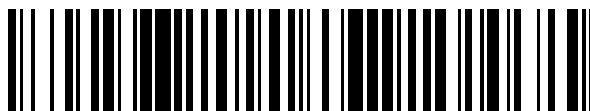


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 338**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/12** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2012 PCT/RU2012/001103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO2013100818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2012 E 12861904 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2797633**

54 Título: **Biocomposite para la regeneración de tejidos y órganos lesionados, un kit para fabricar el biocomposite, un procedimiento de fabricación del biocomposite**

30 Prioridad:

**29.12.2011 RU 2011153873**

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

**16.06.2017**

73 Titular/es:

**"NEXTGEN" COMPANY LIMITED (100.0%)  
ul. Gubkina, 3, korp. 1  
Moscow 119333, RU**

72 Inventor/es:

**ISAEV, ARTUR ALEKSANDROVICH;  
KISELEV, SERGEJ L'VOVICH;  
DEEV, ROMAN VADIMOVICH;  
BOZO, IL'YA YADIGEROVICH y  
FILONENKO, ELENA SERGEEVNA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 617 338 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

Biocomposite para la regeneración de tejidos y órganos lesionados, un kit para fabricar el biocomposite, un procedimiento de fabricación del biocomposite

**Antecedentes de la invención**5 **Campo de la invención**

La invención se presenta en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no se contemplan en el ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan para un fin meramente ilustrativo y no forman parte de la presente invención.

10 Un objeto de la invención pertenece a un biocomposite para el uso en medicina y veterinaria para restaurar tejido y órganos lesionados en mamíferos, a un kit para fabricar el biocomposite, un procedimiento de fabricación del biocomposite, un procedimiento de tratamiento de las investigaciones, y un procedimiento de entrega de ácidos nucleicos.

**Discusión de los antecedentes**

15 Se conocen de la técnica anterior armazones de composite para reparar tejidos, véase, por ejemplo, el documento RU 2 170 104 C2 que desvela armazones de composite que comprenden ácidos nucleicos para atraer células del paciente en el que se implantan, los documentos US 2006/024377 A1 y US 2011/229970 A1 desvelan armazones de composite que comprenden ácidos nucleicos y células, o el documento WO 02/087411 A2 desvela armazones de composite cargados con células transfectadas o cargados con ácidos nucleicos para transfectar células *in vivo* o *in vitro*, pero no ambos simultáneamente. La presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, difiere de dicho estado de la técnica, entre otros, en que el biocomposite comprende tanto células transfectadas como ácidos nucleicos para la transfección.

20

Los procedimientos conocidos de recuperación de tejidos y órganos se basan en construcciones de ingeniería tisular que contienen poblaciones celulares diferentes o varias construcciones genéticas (ácidos nucleicos). Aunque ambas tendencias - celulares y genéticas - son prometedoras, estas tienen una eficacia moderada y limitada.

25 Un procedimiento según el cual solo se administra una construcción genética con ultrasonidos, se describe, por ejemplo, en (Greenleaf W.J., Bolander M.E., Sarkar G. y col. *Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. Ultrasound in Medicine and Biology* 1998; 24(4): 587-595; Schratzberger P., Krainin J.G., Schratzberger G. y col. *Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle Molecular Therapy* 2002, 6(5): 576-583). No obstante, la eficiencia de administración de las construcciones genéticas es baja cuando se utilizan parámetros de radiación ultrasónica seguros para un receptor. La entrega de la cantidad necesaria de construcciones genéticas es posible solo con la exposición ultrasónica perjudicial para los tejidos (véanse, por ejemplo, Duvshani-Eshet M., Machluf M. *Therapeutic ultrasound optimization for gene delivery: a key factor achieving nuclear DNA localization. Journal of Controlled Release* 2005; 108(2-3): 513-528; Kim H.J., Greenleaf J.F., Kinnick R.R. *Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. Human Gene Therapy* 1996; 7(11): 1339-1346).

30

Otro procedimiento según el cual se administran ácidos nucleicos en un complejo con liposomas, se describe, por ejemplo, en (Fraleigh R., Subramani S., Berg P. y col. *Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. J Biol Chem.* 1980; 255(21): 10431-5) y un procedimiento modificado, es decir, la administración de una combinación de un conjugado de liposomas con construcciones genéticas utilizando factores físicos (por ejemplo, ultrasonidos), se describe, por ejemplo, en (Roos A.K., Eriksson F., Timmons J.A. *Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. PLoS One* 2009; 4(9): e7226). No obstante, una proporción significativa de los liposomas se destruye cuando se exponen a enzimas lipolíticas en el tejido, lo que reduce la eficiencia de la entrega de sustancias activas, tales como ácidos nucleicos. La parte restante de ácidos nucleicos se entrega casi de forma concomitante, lo cual no permite alcanzar un efecto prolongado. Además, cuando se transporta a las células diana, un complejo "liposoma-construcción genética" no se destruye, sino que los liposomas se introducen en las células, lo que reduce la seguridad del procedimiento.

40

45

Un procedimiento según el cual se administran ácidos nucleicos a través de electroporación se describe, por ejemplo, en (Roos A.K., Eriksson F., Timmons J.A. *Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. PLoS One.* 2009; 4(9): e7226; Schertzer J.D., Lynch G.S. *Plasmid-based gene transfer in mouse skeletal muscle by electroporation. Methods Mol Biol.* 2008; 433: 115-25). No obstante, este procedimiento se basa en la aplicación de campos eléctricos que impulsan a las construcciones genéticas (solas o en un complejo con otros componentes, por ejemplo, un adyuvante) a través de una membrana biológica. Como resultado de este procedimiento, una porción importante de construcciones genéticas se daña. Este procedimiento no permite alcanzar el efecto prolongado y, por lo tanto, es necesario utilizar el procedimiento repetidas veces.

50

55 Un procedimiento de administración local de una construcción de ingeniería tisular que incluye un armazón tridimensional y células adheridas a su superficie, se describe, por ejemplo, en (Deev R.V., Tsiapkina N.V., Bozo I.

