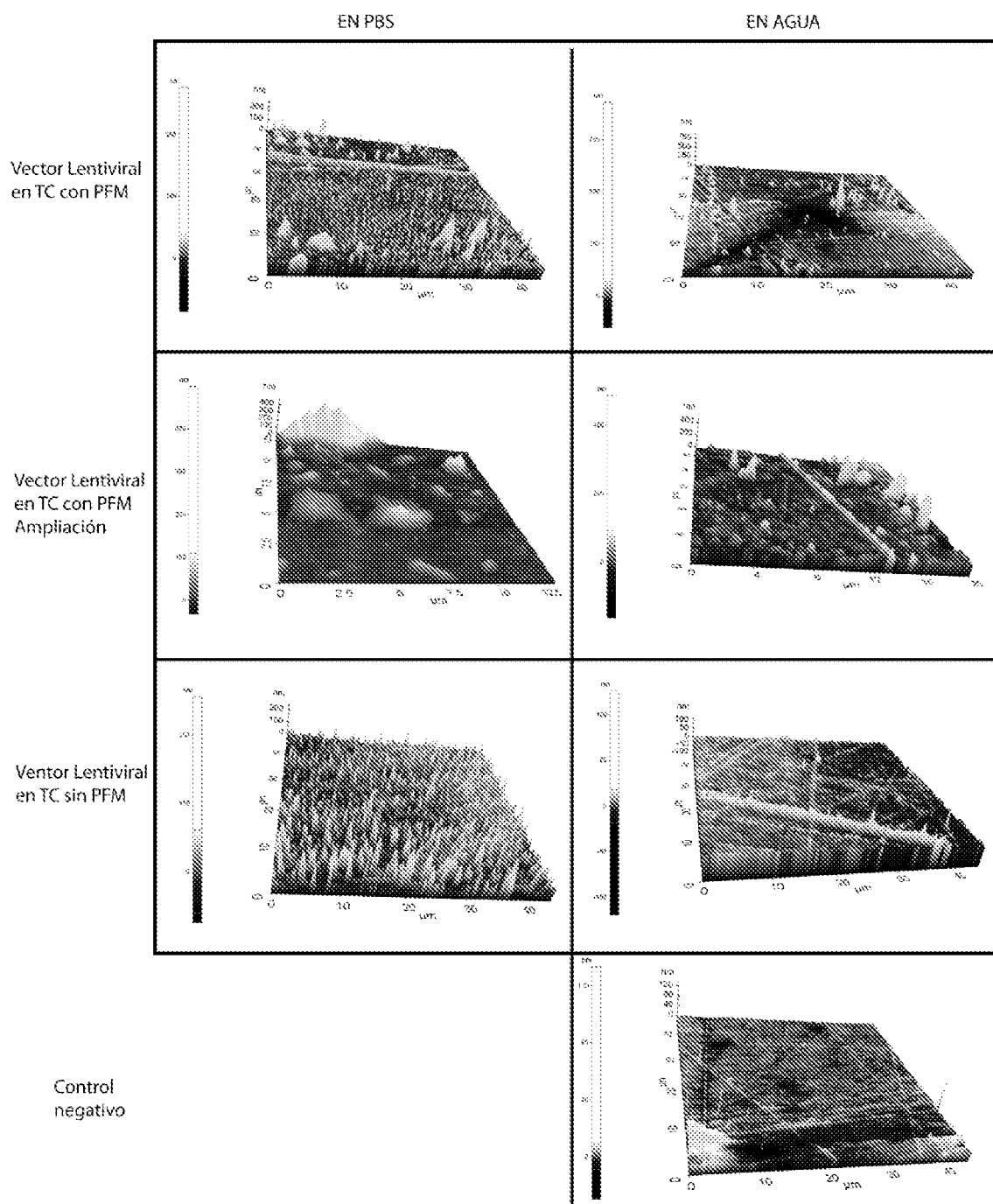


FIG. 4

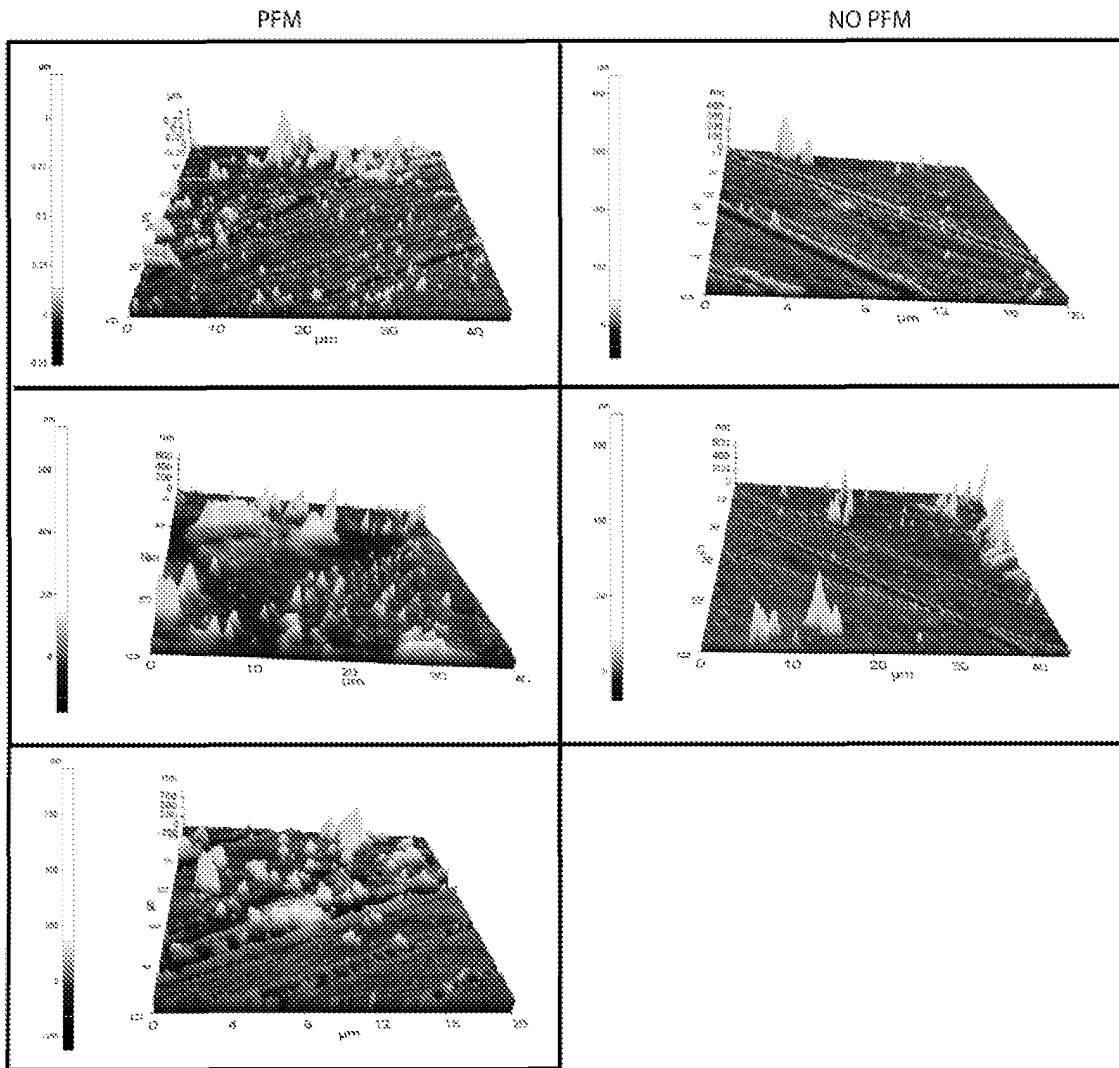


FIG. 5

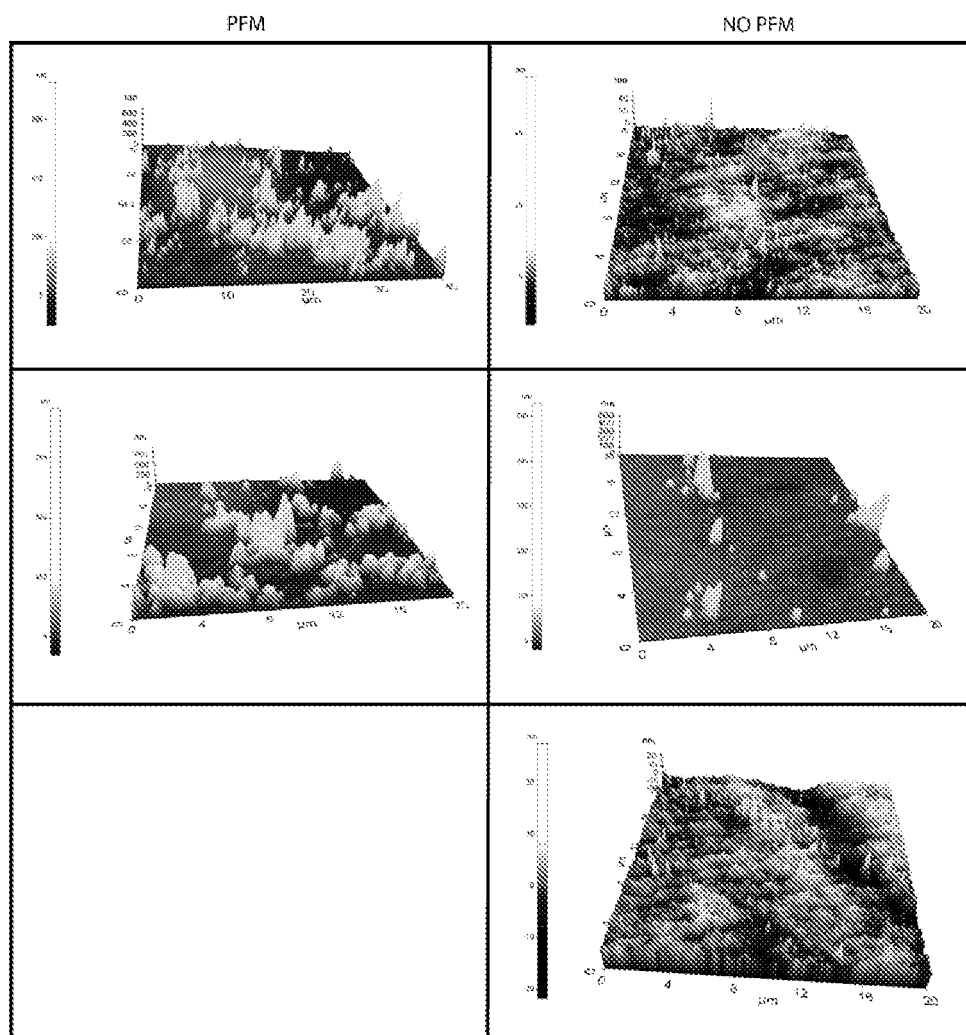


FIG. 6

