

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 606**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

**A61P 19/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2015 PCT/EP2015/066329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16009000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2015 E 15747397 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 3169334**

54 Título: **ARN para su uso en el tratamiento de lesiones de ligamentos o tendones**

30 Prioridad:

**16.07.2014 EP 14177302**

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

**22.11.2021**

73 Titular/es:

**ETHRIS GMBH (100.0%)  
Sammelweisstrasse 3  
82152 Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**HASENPUSCH, GÜNTHER y  
RUDOLPH, CARSTEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 879 606 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

ARN para su uso en el tratamiento de lesiones de ligamentos o tendones

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una composición líquida que contiene ARNm desnudo que codifica para un polipéptido tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento o la prevención de lesiones de ligamentos o tendones, en la dicho ARN está disuelto en una disolución de glucosa. También se da a conocer en el presente documento un método para tratar lesiones de ligamentos o tendones que comprende la administración de una composición líquida que contiene ARN desnudo, tal como ARNm que codifica para un polipéptido que es beneficiosa en el procedimiento de cicatrización de lesiones de ligamentos o tendones.

10 Los ligamentos son estructuras de tejido fibroso densas que se componen principalmente de fibrillas de colágeno muy orientadas y compactas. Debido a esta organización matricial especializada, los ligamentos poseen una gran resistencia a la tracción y flexibilidad. Al mismo tiempo, las lesiones de ligamentos son una de las lesiones más comunes en las articulaciones. Los tendones tienen un papel crucial en el mantenimiento de la mecánica corporal, ya que su función principal es conectar los músculos con los huesos. Son tejidos conjuntivos axiales que aseguran la transmisión de la tracción ejercida por el músculo al hueso dando lugar a movimientos articulares. Los tendones están compuestos por unas pocas células y matrices paralelas de fibras de colágeno. Su importante función mecánica los hace propensos a sufrir lesiones y roturas. Estas lesiones pueden tener diferentes orígenes, como traumatismos, uso excesivo, consecuencia de una enfermedad metabólica o pérdida de elasticidad relacionada con la edad. Normalmente, los ligamentos y los tendones pueden cicatrizar de manera espontánea, pero su regeneración es muy difícil y requiere un periodo muy largo, es decir, varios meses y, a veces, incluso un año. Aunque la cicatrización natural o una reparación quirúrgica eficaz permite principalmente la restitución de una función satisfactoria, a menudo no consigue restituir las características biológicas y biomecánicas completas de un tejido no lesionado. El ligamento o tendón cicatrizado permanece mecánicamente débil y susceptible de volver a lesionarse. Otras lesiones como la tendinosis presentan cambios degenerativos en los que se ven afectados todos los componentes del tendón (tenocitos, matriz extracelular y colágeno). Cuando la cicatrización natural es insuficiente, muchas de las lesiones de ligamentos o tendones continúan presentando problemas clínicos que desafían los tratamientos médicos y quirúrgicos. La imposibilidad de obtener unas condiciones de cicatrización óptimas dio lugar a nuevos enfoques teniendo en cuenta los avances en la comprensión del proceso de cicatrización del ligamento o tendón a nivel celular y molecular. En el caso de la cicatrización del tendón este proceso de cicatrización consta de fases sucesivas: formación de coágulos, inflamación, proliferación, remodelación y maduración (Frank, CB, J. Am. Acad. Orthop. Surgeons 4(1996), 74-83). Se ha demostrado que varios factores de crecimiento y citocinas desempeñan un papel en el proceso de reparación del tendón (Evans, CH, Sports Med. 28 (1999), 71-76). Actúan sobre el crecimiento vascular, la migración celular, la proliferación celular y la síntesis de colágeno y proteínas extracelulares. Para optimizar el proceso de cicatrización de lesiones de ligamentos o tendones, se han desarrollado diferentes enfoques para administrar factores de crecimiento localmente, en particular mediante transferencia de genes. Nakamura *et al.* (J. Clin. Invest. 97 (1996), 226-231) describen la introducción transitoria de un plásmido que lleva un gen indicador ( $\beta$ -gal) en el ligamento rotuliano de rata en cicatrización para estudiar la biología del ligamento. La introducción del ADN plasmídico se logró usando transferencia génica mediada por liposomas por virus hemaglutinante del Japón (VHJ). El mismo grupo informó posteriormente que habían podido introducir con la misma técnica un plásmido que codifica el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-B en el ligamento rotuliano en cicatrización (Nakamura *et al.*, Gene Therapy 5 (1998), 1165-1170). La suspensión de liposomas se inyectó directamente en el ligamento rotuliano lesionado de ratas y pudo observarse una expresión mejorada de PDGF-B en el ligamento en cicatrización hasta 4 semanas después de la transfección, lo que condujo a una promoción inicial de la angiogénesis y la posterior deposición mejorada de colágeno. Ozkan *et al.* (Eur. J. Clin. Invest. 29 (1999), 63-67) describen la transferencia génica directa *in vivo* de un ADN plasmídico que contiene el gen indicador  $\beta$ -gal en el ligamento rotuliano en cicatrización mediante administración intraarterial de liposomas de VHJ. En 2000, Goomer *et al.* (Clinical Orthopaedics and Related Research 379S (2000), S189-S200) informaron sobre un método de transferencia de genes *in vivo* no viral para introducir ADN plasmídico que contiene el gen  $\beta$ -gal, TGF-  $\beta$ 1 o PTHrP en cartílago o tejido tendinoso. Jayankura *et al.* (J. Gene Med. 5 (2003), 618-624) informan sobre la transferencia de genes *in situ* a tendones de animales mediante la inyección de ADN desnudo y la electrotransferencia. La expresión génica se observó exclusivamente en las células adyacentes al sitio de inyección y a lo largo del recorrido de la aguja, lo que indica que el plásmido no podía difundirse a través del tendón denso y que las células transducidas no migran con el tiempo. Delalande *et al.*, informaron sobre otro método de administración no viral de ADN plasmídico al tejido de tendones. (Ultrasonics 50 (2010), 269-272 y J. Controlled Release 156 (2011), 223-230). Los autores introdujeron un plásmido que codifica para la luciferasa o la fibromodulina humana en el tejido de tendones de ratones usando microburbujas y transferencia génica asistida por untrasonido. Suwalski *et al.* (Biomaterials 31 (2010), 5237-5245) describe la posibilidad de acelerar la cicatrización del tendón de Aquiles mediante la introducción de un plásmido que codifica para PDGF a través de nanopartículas de sílice mesoporosas. Un enfoque adicional se describió en Qui *et al.* (Gene Therapy 19 (2012), 703-710) usando destrucción de microburbujas dirigida por ultrasonidos para mejorar la transfección de ADN plasmídico desnudo en tendones de Aquiles de conejo *in vivo*. El documento WO 2007/103787 da a conocer el tratamiento de la tendinopatía mediante la inhibición de moléculas que contribuyen a la formación de cartílago. Por ejemplo, en el

contexto del documento WO 2017/103787, debe usarse una molécula de ARN de interferencia como inhibidor respectivo y el inhibidor puede inyectarse directamente en el tejido de tendones lesionados. En vista del uso previsto de enfoques de terapia génica en el contexto de la cicatrización de lesiones de ligamentos y tendones en la clínica, sería deseable tener a mano métodos para aplicar las proteínas deseadas en forma de ácidos nucleicos que permitan una fácil manipulación.

La presente solicitud aborda esta necesidad proporcionando las realizaciones tal como se define en las reivindicaciones.

En particular, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que es posible administrar y expresar de manera eficaz ARN, en particular ARNm que codifica para un polipéptido, al tejido de ligamentos o tendones permitiendo así la expresión del polipéptido deseado en el tejido de ligamentos o tendones. El ARN está presente en forma desnuda en una composición líquida. Esta composición líquida puede administrarse directamente en el tejido de ligamentos o tendones, por ejemplo, mediante inyección, y no es necesario ningún portador o vector de transferencia génica para el ARN o métodos para mejorar la transferencia en el tejido como electrotransferencia o ultrasonido. Por consiguiente, la presente invención permite una manera fácil de administrar proteínas por medio de terapia génica a través de ARNm al tejido de ligamentos o tendones que puede implementarse de manera eficaz en la clínica. Además, se observó que la expresión de una proteína codificada por un ARN inyectado no sólo se observa directamente en el sitio de inyección, sino también en ubicaciones más distantes en el tendón. Más particular, se demostró que la inyección de ARN desnudo, en particular ARNm modificado químicamente (ARNmq) desnudo, en una disolución que contiene glucosa en tendones dio como resultado una alta expresión de proteína en tendones sanos y lesionados (de manera experimental). Por ejemplo, se demostró que la inyección de BMP-7 que codifica para ARNm dio como resultado una expresión aumentada de proteína BMP-7, menos degradación fulminante del colágeno tipo I, formación disminuida de colágeno tipo III así como tendencia hacia una mayor razón colágeno I/III y atracción celular quimiotáctica en tendones disecados de manera quirúrgica. Además, se encontró que la sobreexpresión de BMP-7 especialmente durante la fase inflamatoria de la regeneración de tendones influye de manera positiva en la cicatrización.

En comparación con el ADN, el ARN tiene la ventaja de que previene el riesgo de mutagénesis de inserción y, por consiguiente, la genotoxicidad. Además, el ARN, en particular ARNm, que va a emplearse en el contexto de la invención se demostró que tenía una excelente compatibilidad biológica *in vivo* cuando se inyecta de manera local en ligamentos o tendones. Por ejemplo, se demostró en el contexto de la invención que la inyección de ARN, en particular ARNm, en tendones o bien intactos o bien lesionados dio como resultado una expresión de proteínas local y distinta. Las proteínas expresadas respectivamente eran biológicamente funcionales.

Por tanto, la presente invención se refiere a una composición líquida que contiene ARN desnudo tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento o la prevención de lesiones de ligamentos o tendones (en un paciente), en la que dicho ARN está disuelto en una disolución de glucosa. También se prevé particularmente que la composición líquida de la invención es un composición líquida farmacéutica.

Los ejemplos adjuntos muestran que es posible expresar de manera eficaz proteínas a partir de ARNm en tejido de tendones según la presente invención. Sin embargo, la presente divulgación no se restringe al uso de un ARN que codifica para un polipéptido. En el contexto de la presente divulgación también es posible emplear otras clases de moléculas ARN, por ejemplo, ARN no codificante, tal como se explicará adicionalmente a continuación.

Un ligamento es el tejido fibroso que conecta los huesos con otros huesos y también se conoce como ligamento articular, larua articular, ligamento fibroso o ligamento verdadero. Por tanto, el término "ligamento" se refiere a una banda de haces de tejido conjuntivo regulares densos, fibrosos, resistentes, hechos de fibras de colágeno atenuadas; con dichos haces protegidos por densas vainas de tejido conjuntivo irregulares. Los ligamentos conectan los huesos con otros huesos para estabilizar las articulaciones. No conectan los músculos a los huesos; que es la función de los tendones. Algunos ligamentos limitan la movilidad de las articulaciones o impiden por completo determinados movimientos.

El término "tendón" (o sinex) se refiere a una banda resistente de tejido conjuntivo fibroso que conecta habitualmente el músculo al hueso y es capaz de resistir la tensión. Los tendones y los músculos trabajan juntos para mover los huesos.

El término "lesión" se refiere a cualquier tipo clase de daño en el ligamento o tendón que tenga un efecto negativo sobre su función, en particular una disminución de la capacidad de recuperación, tenacidad a la fractura y/o resistencia a la tracción. Una lesión puede ser, por ejemplo, inflamación de tejido con o sin áreas necróticas debido al uso excesivo, degeneración, un estado patológico, la causa de la edad, tal como una pérdida de función o elasticidad relacionada con la edad, de una lesión o ruptura. Además, los tendones y ligamentos sanos disecados quirúrgicamente que se propone usar como trasplantes autólogos o alogénicos para reconstruir tendones y ligamentos enfermos o rotos también se consideran lesionados, aunque se genera un estado similar a una lesión como consecuencia del procedimiento quirúrgico. En principio, está previsto en el contexto de la invención tratar (o prevenir) cualquier lesión o daño de ligamento o tendón, cualquier enfermedad o trastorno (degenerativo) de ligamento o tendón y cualquier ligamentopatía (degenerativa) y tendinopatía (degenerativa).

En principio, una lesión de ligamento o tendón, una lesión o daño de ligamento o tendón, una enfermedad o trastorno (degenerativo) de ligamento o tendón o una ligamentopatía (degenerativa) y una tendinopatía (degenerativa) pueden desarrollarse en cualquier tendón y ligamento, respectivamente, del cuerpo.

5 En un aspecto específico, existe el problema de que la tasa de cicatrización/regeneración en el tendón/ligamento es menor que la tasa de lesión/sobrecarga. En otras palabras, puede haber un deterioro del tendón/ligamento debido a una sobrecarga repetitiva. Esto conduce a procesos de degeneración en el tendón/ligamento. Como tal, la tendinopatía/ligamentopatía empeora progresivamente con el uso continuo (excesivo) (de la articulación/músculo(s) afectado(s)). La epicondilitis lateral, también conocida como epicondilitis lateral y “codo de tenista”, respectivamente, es un ejemplo común de una tendinopatía de este tipo. Se caracteriza por dolor lateral en el codo  
10 provocado por uso excesivo. Afecta aproximadamente al dos por ciento de la población, principalmente en la cuarta y quinta décadas. Desde una perspectiva patomecánica, los músculos y tendones del antebrazo se dañan debido al uso excesivo, por ejemplo, repitiendo los mismos movimientos una y otra vez. Además, también los factores intrínsecos están asociados con el riesgo de padecer tendinopatía/ligamentopatía (degenerativa). Estos factores son factores como edad, sexo, obesidad y/o diabetes mellitus tipo II (Ribbans, Bone Joint J. 95-B, 2013, 305-313). Si bien las fibras musculares tienen un alto potencial de cicatrización, las fibras de ligamento/tendón son relativamente avasculares, están peor sostenidas por la sangre y tienden a cicatrizar muy lentamente. Como consecuencia, puede haber una inflamación progresiva (debido al uso excesivo); en el caso de la epicondilitis lateral, inflamación progresiva de los tendones que unen los músculos del antebrazo en la parte externa del codo. El tendón implicado generalmente en la epicondilitis lateral se llama extensor radial corto del carpo.

20 La terapia a corto plazo más común para la epicondilitis lateral es la inyección de fármacos antiinflamatorios tales como los corticosteroides en las partes blandas que rodean el codo. Aunque los estudios apoyan su eficacia para el alivio del dolor a corto plazo, no demuestran beneficio ni cicatrización a largo plazo. En otra terapia de inyección se inyecta sangre autóloga o plasma rico en plaquetas. Sin embargo, también estas terapias de inyección no muestran una mejor eficacia a lo largo del tiempo que la terapia con corticosteroides.

25 De lo anterior queda claro que también existe la necesidad de profilaxis y prevención, respectivamente, de una lesión de ligamento o tendón, una lesión o daño de ligamento o tendón, una enfermedad o trastorno (degenerativo) de ligamento o tendón o ligamentopatía (degenerativa) y tendinopatía (degenerativa) como, por ejemplo, epicondilitis lateral. Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona tal profilaxis y prevención, respectivamente, como, por ejemplo, profilaxis/prevenición de la epicondilitis lateral. En particular, la presente invención proporciona la composición líquida que contiene ARN desnudo de la invención para su uso en la prevención de una lesión de ligamento o tendón, una lesión o daño de ligamento o tendón, una enfermedad o trastorno (degenerativo) de ligamento o tendón o ligamentopatía (degenerativa) y tendinopatía (degenerativa). Lo que se ha dicho en el presente documento en cualquier otra parte con respecto al modo de administración se aplica en este caso, *mutatis mutandis*. En particular, se prevé que la composición líquida que contiene ARN desnudo que va a usarse según la invención se administre directamente al tejido del tendón/ligamento (por ejemplo, mediante inyección).  
30  
35

En aún otra realización, la presente invención proporciona profilaxis y prevención, respectivamente, de la progresión de una lesión de ligamento o tendón, una lesión o daño de ligamento o tendón, una enfermedad o trastorno (degenerativo) de ligamento o tendón o ligamentopatía (degenerativa) y tendinopatía (degenerativa), respectivamente, como, por ejemplo, profilaxis/prevenición de la progresión de la epicondilitis lateral. En particular, la presente invención proporciona la composición líquida que contiene ARN desnudo de la invención para su uso en la profilaxis y prevención, respectivamente, de la progresión de una lesión de ligamento o tendón, una lesión o daño de ligamento o tendón, una enfermedad o trastorno (degenerativo) de ligamento o tendón o ligamentopatía (degenerativa) y tendinopatía (degenerativa). Nuevamente, lo que se ha dicho en el presente documento en cualquier otra parte con respecto al modo de administración se aplica en este caso, *mutatis mutandis*. En particular, se prevé que la composición líquida que contiene ARN desnudo que va a usarse según la invención se administre directamente al tejido del tendón/ligamento (por ejemplo, mediante inyección).  
40  
45

En un aspecto específico, la profilaxis y la prevención, respectivamente, según la invención pueden comenzar una vez que se hayan observado (a) el/los primer(os) síntoma(s). Por ejemplo, un síntoma de este tipo es dolor y/o dolor a la palpación (por ejemplo, dolor y/o dolor a la palpación en la protuberancia ósea en la parte externa del codo en el caso de epicondilitis lateral).  
50

En cualquier caso, la epicondilitis lateral es un ejemplo destacado, aunque no limitativo, de una lesión de ligamento/tendón y ligamentopatía/tendinopatía (degenerativa), respectivamente, que va a tratarse según la invención.