Ya., Pinaeva G.P., Tuhiliv R.M., *A method of combining cultured osteogenic cells and a three-dimensional matrix-carrier*, documento n.º RU 2008150694, publicado el 22 de diciembre de 2008). No obstante, en esta configuración, las células requieren un suministro sanguíneo activo. Una distancia crítica del torrente sanguíneo hemomicrocirculatorio, más allá del cual las células mueren, es inevitablemente de 200-500  $\mu\text{M}$  (véase, por ejemplo, Polykandriotis E., Arkudas A., Horch R. y col. *Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science*. *J. Cell Mol Med* 2007; 11(1): 6-20). Debido a esto, el tamaño de una construcción de ingeniería tisular, en la cual las células de la construcción permanecen viables en un receptor después del trasplante, no debería ser inferior a 1  $\text{cm}^3$ .

Los defectos de dicho tamaño no requieren una optimización adicional del procedimiento regenerativo, por lo tanto, pueden utilizarse construcciones de ingeniería tisular de un tamaño significativamente mayor (de 1  $\text{cm}^3$ ). No obstante, el trasplante de una construcción tan grande puede dañar un área de tejido y puede causar inevitablemente la muerte de una mayor proporción de las células administradas (especialmente las células situadas en una parte central del biocomposite), lo que reduce significativamente la eficiencia del procedimiento. La eficacia de una construcción de ingeniería tisular en la reparación de un defecto óseo (u otras aplicaciones) depende principalmente de la supervivencia de las células que se comprenden en un biocomposite. No obstante, las células de la construcción de ingeniería tisular necesitan oxigenación y, por lo tanto, cuanto mayor sea la construcción de ingeniería tisular, más células podrán morir después del trasplante (especialmente, las células situadas en la parte central (próximas al "núcleo") de la construcción de ingeniería tisular). Por consiguiente, en grandes construcciones de ingeniería tisular (mayores a 1  $\text{cm}^3$ ), pueden morir numerosas células incluidas y la eficiencia de la reparación puede no ser alta (por ejemplo, la eficiencia puede ser idéntica a la del armazón sin las células). Por lo tanto, construcciones de ingeniería tisular de pequeño tamaño son más eficaces para el reemplazo óseo en comparación con el mismo armazón sin las células. Este problema de oxigenación se conoce adecuadamente.

Además, una elección de un tamaño de una construcción de ingeniería tisular se determina por el tamaño de un defecto óseo que tiene que ser reparado; el tamaño de una construcción de ingeniería tisular tiene que coincidir con el tamaño del defecto óseo. Por consiguiente, no pueden utilizarse con eficacia pequeñas construcciones de ingeniería tisular para la reparación de grandes defectos. La regeneración natural de pequeños defectos óseos es bastante buena y no requiere materiales osteoplásticos muy eficaces, tales como construcciones de ingeniería tisular. En este caso, la regeneración es eficaz porque la mayoría de las células incluidas están vivas y realizan su función. Por consiguiente, las construcciones de ingeniería tisular se utilizan preferentemente para reparar defectos óseos grandes; sin embargo, en este caso, se tienen que utilizar construcciones de ingeniería tisular de gran tamaño, y la mayoría de sus células pueden morir, por lo tanto, la eficiencia final disminuye.

Una matriz activada, un procedimiento de fabricación de la matriz, y la administración local de ácidos nucleicos en la matriz de un biocompatible fabricado de varios materiales para proporcionar procedimientos reparadores se describen, por ejemplo, en (Goldstein S.A., *Methods of in vivo gene transfection for reparative wound regeneration*, documento RU n.º 2170104, publicado el 10 de junio de 2001). No obstante, estos enfoques técnicos se relacionan con un producto de dos componentes que incluye un armazón y una construcción genética. En este procedimiento, un elemento celular requerido para la restauración histotípica óptima de tejidos y órganos, está ausente y, por lo tanto, la eficiencia de la aplicación del producto es moderada.

Por consiguiente, existen varios enfoques para fabricar un biocomposite que proporcione una regeneración reparadora de tejidos y órganos.

Un enfoque conocido es la combinación de un armazón y células (enfoque de ingeniería tisular) en un biocomposite. No obstante, cuando el complejo contiene un gran volumen del biocomposite (mayor a 1  $\text{cm}^3$ ), las células incluidas en el biocomposite después del trasplante a un receptor mueren a causa del suministro insuficiente de torrente sanguíneo. Cuanto mayor sea un biocomposite, más células incluidas en el biocomposite y situadas en el interior del armazón morirán. Únicamente las células situadas en la periferia sobreviven. Este problema de suministro sanguíneo de biocomposites de ingeniería tisular existe y hasta ahora no se ha resuelto.

Otro enfoque conocido es la combinación de un armazón y ácidos nucleicos. Sin embargo, los ácidos nucleicos más "seguros" (es decir, ácidos nucleicos transportados por un sistema de entrega no viral, por ejemplo, un plásmido) tienen un bajo nivel de eficiencia de transfección *in vivo*, es decir, solo un 2 a 5 % de los ácidos nucleicos tras el implante de este biocomposite en un receptor transfecta las células. Los ácidos nucleicos incluidos en sistemas de entrega viral proporcionan un mayor nivel de transfección (por ejemplo, la eficiencia de transfección es de hasta un 40-45 %); sin embargo, los sistemas basados en virus son menos "seguros", ya que se introducen a través de partículas virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, o lentivirus).

Por consiguiente, es preciso un composite biológico que carezca de las deficiencias de los procedimientos conocidos.

### **Sumario de la invención**

La invención se presenta en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no se contemplan en el ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan para un fin meramente ilustrativo y no forman parte de la

presente invención.

5 Un objeto de la invención pertenece a un biocomposite para el uso en medicina y veterinaria para recuperar tejido y órganos lesionados en mamíferos, a un kit para fabricar el biocomposite, un procedimiento de fabricación del biocomposite, un procedimiento de tratamiento de las investigaciones, y un procedimiento de entrega de ácidos nucleicos contenidos en el biocomposite. Los presentes inventores han conseguido un objeto de la invención, la primera realización que incluye un biocomposite que comprende un armazón, al menos un ácido nucleico y células que proporcionan una regeneración reparadora como se define en las reivindicaciones. El biocomposite es adecuado para proporcionar procedimientos reparadores en mamíferos lesionados.