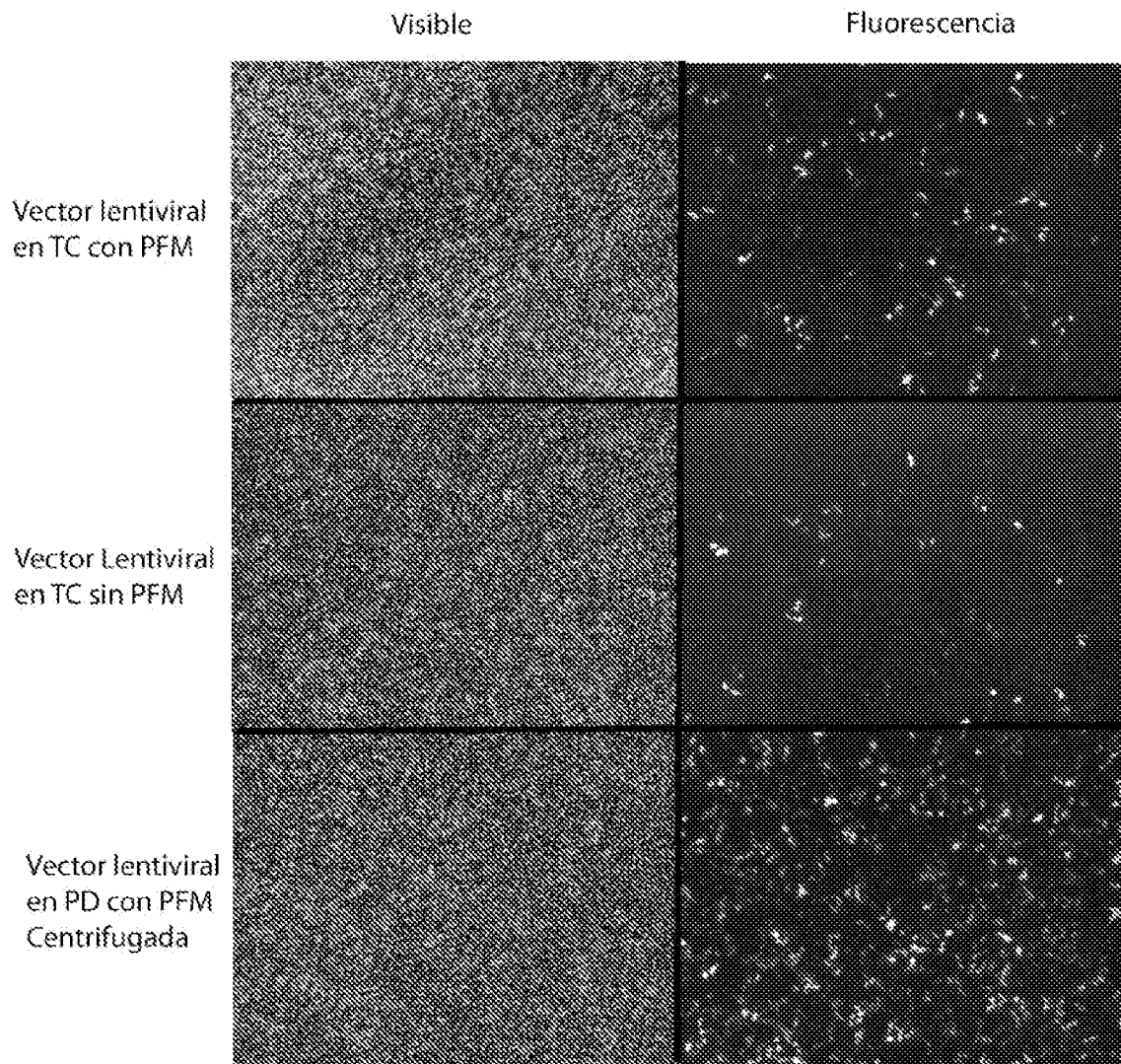


FIG. 7

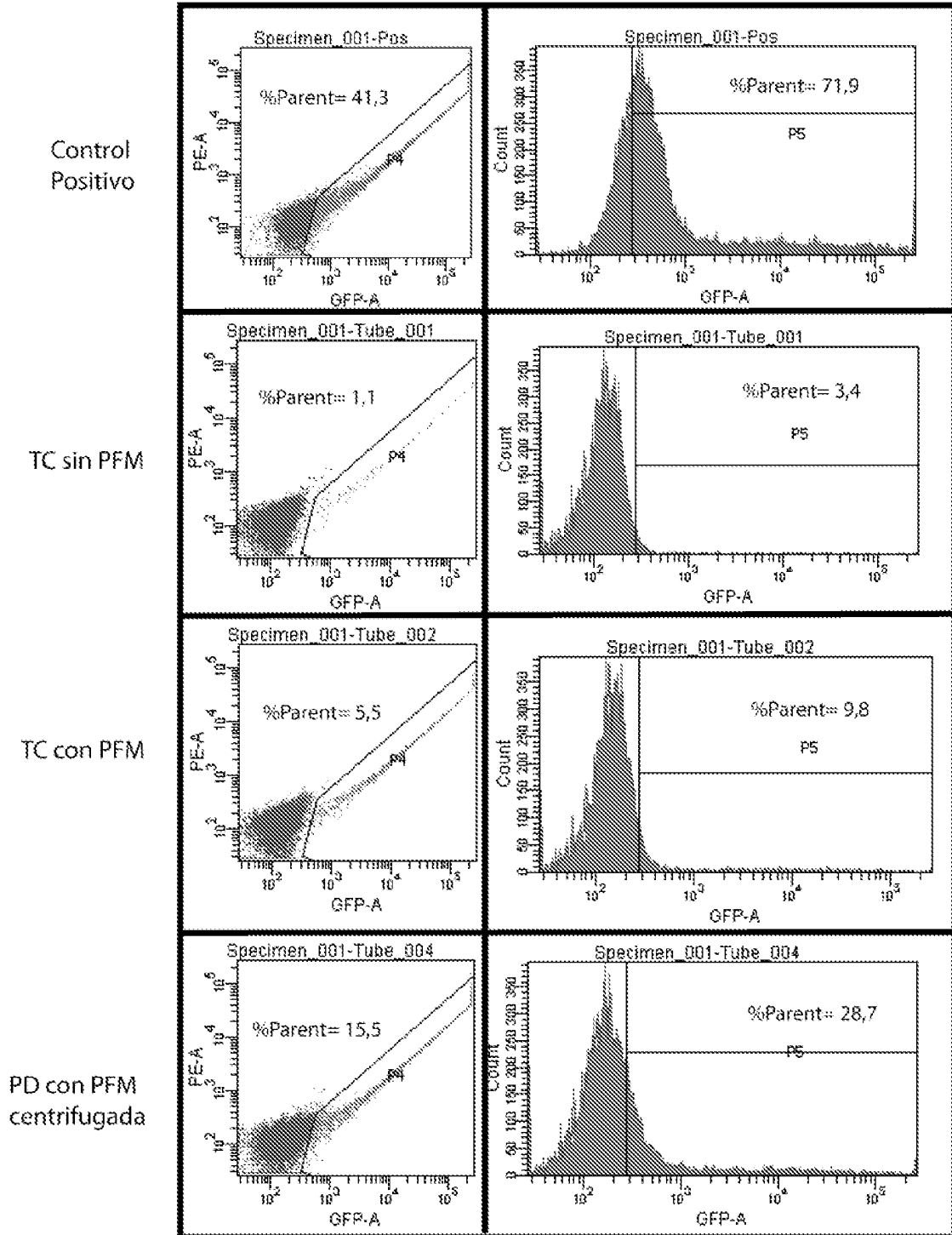


FIG. 8

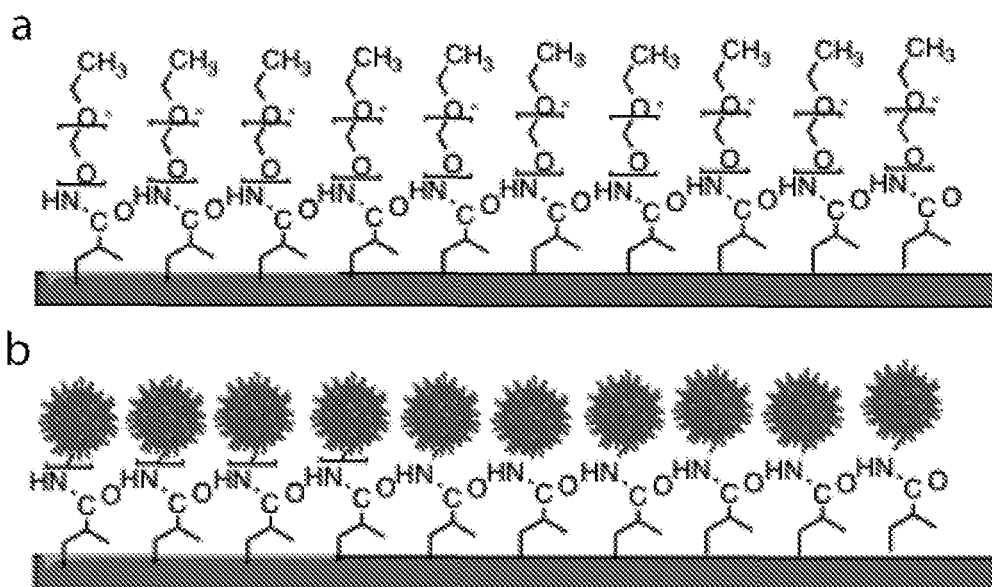


FIG. 9