55 El término “ARN desnudo” significa que el ARN no forma complejos con ninguna otra clase tipo de compuesto, en particular proteínas, péptidos, polímeros, como polímeros catiónicos, lípidos, liposomas, vectores virales o similares. Por tanto, “ARN desnudo” significa que el ARN está presente en la composición líquida en una forma libre y sin complejos que se dispersa de manera molecular en disolución. Por ejemplo, no se prevé que el “ARN desnudo” esté complejado con un sistema portador/reactivo de transfección lipídico y/o polimérico como, por ejemplo, DreamFect™ Gold o PEI (ramificada). Por tanto, la composición líquida de la invención, por ejemplo, no contiene un sistema  
60

portador/reactivo de transfección lipídico y/o polimérico como, por ejemplo, DreamFect™ Gold o PEI (ramificada).

Según la presente invención el ARN desnudo está presente en una composición líquida que se usa para la aplicación al tejido de ligamentos o tendones, en la que el ARN está disuelto en una disolución de glucosa. Una composición líquida es cualquier composición en la que el ARN está presente en disolución en un líquido. La disolución es preferiblemente una disolución acuosa. Por tanto, el líquido puede ser agua, preferiblemente agua estéril, más preferiblemente "agua para inyección" (WIF) o cualquier otra disolución acuosa tamponada o no tamponada. En un aspecto de la presente divulgación, la composición líquida es una disolución no tamponada, preferiblemente una disolución de sales, más preferiblemente una disolución de sales de una sal farmacéuticamente aceptable, incluso más preferiblemente una disolución de NaCl, es decir, solución salina. Preferiblemente, la disolución de sales es isotónica e incluso más preferiblemente muestra un valor de pH fisiológico (ver a continuación).

En otra realización, la disolución en la que está contenido el ARN es una disolución tamponada. Preferiblemente, una disolución de este tipo es isotónica para la sangre y contiene un tampón. En principio, puede usarse cualquier tampón que tampona de manera eficaz en el intervalo fisiológico, en particular en el intervalo de pH 3,0 a 10,5 y más preferiblemente pH de 4,0 a 9,0. Los tampones preferibles son tampones acetato, fosfato, carbonato, lactato y citrato.

Un ejemplo para una disolución tamponada acuosa es una solución de Ringer. La solución de Ringer es una disolución de varias sales disueltas en agua con el fin de crear una disolución isotónica en relación con los líquidos corporales de un sujeto. Contiene normalmente cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y bicarbonato de sodio, en la que el último se incluye para equilibrar el valor de pH. Una solución de Ringer convencional se prepara disolviendo 6,5 g de NaCl, 0,42 g de KCl, 0,25 g de CaCl<sub>2</sub> y 1 mol de bicarbonato de sodio en un litro de agua destilada. La solución de Ringer también puede contener opcionalmente ATP o dextrosa así como antibióticos o antifúngicos. En una realización preferida, la solución de Ringer es una solución de Ringer lactada o acetada. La solución de Ringer lactada es una disolución que es isotónica con la sangre y normalmente destinada a administración intravenosa. Un litro de solución de Ringer lactada contiene 130 meq de ion sodio (=130 mmol/l), 109 meq de ion cloruro (= 109 mmol/l), 28 meq de lactato (= 28 mmol/l), 4 meq de ion potasio (= 4 mmol/l), 3 meq de ion calcio (= 1,5 mmol/l) y tiene una osmolaridad de 273 mOsm/l. La solución de Ringer acetada contiene generalmente iones calcio (c=0,9 mmol/l), iones potasio (c=5,4 mmol/l), iones magnesio (c=1,0 mmol/l), iones sodio (c=130 mmol/l), iones acetato (c=27 mmol/l) y iones cloruro (c=112 mmol/l).

La composición líquida que va a usarse según la invención es una disolución de glucosa que contiene el ARN. La concentración de la glucosa está preferiblemente en el intervalo del 0,1-15% (m/v), más preferiblemente en el intervalo del 1-10% (m/v), incluso más preferiblemente en el intervalo del 2-8% (m/v) y particularmente preferido en el intervalo del 3,75-6,25% (m/v). Es especialmente preferido que la concentración de glucosa está en el intervalo del 5% (m/v) ± 0,2% incluso más preferiblemente en el intervalo del 5% (m/v) ± 0,1%.

Se prefiere que la disolución de glucosa sea una disolución tamponada. En principio cualquier tampón puede usarse para tamponar la disolución de glucosa. El tampón es preferiblemente un tampón que puede mantener el valor de pH en el intervalo fisiológico, es decir, en el intervalo de pH de 3,0 a 10,5, más preferiblemente en el intervalo de pH de 4,0 a 9,0, incluso más preferiblemente en el intervalo de pH de 5,0 a 8,0 y particularmente preferido en el intervalo de pH de 7,3 a 7,5.

En una realización preferida, el tampón se clasifica como "tampón de Good". Los "tampones de Good" son tampones que han sido descritos por Norman Good y sus colaboradores durante el periodo de 1966 a 1980 (Good *et al.*, *Biochemistry* 5 (1966), 467-477; Good *et al.*, *Methods Enzymol.* 24 (1972), 53-6; Ferguson *et al.*, (*Anal. Biochem.* 104 (1980), 300-310)). Los tampones de Good se seleccionan para que cumplan los siguientes en la medida de lo posible:

**pK<sub>a</sub>:** dado que la mayoría de las reacciones biológicas tiene lugar en un pH cerca del neutro entre 6 y 8, los tampones ideales tendrían valores de pK<sub>a</sub> en esta región para proporcionar la máxima capacidad de tamponamiento en la misma.

**Solubilidad:** para una manipulación fácil y debido a que los sistemas biológicos están en sistemas acuosos, se requeriría buena solubilidad en agua. Una baja solubilidad en disolventes no polares (grasas, aceites y disolventes orgánicos) también se considera beneficiosa, ya que esto tendería a evitar que el compuesto tampón se acumule en los compartimentos no polares en los sistemas biológicos: membranas celulares y otros compartimentos celulares.

**Impermeabilidad de la membrana:** de manera ideal, un tampón no pasará fácilmente a través de las membranas celulares, esto también reducirá la acumulación de compuesto tampón dentro de las células.

**Efectos mínimos de las sales:** los tampones muy iónicos pueden provocar problemas o complicaciones en algunos sistemas biológicos.

**Influencias sobre la disociación:** debe haber una influencia mínima de la concentración del tampón, temperatura y composición iónica del medio sobre la disociación del tampón.

Interacciones de cationes con buen comportamiento: si los tampones forman complejos con ligandos catiónicos, los complejos formados deberían ser solubles. De manera ideal, al menos alguno de los compuestos de tamponamiento no formará complejos.

Estabilidad: los tampones deben ser químicamente estables, resistir la degradación enzimática y no enzimática.

- 5 Inercia bioquímica: los tampones no deben influir ni participar en ninguna reacción bioquímica.

Absorbancia óptica: los tampones no deben absorber luz visible o ultravioleta en longitudes de onda superiores a 230 nm para no interferir con los ensayos espectrofotométricos usados comúnmente.

Facilidad de preparación: los tampones deben prepararse y purificarse fácilmente a partir de materiales económicos.

- 10 Los ejemplos de tampones de Good, que también se emplean preferiblemente en la presente invención se exponen en la siguiente tabla.

Tabla 1

Tampón	pK <sub>a</sub> a 20°C	ΔpK <sub>a</sub> /°C	Solubilidad en agua a 0°C
MES	6,15	-0,011	0,65 M
ADA	6,62	-0,011	-
PIPES	6,82	-0,0085	-
ACES	6,88	-0,020	0,22 M
MOPSO	6,95	-0,015	0,75 M
Cloruro de colamina	7,10	-0,027	4,2 M (como HCl)
MOPS	7,15	-0,013	Grande
BES	7,17	-0,016	3,2 M
TES	7,5	-0,020	2,6 M
HEPES	7,55	-0,014	2,25 M
DIPSO	7,6	-0,015	0,24 M
Acetaminoglicina	7,7	-	Muy grande
TAPSO	7,7	-0,018	1,0 M
POPSO	7,85	-0,013	-
HEPPSO	7,9	-0,01	2,2 M
HEPPS	8,1	-0,015	Grande
Tricina	8,15	-0,021	0,8 M
Glicinamida	8,2	-0,029	6,4 M (como HCl)
Bicina	8,35	-0,018	1,1 M
TAPS	8,55	-0,027	Grande

MES: ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico

ADA: ácido *N*-(2-acetamido)iminodiacético

PIPES: ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-etanosulfónico)

- 15 ACES: ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico

MOPSO: ácido 3-morfolino-2-hidroxi-propanosulfónico

MOPS: ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico

BES: ácido *N,N*-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetanosulfónico

TES: ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]etanosulfónico

- 20 HEPES: ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etanosulfónico

DIPSO: ácido 3-(*N,N*-bis[2-hidroxietil]amino)-2-hidroxi-propanosulfónico

TAPSO: ácido 3-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]-2-hidroxi-propano-1-sulfónico

POPSO: ácido 2-hidroxi-3-[4-(2-hidroxi-3-sulfopropil)piperazin-1-il]propano-1-sulfónico

HEPPSO: N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico)

HEPPS: ácido 3-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]propano-1-sulfónico

Tricina: N-(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina

Bicina: ácido 2-(bis(2-hidroxietil)amino)acético

5 TAPS: ácido 3-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]propano-1-sulfónico

Los diferentes tampones de Good mencionados anteriormente cumplen los criterios de selección en varios grados y ningún tampón es completamente inerte en sistemas biológicos. Ejemplos adicionales de tampones de Good que se han identificado mientras tanto son AMPSO (ácido N-(1,1-dimetil-2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico), CABS (ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico), CHES (ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico), CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico) y CAPSO (ácido N-ciclohexil-2-hidroxi-3-aminopropanosulfónico).

En una realización particularmente preferida, el tampón es ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etanosulfónico (HEPES), es decir la disolución de glucosa es una disolución de glucosa tamponada con HEPES (también denominada en el presente documento HBG). Tal como se muestra en los ejemplos adjuntos, una expresión eficaz del ARNm en tejido de tendones puede lograrse si el ARNm, por ejemplo que codifica para BMP-7 humana o una proteína indicadora (luciferasa), se inyecta en el tejido de ligamentos o tendones en forma de una disolución acuosa, por ejemplo, en solución salina o en diferentes disoluciones tamponadas tales como solución de Ringer acetada o lactada. Puede lograrse una expresión particularmente alta si el ARNm se administra en glucosa tamponada con HEPES (HBG), pH 7,4.

Más preferiblemente la HBG es una HBG con una concentración en el intervalo de 0,75 x HBG a 1,25 x HBG, más preferiblemente, de 0,8 x HBG a 1,2 x HBG, incluso más preferiblemente, de 0,9 x HBG a 1,1 x HBG, y particularmente preferida 1 x HBG siendo 1 x HBG. El término "1 x HBG" se refiere a una disolución con la siguiente composición: HEPES 25 mM; glucosa al 5% m/v.

En una realización, la composición líquida de la invención no contiene aminoácidos y/o amonio,

La concentración del ARN en la composición líquida no es particularmente crucial y puede ajustarse según sea necesario. Preferiblemente, la concentración está en el intervalo de 0,1 a 5,0 µg/µl, o en el intervalo de 0,25 a 2,5 µg/µl, más preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 2,0 µg/µl, más preferiblemente en el intervalo de 0,75 a 1,5 µg/µl, incluso más preferiblemente en el intervalo de 0,80 a 1,20 µg/µl, particularmente preferida en el intervalo de 0,90 a 1,10 µg/µl.

La composición líquida que contiene el ARN puede aplicarse al tejido de ligamentos o tendones por medios conocidos por el experto en la técnica, preferiblemente por inyección (inyección directa/local), normalmente usando una jeringa con una aguja. En principio, puede usarse para este fin cualquier jeringa disponible comercialmente en combinación con una aguja. Se prefieren las agujas hipodérmicas. Tal como resulta evidente de los ejemplos adjuntos, el tamaño de la aguja, en particular el diámetro de la aguja, usada para inyectar la composición líquida que contiene el ARN puede influir en la eficacia de la expresión/actividad del ARN en el tejido de ligamentos o tendones. El diámetro de una aguja está indicado por el calibre de la aguja (G; según el calibre de aguja de Stub). Normalmente, las agujas en uso médico van desde 7G (la más grande) a 33G (la más pequeña). En una realización preferida, la aguja usada para inyectar la composición líquida que contiene el ARN tiene un diámetro en el intervalo de 20G a 27G, preferiblemente en el intervalo de 21G a 26G, más preferiblemente en el intervalo de 22G a 25G, incluso más preferiblemente 23G o 24G. Particularmente preferidas son las agujas con un diámetro de 23G.

El ARN contenido en la composición líquida puede ser cualquier ARN tal como se define en las reivindicaciones. Por tanto, en principio, cualquier tipo de ARN tal como se define en las reivindicaciones puede emplearse en el contexto de la presente invención. En una realización preferida, el ARN es un ARN monocatenario. El término "ARN monocatenario" significa una cadena única consecutiva de ribonucleótidos en contraste con las moléculas de ARN en las que dos o más cadenas individuales forman una molécula bicatenaria debido a la hibridación de las cadenas individuales. El término "ARN monocatenario" no excluye que la molécula monocatenaria forme en sí misma estructuras bicatenarias tales como bucles, estructuras secundarias o terciarias.

El término "ARN" cubre ARN que codifica para una secuencia de aminoácidos así como ARN que no codifica para una secuencia de aminoácidos. Se ha sugerido que más del 80% del genoma contiene elementos de ADN funcionales que no codifican para proteínas. Estas secuencias no codificantes incluyen elementos de ADN reguladores (sitios de unión para factores de transcripción, reguladores y correguladores etc.) y secuencias que codifican para transcritos que nunca se traducen en proteínas. Estos transcritos, que están codificados por el genoma y se transcriben en ARN pero no se traducen en proteínas, se denominan no codificantes (ARNnc). Por tanto, también se da a conocer en el presente documento que el ARN es un ARN no codificante. Preferiblemente, el ARN no codificante es una molécula monocatenaria. Los estudios demuestran que los ARNnc son actores críticos en la regulación génica, mantenimiento de la integridad genómica, diferenciación y desarrollo celular, y están mal regulados en diversas enfermedades humanas. Existen diferentes tipos de ARNnc: ARNnc cortos (20-50 nt), medios

(50-200 nt) y largos (>200 nt). El ARNnc corto incluye microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de interacción con piwi (ARNpi) y ARN que inicia la transcripción (ARNit). Los ejemplos de ARNnc medios son ARN nucleares pequeños (snARN), ARN nucleolares pequeños (snoARN), ARN de transferencia (ARNt), ARN asociados al sitio de inicio de la transcripción (TSSaARN), ARN pequeños asociados a promotores (PASR), y transcritos en el sentido 5' de promotores (PROMPTS). Los ARN no codificantes largos (ARNncl) incluyen ARN no codificante intergénico largo (ARNncil), ARNncl antisentido, ARNncl intrónicos, ARN ultraconservados transcritos (T-UCR), y otros (Bhan A, Mandal SS, Chem Med Chem. 26 de marzo de 2014. doi: 10,1002/cmdc.201300534). De los ARN no codificantes mencionados anteriormente sólo el ARNip es bicatenario. Por tanto, si el ARN no codificante es monocatenario, no es ARNip. En una realización particularmente preferida el ARN es un ARN codificante, es decir un ARN que codifica para una secuencia de aminoácidos. Tales moléculas de ARN también se denominan ARNm (ARN mensajero) y son moléculas de ARN monocatenarias. El ARN puede obtenerse mediante metodología química y enzimática de síntesis conocida por un experto habitual en la técnica, o mediante el uso de tecnología recombinante. o puede aislarse de fuentes naturales, o mediante una combinación de las mismas. El ARN puede comprender opcionalmente nucleótidos no naturales.