10 En otra realización, el armazón es un material sólido orgánico o inorgánico seleccionado entre el grupo que consiste en un material metálico, colágeno, quitosano, fosfato de calcio, hidroxiapatita, biocerámica, biovidrio, material de aluminato, proteínas purificadas, productos de matriz extracelular o una combinación de los mismos.

15 En una realización diferente, el armazón es al menos un líquido seleccionado entre el grupo que consiste en una solución de NaCl al 0,9 %, una solución de dextrano, una solución salina, una solución de ácido hialurónico, y ácido condroitínsulfúrico. Preferentemente, el armazón es al menos un material seleccionado entre el grupo que consiste en un colágeno, un alginato, un gel de gelatina, una solución coloidal, una pomada, y una crema. En aún otra realización, el armazón comprende al menos un material seleccionado entre el grupo que consiste en un sólido, un líquido, un gel, una pomada y un material de crema. El armazón también puede ser nanoestructurado.

En una realización, al menos dicho ácido nucleico definido en las reivindicaciones es un ADN que se incluye en una molécula de vector.

20 Un biocomposite puede comprender células autógenas y/o alógenas. En una realización, las células son derivados de una o varias líneas citogenéticas. Preferentemente, el biocomposite comprende células madre, progenitoras o diferenciadas, o una combinación de células diferenciadas de diversas maneras.

En una realización, las células se derivan de mamíferos inmediatamente antes de la adición de células al biocomposite, o células que han sido previamente expuestas a tecnologías de laboratorio de procesamiento celular.

25 La presente descripción contempla un procedimiento de fabricación de un biocomposite que comprende la combinación de al menos dicho ácido nucleico con un armazón, de manera que se crea un complejo, y la adición de células al complejo creado, en el que las células son previamente transfectadas con al menos un ácido nucleico, que puede ser idéntico o diferente de al menos un ácido nucleico combinado con el armazón, y en el que las células proporcionan una regeneración reparadora histotípica.

30 La presente descripción contempla además un procedimiento de fabricación de un biocomposite que comprende transfectar células preliminares, que proporcionan una regeneración reparadora histotípica, con al menos un ácido nucleico y, combinar las células transfectadas con un armazón.

35 El biocomposite descrito en el presente documento puede utilizarse en un procedimiento para la cicatrización de una lesión en un mamífero que comprende la administración del biocomposite de acuerdo a las realizaciones ejemplificadas a un mamífero en necesidad. Preferentemente, el biocomposite se administra directamente a un área de tejido dañado como parte de una operación o manipulación quirúrgica. El biocomposite puede administrarse en una inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraósea, endolumbar, subdural, intraarticular, u endobulbar. En otra realización, el biocomposite se aplica tópicamente.

40 La presente descripción se refiere asimismo a un procedimiento de entrega de al menos un ácido nucleico comprendido en el biocomposite, el procedimiento comprende la administración del biocomposite a un mamífero en necesidad del mismo.

45 La presente descripción se refiere además a un kit para la preparación de un biocomposite que comprende un recipiente que comprende un complejo de un armazón y al menos un ácido nucleico y un recipiente separado para combinar el complejo con un fluido biológico o un medio de cultivo con las células que proporcionan la regeneración reparadora. En un ejemplo, al menos un ácido nucleico es un ADN que se incluye en una molécula de vector, en el que el vector es un plásmido, un virus, un episoma, o un transposón.

Las células pueden derivarse de mamíferos inmediatamente antes de la adición de células al biocomposite, o células que han sido previamente expuestas a tecnologías de laboratorio de procesamiento celular.

50 La presente descripción se refiere, además, a un procedimiento de fabricación de un biocomposite que comprende la combinación de al menos un ácido nucleico con un armazón, de manera que se crea un complejo, y la adición de células al complejo creado, en el que las células comprenden (i) células que son previamente transfectadas con al menos un ácido nucleico, que puede ser idéntico o diferente de al menos un ácido nucleico combinado con el armazón, y (ii) células que no se han transfectado previamente, en el que las células (i) y (ii) proporcionan una regeneración reparadora histotípica.

Un biocomposite para proporcionar procedimientos reparadores en mamíferos lesionados puede comprender un almacén, al menos un ácido nucleico y células que proporcionan una regeneración reparadora.

5 Los detalles se exponen a continuación en la descripción adjunta. En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Los ejemplos se presentan exclusivamente con fines ilustrativos.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra un biocomposite que incluye células y ácidos nucleicos combinados con un almacén de un material osteoplástico. **A** - microscopía óptica, **B** - microscopía electrónica de barrido.

10 La Figura 2 muestra una etapa de trasplante de un producto médico (biocomposite) en el experimento. **A** indica un defecto óseo antes de la administración del biocomposite, en el que las agujas de Kirschner se colocaron para fijar una diastasis y el eje de la extremidad. **B** indica un biocomposite que se administra al defecto óseo.

La Figura 3 muestra una tibia de conejo. El regenerado óseo se define en la parte central (marcado por una flecha blanca), que se produce con el biocomposite.

15 La Figura 4 muestra el regenerado óseo que se formó después de la administración de un material genético químicamente compartimentado y células. Se muestra un cuadro histológico. Tinción:

hematoxilina y eosina. Microscopía óptica: ampliación x 100.

**Descripción detallada de la invención**

20 Los presentes inventores han descubierto un nuevo procedimiento de cicatrización de lesiones histotípicas en mamíferos mediante la administración a un receptor de un complejo génico-celular uniforme para una manifestación óptima (pronunciada y prolongada) de una acción diana.

La creación y aplicación de nuevos materiales génicos-celulares permiten la introducción de una cantidad máxima de ácidos nucleicos necesarios para la restauración óptima de tejidos y órganos de elementos celulares a un área diana, la consecución de un efecto sinérgico y prolongado de componentes activos, y también permite la prevención de las desventajas halladas en los productos análogos.

25 El nuevo procedimiento aumenta la eficacia y la eficiencia de la restauración de tejidos y órganos, debido a, entre otros:

- entrega óptima de ácidos nucleicos que se protegen contra los factores perjudiciales de un lecho receptor en el receptor, así como la liberación prolongada de una estructura de almacén, es decir, un efecto diana prolongado;
- administración de una población celular necesaria a un receptor que proporciona una restauración histotípica de la integridad de tejidos y órganos; y
- efecto sinérgico de los ácidos nucleicos y células incluidos en un biocomposite médico uniforme (producto médico).