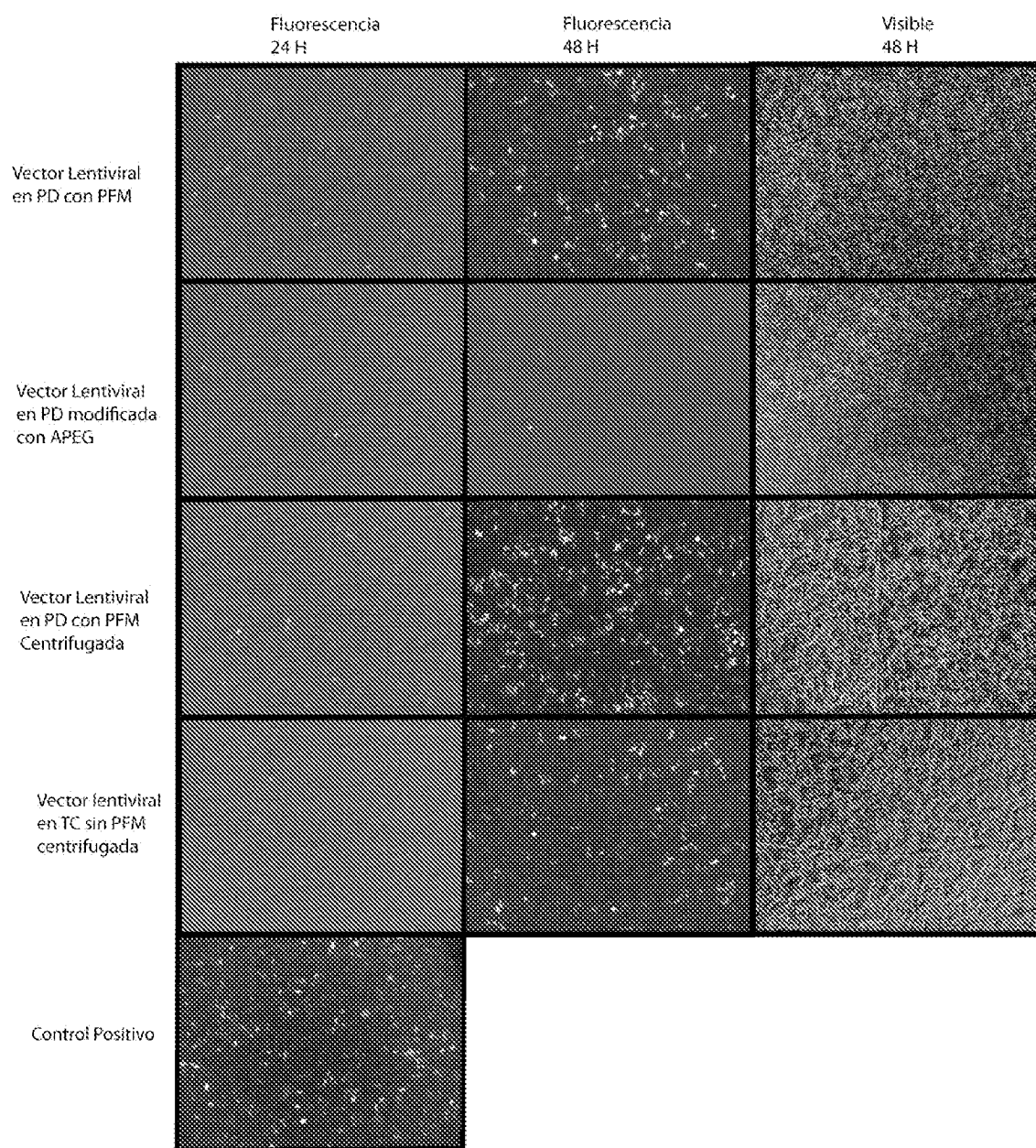


FIG. 10

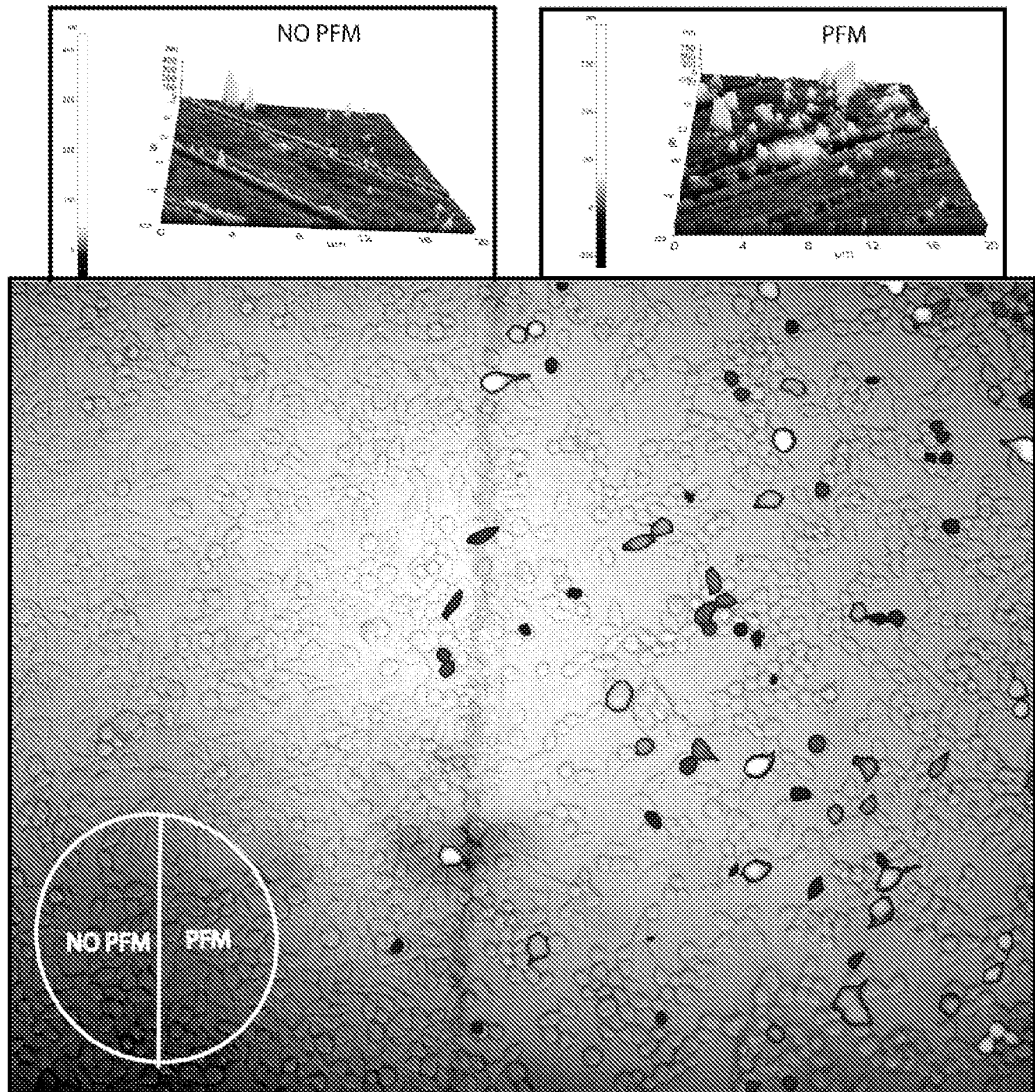


FIG. 11

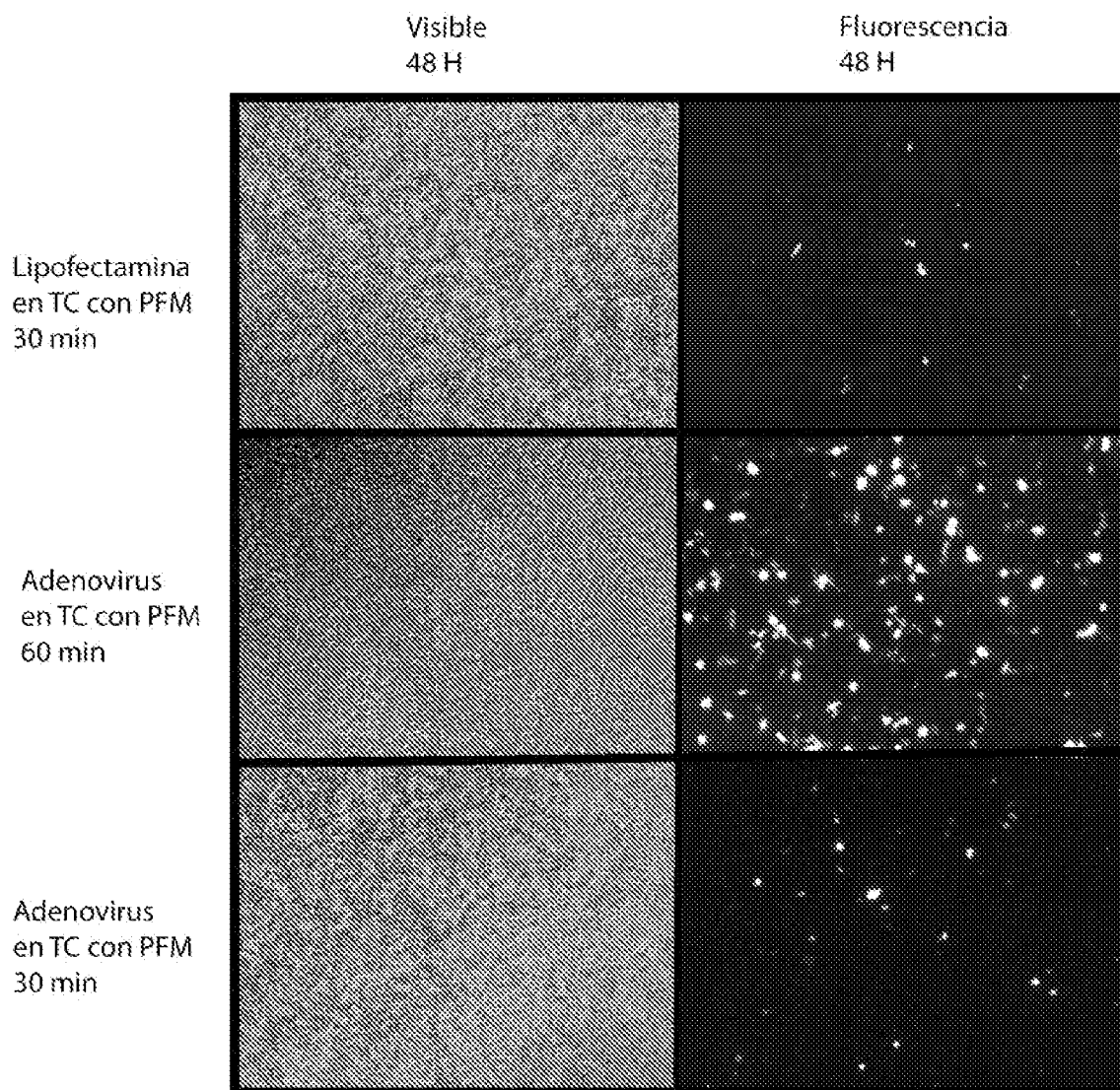


FIG. 12



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931268

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MA, Z et al. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2007, Vol 60, páginas 137-157, página 141, columna 2; página 153, columna 1.	1-33
A	BENGALI, Z et al. Gene delivery by immobilization to cell-adhesive substrates. MRS Bull. 2005 Vol 30 (9), páginas 659-662, todo el documento.	1-33
A	HU W-W et al. The use of reactive polymer coatings to facilitate gene delivery from poly (epsilon-caprolactone) scaffolds. Biomaterials 2009, Vol 30, páginas 5785-92, página 5785, resumen; página 5791, columna 2.	1-33