El ARN según la invención se refiere a ARNm y lo más preferiblemente a ARNm modificado, en particular a ARNm modificado tal como se describe a continuación en el presente documento y, por ejemplo, en el documento WO 2011/012316. El ARNm codifica para un polipéptido tal como se define en las reivindicaciones lo que puede tener un efecto positivo sobre el proceso de cicatrización de lesiones de ligamentos o tendones. Por tanto, el polipéptido es un polipéptido que tiene un efecto beneficioso sobre el proceso de cicatrización de lesiones de ligamentos o tendones, en particular un polipéptido que es terapéuticamente activo en el proceso de cicatrización de un ligamento o tendón. Los ejemplos para tales polipéptidos son factores de crecimiento y citocinas. Los ejemplos para factores de crecimiento son factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) tal como factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF). Sin restringirse a la teoría, tanto FGF como TGF- $\beta$  (TGF- $\beta 1$ ) son importantes/están implicados en la organización paralela de fibrillas de colágeno. Otros ejemplos son factores de crecimiento y diferenciación (GDF) que son una subfamilia de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) y están implicados en el desarrollo embrionario de diferentes órganos. GDF 5, 6 (BMP-13) y 7 (BMP-12) son particularmente preferidas ya que se ha demostrado que conducen a la formación ectópica de ligamentos y tendones cuando se inyectan en ratas (Evans, CH, Sports Med. 28 (1999), 71-76). Un ejemplo adicional y preferido para un factor de crecimiento es BMP-7, por ejemplo, tal como se codifica por una secuencia de nucleótidos tal como se representa en SEQ ID NO. 1, 2 ó 3 (véase también, por ejemplo, el número de registro de Pubmed: NM\_001719; Versión: NM\_001719.2, GI:187608319; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001719.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001719.2) (secuencia sin codones optimizados que incluye exones; la secuencia codificante comienza en nt948 y termina, sin interrupciones, en nt4031)).

Otros ejemplos dados a conocer en el presente documento para proteínas que pueden estar codificadas por el ARNm son factores de transcripción para activar el programa de regeneración en tendones/ligamentos o inhibir los programas celulares antirregenerativos en tendones/ligamentos, por ejemplo EGR1/2, Scleraxis, Mohawk y Sox9 (Guerquin *et al.*, J. Clin. Invest. 123 (2013), 3564-3576; Huanhuan Liu *et al.*, Cell and Tissue Research 356(2014), 287-298). Ejemplos adicionales para proteínas que están codificadas por el ARNm dado a conocer en el presente documento son proteínas estructurales tales como colágenos o proteoglicanos.

Los ejemplos adicionales para proteínas que pueden estar codificadas por el ARN dado a conocer en el presente documento son los siguientes: oncogén B de osteosarcoma de FBJ (Fosb), oncogén de osteosarcoma de FBJ (c-Fos), regulador de señalización de proteína G-1 (Rgs1), péptido similar a galanina (Galp), proteína de respuesta de crecimiento temprano-1 (Egr1), proteína de respuesta de crecimiento temprano-2 (Egr2), proteína Homeobox de NK6 1 (Nkx), proteína similar a proteína s10 ribosómica (LOC688706), proteína similar a farnesil pirofosfato sintetasa específica de testículo (RGD1565157), homólogo de Frizzled 9 (Fzd9), aldehído oxidasa-1 (Aox-1), proteína de unión a selenio 1 (Selenbp1), proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógenos 13 (Map3k13), agrecano, Adams-4, Alox-5, Ptges, iNOS, IL-1, antagonista del receptor de IL-1, angpoyetina 1, proteína similar a angpoyetina 1, Vegf, Pappa, Fmo2, C1qTNF3, Fbap4, Scleraxis, tendomodulina, F2r12, F3 y F5, tgf-3, mdk, y bmp-6, queratocán y fibromodulina, coll VIII, coll XI, coll I, Amot, Epha3, Epha4, Fgf-2, Calp6, Enpp2, Fmo1-4, MaoB, Nox4, Xdh, Hmox1, S100a9, Pappa, Arklc14, Arklc19, Gstt2, Gstm5, Gstm7, Hasph1, Hsph8, Hspa1b, Six1, Six2, factores de crecimiento y diferenciación (GDF, GDF1-11, GDF15), Smad8, Homer-1b, proteína de tipo receptor de glutamato metabotrópico 1, receptor de histamina H2, proteínas relacionadas con vegetales, receptor de linfocitos citotóxicos naturales secretados 2B4, 5-lipoxigenasa, factor de crecimiento preproepidérmico, cadena lambda-5 de inmunoglobulina, lumicano, betacelulina, rSec8, Sonic hedgehog, proteína Homeobox de LIM 7, Frizzled, ZOG, proteína Notch 3, inhibidor de tejidos de metaloproteinasas tipo 2, subunidad 2C del receptor de N-metil-D-aspartato, antígeno CD2 marcador de células T, proteína que interactúa con el receptor de glutamato 2, sinapsina 2b, factor de crecimiento de hepatocitos, región V de la cadena beta activa del receptor de células T, proteína unida al receptor de factores de crecimiento 14, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos-3, proteínas relacionadas con vegetales, transportador de glutamato de alta afinidad y proteína Homeobox rPtx2. Se ha informado de que los que codifican para estas proteínas se desregulan durante la regeneración del tejido de tendones.

En una realización, se prevé la administración de dos o más (por ejemplo 3, 4 ó 5) ARNm que codifican cada uno

para un polipéptido diferente tal como se describe en el presente documento y, en particular, tal como se describió anteriormente. En este contexto, la administración puede ser simultáneamente (preferida) o de manera secuencial. De manera similar, puede aplicarse la administración de un ARNm que codifica para dos o más (por ejemplo 3, 4 ó 5) de los polipéptidos tal como se describe en el presente documento y, en particular, tal como se describió anteriormente.

En el contexto de esta realización, se prefiere que los dos o más (por ejemplo 3, 4 ó 5) polipéptidos se seleccionen del grupo que consiste en PDGF, FGF tal como bFGF, IGF-1, TGF-1, EGF, un GDF y BMP. En este contexto, el GDF puede ser GDF 5, 6 (BMP-13), 7 (BMP-12) y/o miostatina (GDF-8) y/o la BMP puede ser BMP-7.

El término "ARNm" (es decir, ARN mensajero) se refiere a polímeros que están formados por elementos estructurales de fosfato de nucleósido principalmente con adenosina, citidina, uridina y guanosina como nucleósidos, y que contienen una región codificante que codifica para un polipéptido. En el contexto de la presente invención, debe entenderse que ARNm significa cualquier molécula de polirribonucleótido que, si entra en la célula, es adecuada para la expresión de un polipéptido o fragmento del mismo o es traducible a un polipéptido o fragmento del mismo. El término "polipéptido" en este caso abarca cualquier clase de secuencia de aminoácidos, es decir, cadenas de dos o más aminoácidos, cada una de las cuales está unida a través de enlaces peptídicos y también incluye péptidos y proteínas de fusión.

El ARNm contiene una secuencia de ribonucleótidos que codifica para un polipéptido o fragmento del mismo cuya función en la célula o en las proximidades de la célula es necesaria o beneficiosa, en particular en el contexto de la cicatrización de lesiones de ligamentos o tendones. El ARNm puede contener la secuencia del polipéptido completo o una variante funcional del mismo. Además, la secuencia de ribonucleótidos puede codificar para un polipéptido que actúa como factor, inductor, regulador, estimulador o enzima, o un fragmento funcional del mismo, en el que este polipéptido es uno cuya función es necesaria para tratar un trastorno, en particular una lesión de ligamentos o tendones.

En este caso, se entiende por variante funcional un fragmento que en la célula puede asumir la función del polipéptido cuya función en la célula es necesaria. Además, el ARNm también puede tener otras regiones funcionales y/o regiones no codificantes en 3' o 5'. Las regiones no codificantes en 3' y/o 5' pueden ser las regiones que flanquean naturalmente la secuencia que codifica el polipéptido o secuencias artificiales que contribuyen a la estabilización del ARN. Los expertos en la técnica pueden determinar las secuencias adecuadas para esto en cada caso mediante experimentos de rutina.

En una realización preferida, el ARNm contiene una caperuza m7GpppG, un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y/o una cola de poliA en el extremo 3' en particular para mejorar la traducción. El ARNm puede tener además regiones que promueven la traducción.

En una realización preferida, el ARN, preferiblemente el ARNm, es un ARN que contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados. Preferiblemente, es un ARN(m) que contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados tal como se describe en el documento WO2011/012316. Se notifica que el ARNm descrito en ese documento muestra una estabilidad aumentada y una inmunogenicidad disminuida. En una realización preferida, en ARNm modificado de este tipo se modifican del 5 al 50% de los nucleótidos de citidina y del 5 al 50% de los nucleótidos de uridina. Los nucleótidos que contienen adenosina y guanosina pueden no modificarse. Los nucleótidos de adenosina y guanosina pueden estar sin modificar o parcialmente modificados, y preferiblemente están presentes en forma no modificada. Preferiblemente del 10 al 35% de los nucleótidos de citidina y uridina están modificados y de manera particularmente preferida el contenido de los nucleótidos de citidina modificados se encuentra en un intervalo del 7,5 al 25% y el contenido de nucleótidos de uridina modificados en un intervalo del 7,5 al 25%. Se ha encontrado que, de hecho, un contenido relativamente bajo, por ejemplo, sólo el 10% de cada uno de los nucleótidos de citidina y uridina modificados puede lograr las propiedades deseadas. Se prefiere particularmente que los nucleótidos de citidina modificados sean residuos de 5-metilcitidina y los nucleótidos de uridina modificados sean residuos de 2-tiouridina. Lo más preferiblemente, el contenido de nucleótidos de citidina modificados y el contenido de nucleótidos de uridina modificados es del 25%, respectivamente.

En otra realización preferida, el ARN, preferiblemente el ARNm, puede combinarse con sitios de unión diana, secuencias de direccionamiento y/o con sitios de unión a micro-ARN, para permitir la actividad del ARN deseado sólo en las células relevantes. En una realización adicional preferida, el ARN puede combinarse con micro-ARN o ARNh<sub>c</sub> en el sentido de 3' de la cola de poliA en 3'.

Preferiblemente, el ARN desnudo que va a emplearse en el contexto de la presente invención, en particular el ARNm desnudo, tiene codones optimizados. Un ejemplo no limitativo de un ARN(m) con codones optimizados y modificado químicamente que va a emplearse en el contexto de la invención es el ARNm que codifica para BMP-7 con codones optimizados tal como se representa en SEQ ID NO. 2 ó 3. El experto en la técnica puede fácilmente optimizar los codones de un ARN(m) dado basándose en los medios y métodos respectivos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la optimización de codones puede realizarse usando el software "GENEius" de Eurofins (véase, por ejemplo, [https://www.eurofinsgenomics.eu/media/892634/an\\_geneius\\_compared-to-competitors.pdf](https://www.eurofinsgenomics.eu/media/892634/an_geneius_compared-to-competitors.pdf)). Además, el experto en la técnica puede fácilmente modificar químicamente un ARN(m) dado basándose en los medios y métodos respectivos

conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 2011/012316).

La presente invención también se refiere a un ARNm que codifica para un polipéptido tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de lesiones de ligamentos o tendones en el que el ARN se administra, en particular directamente el, el ligamento o tendón (preferiblemente mediante inyección) en forma de una composición líquida en la que el ARN está contenido como ARN desnudo. Con respecto a la forma de administración y las características de la composición y el ARN contenida en la misma, se aplica lo mismo que se ha expuesto en el presente documento en cualquier otra parte.

También se da a conocer en el presente documento un método para tratar (o prevenir) lesiones de ligamentos o tendones que comprende la administración (de una cantidad farmacéuticamente eficaz) de una composición líquida que contiene ARN desnudo, preferiblemente ARNm que codifica para un polipéptido (por ejemplo, BMP-7), que es beneficioso en el proceso de cicatrización de la lesión de ligamentos o tendones del ligamento o tendón (a un paciente que lo necesita). Con respecto a la forma de administración y las características de la composición y el ARN contenido en la misma, se aplica lo mismo que se ha establecido en el presente documento en cualquier otra parte.

En una realización preferida, la composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, de la presente invención va a administrarse a, en particular directamente en, el ligamento o tendón. En este contexto, la forma más preferida de administración es inyección, es decir inyección intraligamento o intratendón.

En principio, se prevé en el contexto de la invención administrar la composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, lo antes posible, es decir, en el estadio más temprano posible de la lesión de ligamento/tendón y ligamentopatía/tendinopatía (degenerativa), respectivamente. Por ejemplo, este estadio es una vez (a) el/los primer(os) síntoma(s) observado(s) (por ejemplo, dolor o dolor a la palpación) o una vez que comienza una intervención quirúrgica o durante una intervención quirúrgica. Esto se aplica tanto a las formas agudas como crónicas de las lesiones/enfermedades/trastornos que van a tratarse o prevenirse según la invención. Sin embargo, cualquier posible punto de tiempo después del diagnóstico es posible y útil y, por tanto, se prevé según la invención. Por ejemplo, en caso de que haya una intervención quirúrgica (por ejemplo, después de una rotura de ligamento/tendón), la composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, pueden administrarse ya durante, pero al menos poco después, la intervención quirúrgica. Cuando se administra durante la intervención quirúrgica, la composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, pueden administrarse a (por ejemplo, mediante inyección en) una o ambas colas de la rotura.

En una realización específica, la composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, deben administrarse durante o incluso antes de la fase inflamatoria y proliferativa temprana, respectivamente, de la regeneración de ligamento/tendón. Por ejemplo, la administración puede ser durante el día 0 al día 10, preferiblemente durante el día 0 al día 7, después del daño/después de la lesión. Más específicamente, la administración puede ser el día 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 después del daño/después de la lesión. Preferiblemente, la administración es el día 1 e incluso más preferiblemente el día 0 después del daño/después de la lesión.

La administración de la composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, según la invención puede, por ejemplo, dependiendo de la evolución de la lesión/enfermedad/trastorno que va a tratarse/prevenirse, repetirse al menos una vez pero preferiblemente varias veces (por ejemplo, de 3 a 5 veces). La administración repetida puede ser cada pocas semanas (por ejemplo, cada 1, 2, 3 ó 4 semanas) hasta cada pocos días (por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 días).

La composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, de la invención pueden administrarse a un paciente en una dosis adecuada. El médico responsable puede determinar la posología basándose, por ejemplo, en factores clínicos. Como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular que va a administrarse, sexo, momento y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se estén administrando de manera simultánea. Sin embargo, el experto en la técnica/el médico responsable puede deducir fácilmente (una) concentración/concentraciones (terapéuticamente) eficaz y/o dosificaciones de/de los principio(s) activo(s) que va a administrarse, por ejemplo, *in vivo* o *ex vivo*. Pueden tomarse muestras correspondientes de, por ejemplo, el ligamento o tendón (por ejemplo, mediante una sonda adecuada) y pueden detectarse los compuestos activos (ARN desnudo) y determinarse sus correspondientes concentraciones en dichas muestras, por ejemplo, mediante HPLC.

La determinación de las concentraciones de compuesto activo puede obtenerse en pacientes humanos, individuos sanos (humanos) así como en animales (por ejemplo, ratones, ratas, cerdos, caballos y similares), como animales de laboratorio, animales transgénicos no humanos (por ejemplo, ratones, ratas, cerdos transgénicos y similares). Se prevé que la determinación de las concentraciones de compuesto activo en, por ejemplo, el ligamento o tendón, por ejemplo, puede deducirse en voluntarios (sanos) y pueden establecerse esquemas de administración correspondientes para pacientes (humanos). Por ejemplo, las dependencias de la dosificación (por ejemplo, dosificaciones administrada frente a la concentración/dosificación detectadas (en diversas regiones) del ligamento o tendón pueden determinarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. Los métodos adicionales

comprenden, pero no se limitan a, la detección de péptidos marcados *in vivo* (por ejemplo, mediante las técnicas de marcado correspondientes, como marcado radiactivo, marcado fluorescente, etc.) o ensayos fisiológicos/bioquímicos. Por consiguiente, puede deducirse la dosificación de compuestos activos que va a administrarse para obtener una concentración deseada de los compuestos activos (en una determinada parte del ligamento/tendón). Estos y otros métodos para deducir tales concentraciones se conocen en la técnica.

Una dosis típica de principios activos (por ejemplo, ARN desnudo) puede ser, por ejemplo, en el intervalo de 1 ng a varios gramos, preferiblemente en el intervalo de 0,1 µg a 1 g, preferiblemente en el intervalo de 1 µg a 0,1 g, preferiblemente en el intervalo de 10 µg a 10 mg, y lo más preferiblemente en el intervalo de 100 µg a 1 mg. Esto se aplica particularmente a un paciente humano. Aplicada a la terapia con ARN(m), la dosificación de un ARN(m) para la expresión (o para la inhibición de la expresión) debe corresponder a este intervalo; sin embargo, en principio, también se prevén las dosis por debajo o por encima de este intervalo a modo de ejemplo, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente. Generalmente, el régimen como administración regular de la composición líquida debe estar en el intervalo de unidades de 0,1 µg a 10 mg, preferiblemente en el intervalo de unidades de 1 µg a 1 mg, más preferiblemente en el intervalo de unidades de 10 µg a 0,1 mg por kilogramo de peso corporal por día. De nuevo, esto se aplica particularmente a un paciente humano. El progreso puede monitorizarse mediante evaluación periódica. Las dosificaciones pueden variar pero una dosificación preferida para la administración mediante inyección de ARN(m) como constituyentes de la composición líquida de la presente invención es de desde aproximadamente  $10^5$  hasta  $10^{15}$  copias de la molécula de ARN(m) por inyección. De nuevo, esto se aplica particularmente a un paciente humano.