Por consiguiente, un objeto de la presente solicitud es un nuevo biocomposite para proporcionar procedimientos reparadores en mamíferos lesionados que comprende un almacén, células, y al menos un ácido nucleico.

35 La interacción de las células y los ácidos nucleicos en este biocomposite es similar a la simbiosis, es decir, las células proporcionan un aumento en el nivel de la expresión de los ácidos nucleicos y actúan como un vehículo similar a la entrega, mientras que los ácidos nucleicos libres (que se sitúan en el almacén en lugar de las células del biocomposite) se transfectan con células de un receptor (después del trasplante del biocomposite) y los productos de expresión de los ácidos nucleicos aumentan un índice de supervivencia de las células del biocomposite y/o regulan su actividad morfofuncional, en función del tipo de ácidos nucleicos que se utilizan para la fabricación de un biocomposite (por ejemplo, ácidos nucleicos que contienen genes de factor angiogénico, trófico, y cualquier otro factor).

40 La presente descripción desvela un biocomposite que incluye un almacén, al menos un ácido nucleico, y al menos un tipo de células que proporcionan la regeneración reparadora histotípica al igual que un agente que proporciona procedimientos reparadores en mamíferos lesionados.

45 Ejemplos de ácidos nucleicos se seleccionan entre el grupo que consiste en: un gen codificante de ADN, gen no codificante de ADN, ADN contenido en una molécula de vector (por ejemplo, plásmidos, virus, episomas, transposones), ADN lineal libre, ARN monocatenario, ARN bicatenario, ARN con ribonucleótidos modificados, ARN dependiente/independiente de caperuza 5', ARN dependiente/independiente de poli(A) en 3', microARN, ARNip, y una combinación de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden incluirse en una composición en diversas variantes posibles en función de un componente de almacén relevante. Un biocomposite para la restauración de tejidos y órganos contiene al menos un ácido nucleico o sus diversas combinaciones, en el que al menos un ácido nucleico puede codificar opcionalmente al menos un gen. En una realización, se utiliza al menos una construcción genética de policasete.

- La selección de un gen diana o varios genes diana contenidos en el ácido nucleico de un tipo, o la selección de varios tipos de ácidos nucleicos que contienen diferentes genes diana, para producir un biocomposite depende de los materiales seleccionados para la restauración de tejidos y órganos se asocia con un efecto biológico de ciertos factores codificados por el gen diana de los ácidos nucleicos. Es apropiado utilizar ácidos nucleicos que codifican un factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) o factor-1 derivado de células estromales (FDCE-1) para restaurar los tejidos y órganos debido a la inducción de angiogénesis como se define en las reivindicaciones adjuntas.
- Un almacén puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica sólida, y puede ser al menos un material seleccionado entre el grupo que consiste en: un material metálico, colágeno, quitosano, fosfato de calcio, hidroxiapatita, biocerámica, biovidrio, material de aluminato, proteína purificada, producto de matriz extracelular, y una combinación de los mismos. En una realización, el almacén es tridimensional.
- Un almacén puede ser líquido. En una realización, el almacén es al menos una solución seleccionada entre el grupo que consiste en una solución de NaCl al 0,9 %, una solución de dextrano, una solución salina (por ejemplo, una solución de Hank, de Ringer) y una solución de ácido orgánico, (por ejemplo, componentes de una sustancia amorfa de una matriz extracelular (por ejemplo, ácido hialurónico o ácido condroitínsulfúrico)).
- En una realización, un almacén se encuentra en al menos una forma seleccionada entre el grupo que consiste en un gel (por ejemplo, colágeno, alginato, o gelatina), una solución coloidal, una pomada, y una forma de crema.
- En otra realización, un almacén puede representar un material complejo que contiene un sólido, un líquido, un gel, una pomada, o un material de crema y diversas combinaciones de los mismos.
- En otra realización, un almacén puede contener al menos un material nanoestructurado.
- La selección de una población celular se determina por la naturaleza histogenética de un tejido para el cual se orienta selectivamente la reparación de la integridad con el biocomposite derivado. Para producir un biocomposite, resulta apropiado utilizar estos tipos de células que son capaces de diferenciarse mientras se desplazan a las células de los tejidos dañados o ya son células diferenciadas que se corresponden con las células del tejido dañado, así como las células que son capaces de proporcionar un procedimiento de regeneración reparadora histotípica. Dichas células incluyen casi cualquier célula capaz de producir factores de crecimiento necesarios u optimizar indirectamente un procedimiento reparador, por ejemplo, mediante estimulación y/o angiogénesis.
- En una realización, un biocomposite contiene células autógenas y/o alógenas. Las células pueden derivarse de una o más líneas citogenéticas.
- En otra realización, un biocomposite contiene células madre, progenitoras o diferenciadas, o una combinación de las mismas.
- El biocomposite puede contener células que se derivan directamente de mamíferos, es decir, células que se utilizan en el biocomposite inmediatamente después de haberse obtenido de los mamíferos sin aplicación de otras tecnologías de laboratorio de procesamiento celular (por ejemplo, sin el uso de cultivo adicional, determinación del fenotipo inmune, y/o inducción de la diferenciación), es decir, las llamadas células "frescas". En un ejemplo, las células frescas son células que se obtienen de un mamífero y se procesan solo mínimamente, por ejemplo, se centrifugan y/o filtran, y luego se administran inmediatamente al mamífero.
- En un ejemplo diferente, un biocomposite contiene células que han sido expuestas a tecnologías de laboratorio de procesamiento celular (por ejemplo, cultivo adicional, determinación del fenotipo inmune, inducción de la diferenciación y/o transfección con al menos una construcción genética). En un ejemplo, las células pueden congelarse después de obtenerse de los mamíferos.
- Asimismo se proporciona un procedimiento de fabricación de un biocomposite definido en las reivindicaciones adjuntas. Ejemplos de la combinación de componentes como resultado del biocomposite son:
1. Combinación de al menos un ácido nucleico con un almacén y, adición posterior de las células, que proporcionan una regeneración reparadora histotípica, al complejo derivado que contiene al menos un ácido nucleico y el almacén.
  2. Combinación de al menos un ácido nucleico con un almacén y, adición posterior de las células, que se han transfectado previamente con al menos un ácido nucleico (el mismo o diferente de los ácidos nucleicos combinados con el almacén), al complejo creado del almacén y al menos un ácido nucleico, en el que las células proporcionan una regeneración reparadora histotípica al complejo creado.
  3. Combinación de al menos un ácido nucleico con un almacén, en el que el ácido nucleico se combina previamente con las células que proporcionan una regeneración reparadora histotípica, y posteriormente se añaden las células transfectadas al almacén.
  4. Combinación, al principio, de las células con un almacén y posteriormente adición de los ácidos nucleicos.
  5. Combinación de una población celular con un almacén, mientras que otra población celular se transfecta con una construcción genética, y a partir de ahí, combinación en un biocomposite de las células transfectadas y el producto que incluye las células combinadas con el almacén.