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.03.2011

Examinador
M. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08G18/04 (2006.01)

C08G71/00 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

A61K47/34 (2006.01)

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

C08G, G01N, C12N, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-33	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-33	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MA, Z et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2007, Vol 60, páginas 137-157.	2007
D02	BENGALI, Z et al. MRS Bull. 2005 Vol 30 (9), páginas 659-662.	2005
D03	HU W-W et al. Biomaterials 2009, Vol 30, páginas 5785-5792.	12.07.2009

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

La presente solicitud divulga una superficie bioactiva formada por una matriz polimérica (a), un complejo conector (b) que tiene al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica (a), y un vector de transferencia génica (c) unido covalentemente al complejo conector (b), mediante un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo. El complejo conector también incluye una molécula seleccionada entre azúcar, péptido, lípido o cualquier combinación de los mismos y que se encuentra entre el vector de transferencia y los grupos carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo (reivindicaciones 1-13). Se reivindica también un dispositivo implantable que presenta al menos una parte de su superficie recubierta con una superficie bioactiva; el uso de dicha superficie bioactiva o dispositivo para transferir un ácido nucleico a al menos una célula; así como el método para transferir un ácido nucleico a (reivindicaciones 14-19). La invención se refiere también a un kit para llevar a cabo tal método (reivindicaciones 20-23) y un procedimiento para elaborar la superficie bioactiva (reivindicaciones 24-32).

El documento D01 divulga una revisión de polímeros en biomedicina para ingeniería de tejidos, refiriéndose a que la inmovilización de biomoléculas proteicas específicas es la manera más eficaz para preparar la superficie de las células y que grupos reactivos como -COOH y -NH₂ se introducen con frecuencia en la superficie del material como sitios de unión covalente a las proteínas. En particular, indica que para inmovilizar covalentemente las moléculas de proteínas en biomateriales poliméricos químicamente inertes, se deben introducir primero como sitios de unión grupos reactivos como grupos hidroxilo, carbonilo o amino (ver página 141, columna 2; página 153, columna 1).

El documento D02 estudia cómo mejorar la transferencia y liberación genética para uso terapéutico mediante el uso de biomateriales que pueden mejorar la disponibilidad de vectores virales o no virales. Para ello, los biomateriales utilizan dos mecanismos básicos: liberación polimérica y disponibilidad mediada por sustrato. En particular, en la revisión que hace este documento, se describen las propiedades de los vectores virales y no-virales, se presentan las estrategias para inmovilizar ADN al biomaterial y se estudia el desarrollo de biomateriales para promover la adhesión a la célula y aumentar la transferencia génica (ver todo el documento).

El documento D03 se refiere a un estudio en el que se desarrolla la modificación de una superficie para funcionalizar superficies de biomateriales, de esta forma partículas virales se unen a los materiales para controlar espacialmente la expresión genética en regiones definidas. En él se indica que aunque la técnica que desarrolla puede tener otras aplicaciones, una de ellas es la de unir de forma eficaz vectores virales a las superficies de los materiales para facilitar la liberación genética (ver página 5785, resumen; página 5791, columna 2).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la invención es una superficie bioactiva con una matriz polimérica (a), un complejo conector (b) que tiene al menos un compuesto unido covalentemente a la superficie de la matriz polimérica (a), y un vector de transferencia génica (c) unido covalentemente al complejo conector (b), mediante un grupo seleccionado entre carboxilo, amino, isocianato e hidroxilo. Es también objeto de esta invención el uso de la superficie bioactiva para transferir un ácido nucleico a una célula.

1.1. REIVINDICACIONES 1-33

El uso de biomateriales, especialmente biopolímeros en biomedicina para realizar ingeniería de tejidos o transferencia de material genético es conocido en el estado de la técnica. De hecho, los documentos D01-D03 anticipan la modificación de las propiedades de las superficies de materiales poliméricos a utilizar en biomedicina para hacerla biocompatible, así como la transferencia de material genético mediante el uso de vectores.

Sin embargo, las características de la superficie reivindicada en la presente solicitud, no coinciden con las de estos documentos. Ni tampoco serían obvias para un experto en la materia considerando estos documentos individualmente o en conjunto.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-33 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).