En particular, se prevé que la composición líquida de la invención se administre a un paciente, preferiblemente a un paciente humano/un ser humano. Sin embargo, las lesiones de ligamentos o tendones (y estados relacionados) descritas en el presente documento también pueden tratarse (o prevenirse) en un sujeto/paciente animal no humano como, por ejemplo, una mascota (por ejemplo, perro, gato, conejo, rata y ratón), ganado (por ejemplo vaca, cerdo, oveja), un caballo (por ejemplo, un caballo de carreras) o poni o un pájaro (por ejemplo, pollo, pavo, loro).

Cualquiera de las composiciones líquidas de la invención puede proporcionarse junto con un manual de instrucciones o folleto de instrucciones. El manual/folleto de instrucciones puede comprender una guía para el experto en la técnica/médico responsable de cómo tratar (o prevenir) una enfermedad o trastorno tal como se describe en el presente documento (lesión de ligamentos o tendones) según la invención. En particular, el manual/folleto de instrucciones puede comprender una guía para el modo de suministro/administración y régimen de suministro/administración descritos en el presente documento, respectivamente (por ejemplo, la vía de suministro/administración, pauta posológica, momento de suministro/administración, frecuencia de suministro/administración). En particular, el manual/folleto de instrucciones puede comprender las instrucciones de que la composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, que va a inyectarse y/o va a prepararse para inyección en el ligamento o tendón. El manual/folleto de instrucciones puede comprender además las instrucciones de que la composición líquida y el ARN desnudo, respectivamente, se prepare para administración durante la fase inflamatoria que sigue a la lesión del ligamento o tendón. En principio, lo que se ha mencionado en el presente documento en cualquier otra parte con respecto al modo de suministro/administración y régimen de suministro/administración, respectivamente, puede estar comprendido en las instrucciones respectivas en el manual/folleto de instrucciones.

También se da a conocer en el presente documento una disolución de glucosa tamponada con HEPES que comprende ARN desnudo, preferiblemente un ARNm que codifica para un polipéptido (por ejemplo BMP-7). Con respecto a las realizaciones preferidas de la disolución y el ARN, se aplica lo mismo que se ha expuesto en el presente documento en cualquier otra parte.

Además, la presente invención también se refiere a una composición terapéutica que contiene ARNm que codifica para un polipéptido tal como se define en las reivindicaciones (por ejemplo, BMP-7), que es terapéuticamente activo en el proceso de cicatrización de un ligamento o tendón. La composición terapéutica es una formulación líquida en la que el ARN está presente en forma de ARN desnudo, y en la que la composición es una disolución de glucosa que contiene el ARN desnudo. Con respecto a la forma de administración y las características de la composición y el ARN contenido en la misma, se aplica lo mismo que se ha expuesto en el presente documento en cualquier otra parte.

La composición líquida para su uso según la invención puede proporcionarse en (o en forma de) un kit/un kit de contenido. El kit puede comprender uno o más de los componentes de la composición líquida de la invención, por ejemplo, en uno o más recipientes individuales. Por ejemplo, el kit puede comprender el ARN desnudo (por ejemplo en forma seca), un solubilizante y disolución acuosa (tamponada o no tamponada), por ejemplo en uno, dos o tres (o más) recipientes individuales, respectivamente. El kit también puede comprender el manual de instrucciones o folleto de instrucciones.

#### **Leyendas de las figuras**

La figura 1 muestra la expresión del ARNm desnudo que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) en HBG pH 7,4 (1x) frente a ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) en diferentes sistemas de portadores en tendón

bovino y ovino (véase el ejemplo 1).

La figura 2 muestra la expresión del ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) en tendones de diferentes especies (véase el ejemplo 2). Los datos representan el nivel de expresión 24 h después de la inyección.

5 La figura 3 muestra la cinética de la expresión del ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) de diferentes concentraciones de ARNm en explantes de tendón ovino (véase el ejemplo 3).

La figura 4 muestra la comparación de diferentes disolventes usados para la inyección de ARNm desnudo en explantes de tendón bovino (véase el ejemplo 4).

10 La figura 5 muestra una comparación de la expresión del ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) en explantes de tendón bovino cuando se inyecta en agua para inyección (WFI), NaCl (solución salina isotónica) y HBG (1x) pH 7,4 (véase el ejemplo 5).

La figura 6 muestra la influencia de la concentración de HBG sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) en explantes de tendón bovino (véase el ejemplo 6).

La figura 7 muestra la influencia de la cantidad de ARNm sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) en explantes de tendón ovino (véase el ejemplo 7).

15 La figura 8 muestra la influencia de la concentración de ARNm sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) en explantes de tendón bovino (véase el ejemplo 8).

La figura 9 muestra la influencia del tamaño de la aguja sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para luciferasa de luciérnaga (FFL) en explantes de tendón ovino (véase el ejemplo 9).

20 La figura 10a muestra un tendón flexor digital profundo ovino intacto. Alta expresión en el área inyectada del tendón 24 horas después de la inyección de SNIM®-FFL-RNA (documento WO 2011/012316) (véase el ejemplo 10).

La figura 10b muestra un tendón levemente dañado mediante inyección de 100 UDC. Alta expresión en el área periférica inyectada del defecto (véase el ejemplo 10).

25 La figura 10c muestra un tendón gravemente dañado mediante inyección de 200 UDC. Expresión puntual en el área periférica inyectada del defecto. El tendón se abrió longitudinalmente antes de la incubación en luciferina (véase el ejemplo 10).

La figura 10d muestra tendón gravemente dañado mediante inyección de 500 UDC. Expresión puntual en el área periférica inyectada del defecto. El tendón se cortó antes de la incubación en disolución de luciferina (véase el ejemplo 10).

30 Figura 11A Sección longitudinal de tendones ovinos 24 horas después de inyección de ARNm de LacZ modificado y tinción con LacZ. Es detectable un precipitado azul en el área central del tendón (véase el ejemplo 11).

Figura 11B Sección longitudinal de tendones ovinos de control sin tratar y tinción con LacZ. No es detectable un precipitado azul en el área central del tendón (véase el ejemplo 11).

35 Figura 11C Imágenes microscópicas de una sección longitudinal de tendones ovinos 24 horas después de la inyección de ARNm de LacZ modificado y tinción con LacZ. Es detectable un precipitado azul en células entre las fibras del tendón (véase el ejemplo 11).

Figura 11D Imágenes microscópicas de una sección longitudinal de tendones ovinos de control sin tratar y tinción con LacZ. No es detectable un precipitado azul en células entre las fibras del tendón (véase el ejemplo 11).

40 Figura 12A Imágenes microscópicas de una sección longitudinal de inmunohistoquímica de BMP7 de tendón de Aquiles de rata tratado con ARNm de BMP7 modificado 24 h después de la inyección. Es detectable tinción roja/morada en células entre las fibras del tendón (véase el ejemplo 12).

Figura 12B Imágenes microscópicas de una sección longitudinal de un tendón de Aquiles de rata sin tratar de control. No es detectable tinción roja/morada en células entre las fibras del tendón (véase el ejemplo 12).

45 Figura 13 se inyectó ARNm marcado con  $I^{125}$  en tendón porcino y se obtuvieron imágenes de manera radioisotópica 30 min después (parte superior del tendón). La parte inferior del tendón actúa como control negativo. (véase el ejemplo 13). El ARNm se difunde lentamente fuera del sitio de inyección.

Figura 14 Expresión de proteínas en explantes de tendones intactos después de la inyección de ARNm desnudo. (A) Obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) 24 horas después de inyección de ARNm<sup>LUC</sup> en explantes de tendón de diferentes especies. Se inyectaron o bien 26,6  $\mu$ g [0,65 mg/ml] (rata), 50  $\mu$ g [0,5 mg/ml] (bovino, equino) o bien 100  $\mu$ g [1 mg/ml] (porcino, ovino) de ARNm<sup>LUC</sup> desnudo. Se detectó la expresión en todas las especies

5 sometidas a prueba. (B) La expresión de la luciferasa es dependiente de la dosis. Se les inyectó a explantes de tendón porcinos o bien 25 µg, 50 µg, 100 µg o bien 200 µg de ARNm<sup>LUC</sup> en 250 µl de solución salina isotónica (NaCl). Se muestra la expresión media ± EEM del punto de tiempo de 24 horas (n=4). (C) Explantes de tendón porcino que muestran un precipitado macroscópicamente azul extendido en forma de tubo 24 horas después de la inyección de ARNm<sup>LacZ</sup> y tinción con X-Gal. (D) Explantes de control 24 horas después de la inyección de ARNm<sup>LUC</sup> y tinción con X-Gal. (E, F, G, H) Secciones de tendones porcinos inyectados con ARNm<sup>LacZ</sup> teñidos con LacZ (E, G) e inyectados con ARNm<sup>LUC</sup> (F, H) contrateñidos con hematoxilina. Se expresó de manera local β-galactosidasa cerca del sitio de inyección (E) y pudo detectarse en tenocitos (G) y tejido conjuntivo, mientras que los controles tratados con ARNm<sup>LUC</sup> fueron negativos para actividad de β-gal (F, H). E, F Aumento original x20. G, H Aumento original x40. (I, J, K, L) Inmuntinción con BMP-7 en secciones de tendones de Aquiles de rata tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> (I, K) y controles sin tratar (J, L) teñidos con hematoxilina. Las señales positivas se tiñeron de rojo. BMP-7 es detectable de manera creciente en paredes vasculares, tejido conjuntivo (I) así como en tenocitos (K) en tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup>. I, J Aumento original x10. K, L Aumento original x40.

15 Figura 15 Cinética de expresión y comparación de diferentes disolventes usados para inyección de ARNm desnudo. (A) Cinética de expresión de luciferasa en explantes de tendón bovino. Se inyectaron 50 µg de ARNm<sup>LUC</sup> [0,5 mg/ml] en solución salina isotónica. Los datos representan los niveles de expresión medios ± EEM después de 24 h, 48 h y 72 h después de la inyección (n ≥ 10). Se midió la expresión de luciferasa más alta después de 24 horas después de la inyección. En un plazo de 72 horas la actividad de luciferasa disminuyó a los niveles previos. (B) Se inyectaron 50 µg de ARNm<sup>LUC</sup> [0,25 mg/ml] en diferentes disolventes en explantes de tendón bovino (n ≥ 5). El eje vertical muestra los valores de expresión de FFL, mientras que el eje horizontal muestra los diferentes disolventes que se usaron para la dilución. Los datos representan los niveles de expresión promedio ± EEM 24 horas después de la inyección. Se observó una expresión significativamente mejorada con HBG al 5% (15 veces) en comparación con el ARNm<sup>LUC</sup> disuelto en solución salina (\*, p < 0,05) y (57 veces) en comparación con Aminosteril plus (\*, p < 0,05). (C) Comparación de diferentes concentraciones de HBG. Los datos representan la media ± EEM de la expresión de luciferasa después de 24 horas después de la inyección de ARNm<sup>LUC</sup> (0,5 mg/ml) (n ≥ 5). La HBG al 5% dio como resultado valores de expresión significativamente mayores (50 veces) en comparación con el 2,5%, 20 veces en comparación con el 10% (\*, p < 0,05) y 4 veces en comparación con el 3,75% (\*, p < 0,05). (D) Comparación de los disolventes que contienen glucosa y disoluciones sin glucosa. Se inyectaron 50 µg de ARNm<sup>LUC</sup> [0,5 mg/ml] en explantes de tendón porcino 24 antes de BLI (n=5). Los datos representan la media ± EEM de expresión de luciferasa. Los valores de expresión de luciferasa promedios a partir de ARNm<sup>LUC</sup> formulado en HBG al 5% y en NaCl+gluc. al 5% fueron significativamente mayores (20 veces para HBG al 5% y 21 veces para NaCl+ gluc. al 5%) en comparación con solución salina isotónica (\*, p < 0,05). (E) Comparación de sistemas de portadores y solución salina isotónica. La actividad de luciferasa promedio con ARNm<sup>LUC</sup> complejoado con portadores o bien lipídicos o bien poliméricos sólo alcanzaron niveles de expresión previa en tendones bovinos así como en ovinos. La expresión promedio a partir de 25 µg de ARNm<sup>LUC</sup> disuelto en solución salina fueron 22 veces mayores en comparación con 25 µg de ARNm<sup>LUC</sup> complejoado con brPEI (\*, p < 0,05).

40 Figura 16 Expresión de proteínas en tendones de Aquiles de rata intactos y lesionados *in vivo*. (A) BLI 24 horas después de la inyección de ARNm<sup>LUC</sup> en el tendón de Aquiles intacto. (B) Cinética y dependencia de la dosis de la expresión de luciferasa en tendones de Aquiles intactos. Se aplicó por vía intraperitoneal sustrato de luciferina 15 minutos antes de la medición (media ± EEM, n=4) (C) Intensidad media de inmuntinción con BMP-7 de tendones de Aquiles en el día 1, 2 y 7 después de la lesión o bien tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> o bien con vehículo. Se observó una tendencia de niveles de BMP-7 aumentados en tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> en comparación con los tendones tratados con vehículo (n ≥ 3). (D) Tinción de H.E. de tendones de Aquiles en el día 1, 2 y 7 después de la lesión, tratados o bien con ARNm<sup>BMP-7</sup> o bien con vehículo. Las escalas gráficas son equivalentes a una longitud de 400 µm. (E) Intensidad media de inmuntinción con colágeno tipo I de tendones de Aquiles en el día 1, 2 y 7 después de la lesión tratados o bien con ARNm<sup>BMP-7</sup> o bien con vehículo. Mayor intensidad en el día 2 y el día 7 en tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> en comparación con tendones tratados con vehículo (n ≥ 3). (F) Intensidad media de inmuntinción con colágeno tipo III de tendones de Aquiles en el día 1, 2 y 7 después de la lesión tratados o bien con ARNm<sup>BMP-7</sup> o bien con vehículo. Menor intensidad de colágeno tipo III en tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> en el día 7 en comparación con tendones tratados con vehículo (p = 0,057, n=3). (G) Razones de intensidad media de inmuntinción con colágeno tipo I a colágeno tipo III de tendones de Aquiles en el día 1, 2 y 7 después de la lesión tratados o bien con ARNm<sup>BMP-7</sup> o bien con vehículo. Tendencia hacia mayores razones colágeno I/III en tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> en comparación con tendones tratados con vehículo (n ≥ 3).

55 Figura 17 Patología de defectos tendinosos inducidos por gel de colagenasa en oveja. (A-F) Ecografías longitudinales (A-C) y transversales (D-F) de una extremidad trasera lesionada de oveja. (A, D) Ecografía longitudinal y transversal en el día 0 antes de la inyección de colagenasa, (B, E) 3 y (C, F) 7 días después de la inyección de gel de colagenasa (100 UDC). (G) Análisis de diámetro durante el periodo experimental de tendones a los que se les ha inyectado o bien 100, 200 o bien 500 UDC y controles contralaterales sin tratar. Los datos se representan como media ± DE. El diámetro del DDFT aumentó de manera progresiva en todos los grupos después de la aplicación de colagenasa. (H) Análisis de grosor externo de oveja tratada con 100 UDC durante el periodo experimental. Los datos se representan como media ± DE. El grosor externo alcanzó el máximo (1,5 veces) 4 días después de la inyección de colagenasa. (I-L) Tinción de H.E. de tendones ovinos intactos (I, J) y lesionados (K, L). (I, J) Típica estructura de fibras con tenocitos ubicados entre las fibras. (K) Material necrótico, hematoma, inflamación y

pérdida masiva de estructura de fibras en el área central del defecto. La estructura de fibras ajustadas era todavía evidente aunque las fibras estaban hinchadas y las conexiones entre fibras parecían aflojadas. (L) Se aumentó el número de células y la densidad celular en áreas rodeadas en su mayoría intactas. (I, K Aumento original  $\times 10$ , J, L Aumento original  $\times 20$ )

- 5 Figura 18 Ecografía longitudinal de una extremidad trasera de oveja. Se insertó la aguja en tendón flexor digital profundo de oveja antes de realizarse la inyección de colagenasa. (SDFT= tendón flexor digital superficial, DDFT= tendón flexor digital profundo, M.interosseus= músculo interóseo)

- Figura 19 Transfección *in vivo* exitosa de tendones lesionados e intactos en oveja. (A, B) Ecografía longitudinal (A) y transversal (B) de un DDFT dañado en el día 6 con aguja insertada en la parte central del tendón. (C) Ecografía longitudinal justo después de la inyección de SNIM-RNALUC (documento WO 2011/012316). El aire inyectado es visible en el área central del tendón. (D, E) BLI de DDFT ovino contralateral explantado dañado (D) e intacto (E) DDFT 24 horas después de la inyección *in vivo* de 200  $\mu\text{g}$  ARNm<sup>LUC</sup> en cada DDFT. Se indujo el daño mediante inyección de 100 unidades de digestión de colágeno. Se realizó la BLI en el plazo de 2 horas después de la eutanasia. (F, G) Tinción de H.E. de tendón intacto tratado con ARNm<sup>LUC</sup> en el sitio de inyección (F) y 3 cm proximal al sitio de inyección (G). Aumento original  $\times 20$ . (H) Análisis de glóbulos blancos (WBC) en el día 0, día 6 y día 7. Las líneas de trazos definen el intervalo de referencia (5-11 G/l).
- 10
- 15