6. Combinación de al menos un ácido nucleico con un armazón, y posterior adición de las células al complejo, en el que las células comprenden (i) células que se transfectaron previamente con al menos un ácido nucleico, que puede ser el mismo o diferente de al menos un ácido nucleico combinado con el armazón, y (ii) células que no se transfectaron previamente, en el que las células (i) y (ii) proporcionan una regeneración reparadora histotípica.

5 La interacción de ácidos nucleicos y un armazón puede ser una interacción reversible de una construcción genética con los componentes del armazón por medio de la formación de enlaces químicos débiles (temporales) entre los componentes del armazón y los ácidos nucleicos, por medio de la impregnación de los ácidos nucleicos en la estructura del armazón (por ejemplo, un portador líquido, pomada o gel), o por aplicación de los ácidos nucleicos a la superficie de un armazón sólido con diferentes sustancias adhesivas. Debido a la interacción reversible entre los ácidos nucleicos y el armazón, una vez que el biocomposite contacta (interactúa) con fluidos biológicos (en particular, tras la administración a un receptor), las construcciones genéticas se liberan posteriormente debido a ciertos factores del lecho receptor, y también debido a la biorreabsorción del armazón (cuando el armazón incluye materiales biorreabsorbentes). Los componentes del armazón que son capaces de fabricar enlaces químicos con ácidos nucleicos pueden representarse, por ejemplo, por hidroxiapatita, fluorapatita (por ejemplo, Giovannini R., Freitag R. *Comparison of different types of ceramic hydroxyapatite for the chromatographic separation of plasmid DNA and a recombinant anti-Rhesus D antiorganism. Bioseparation* 2001; 9:359-368), carbonilimidazol (por ejemplo., Sousa A., Tomaz C.T., Sousa F. y col. *Successful application of monolithic innovative technology using a carbonyldiimidazole disk to purify supercoiled plasmid DNA suitable for pharmaceutical applications. J Chromatogr A* 2011; 1218(46):8333-43), poliacrilimida (Zhang Y.S., Bai X.F. *A simple, rapid and high-resolution banding method in polyacrylamide gels*. Yi Chuan. 2008; 30(2):251-4), y/o polímeros de ácido metacrílico (Smrekar F., Podgornik A., Ciringer M. y col. *Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns. Vaccine* 2010; 28(8):2039-45). El armazón protege a una sustancia activa - ácidos nucleicos compartimentados - contra el daño de los factores tisulares del receptor y permite prolongar el efecto debido a un enlace químico temporal con la construcción genética. La fuerza de los enlaces químicos entre los ácidos nucleicos y el armazón puede ser diferente en función de los materiales del armazón y un tipo de los ácidos nucleicos. La fuerza de los enlaces químicos varía desde la ausencia de la unión a casi una unión irreversible.

La interacción de los ácidos nucleicos y las células que forman un biocomposite se realiza por la transfección celular con una construcción genética. Los ácidos nucleicos se introducen en las células *in vitro* antes de combinarse con un armazón, y como parte del armazón cuando los ácidos nucleicos se combinan en primer lugar con el armazón y, posteriormente se añaden las células.

El número de ácidos nucleicos para obtener un biocomposite se define por la capacidad del armazón, que es el número máximo de ácidos nucleicos que pueden situarse en la superficie del armazón, así como el número de ácidos nucleicos que puede transfectar una población celular para combinarse con el armazón para la fabricación de un biocomposite. El número de ácidos nucleicos para obtener un biocomposite depende de la situación específica y puede determinarse por un experto.

Las células que forman un biocomposite se adhieren a la superficie de un armazón sólido debido a varios mecanismos de matriz celular e interacción célula-célula, o se localizan en el interior de un portador líquido, gel o pomada. El número de células que se requiere para la fabricación de un biocomposite se define por la superficie del armazón (para un armazón sólido) o por el volumen del armazón (para un armazón líquido y de gel), y por la concentración más baja requerida que proporciona una regeneración reparadora de un tejido dañado, y también se puede determinar en base a ciertas condiciones.

El efecto sinérgico de los ácidos nucleicos y las células puede ser diferente en función de la tecnología de su combinación con el armazón en un producto médico uniforme, y dependiendo de los tipos de construcciones genéticas y células. El efecto sinérgico se implementa en ambas etapas: cuando se obtiene un biocomposite (producto) e inmediatamente después de su trasplante a un receptor. Cuando se prepara un biocomposite, la sinergia se obtiene mediante la transfección celular con ácidos nucleicos (con el arrastre completo de ácidos nucleicos en la transfección *in vitro* o por una parte de los ácidos nucleicos en la transfección después de combinarse con un armazón), que proporciona un aumento del número de los ácidos nucleicos introducidos, y también permite optimizar las propiedades de una población celular por inducción de la expresión de genes diana que se sitúan en los ácidos nucleicos introducidos. Una tecnología eficaz para obtener el efecto sinérgico es la transfección celular *in vitro* (una combinación de las células y ácidos nucleicos) y una combinación de un armazón con las células ya transfectadas, una combinación de las células con el complejo "armazón-ácidos nucleicos", la transfección celular *in vitro* y una combinación posterior con el complejo "armazón-ácidos nucleicos". Una variante menos eficaz de obtención del efecto sinérgico incluye una combinación de las células con un armazón y la posterior adición de los ácidos nucleicos. Esta tecnología para la adición de ácidos nucleicos utiliza reactivos y factores físicos (por ejemplo, secado) que dañan a las células. Cuando se administran a un receptor, se expresan las construcciones genéticas, transportadas por las células del lecho del receptor y por las células del producto trasplantado, y los productos de expresión inducen y conservan una actividad morfofuncional, incluyendo la actividad de las células introducidas en el biocomposite.

El biocomposite puede utilizarse para la entrega eficaz de ácidos nucleicos a un sujeto, por ejemplo, mamíferos.

El biocomposite también puede utilizarse para producir una reparación histotípica de lesiones en mamíferos.

Los procedimientos de la administración de biocomposite pueden ser diferentes y dependen de la forma y el tipo de lesiones de tejidos y órganos. Por ejemplo, un biocomposite puede administrarse inmediatamente a un área de tejido dañado como parte de una operación o manipulación quirúrgica. El biocomposite (con un portador líquido o gel) puede administrarse a un receptor en forma de inyecciones (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraósea, endolumbar, subdural, intraarticular, endobulbar) o puede utilizarse en forma de aplicación (con un portador líquido, gel, crema, o pomada).

Se desvela asimismo un kit para fabricar un biocomposite que incluye dos componentes/recipientes: uno de los componentes sirve para mantener un complejo "armazón-ácidos nucleicos" en un recipiente apropiado, y el otro componente sirve para combinar el complejo "armazón-ácidos nucleicos" con un fluido o medio de cultivo y células; y para transportar las células.

El primer componente del kit es un producto que tiene dos capas: una capa interna que es estéril en el interior y en el exterior y se utiliza para mantener un complejo "armazón-ácidos nucleicos" y para conservar su esterilidad; y una capa externa que es estéril solo en el interior, pero no en el exterior. La capa externa se fija firmemente a la capa interna y proporciona esterilidad a la parte interna y protección contra un daño mecánico. La capa externa puede abrirse con facilidad sin contacto alguno con la parte interna estéril.

El segundo componente del kit, que sirve para combinar el complejo "armazón-ácidos nucleicos" y células, representa un recipiente estéril fabricado de vidrio o de materiales polímeros y tiene un volumen requerido para transportar el armazón con los ácidos nucleicos y un medio de cultivo o un fluido biológico (por ejemplo, sangre) con las células. El recipiente estéril está complementado además por dos capas, la capa estéril interna en ambas caras y la capa externa que es estéril en el interior, pero no en el exterior.

Por consiguiente, el kit para la fabricación de un biocomposite contiene un complejo de un armazón con al menos un ácido nucleico en un recipiente y un segundo recipiente para combinar el complejo con un fluido biológico o un medio de cultivo que contiene las células que proporcionan una regeneración reparadora histotípica.

Parece oportuno proporcionar ejemplos sobre posibles implementaciones parciales de la presente invención: fabricar un biocomposite combinando un armazón que contiene hidroxiapatita y colágeno óseo, con una población de células mononucleares de sangre autógena y una construcción genética que contiene una secuencia de nucleótidos con un gen de FCEV (véase la patente RU 2297848), y su uso para una regeneración reparadora del tejido óseo (reemplazo del defecto óseo de 2 cm de largo en una tibia de conejo).

### 30 Ejemplos

**Ejemplo 1.** Unión química de un ácido nucleico y un armazón.

1. La preparación del armazón. En este ejemplo, se utilizó el armazón combinado que incluía colágeno sintético tipo I e hidroxiapatita (una relación era del 60 %/40 %, respectivamente). Además, el volumen del armazón era 1 cm<sup>3</sup>. El armazón:

35 a) se lavó (se incubó en 1 ml de una solución de fosfato 0,5 M a 37 °C con agitación constante durante 12 horas);  
 b) se equilibró (se procesó con 1 ml de fosfato 10 mM a 37 °C con agitación constante, 3 veces durante 10 min cada una de las veces); y  
 c) se secó (se incubó a 37 °C hasta el secado completo durante 3 horas).

40 2. Se aplicó el ácido nucleico (se incubó con una solución que contenía un plásmido de ADN, en 100 µl de fosfato 10 mM a una concentración de 1µg/µl a 37 °C y con agitación constante durante 12 horas) teniendo en cuenta la capacidad del armazón estimada para los ácidos nucleicos, que en este ejemplo era de 202,765 ng de los ácidos nucleicos por 1 mg del armazón.

3. Procesamiento del complejo creado "armazón-construcción genética". El complejo

45 a) se lavó (se procesó con 1 ml de una solución de fosfato 5 mM durante 3 veces); y  
 b) se secó (se incubó a 37 °C hasta el secado completo durante 3 horas).

50 4. El complejo "armazón-ácidos nucleicos" se combinó con una población de células mononucleares de sangre autógena, en el que las células se obtuvieron inmediatamente antes de una cirugía (durante la realización de la cirugía). 1 cm<sup>3</sup> en volumen del complejo "armazón-ácidos nucleicos" se transfirió a un recipiente que contenía 5 ml de la sangre del paciente extraída por una jeringa del área de tejido dañado cuando se realizó una cirugía. La exposición duró varios minutos, es decir, durante un periodo de tiempo suficiente para rellenar todos los poros del armazón que transportan los ácidos nucleicos por la sangre que contiene las células mononucleares autólogas que producen una regeneración reparadora histotípica del tejido óseo.

**Ejemplo 2.** Trasplante del complejo creado en el ejemplo 1.



En el trasplante del producto médico (biocomposite), se utilizó un defecto óseo de 2 cm de largo en una tibia de conejo como modelo para este experimento. En primer lugar, las agujas de Kirschner se colocaron para fijar la diastasis y el eje de la extremidad, tras lo cual se administra el biocomposite al defecto óseo.

5 Las figuras 1-4 ilustran los datos que confirman la eficacia y la eficiencia de la administración del material genético químicamente compartimentado y las células para producir la osteogénesis reparadora.

10 Para confirmar la unión química del ácido nucleico y el armazón del material osteoplástico tras el lavado y secado del producto creado, se realizó la disociación, es decir, la destrucción de la unión y la liberación del ácido nucleico en la solución. Para ello, el producto se procesó con 50 µl de una solución de fosfato 0,5 M a 37 °C y se agitó de forma constante durante 10 minutos, y posteriormente se realizó la espectrofotometría de la solución con el ácido nucleico eluido (espectrofotómetro Nanodrop-1000). Como resultado, la concentración de los ácidos nucleicos en la solución se midió como 202,765 ng por cada mg del armazón (varios armazones tienen diferentes capacidades).