- Figura 20 Caracterización de defectos 7 días después de la aplicación de gel de colagenasa que contenía 200 UDC o 500 UDC (tinción con H.E.) (A) Hematoma en el área central del defecto. (B) Material necrótico, conglomeración de glóbulos rojos así como células inflamatorias en el área periférica inyectada del defecto. (C) Neovascularización y (D) invasión de células inflamatorias en el área periférica inyectada del hematoma. (E) Acumulación de glóbulos rojos entre las fibras cerca del defecto e inflamación masiva. (F) El tendón intacto contralateral de la extremidad con tenocitos ubicados entre las fibras paralelas. (A-C, E, F aumento original  $\times 10$ , D aumento original  $\times 20$ ).
- 20
- 25

### Ejemplos

- 25 Metodología de experimentos *ex vivo* (especialmente relacionados con los ejemplos 1 a 9) de extracción y preparación de tendones

- Se recogió el tejido de tendones de animales o bien sacrificados o bien eutanasiados en el plazo de una hora *post mortem* y se aclaró con PBS de Dulbecco enfriado en hielo (1x) que contenía penicilina/estreptomicina al 1% dos veces. Tendones flexores digitales profundos derivados de ganado, caballos u oveja y tendones de Aquiles derivados de ratas o cerdos. Se retiró el tejido conjuntivo y se realizaron cortes seriados de los tendones principales (0,5 cm x 3 cm).
- 30

### Síntesis de ARN

- Se clonó una secuencia de ADN con codones optimizados (por ejemplo, SEQ ID No. 2) con secuencias flanqueantes conocidas en un vector de expresión convencional para la producción de ARNm *in vitro*. Para generar el molde para la transcripción *in vitro*, el plásmido se linealizó en el sentido de 3' de la cola de poli (A) y se purificó usando extracción con cloroformo y precipitación con acetato de sodio tal como describen Sambrook *et al.* (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T (1989) en Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. vol. 1, 2, 3). La linealización completa del molde de plásmido se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el sistema de producción de ARN a gran escala RiboMAX - T7 (Promega, Alemania) a 37°C siguiendo el protocolo del fabricante. Para la transcripción *in vitro* de ARNm modificado químicamente (ARNmq), el 25% de citidina-5'-trifosfato y el 25% de uridina-5'-trifosfato se reemplazaron por 5-metilcitidina-5'-trifosfato (TriLink, EE.UU.) y 2-tiouridina-5'-trifosfato (TriLink, EE.UU.), respectivamente, en la mezcla de reacción (para más detalles, véase el documento WO 2011/012316). La purificación del ARNm se realizó mediante extracción con cloroformo y cromatografía de exclusión molecular.
- 35
- 40

### Transfección y cultivo *ex vivo*

- 45 El ARNm se diluyó en diferentes disolventes y diferentes concentraciones antes de que se realizase la inyección lentamente en dirección paralela a las fibras del tendón usando una aguja 23G para los tendones principales y jeringas de insulina 30G para los tendones de Aquiles de rata. Los cortes seriados de tendones transfectados se almacenaron en matraces de cultivo de tejidos con tapas ventiladas en medio DMEM (1x) + GlutaMAX que contenía penicilina/estreptomicina al 1%, nistatina al 2% y FBS al 10% a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> inmediatamente después de la inyección de SNIM®-RNA (documento WO 2011/012316). Se almacenaron de cuatro a cinco muestras por matraz.
- 50

### Medición de bioluminiscencia

- La luciferasa de luciérnaga (FFL) es una proteína informadora común que no está presente de manera endógena en los mamíferos y puede detectarse fácilmente mediante obtención de imágenes luminiscentes. La luciferasa cataliza la reacción de luciferina y oxígeno que da como resultado una emisión de bioluminiscencia.
- 55 La bioluminiscencia se midió en los puntos de tiempo indicados (24 h, 48 h, 72 h, 168 h) usando sistema de

obtención de imágenes *in vivo* Xenogen IVIS 100 (Caliper Life Science, EE.UU.). Se añadió sustrato de D-luciferina diluido en PBS de Dulbecco (1x) a los matraces de cultivo celular (100 µg de medio de D-luciferina/ml) una hora antes de la medición de la actividad de luciferasa. La medición se realizó en el campo de visión A con alta sensibilidad (agrupación 16) y un tiempo de exposición de 1 minuto. Para el análisis se usó el software Living Image® 2.50.

#### Tinción con betagalactosidasa (LacZ)

La betagalactosidasa es otra proteína indicadora común usada para el análisis de la expresión génica. La escisión del sustrato Xgal da como resultado un precipitado azul. Se inyectaron cortes seriados de tendón con 100 µg de ARN de LacZ modificado disuelto en 250 µl de solución salina isotónica. La tinción con LacZ se realizó 24 horas después de la inyección.

#### Inmunohistoquímica de BMP7

Se inyectaron tendones de Aquiles de rata con 30 µg de ARNm de BMP-7 modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) disuelto en 40 µl de glucosa tamponada con HEPES concentrada 1x (HBG, HEPES 25 mM, glucosa al 5% m/v) pH 7,4. Después de 24 horas de incubación, los tendones se incrustaron en Tissue-Tek, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Sophistolab AG (Muttentz, Suiza) realizó la criosección y la inmunohistoquímica.

#### Obtención de imágenes radioisotópicas

Se inyectó el ARNm marcado con  $^{125}$ I en tendón porcino (Pierce Iodination Tubes). Se realizó la medición con 1x1 agrupación, FOV 10 y un tiempo de exposición de 1 min usando un sistema de rayos X In-Vivo Xtreme BI 4MP (Bruker).

Los siguientes ejemplos 1 a 9 representan los experimentos *ex vivo*.

Ejemplo 1: comparación de la bioactividad del ARNm desnudo con el ARNm complejado con lípidos y polímeros después de la inyección en explantes de tendón bovino y ovino. Se inyectaron 50 µg de ARNm modificado desnudo que codifica luciferasa de luciérnaga (FFL) (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) en cinco explantes de tendón bovino u ovino, respectivamente, y se comparó con ARNm de FFL modificado complejado con DreamFect™ Gold (4 µl/1 µg de ARN, explantes de tendón bovino) o PEI ramificada de 25 kDa (N/P = 10, explantes de tendón ovino). Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1. La expresión de luciferasa de ARNm de FFL modificado desnudo fue 295,5 veces mayor que para DreamFect™ Gold y 122,5 veces mayor que para PEI ramificada. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1.

Ejemplo 2: bioactividad de ARNm desnudo en explantes de tendones de diferentes especies. Se inyectó ARNm de FFL modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) en explantes de tendón derivados de ratas, ganado, oveja, caballos y cerdos. Se inyectaron 30 µg (tendones de rata), 50 µg (tendones bovinos, ovinos y porcinos) o 100 µg (tendones equinos y ovinos) de ARNm de FFL modificado. Los resultados se muestran en la figura 2. Se observó expresión de luciferasa en todas las especies diferentes que se habían sometido a prueba.

Ejemplo 3: cinética de expresión de diferente ARNm en diferentes dosis.

Se disolvieron 200 µg, 100 µg, 50 µg, 25 µg y 12,5 µg de ARNm de FFL modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) en 250 µl de solución salina isotónica. Se midió la bioluminiscencia en determinados puntos de tiempo (24 h, 48 h, 72 h, 168 h). Los resultados se muestran en la figura 3. La expresión más alta de cada dosis sometida a prueba se detectó después de 24 horas después de la transfección. La expresión disminuyó durante 7 días después de la transfección.

Ejemplo 4: comparación de diferentes disolventes usados para inyección de ARNm desnudo en explantes de tendones.

Se disolvieron 50 µg de ARNm de FFL modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) en 200 µl (c=0,25 mg/ml) de diferentes disolventes y se inyectaron en cinco explantes de tendones por grupo. Los resultados se muestran en la figura 4. Los niveles de bioluminiscencia más altos después de 24 horas se detectaron cuando se disolvió ARNm de FFL modificado en solución salina en comparación con otras disoluciones. También se observó expresión significativa en acetato de Ringer o lactato de Ringer.

Ejemplo 5: comparación de ARNm de FFL modificado disuelto en solución salina isotónica, agua para inyección y glucosa tamponada con HEPES (HBG 1x).

Se disolvieron 50 µg de ARNm de FFL modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) en 100 µl (c=0,5 mg/ml) de HBG pH 7,4 (1x; HEPES 25mM, glucosa al 5%), solución salina isotónica y agua para inyección (WFI) y se inyectaron en ocho explantes de tendón bovino. La expresión fue más alta en glucosa tamponada con HEPES. Los resultados se muestran en la figura 5. Después de 24 horas, los niveles de bioluminiscencia fueron 6,3 veces

mayores que cuando se disolvió ARNm de FFL modificado en HBG pH 7,4 (1x) en comparación con ARNm de FFL modificado disuelto en solución salina isotónica y 7,8 veces mayor en comparación con ARNm de FFL modificado disuelto en WFI. Después de 48 horas, la expresión fue 9 veces mayor usando HBG pH 7,4 (1x) en comparación con solución salina isotónica y 11 veces mayor en comparación con WFI.

5 Ejemplo 6: comparación de diferentes concentraciones de HBG.

Se disolvieron 50 µg de ARNm de FFL modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) en 100 µl (c=0,5 mg/ml) de 0,5x, 0,75x, 1x o 2x HBG concentrada pH 7,4 y se inyectó en cinco explantes de tendón bovino. Los resultados se muestran en la figura 6. HBG 1x concentrada dio como resultado una expresión 17,7 veces mayor en comparación con 0,5x, 1,4 veces mayor en comparación con 0,75x y 7,3 veces mayor en comparación con 2x después de 24 horas y una expresión 10,4 veces mayor en comparación con 0,75x después de 48 horas.

Ejemplo 7: comparación de diferentes cantidades de ARNm de FFL modificado.

Se disolvieron 50 µg y 100 µg de ARNm de FFL modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) en 100 µl de HBG pH 7,4 (1x) y se inyectaron en explantes de tendón ovino. Los resultados se muestran en la figura 7. 100 µg de ARNm modificado dieron como resultado una expresión 3 veces mayor después de 24 horas, una expresión 3,2 veces mayor después de 48 horas y una expresión 1,2 veces mayor después de 72 horas en comparación con 50 µg de ARNm. Por tanto, la expresión de luciferasa es dependiente de la dosis.

Ejemplo 8: comparación de diferentes concentraciones de ARNm.

Se disolvieron 50 µg de ARNm de FFL modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) en 100 µl (c=0,5 mg/ml) y en 200 µl (c=0,25 mg/ml) de HBG pH 7,4 (1x) y se inyectaron en explantes de tendón bovino. Los resultados se muestran en la figura 8. El aumento de la concentración de ARNm c=0,5 mg/ml dio como resultado una expresión 5,1 veces mayor después de 24 horas y una expresión 21,2 veces mayor después de 48 horas en comparación con la concentración de ARNm más baja de c=0,25 mg/ml.

Ejemplo 9: comparación de diferentes tamaños de aguja que se usaron para la inyección en explantes de tendón ovino.

25 Se realizó la inyección con agujas 21G, 23G, 26G, 27G o 30G. Los resultados se muestran en la figura 9. La expresión más alta se produjo cuando se inyectaron 100 µg (0,25 mg/ml) de ARNm de FFL modificado usando una aguja 23G. También se detectó una expresión alta con una aguja 30G en tendones de ratas.

El siguiente ejemplo 10 representa los experimentos *in vivo*.

Ejemplo 10: expresión de luciferasa en tendones ovinos intactos y dañados.

30 Metodología de experimentos *in vivo*

Inducción de defectos en tendones

Se inyectaron 500, 200 o 100 UDC (unidades de digestión de colágeno) de colagenasa tipo 1A en los tendones flexores digitales profundos (extremidad trasera) de ovejas merinas hembra maduras. La inyección se realizó bajo guía ecográfica.

35 Transfección *in vivo* y extracción de tendones

Seis días después de la inyección de colagenasa, se inyectó ARNm de FFL modificado (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina) diluido en HBG pH 7,4 (1x) en tendones flexores digitales profundos sanos y dañados. Se aplicó ARNm de FFL modificado (250 µg) en dos inyecciones individuales de 150 µl (proximal y distal al defecto) bajo guía ecográfica.

40 Al día siguiente, se extrajeron los tendones en el plazo de una hora después de la eutanasia. Se retiró el tejido conjuntivo y la vaina del tendón.

Medición de bioluminiscencia

45 Se incubaron inmediatamente los tendones extraídos en disolución de D-luciferina (100 µg D-luciferina/ml PBS (1x)) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora antes de realizarse la obtención de imágenes de bioluminiscencia usando un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS *In-Vivo* Sistema 100 (Caliper Life Science, EE.UU.)

La medición se realizó en el campo de visión A con alta sensibilidad (agrupación 16) y un tiempo de exposición de 1 minuto. Para el análisis se usó el software Living Image® 2.50.

Los resultados se muestran en la figura 10 a a d. La expresión de luciferasa se detectó en tendones intactos y en tendones dañados leve, moderada e incluso gravemente.

Ejemplo 11: expresión de LacZ en tendones ovinos.

Se les inyectó a los explantes de tendón 100 µg de ARN de LacZ modificado disuelto en 250 µl de solución salina isotónica. La tinción con LacZ se realizó 24 horas después de la inyección. La escisión del sustrato Xgal da como resultado un precipitado azul. Se usaron explantes de tendón ovino sin tratar como controles. Los resultados se muestran en la figura 11A a D.

Ejemplo 12: expresión de BMP-7 en tendones de rata.

Se inyectaron tendones de Aquiles de rata con 30 µg de ARNm de BMP-7 modificado químicamente (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina; SEQ ID NO. 3) disuelto en 40 µl de glucosa tamponada con HEPES concentrada 1x (HBG, HEPES 25 mM, glucosa al 5% m/v) pH 7,4. Después de 24 horas de incubación, los tendones se incrustaron en Tissue-Tek, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Se realizó la criosección y la inmunohistoquímica de BMP-7. Los resultados se muestran en la figura a12 A y B.

Ejemplo 13: obtención de imágenes de ARNm marcado de manera radioisotópica

Se inyectó ARNm marcado con  $I^{125}$  en tendón porcino (Pierce Iodination Tubes). Se realizó la medición con 1x1 agrupación, FOV 10 y un tiempo de exposición de 1 min usando un sistema de rayos X In-Vivo Xtreme BI 4MP (Bruker) 30 min después de la inyección. Los resultados se muestran en la figura 13.

Materiales y métodos adicionales (especialmente relacionados con los ejemplos 14 a 18)

Transfección *ex vivo*, cultivo y obtención de imágenes de bioluminiscencia

Tendones flexores digitales profundos (DDFT) derivados de caballos, ganado, oveja o cerdos y tendones de Aquiles derivados de ratas. Se extrajeron los tendones en el plazo de una hora después de haberse eutanasiado (caballos, oveja, ratas) o sacrificado (cerdos y ganado) los animales y se aclararon dos veces en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) enfriada con hielo (Life Technologies GmbH Darmstadt, Alemania) que contenía penicilina/estreptomina al 1% (PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria). Se diluyó ARNm modificado químicamente desnudo que codifica para luciferasa (ARNmq<sup>LUC</sup>), β-galactosidasa (ARNmq<sup>LacZ</sup>) o proteína morfogenética ósea humana 7 (ARNmq<sup>BMP-7</sup>) (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina; SEQ ID NO. 3) en diferentes disolventes y diferentes concentraciones. La inyección de ARNm se realizó en dirección paralela a las fibras del tendón usando agujas 23G (Sterican, B.Braun Melsungen AG, Alemania) y jeringas Injekt-F de 1 ml (B.Braun Melsungen AG, Alemania) para los tendones principales y jeringas de insulina 30G (BD Micro-Fine, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EE.UU.) para los tendones de Aquiles de rata. Se diluyó el ARNm<sup>LUC</sup> en diferentes disolventes y se preparó usando disoluciones disponibles comercialmente y productos químicos de laboratorio convencionales (tabla 2). Se ajustó la glucosa tamponada con Hepes (HBG) (Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf, Alemania) a pH 7,4 y se preparó en cuatro concentraciones diferentes, concretamente el 2,5%, el 3,75%, el 5% y el 10%. El ARNm<sup>LacZ</sup> y el ARNm<sup>BMP-7</sup> se prepararon en solución salina sólo. Se preparó ARNm<sup>LUC</sup> complejo usando Dreamfect™ Gold (OZ Biosciences Marsella, Francia) tal como recomienda el fabricante (10 µg de ARNm<sup>LUC</sup>/40 µl de Dreamfect™ Gold) y usando polietilimina ramificada (brPEI) 25kDa (Sigma-Aldrich Schnellendorf, Alemania) en una razón N/P de 1:10 usando 25 µg de ARNm<sup>LUC</sup>.

La muestra de tendón transfectado se almacenó en matraces de cultivo de tejidos T75 (TPP Trasadingen, Suiza) en 50 ml de medio DMEM (1X) + GlutaMAX (Life Technologies Darmstadt, Alemania) que contenía penicilina/estreptomina al 1% (PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria), nistatina al 2% (Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf, Alemania) y FBS al 10% (Life Technologies Darmstadt, Alemania) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> inmediatamente después de la inyección de ARNm.

La obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) se realizó en determinados puntos de tiempo, concretamente 24, 48 y 72 horas después de la transfección, usando un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS *In-Vivo* 100 (Caliper Life Science, EE.UU.). Se añadió sustrato de D-luciferina (S039, SYNCHEM, Felsberg/Altenburg, Alemania) diluido en PBS de Dulbecco (1X) a los matraces de cultivo celular (100 µg de D-luciferina/ml de medio) una hora antes de la medición de la actividad de luciferasa. La medición se realizó en el campo de visión A con alta sensibilidad (agrupación 16) y un tiempo de exposición de un minuto. Para el análisis de datos se utilizó el software Living Image® 2.50.

Procesamiento histológico de explantes de tendones cultivados *ex vivo*

Se realizó la tinción para determinar la actividad de β-galactosidasa 24 horas después de que inyectara el ARNm correspondiente según el protocolo de Dai *et al.* (Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society. 2003;21:604-9). Se fijó la muestra de tendón sobre hielo durante 30 minutos en glutardialdehído al 0,5% (Carl Roth Karlsruhe, Alemania) y cloruro de magnesio hexahidratado 2 mM (Carl Roth Karlsruhe) en DPBS, se ajustó a pH 7,4 y se lavó posteriormente dos veces en tampón de aclarado (HEPES 100 mM, DTT 5 mM (ditiotreitól, Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf, Alemania), MgSO<sub>4</sub> 1 mM (sulfato de magnesio heptahidratado, Carl Roth Karlsruhe), Triton X-100 al 2% (Carl Roth Karlsruhe), pH 8,0) a temperatura ambiente

durante 30 minutos y luego se aclaró a 50°C durante una hora. Posteriormente, se incubó la muestra de tendón en disolución de tinción con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolilo  $\beta$  1 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM (ferricianuro(III) de potasio, Carl Roth Karlsruhe), K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM (hexacianoferrato(II) de potasio trihidratado, Carl Roth Karlsruhe) en DPBS, pH 7,4) durante la noche en una incubadora sin CO<sub>2</sub>. Finalmente, se fijaron los tendones en formaldehído al 4% (Roti Histofix, Carl Roth Karlsruhe), se deshidrataron, se incrustaron en parafina y se contratificaron para hematoxilina.

Para determinar la inmunohistoquímica (IHC) de BMP-7, se incrustaron los tendones en compuesto Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek Staufeu, Alemania), se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Un laboratorio externo preparó las criosecciones y realizó la inmunohistoquímica (Sophistolab AG Muttenuz, Suiza) usando un anticuerpo policlonal de conejo BMP-7 (ab56023, abcam plc Cambridge, R.U.) como anticuerpo primario.

#### Estudios *in vivo* en tendones de Aquiles de rata intactos y lesionados

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética local para experimentos con animales y se adhirieron a las pautas internacionales para el cuidado y tratamiento de animales de laboratorio. Se alojaron en grupo ratas Sprague Dawley hembra (4 meses de edad, peso corporal entre 300 g y 340 g, Janvier Labs Saint-Berthevin, Francia) bajo un círculo de luz-oscuridad de 12:12 h con comida y agua a demanda. Se usaron 16 ratas para determinar la cinética de la proteína indicadora de luciferasa en tendones de Aquiles intactos y se usaron 24 ratas para someter a prueba el potencial terapéutico de BMP-7 en tendones de Aquiles lesionados.

Para determinar la expresión de la proteína indicadora de luciferasa en tendones de Aquiles de rata intactos, se anestesió a los animales mediante inhalación de isoflurano con aire y O<sub>2</sub> como gases portadores (isoflurano al 3-5% en volumen en una cámara de inhalación para inducción seguido por el 1,5-2,5% en volumen usando una máscara de inhalación para mantenimiento). Luego se inyectaron diferentes dosis de ARNm<sup>LUC</sup> (0, 10, 20, 40  $\mu$ g; 10  $\mu$ l de volumen de dosis) en el tendón de Aquiles derecho (n = 4 ratas/grupo de dosis). En el día 1, 2 y 7 después de la inyección de ARNm<sup>LUC</sup> *in vivo* se realizó la obtención de imágenes de bioluminiscencia usando Photon Imager™ (Biospace Lab Nesles la Vallée, Francia). La BLI se realizó 15 minutos después de la administración por vía intraperitoneal del sustrato de D-Luciferina (L-8220 disuelto en solución salina al 0,9%, Biosynth Staud, Suiza) (150 mg/kg, 5 ml/kg). Las imágenes se adquirieron usando 10 minutos de tiempo de integración. No se usó ningún filtro. La cuantificación se realizó usando una región de interés definida manualmente (tendón de Aquiles) y los resultados se expresaron como recuentos totales. Se usó el software M<sup>3</sup>Vision (Biospace Lab, Nesles la Vallée, Francia) para el análisis de los datos. En el día 7, las ratas se sacrificaron con CO<sub>2</sub>, se explantaron inmediatamente los tendones de Aquiles y se midió de nuevo la actividad de luciferasa en explantes de tendón.

Se aplicó directamente ARNm<sup>BMP-7</sup> terapéutico (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitidina; SEQ ID NO. 3) en los tendones de Aquiles lesionados, es decir, disecados y reparados quirúrgicamente para investigar la influencia sobre la cicatrización temprana del tendón. Antes de la cirugía, las ratas recibieron una inyección subcutánea (sc.) de 0,05 mg/kg de buprenorfina (Temgesic®, Reckitt Benckiser Wallisellen, Suiza). La cirugía se realizó bajo anestesia por inhalación tal como se describió anteriormente. La pata izquierda se preparó para una cirugía aséptica y luego se fijó en un soporte hecho a medida para estabilizar el tobillo en una posición de 90° con la pata hacia abajo. Se hizo una incisión por encima del tendón de Aquiles izquierdo. Se expuso el tendón de Aquiles superficial y se disecó completamente en la porción media entre el lado calcáneo y la inserción del músculo. El tendón del músculo plantar quedó intacto. Luego se realizó una anastomosis de extremo a extremo de los muñones del tendón de Aquiles aplicando una sutura con patrón en triple polea usando un filamento monofilamento no absorbible (Prolene® 5-0, aguja de corte inverso 3/8 P3, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Alemania). Posteriormente, el ARNm<sup>BMP-7</sup> (100  $\mu$ g) o vehículo se administró por vía intratendinosa proximal y distal a la anastomosis con un volumen de dosis por sitio de inyección de 5  $\mu$ l (jeringas de insulina 30G BD Micro-Fine, Becton, Dickenson and Company, Franklin Lakes, EE. UU.). Luego se cerraron la capa subcutánea y la piel mediante una técnica de sutura continua con una sutura intracutánea interrumpida usando un hilo sintético absorbible (Safil® 6-0, B. Braun Melsungen AG, Alemania). Luego se dejó que los animales se despertaran sobre una almohadilla térmica para ayudar a que volvieran a la temperatura corporal normal. Se volvió a administrar buprenorfina cada 8-12 h después de la cirugía durante un máximo de dos días.

En el día 1, 2 y 7 después de la cirugía cada 4 ratas tratadas con ARNm<sup>BMP-7</sup> y 4 ratas tratadas con vehículo se sacrificaron con CO<sub>2</sub> y se explantaron tanto los tendones de Aquiles contralaterales lesionados como los intactos. Los tendones de Aquiles se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich Chemie Buchs, Suiza), se deshidrataron con una serie de etanol ascendente y se incrustaron en parafina (Paraplast Xtra, Leica Wetzlar, Alemania). Para determinar la inmunohistoquímica se usaron anticuerpo anti-BMP-7 (ab56023, abcam plc Cambridge, R.U.), anticuerpo policlonal anticolágeno I (ab 34710, abcam plc Cambridge, R.U.) y anticuerpo policlonal anticolágeno III (ab7778, abcam plc Cambridge, R.U.) como anticuerpos primarios. Como anticuerpos secundarios se usaron anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo biotinilado (BA-1000, Vector Laboratories, Peterborough, R.U.). Se indujo la tinción por la actividad de peroxidasa (marcada con biotina). Las secciones se contratificaron con hematoxilina (VWR International, Dietikon, Suiza). La tinción con DAB en imágenes microscópicas se estableció como umbral y se evaluaron los valores medios de gris de los píxeles positivos. El análisis se realizó con Fiji/Image J versión 1.49k.

Estudios *in vivo* en un modelo ovino lesión aguda de tendón

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética local para experimentos con animales y se adhirieron a las pautas internacionales para el cuidado y tratamiento de animales de laboratorio. Para experimentos con animales grandes, se alojaron en grupo nueve ovejas merinas maduras hembra, de 4 a 7 años de edad, con un peso de entre 72 kg y 87 kg, bajo un círculo de luz-oscuridad de 12:12 h. Se proporcionó heno y agua a demanda. Todos los animales grandes no tenían evidencia clínica o ecográfica de lesión del tendón.

Para la inducción de defectos tendinosos se eligió un modelo de gel de colagenasa (Watts, Equine veterinary journal. 2012;44:576-86; Smith, Equine veterinary journal. 2014;46:4-9). El área del metatarso de ambas extremidades traseras se recortó, se afeitó y se preparó asépticamente antes de inyectarse 500, 200 o 100 unidades de digestión de colágeno (UDC) de colagenasa tipo 1A (de *Clostridium histolyticum* C0130, Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf, Alemania) en el tendón flexor digital profundo (DDFT) de la extremidad trasera izquierda. La colagenasa se diluyó en PBS de Dulbecco (1X), se esterilizó por filtración y se combinó con 50 µl de disolución de trombina (componente 2, Tissucol Duo S Immuno, Baxter Unterschleißheim, Alemania). La inyección se realizó con un acceso lateral en el área media del tarso bajo guía ecográfica (Mindray DP 50 vet; Sonoring Schmitt-Haverkamp, Alemania) usando una aguja de calibre 23 y un sistema Duploject (Baxter Alemania) en el que la disolución de colagenasa-trombina se combinó con 50 µl de disolución de fibrinógeno (componente 1, Tissucol Duo S Immuno, Baxter Alemania) durante la inyección. La figura 18 muestra una ecografía longitudinal de la extremidad trasera de una oveja mientras se insertaba la aguja en el DDFT justo antes de que se realizara la inyección. Asegurándose de que se había completado el proceso de formación del gel, no se retiró la aguja hasta que pasaron 30 segundos después de la inyección. Se aplicó una sutura en la que se insertó la aguja.

Se administraron antibióticos (Veracin® compositum 3 ml/50 kg, Albrecht, Aulendorf, Alemania) por vía intramuscular cada dos días durante cinco días. Se aplicaron 0,3 mg de clorhidrato de buprenorfina (Buprenovet® multidosis 0,3 mg/ml, Bayer HealthCare, Leverkusen, Alemania) por vía subcutánea cada doce horas durante dos días y ketoprofeno 3 mg/kg (Romefen® PR al 10%, Merial, Hallbergmoos, Alemania) cada veinticuatro horas durante cinco días como analgésicos. Dos veterinarios realizaron ecografías frecuentes y un examen clínico diario. Se usó un ecógrafo portátil Mindray DP 50 vet (Sonoring Schmitt-Haverkamp, Alemania) con una sonda lineal (5-12 MHz). Las ecografías se realizaron con la oveja soportando peso sobre la pata examinada. Se midió el diámetro del DDFT en el área media del tarso, 2 cm por debajo de la sutura aplicada. El grosor externo se midió de medial a lateral en la misma área del tarso medio utilizando un compás calibrador digital en el grupo tratado con 100 UDC.

Seis días después de la inyección de colagenasa, se inyectó ARNm<sup>LUC</sup> diluido en HBG al 5% en tendones flexores digitales profundos sanos y dañados de ambas extremidades traseras. El procedimiento se realizó nuevamente bajo anestesia general. El ARNm<sup>LUC</sup> se aplicó en dos inyecciones individuales de 100 µg (grupo de 500 UDC, n = 2), 200 µg (grupo de 200 UDC, n = 2) o 250 µg (grupo de 100 UDC, n = 2) de ARNm (área proximal y distal del defecto) bajo guía ecográfica. Se aspiró algo de aire en la jeringa y se inyectó al final de la inyección para asegurarse de que la jeringa y la aguja se vaciaron por completo. Se administró ketoprofeno 3 mg/kg (Romefen® PR 10%) por vía intravenosa durante la anestesia.

Al día siguiente, las ovejas se eutanasiaron mediante una sobredosis intravenosa de pentobarbital (Euthadorm®, CP-Pharma, Burgdorf, Alemania) y se extrajeron los tendones una hora después de la eutanasia. Se extrajo el tejido conjuntivo y la vaina del tendón. Los tendones extraídos se incubaron inmediatamente en disolución de D-luciferina (100 µg de D-luciferina/ml de PBS (1x)) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora antes de que se realizara la obtención de imágenes de bioluminiscencia usando un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS *in vivo* 100 (Caliper Life Science, EE.UU.). La medición se realizó en el campo de visión A con alta sensibilidad (agrupación 16) y un tiempo de exposición de un minuto. Para el análisis se usó el software Living Image® 2.50. Los tendones se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, se deshidrataron con una serie ascendente de etanol y se incrustaron en parafina. En tendones intactos, se eligieron cinco partes del área inyectada con ARNm<sup>LUC</sup>, así como las partes 3 cm proximal y distal al sitio de inyección. En los tendones lesionados se seleccionaron áreas centrales y periféricas del defecto. Se tiñeron secciones de 3 µm con hematoxilina y eosina para el examen histopatológico.

Se extrajo sangre el día 0, el día 6 (antes de la aplicación del ARNm) y el día 7 (antes de la eutanasia) y un laboratorio veterinario externo analizó el hemograma completo, así como los valores de las pruebas de hígado y riñón.

## Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 5. Los resultados se presentan como la media ± EEM, con n igual al número de muestras por grupo. Las diferencias entre grupos se analizaron para determinar la significación usando la prueba de la U de Mann Whitney, con significación alcanzada a p < 0,05. Los resultados en la figura 17G, H y tab. 3 se presentan como la media ± DE.

Ejemplo 14: la inyección de ARNm desnudo da como resultado una alta expresión de proteínas en explantes de tendones

Se inyectó ARNm desnudo disuelto en solución salina en explantes de tendones para investigar si los ARN mensajeros modificados químicamente podían transfectar el tejido de tendones dando como resultado así la expresión de proteína(s) terapéutica(s). Un experimento inicial *ex vivo* se realizó en tendones porcinos explantados. Se transfectó tejido de tendones mediante inyección directa de ARNm<sup>LUC</sup> tras lo que, se incubaron los explantes (24 horas, 37°C, el 5% de CO<sub>2</sub>) y posteriormente se midió la actividad de luciferasa. Usando esta metodología, se detectó la expresión de luciferasa en una muestra inyectada con ARNm<sup>LUC</sup>, pero no en los tendones de control sin tratar o en los tendones inyectados sólo con solución salina. Basándose en estos hallazgos prometedores, se realizaron experimentos adicionales en explantes de diferentes especies animales para investigar si el concepto de transfección *ex vivo* podría aplicarse con éxito a más mamíferos. Curiosamente, además de la expresión en explantes de tendón porcino, la inyección de ARNm<sup>LUC</sup> desnudo dio como resultado también una expresión distinta de luciferasa en tendones explantados de oveja, ganado, caballos y ratas (figura 14A). En particular, los patrones de expresión revelaron una distribución particular con la actividad de luciferasa más alta en el sitio de inyección y una distribución delgada en forma de tubo dentro de todo el explante.

En un siguiente conjunto de experimentos, la expresión dependiente de la dosis de luciferasa podría demostrarse en tendones porcinos después de la inyección de ARNm<sup>LUC</sup> (figura 14B). La expresión de luciferasa se correlacionó directamente con la cantidad de ARNm inyectado y fue 10 veces mayor en una cantidad usada de ARNm<sup>LUC</sup> de 200 µg en comparación con 25 µg (figura 14B). Para identificar las células transfectadas, se inyectó ARNm que codifica la β-galactosidasa en explantes de tendón porcino y se tiñeron tejidos para determinar la actividad β-gal a las 24 horas después de la incubación. De manera similar a la expresión de luciferasa, la mayor parte de la expresión de β-gal se localizó tanto en los tenocitos como en las células del tejido conjuntivo cerca del sitio de inyección (figuras 14D, 14F). En los tendones de control inyectados con ARNm<sup>LUC</sup> no pudo observarse tinción de β-gal positiva (figuras 14E, 14G).