15 Para confirmar la viabilidad de la combinación de una población de células mononucleares de sangre autógena con el producto-biocomposite, se realizó microscopía óptica del producto y se identificaron las células que se adhirieron a la superficie del armazón. Los procedimientos de microscopía óptica, electrónica de barrido y de transmisión mostraron que las células que se adhirieron a la matriz se propagan y cubren casi toda la superficie vacía del armazón (Fig. 1).

20 Este ejemplo muestra la viabilidad de la combinación de ácidos nucleicos, células y armazón, la posibilidad de la administración del producto médico creado a un receptor, y también demuestra una restauración más rápida y eficaz de la integridad ósea en una tibia de conejo en comparación con los análogos más próximos, en el que el resultado de este experimento se obtuvo un mes antes cuando se utilizó el nuevo biocomposite.

### **Ejemplo 3**

Los complejos que se prepararon incluyen los siguientes materiales del armazón (cada material en un armazón diferente) y ácidos nucleicos en las cantidades que se indican a continuación:

- 25 - el fosfato de calcio se combinó con 72,5 ng de ácidos nucleicos por 1 mg de este armazón;
- la hidroxiapatita se combinó con 347,8 ng de ácidos nucleicos por 1 mg de este armazón;
- los productos de matriz extracelular (matriz ósea desmineralizada alogénica) se combinaron con 108,4 ng de ácidos nucleicos por 1 mg de este armazón;
- los productos de matriz extracelular (matriz ósea desproteinizada xenogénica) se combinaron con 285,7 ng de ácidos nucleicos por 1 mg de este armazón; y
- 30 - una composición de fosfato de calcio e hidroxiapatita se combinó con 520,1 ng de ácidos nucleicos por 1 mg de este armazón.

Cada uno de estos ejemplos se realizaron con ayuda de la tecnología (protocolo) descrita en el Ejemplo 1. Las células se añadieron al complejo del armazón y ácidos nucleicos en la segunda etapa.

35 Los diferentes tipos de células (que se obtuvieron por diferentes tecnologías) para armazones específicos fueron: un cultivo de células estromales mesenquimales pluripotentes, cultivo de fibroblastos, cultivo de células osteogénicas periostales; o sangre fresca con células, o fracción de células vasculares estromales, obtenidas con el aparato especial (por ejemplo, Cytori).

Estas variantes del biocomposite se fabricaron de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 1, tenían las propiedades de reparación de los defectos óseos y se ensayaron en el modelo descrito en el Ejemplo 2.

### **Ejemplo 4**

Se ensayaron una serie de biocomposites creados en el modelo con defectos óseos craneales.

45 Se eligieron defectos craneales (diámetro de 10 mm) de huesos parietales como el modelo de defectos óseos de tamaño crítico. Los defectos bilaterales idénticos se fabricaron para todos los animales (conejos). Los biocomposites (un complejo de un armazón y un plásmido que transporta un gen de FCEV), al que se añadió sangre autóloga fresca inmediatamente antes del implante en los defectos óseos, se implantaron en los defectos de los huesos parietal derecho (grupo experimental), mientras que el armazón sin ácidos nucleicos ni células (sangre fresca) (control 1), o el armazón con solo las células sanguíneas (control 2), o el armazón con solo los ácidos nucleicos (control 3) se utilizaron para la cara izquierda del cráneo. Los resultados se evaluaron a los 15, 30, 45, 60, 90 días.

50 Se mostró que para los biocomposites de los grupos del ejemplo, la transfección de las células del lecho del receptor por el plásmido que transporta el ADNc de un gen de FCEV fue superior, lo que dio como resultado una angiogénesis y osteogénesis reparadora más pronunciada en todos los intervalos temporales ensayados en comparación con los de todos los grupos de control.

Las realizaciones ejemplificadas son aplicables en la práctica médica, especialmente en la estimulación de los procedimientos reparadores en tejidos, así como en veterinaria para el tratamiento de mamíferos.

55

**REIVINDICACIONES**

1. Un biocomposite que comprende:
  - un almacén,
  - al menos un ácido nucleico situado en dicho almacén, en el que al menos dicho ácido nucleico codifica al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) y en factor-1 derivado de células estromales (FDCE-1), y
  - células que proporcionan una regeneración reparadora y han sido transfectadas por al menos un ácido nucleico, en el que al menos dicho ácido nucleico codifica al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) y en factor-1 derivado de células estromales (FDCE-1), y en el que dicho biocomposite es para su uso como un medicamento.
  
2. El biocomposite según la reivindicación 1, para su uso en un procedimiento de cicatrización de una herida, en el que dicho biocomposite es adecuado para la administración a un mamífero en necesidad del mismo, preferentemente dicho biocomposite es adecuado para la administración directa a un área de tejido dañado como parte de una operación o manipulación quirúrgica, dicho biocomposite es además adecuado preferentemente para la administración en una inyección intramuscular, intraarticular, intraósea, intravenosa, intraarterial, intradérmica, subcutánea, endolumbar, subdural, u endobulbar, dicho biocomposite es además adecuado preferentemente para aplicación tópica.
  
3. El biocomposite según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para su uso en un procedimiento de suministro de al menos dicho ácido nucleico comprendido en dicho biocomposite a un mamífero en necesidad del mismo, en el que dicho biocomposite es adecuado para su aplicación a dicho mamífero.
  
4. El biocomposite según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que:
  - a) el almacén es un material orgánico o inorgánico sólido seleccionado entre el grupo que consiste en: un producto de matriz extracelular, colágeno, hidroxapatita, fosfato de calcio, proteínas purificadas, biocerámica, biovidrio, quitosano, material de aluminato, material metálico o una combinación de los mismos; o
  - b) el almacén es al menos un líquido seleccionado entre el grupo que consiste en: una solución de NaCl al 0,9 %, una solución de dextrano, una solución salina, una solución de ácido hialurónico, y ácido condroitinsulfúrico; o
  - c) el almacén es al menos un material seleccionado entre el grupo que consiste en: un colágeno, un alginato, un gel de gelatina, una solución coloidal, una pomada, y una crema; o
  - d) el almacén comprende al menos un material seleccionado entre el grupo que consiste en: un sólido, un líquido, un gel, una pomada y un material de crema; o
  - e) el almacén está nanoestructurado.
  
5. El biocomposite según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el al menos un ácido nucleico es un ADN que se incluye en una molécula de vector, en el que el vector se selecciona entre un grupo que consiste en: un plásmido, un virus, un episoma, un transposón.
  
6. El biocomposite según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende células autógenas y/o alogenas.
  
7. El biocomposite según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las células son derivados de una o varias líneas citogenéticas.
  
8. El biocomposite según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende células madre, progenitoras o diferenciadas, o una combinación de células diferenciadas de diversas maneras.
  
9. El biocomposite según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que las células se derivan de mamíferos inmediatamente antes de la adición de células al biocomposite, o células que han sido previamente expuestas a tecnologías de laboratorio de procesamiento celular.
  
10. Un procedimiento de fabricación de un biocomposite según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, que comprende: la combinación de al menos dicho ácido nucleico con dicho almacén, de manera que se crea un complejo, y la adición de dichas células transfectadas al complejo creado del almacén y de al menos un ácido nucleico.

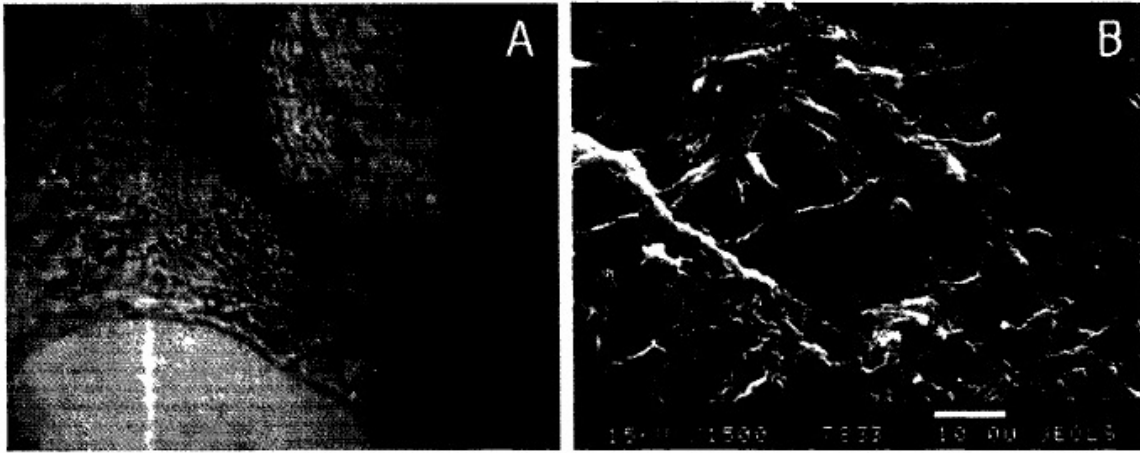


FIG. 1



**A**

**B**

FIG. 2

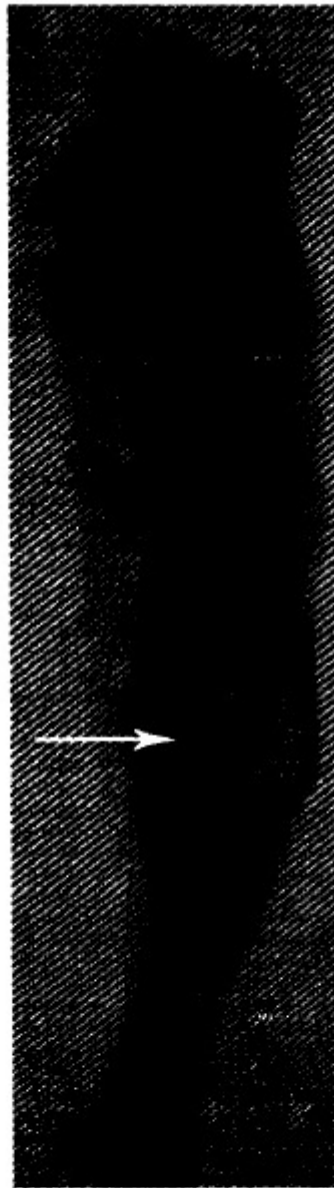


FIG. 3

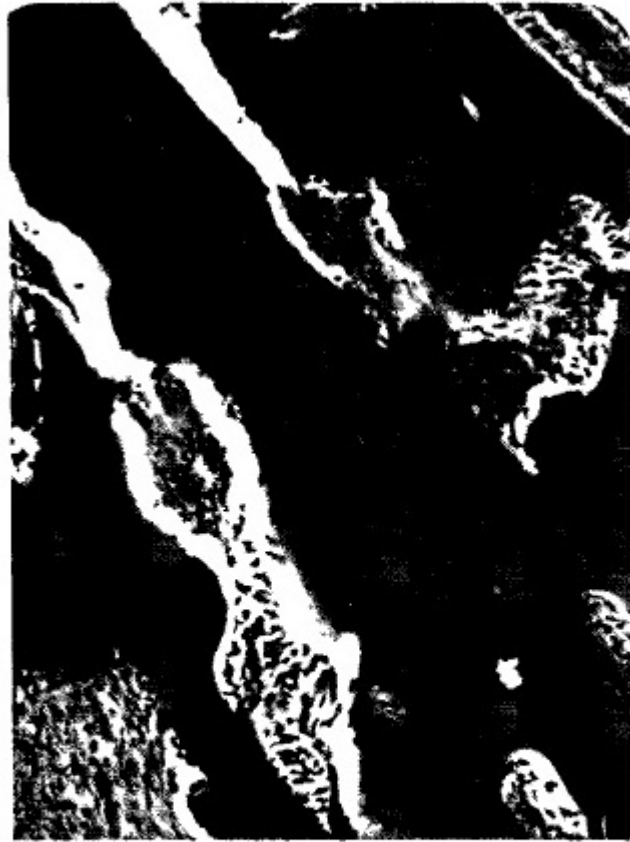


FIG. 4