Los resultados alentadores con genes indicadores (luciferasa y β-galactosidasa) nos llevaron a investigar la aplicabilidad de esta tecnología para producir proteínas terapéuticas. Se seleccionó BMP-7 humana como diana terapéutica, ya que recientemente se ha discutido su potencial para aumentar los procesos de cicatrización debido a los efectos estimulantes sobre los tenocitos (Yeh, Journal of cellular biochemistry. 2008;104:2107-22; Pauly, Journal of shoulder and elbow surgery/American Shoulder and Elbow Surgeons. 2012;21:464-73). Además los experimentos *in vivo* estaban destinados a realizarse en ratas, por tanto se inyectó ARNm que codifica para BMP-7 humana en tendones de Aquiles de rata y se realizó la inmunohistoquímica (IHC) de BMP-7 después de un periodo de cultivo de 24 horas. Usando esta metodología, se encontraron señales positivas para BMP-7 en paredes vasculares, tejido conjuntivo y tenocitos en una muestra de tendón transfectada con BMP-7 (figuras 14H, J). De hecho, la muestra de control también mostró ser ligeramente positiva, pero simplemente en las paredes vasculares (figuras 14I, K).

Ejemplo 15: la glucosa mejora, los aminoácidos alteran la expresión de luciferasa en explantes de tendones

Como los experimentos iniciales mostraron la expresión más fuerte en el tejido de tendones bovino, se continuó utilizando explantes de tendón bovino para experimentos adicionales. Al investigar la cinética de expresión, se observó la expresión máxima después de 24 horas y una clara disminución (2 veces) después de 48 horas. A las 72 horas después de la inyección, la expresión de luciferasa se redujo a niveles casi previos (figura 15A).

Se investigó adicionalmente si la transfección del tendón y la expresión transgénica podrían potenciarse adicionalmente a través del uso de diferentes disoluciones de laboratorio convencionales y/o disponibles comercialmente que contienen aminoácidos, electrolitos y/o azúcares. Se planteó la hipótesis de que (1) los gradientes osmóticos pueden aumentar el flujo de electrolitos intracelulares y, por tanto, la captación intracelular de ARNm, (2) proporcionar a las células aminoácidos adicionales puede mejorar la traducción de ARNm, (3) precipitar ARNm con acetato de amonio puede producir un "efecto de depósito", lo que permite una expresión a relativamente largo plazo. Además, se usaron disoluciones coloidales para someter a prueba la influencia de moléculas grandes sobre la transfección del tejido de tendones. Como los niveles de expresión más altos se observaron 24 horas después de la inyección de ARNm<sup>LUC</sup>, este punto de tiempo se seleccionó para la comparación de diferentes disolventes.

De hecho, los resultados revelan una fuerte influencia del disolvente/electrolito usado sobre la expresión de luciferasa resultante. Este efecto fue más prominente cuando se compararon disoluciones que contenían electrolitos y/o glucosa con disoluciones que contenían aminoácidos (figura 15B). De manera notable, la disolución que contiene glucosa tal como el tampón HEPES que contiene glucosa al 5% (HBG al 5%) dio como resultado la expresión de luciferasa más alta en comparación con la solución salina (15 veces, P < 0,05) o la disolución que contiene aminoácidos (57 veces en comparación con Aminosteril plus, p < 0,05). El ARNm<sup>LUC</sup> en disolución de acetato de amonio suprimió completamente la expresión de luciferasa. Razonamiento, si la concentración de glucosa influye en la eficacia de la transfección, la expresión más alta de luciferasa se observó a una concentración de glucosa del 5% y que disminuyó varias veces cuando la concentración de glucosa aumentó (20 veces menos) o disminuyó (50 veces) (figura 15 C). Para verificar que estos hallazgos fueran transferibles a otras especies, se continuaron los experimentos en tendones porcinos. Se examinó además si mezclar glucosa y solución salina puede mejorar adicionalmente la eficacia de la transfección. Mezclar glucosa al 5% con solución salina (NaCl + gluc. al 5%) no afectó la expresión de luciferasa en comparación con la disolución de HBG al 5% (figura 15D).

Dado que la aplicación de ARNm se usó recientemente para realizarla con ARNm formulado en sistemas de portadores, se examinó además la eficacia de transfección del ARNm<sup>LUC</sup> complejado con portadores lipídicos y poliméricos en diferentes especies. Curiosamente, ARNm<sup>LUC</sup> complejado con DreamFect Gold dio como resultado niveles de expresión sólo comparables a la muestra p/t. Además, la expresión de luciferasa fue 22 veces menor en los tendones tratados con ARNm<sup>LUC</sup> complejado con brPEI en comparación con ARNm<sup>LUC</sup> disuelto en solución salina.

Ejemplo 16: el ARNm modificado químicamente desnudo transfecta de manera eficaz tendones de Aquiles de rata intactos *in vivo*

Para someter a prueba la traducción de los hallazgos *ex vivo*, se inyectó ARNm<sup>LUC</sup> *in vivo* disuelto en la disolución de mejor rendimiento (HBG que contiene glucosa al 5%, ajustado a un pH de 7,4) en los tendones de Aquiles de ratas en 4 dosis diferentes (40, 20, 10 y 0 *in vivo* g). La expresión de la proteína de luciferasa se midió mediante BLI *in vivo* 1, 2 y 7 días después de la inyección (figura 16A). La expresión de luciferasa dependiente de la dosis también se observó en tendones de Aquiles de rata *in vivo* y la cinética de expresión fue comparable con los datos *ex vivo* en tendones porcinos (figura 14B) y tendones bovinos (figura 15A). La expresión más alta se observó 24 horas después de la inyección de ARNm que disminuyó con el tiempo hasta niveles extremadamente bajos pero detectables el día 7 (figura 16B).

Ejemplo 17: ARNm<sup>BMP-7</sup> afecta de manera positiva a la cicatrización temprana en tendones de Aquiles de rata lesionados *in vivo*

Se investigó el potencial terapéutico de la BMP-7 humana en ratas sobre la curación de los tendones de Aquiles disecados y reparados quirúrgicamente. El examen histológico de la cicatrización de los tendones de Aquiles se realizó 1, 2 y 7 días después de la cirugía e inyección de ARNm<sup>BMP-7</sup> (25% de 2-tiouridina, 25% de 5-metilcitosina; SEQ ID NO. 3) o vehículo (HBG al 5%).

Las muestras de tendones se tiñeron para detectar BMP-7 usando inmunohistoquímica (IHC) para evaluar si la inyección de ARNm<sup>BMP-7</sup> indujo la expresión de proteínas terapéuticas. En comparación con los tendones de Aquiles contralaterales intactos sin tratar, la expresión de BMP-7 aumentó en todos los tendones que se sometieron a un procedimiento quirúrgico desde el día 1 hasta el final del estudio en el día 7, sin importar si recibieron ARNm<sup>BMP-7</sup> o vehículo. Sin embargo, los niveles de expresión de BMP-7 fueron mayores durante todo el periodo experimental en tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> en comparación con tendones tratados con vehículo (figura 16C).

En el día 1 después de la cirugía, el examen histopatológico del tendón de Aquiles lesionado reveló una reacción inflamatoria con inmigración de granulocitos y áreas más o menos necróticas con o sin hematoma en ambos grupos. Se observó un aumento de la actividad mitótica de los tenocitos y fibroblastos en ambos grupos, de hecho más distinto en los animales tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup>. En el día 2 después de la cirugía, fue evidente un aumento comparable de la inflamación y la proliferación tisular en ambos grupos. En el día 7 después de la cirugía fue evidente un progreso proliferativo adicional, sin embargo, todas las muestras presentaron tejido fibroso en forma de puente en la región de anastomosis (figuras 16D, E).

El análisis de IHC para colágeno tipo I reveló una ligera disminución en la expresión desde el día 1 hasta el día 2 en los tendones tratados con vehículo, mientras que la intensidad media en los tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> permaneció estable. La disminución fue seguida por un aumento muy leve hasta el día 7 en ambos grupos. En el día 2 y el día 7, la intensidad del colágeno tipo I, por tanto, fue mayor en los tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> en comparación con los tendones tratados sólo con vehículo (figura 16E). Por el contrario, la expresión de colágeno tipo III disminuyó desde el día 1 hasta el día 2 en ambos grupos, pero más distinta en el grupo de ARNm<sup>BMP-7</sup>, seguido por un aumento pronunciado en el grupo de vehículo desde el día 2 hasta el día 7. En el día 7, la intensidad de la señal para el colágeno tipo III fue considerablemente menor en los tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> que en los tendones tratados con vehículo ( $p = 0,057$ ) (figura 16F). Además, las razones de colágeno tipo I con respecto a colágeno tipo III de tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> fueron mayores el día 2 y el día 7 en comparación con el grupo de vehículo (figura 16G).

Ejemplo 18: ARNm desnudo transfecta de manera eficaz tendones lesionados e intactos en grandes animales *in vivo*

La tendinopatía se caracteriza por desorganización de la matriz, hiper celularidad, desorientación de las fibras y crecimiento infiltrante vascular. Como estas condiciones no pueden compararse con las de los tendones intactos o lesionados quirúrgicamente, debe investigarse la capacidad del ARNm de transfectar tendones en un modelo animal grande de tendinopatía. Por tanto, se inyectó gel de colagenasa en tres dosis diferentes (100 UDC, 200 UDC, 500 UDC) en el tendón flexor digital profundo (DDFT) izquierdo de ovejas ancianas anestesiadas para generar un defecto con fallo parcial, que se asemeja a las características clínicas de las etapas preliminares de las tendinopatías en humanos y caballos. El examen clínico y la ecografía posteriores se realizó en diferentes puntos de tiempo (figuras 17A-F). Además, la ecografía reveló una falta de homogeneidad creciente en todos los grupos. El diámetro de los DDFT tratados con 100 UDC aumentó 1,57 veces desde 0,44 cm  $\pm$  0,030 cm hasta 0,69 cm  $\pm$  0,126 cm en el plazo de 2 días y hasta 0,74 cm  $\pm$  0,150 cm en el día 7 (figura 17G). El diámetro de los DDFT de las ovejas

tratadas con 200 UDC y 500 UDC aumentó aún más, con un tamaño máximo en el día 6 (1,01 cm  $\pm$  0,0566 cm para 200 UDC, 1,04 cm  $\pm$  0,099 cm para 500 UDC). Debido al presente tratamiento del dolor, solo se objetó una ligera cojera en la oveja tratada con 100 UDC en el plazo de los primeros tres días después de la inyección de gel de colagenasa. Sin embargo, el grosor externo de las extremidades aumentó 1,5 veces en el plazo 4 días desde 1,47 cm  $\pm$  0,351 cm hasta 2,23 cm  $\pm$  0,493 cm, pero disminuyó de nuevo de forma constante hasta 1,87 cm  $\pm$  0,462 cm en el día 7 (figura 17H). La oveja tratada con 200 UDC o 500 UDC sufrió de cojera moderada en el plazo de los cuatro días posteriores a la inyección de colagenasa y de cojera leve hasta el día 7.

Los defectos de los tendones se investigaron histológicamente el día 7 (animales eutanasiados ese día), revelando áreas necróticas más pequeñas con pérdida de estructura de fibras, conglomerados de glóbulos rojos y algunas células inflamatorias invasoras en el área central del defecto (figura 17K) también como conglomerados más pequeñas de glóbulos rojos y células inflamatorias aisladas entre fibras del tendón en el área adyacente al defecto en tendones tratados con 100 UDC. Además, las fibras adyacentes parecían hinchadas y las conexiones entre las fibras parecían aflojadas. El número de células y la densidad celular aumentaron (figura 17I) en comparación con los tendones intactos (figura 17L). Los tendones a los que se les inyectaron 200 UDC y 500 UDC se caracterizaron por una gran área de necrosis y un hematoma con una inmensa pérdida de estructura de fibras. Además, podría objetarse la invasión masiva de células inflamatorias (figura 18). El área necrótica en los tendones a los que se les inyectaron 500 UDC se extendió a un tercio del tendón, en los tendones a los que se les inyectaron 200 UDC se afectó alrededor de un cuarto del tendón.

El día 6, es decir, 24 horas antes de la eutanasia, se inyectó ARNm<sup>LUC</sup> (500  $\mu$ g en el grupo de 100 UDC, 400  $\mu$ g en el grupo de 200 UDC y 200  $\mu$ g en el grupo de 500 UDC) en el defecto del tendón izquierdo lesionado (figuras 19A, B) y en el derecho intacto bajo guía ecográfica. El aire inyectado que se había extraído en la jeringa junto con ARNm<sup>LUC</sup> hizo visible la posición de aplicación mediante ecografía (figura 17C). Un día después, se eutanasió a la oveja y se extrajeron los tendones para la BLI *ex vivo* y el examen histopatológico. La expresión de luciferasa estaba más ampliamente distribuida e intensa en la región lesionada que en el tejido sano del tendón contralateral (figuras 19D, E). El examen histopatológico de los tendones intactos tratados con ARNm<sup>LUC</sup> mostraron predominantemente tejido de tendones intacto sin hallazgos patológicos. Sólo pudieron detectarse unos pocos conglomerados celulares pequeños de macrófagos y granulocitos (figura 19F). El tejido distal y proximal del sitio inyección no presentaba ninguna anomalía (figura 19G). No pudo detectarse cojera o hinchazón de los tejidos.

Con respecto a los efectos secundarios, cabe mencionar que los animales se examinaron clínicamente todos los días. No se hicieron evidentes efectos adversos debido a la aplicación de ARNm. Además, el análisis de sangre se realizó antes y 24 horas después de la aplicación de ARNm. De hecho, no se hicieron evidentes cambios patológicos y los valores medidos de leucocitos sanguíneos estaban dentro del intervalo fisiológico después de la aplicación de ARNm (figura 19H). Además, se analizaron los valores de hemograma completo, pruebas hepáticas y renales (figura 20). No pudieron identificarse hallazgos patológicos debidos a la aplicación de ARNm.

Ejemplo 19: análisis adicional, especialmente de los ejemplos 14 a 18

Las lesiones de tendones o tendinopatías degenerativas son comunes tanto en animales como en seres humanos, especialmente en atletas (Kvist, Sports medicine (Auckland, NZ). 1994;18:173-201). Por ejemplo, las tendinopatías del tendón de Aquiles y del manguito de los rotadores se diagnostican con frecuencia en seres humanos (Jarvinen, Foot and ankle clinics. 2005;10:255-66, Herrmann, Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca. 2014;81:256-66). El aspecto del daño del tendón es variado. La aparición es heterogénea y varía desde rotura aguda hasta tendinopatías crónicas. Los motivos médicos son multilaterales y los factores de predisposición son similares en seres humanos y animales, como sobrecarga por entrenamiento o desplazamiento articular, edad, sexo, genética, peso corporal o endocrinopatías (Patterson-Kane, Revista ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources. 2014;55:86-99, Perkins, New Zealand veterinary journal. 2005;53:184-92, Baird, Connective tissue research. 2014;55:275-81, Ippolito, Italian journal of orthopaedics and traumatology. 1975; 1: 133-9, Magnan, Foot and ankle surgery: official journal of the European Society of Foot and Ankle Surgeons. 2014;20:154-9). En numerosos casos, el daño crónico provocado por el uso excesivo o los procesos degenerativos conduce a una lesión aguda o incluso a la rotura del tendón (Jarvinen, Scandinavian journal of medicine & science in sports. 1997;7:86-95). Además de los procesos degenerativos, una cicatrización fallida después de una lesión del tendón también se analiza como patogenia de las tendinopatías (Rees, The American journal of sports medicine. 2009;37:1855-67, Watts, Equine veterinary journal. 2012;44:576-86).

El potencial de cicatrización natural del tejido de tendones es bajo debido a la hipocelularidad, hipovascularidad y una tasa metabólica baja en comparación con otras partes blandas (Bray, Journal of anatomy. 1996;188 (Pt 1): 87-95, Sharma, Journal of musculoskeletal & neuronal interactions. 2006;6:181-90, Liu, Tissue engineering parte B, Reviews. 2011; 17: 165-76). Por tanto, el proceso de cicatrización es extremadamente lento (James, The Journal of hand surgery. 2008;33:102-12, Williams, Sports medicine (Auckland, NZ). 1986;3:114-35); habitualmente, lleva meses o años. Además, el proceso de cicatrización da como resultado normalmente sólo la reparación del tejido en lugar de la regeneración, ya que la resistencia a la tracción y la elasticidad originales habitualmente no se recuperan (Sharma, Foot and ankle clinics. 2005;10:383-97). Por tanto, la recuperación rara vez es completamente funcional (Sharma, Journal of musculoskeletal & neuronal interactions. 2006;6:181-90, Hogan, The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2011;19:134-42) y el riesgo de una nueva lesión o incluso una rotura de tendón

aumenta considerablemente (Mast, The Surgical clinics of North America. 1997;77:529-47).

Los métodos de tratamiento son numerosos y pueden clasificarse en terapia conservadora y quirúrgica. Además del reposo y el vendaje seguido de ejercicio controlado en casos de lesión aguda, los métodos de terapia conservadora también pueden ser la aplicación intralesión de diversas sustancias tales como los corticosteroides (Muto, Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2014;32:1297-304, Hart, Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine. 2011;21:540-1), que es muy controvertido; ácido hialurónico (Muneta, Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association. 2012;17:425-31, Foland, American journal of veterinary research. 1992;53:2371-6) que son componentes de la matriz extracelular en los tendones. Además, son usados métodos físicos tales como la estimulación electromagnética o la terapia de ondas de choque (Bosch, Equine veterinary journal. 2007;39:226-31, Seeliger, European journal of medical research. 2014;19:37). También diversos enfoques que usan células madre (Smith, Disability and rehabilitation. 2008;30:1752-8, Martinello, Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2013;31:306-14, Renzi, Research in veterinary science. 2013;95:272-7) y se investigan terapias basadas en factores de crecimiento (Witte, Journal of the American Veterinary Medical Association. 2011;239:992-7, Shah, Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society. 2013;31:413-20, Arguelles, The Veterinary record. 2008;162:208-11, de Vos, British journal of sports medicine. 2011;45:387-92).

La suposición de que las citocinas y los factores de crecimiento desempeñan un papel clave durante el proceso de cicatrización generó un considerable interés de investigación en la terapia génica basada en factores de crecimiento, es decir, que estimulan la proliferación celular, así como la diferenciación celular y la formación de componentes de la matriz extracelular (Molloy, Sports medicine (Auckland, NZ). 2003;33:381-94, Evans, Sports medicine (Auckland, NZ). 1999;28:71-6, Grotendorst, International Journal of tissue reactions. 1988; 10: 337-44). Varios experimentos *ex vivo* y *in vivo* proporcionaron resultados prometedores, por ejemplo, una mejor cicatrización del tendón en un modelo de cicatrización del tendón de Aquiles de rata después de la transferencia del gen BMP-12 (Majewski, Gene therapy. 2008;15:1139-46) o una influencia positiva del plasma rico en plaquetas en las lesiones centrales de los tendones flexores digitales superficiales (SDFT) en caballos (Bosch, Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society. 2010;28:211-7). En los últimos años, gran parte de la investigación se ha centrado en la transferencia génica de ADN en el campo de las terapias basadas en factores de crecimiento (Majewski, Gene therapy. 2008;15:1139-46, Nakamura, Gene therapy. 1998;5:1165-70, Evans, International orthopaedics. 2014, Lou, Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society. 2001;19:1199-202), que no son muy eficientes debido a las limitaciones de entrada nuclear en células que no se dividen (Tong, Current gene therapy. 2009;9:495-502) y conllevan un riesgo potencial de mutagénesis. Por otro lado, se ha aplicado ARN mensajero con éxito en diversos modelos de ratón. Kormann *et al.* notificaron un aumento de los niveles de hematocrito después de una única inyección intramuscular de ARNm que codifica para eritropoyetina murina modificada y, además, la aplicación de aerosol que contiene ARNm que codifica para la proteína surfactante B en un modelo de enfermedad congénita de ratón reacondicionó grandes partes del pulmón (Kormann, Nature biotechnology. 2011; 29: 154-7). Además, el ARNm modificado que codifica para VEGF humano mejoró la función cardíaca y la supervivencia a largo plazo en un modelo de ratón de infarto de miocardio (Zangi, Nature biotechnology. 2013;31:898-907). En el contexto de la invención se centró la atención en la aplicación de ARNm desnudo modificado químicamente (ARNmq) en tendones intactos así como quirúrgica y químicamente lesionados.

Los ARNm modificados químicamente representan una novedosa tecnología de plataforma para transfectar tejidos y, en consecuencia, expresar proteínas terapéuticas dentro del cuerpo para el tratamiento de diversos estados patológicos (Kormann, Nature biotechnology. 2011;29:154-7, Zangi, Nature biotechnology. 2013;31:898-907). Se notifica en el presente documento por primera vez que existe la posibilidad de usar la tecnología de ARNmq como un enfoque terapéutico para la expresión eficaz de proteínas fisiológicamente activas en tendones intactos y lesionados. Un método de transfección autoestablecido *ex vivo* nos permitió seleccionar la eficacia de la transfección del ARNm<sub>q</sub> en una variedad de especies (oveja, ganado, caballos, cerdos y ratas), para optimizar las condiciones de transfección y evaluar la expresión de varias proteínas (luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa y BMP-7) en de una manera rentable y rápida. La expresión de la proteína indicadora fue independiente de la especie y los niveles de expresión fueron significativamente más altos cuando se aplicó ARNm<sub>q</sub> desnudo en comparación con ARNm<sub>q</sub> complejo con portadores lipídicos y poliméricos comunes. Además, la expresión transgénica podría optimizarse cuando se usa ARNm desnudo disuelto en disolventes que contienen glucosa, lo que posiblemente podría explicarse por los efectos de la nutrición, ya que los tendones están mal provistos de sangre debido a la baja incidencia de vasos sanguíneos.

Los resultados de los estudios *ex vivo* se confirmaron *in vivo* en tendones de Aquiles de rata intactos y posteriormente en un modelo de lesión del tendón de Aquiles de tendones de Aquiles disecados y reparados quirúrgicamente en ratas, así como en un modelo de defecto del tendón inducido por gel de colagenasa en oveja. La inyección de ARNm<sub>q</sub><sup>LUC</sup> en tendones sanos dio como resultado una considerable expresión de luciferasa, alcanzando su punto máximo después de 24 horas y desapareciendo en el plazo 7 días de una manera dependiente de la dosis. Estas observaciones se asemejan a la cinética de expresión observada en los estudios *ex vivo*. La inyección de ARNm<sub>q</sub><sup>BMP-7</sup> en los tendones de Aquiles lesionados, a su vez, dio como resultado un patrón de expresión de BMP-7 con niveles de BMP-7 en aumento progresivo hasta el día 7. Además, se detectó determinada expresión previa de BMP-7 en tendones de ratas sanas *ex vivo* e *in vivo*, tal como el anticuerpo usado reaccionó de

forma cruzada con BMP-7 de rata endógena. Además, la expresión de BMP-7 endógena se incrementó fuertemente, debido al procedimiento quirúrgico durante la tenotomía de Aquiles de rata. De hecho, otros autores ya han descrito el aumento de la expresión de BMP-7 como consecuencia de lesiones en los tendones en diversos estudios con animales y en muestras de tejido de tendones tendinopáticos derivadas de pacientes (Eliasson, *Clinical orthopaedics and related research*. 2008;466:1592-7, Yee, *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29:816-21, Rui, *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. 2012;20:1409-17, Yu, *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America y the International Arthroscopy Association*. 2007;23:205-10, Lui, *BMC musculoskeletal disorders*. 2013;14:248). Sin embargo, se observó una tendencia a una expresión aumentada de BMP-7 en los tendones que se trataron con ARNm<sup>BMP-7</sup> en comparación con los tendones que se trataron con vehículo en todo los puntos de tiempo después de la lesión. Por tanto, se razonó que la inyección de ARNm<sup>BMP-7</sup> puede contribuir a una expresión aumentada y prolongada de BMP-7 en los tendones lesionados.

El aumento del catabolismo del colágeno tipo I se considera un parámetro crítico en la fase inflamatoria y proliferativa temprana (del día 1 al día 7 después de la lesión) de la cicatrización del tendón, aunque se sospecha que una fuerte disminución del colágeno tipo I se asocia con una mayor formación de tejido cicatricial no funcional, en lugar de tejido funcional de tendones (Sharma, *The surgeon: journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*. 2005;3:309-16, Loiselle, *PloS one*. 2012;7:e40602). Por el contrario, el colágeno tipo III se asocia con características de tejido similar a una cicatriz, concretamente, pérdida de resistencia a la tracción y elasticidad en comparación con el tejido de tendones intacto (Sharma, *Foot and ankle clinics*. 2005;10:383-97). Por tanto, es deseable un contenido preferiblemente pequeño de colágeno tipo III. En el presente estudio, se detectó una tendencia de catabolismo de colágeno tipo I en el grupo de vehículo hasta el día 2 después de la cirugía, mientras que el contenido de colágeno tipo I en tendones que se trataron con ARNm<sup>BMP-7</sup> permaneció estable durante todo el experimento. Se observó un fuerte aumento en el contenido de colágeno tipo III en el grupo de vehículo desde el día 2 hasta el día 7 después de la cirugía, mientras que en los tendones que se trataron con ARNm<sup>BMP-7</sup> el aumento fue menos prominente. Por consiguiente, se detectó una tendencia hacia una mayor razón de colágeno tipo I con respecto a colágeno tipo III en los tendones tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup>. La evaluación histopatológica reveló un aumento de la infiltración celular en los animales tratados con ARNm<sup>BMP-7</sup> el día 1 después de la lesión. Sin embargo, no se hicieron evidentes diferencias con respecto a la inflamación y la formación de callos después del día 2 y del día 7.

Tomando estos hallazgos en conjunto, la expresión inducida por ARNm<sup>BMP-7</sup> por la proteína BMP-7 fisiológicamente funcional aparentemente apoya la cicatrización del tendón, a través de más infiltración celular y una formación de colágeno III menos fulminante. En principio, los resultados actuales proporcionan información sobre la fase de cicatrización temprana de la lesión aguda del tendón de Aquiles en ratas. Sin embargo, podrían realizarse estudios a largo plazo para aclarar adicionalmente si la intervención del ARNm<sup>BMP-7</sup> en puntos de tiempo tempranos sería beneficiosa en todas las fases de todo el proceso de cicatrización. Aunque las opiniones pueden ser discordantes en cuanto a la cuestión de si BMP-7 mejora la cicatrización de tendones o la deteriora al inducir la osificación heterotópica o la formación de cartílago (Yeh, *Journal of cellular biochemistry*. 2008;104:2107-22, Yee, *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29:816-21, Forslund, *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1998;69:622-6, Lui, *Rheumatology (Oxford, Inglaterra)*. 2013;52:2116-26), los hallazgos proporcionados en el presente documento sugieren que la sobreexpresión de BMP-7 durante la fase inflamatoria de regeneración de tendones influye positivamente en la cicatrización, debido a la atracción quimiotáctica de las células, la degradación menos pronunciada del colágeno tipo I y la disminución de la formación de colágeno tipo III.

La rotura del tendón puede producirse de manera espontánea y es posible que los pacientes no hayan sufrido síntomas antes (Kvist, *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 1994;18:173-201, Jozsa, Champaign, Illinois: Human Kinetics; 1997). Se cree que los procesos degenerativos son los responsables, que pueden conducir a una estructura alterada en el tejido tendinopático en comparación con los tendones intactos (Riley, *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2002;21:185-95). El tejido transformado se caracteriza por la desintegración de las fibras de colágeno, la pérdida de la organización de la matriz y, en la mayoría de los casos, procesos inflamatorios leves en estadios crónicos (Pecina, *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. 2010;77:277-83). Una explicación para este clase de degeneración podría ser una regulación por incremento de las enzimas colagenolíticas, tales como las metaloproteinasas de matriz específica (MMP), ya que se ha detectado en tendones tendinopáticos crónicamente alterados de seres humanos y animales (Castagna, *Arthritis and rheumatism*. 2006;54:832-42, Muir, *Veterinary Surgery*. 2005;34:482-90, Nomura, *J Vet Med Sci*. 2007;69:637-9). También se han observado patrones de expresión de MMP similares en tendones afectados experimentalmente por inyección de gel de colagenasa en caballos (Watts, *Equine veterinary journal*. 2012;44:576-86). Sin embargo, en la medicina humana y veterinaria, los pacientes a menudo presentan síntomas como dolor y malestar, en un estadio clínico antes de que se rompan los tendones. En casos de uso excesivo, estos síntomas probablemente sean el resultado de alteración de la fibra microtraumática y la posterior inflamación (Kannus, *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 1997;7:78-85). Basándose en estos supuestos podría generarse un modelo de defecto con fallo parcial con inyección de 100 UDC, imitando características clínicas de estadios preliminares de tendinopatías en seres humanos y equinos. Cabe mencionar que los defectos inducidos por 200 UDC o 500 UDC provocaron una patología perjudicial, que no se considera que represente la situación clínica.

A partir de los experimentos *ex vivo* dados a conocer en el presente documento que usan el ARNm que codifica

para  $\beta$ -galactosidasa, puede observarse que la expresión transgénica se distribuye en forma de tubo, dentro de las fibrillas en una muestra sana. Por tanto, se razonó si este patrón de distribución sería el mismo en tendones alterados patológicamente, con estructura de fibras desintegrada debido a la inyección previa de colagenasa. Para clarificar esta cuestión, se inyectó ARNm<sup>LUC</sup> en regiones lesionadas de tendones en un modelo de tendinitis de oveja altamente traslacional. De hecho, se observó en los tendones tratados con 100 UDC que la eficacia de la transfección en los tendones lesionados alcanzaba niveles iguales que en los tendones intactos. Además, la expresión transgénica se distribuyó más ampliamente y fue más intensa en los tendones lesionados. Sin restringirse a la teoría, esta observación se debe muy probablemente a un número de células aumentado y una mayor actividad metabólica en los tendones lesionados en comparación con el tendón intacto. Otra posible explicación, pero nuevamente sin restringirse a la teoría, podría ser la circunstancia de que partes de la matriz extracelular se desintegraron en los tendones lesionados y, como consecuencia, las conexiones entre las fibras se aflojaron. De hecho, el ARNm<sup>LUC</sup> inyectado puede extenderse más ampliamente entre fibras y, por tanto, alcanzó un mayor número de células.

Con respecto a la compatibilidad biológica, los tendones intactos se examinaron histopatológicamente 24 horas después de la inyección de ARNm<sup>LUC</sup>. El examen mostró sólo una leve reacción inflamatoria inespecífica cerca del sitio de inyección. Sin embargo, no puede excluirse que el propio ARNm, la proteína expresada, el estrés mecánico debido a la inyección de volumen o el trauma provocado por la inserción de la aguja, induzcan una respuesta inmunitaria local inespecífica leve. Los valores de las pruebas de hígado y riñón, así como el hemograma completo, se realizaron para investigar la seguridad farmacéutica del ARNm en animales grandes después de la aplicación local en los tendones. En los estudios a corto plazo, el ARNm no condujo a daño orgánico en el hígado o el riñón y no afectó de manera relevante al sistema inmunitario, ya que los valores determinados permanecieron dentro del intervalo fisiológico 24 horas después de la aplicación del ARNm o ya habían diferido ligeramente de antemano. Es fácilmente posible evaluar el potencial terapéutico del ARNm en tendones desintegrados químicamente mediante la aplicación de ARNm que codifica para proteínas terapéuticas en un modelo de defecto establecido con fallo parcial como, por ejemplo, se describe en el presente documento.

Estos resultados indican que los ARNm tiene el potencial como un profármaco novedoso, que podría usarse para expresar proteínas terapéuticas en tendones lesiones. Pueden realizarse investigaciones a largo plazo adicionales sobre el potencial terapéutico, de, por ejemplo, BMP-7, para el tratamiento de trastornos de tendones.

La presente invención se refiere a las siguientes tablas complementarias:

**Tabla 2**

Disoluciones usadas para la dilución de ARNm. Se enumera una selección de componentes primarios.

<sup>1</sup> disponible comercialmente, <sup>2</sup> disolución química convencional elaborada internamente, HEPES: ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanolsulfónico).

Descripción	Etiqueta	Componentes primarios
Que contienen compuestos de nitrógeno	Disolución de acetato de amonio <sup>1</sup> Aminosteril plus <sup>1</sup> Aminoven al 15% <sup>1</sup>	Acetato de amonio Aminoácidos totales 100 g/l, K, Ca, Mg, Cl, fosfato, acetato Aminoácidos totales 150 g/l
Disoluciones coloidales	HAES steril al 10% <sup>1</sup> Gelafundin al 4% <sup>1</sup>	Hidroxietil-almidón 100 g/l, Na, Cl Polisuccinato de gelatina 40 g/l, Na, Cl
Que contienen glucosa	Glucosa tamponada con HEPES al 2,5% <sup>2</sup> Glucosa tamponada con HEPES al 3,75% <sup>2</sup> Glucosa tamponada con HEPES al 5% <sup>2</sup> Glucosa tamponada con HEPES al 10% <sup>2</sup>	HEPES 12,5 mM, glucosa 25 g/l HEPES 18,75 mM, glucosa 37,5 g/l HEPES 25 mM, glucosa 50 g/l HEPES 50 mM, glucosa 100 g/l
Que contienen electrolitos	Solución salina isotónica (NaCl) <sup>2</sup> Acetato de Ringer <sup>1</sup> Lactato de Ringer <sup>1</sup>	Glucosa, Na, Cl Na, K, Ca, Mg, Cl, acetato Na, K, Ca, Cl, lactato
Que contienen electrolitos y glucosa	Solución salina isotónica + glucosa al 5% <sup>2</sup> (NaCl+gluc. al 5%)	Glucosa 50 g/l, Na, Cl

**Tabla 3**

Análisis de hemograma y valores de pruebas de órganos. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE (n=2, \*n=1). Intervalos de referencia: <sup>1</sup> 4-11 G/l, <sup>2</sup> 27-40%, <sup>3</sup> 280-650 G/l, <sup>4</sup> 5-11 mg/dl, <sup>5</sup> < 1,9 mg/dl, <sup>6,7</sup> < 180 U/l, <sup>8</sup> < 32 U/l, <sup>9</sup> < 9 U/l, <sup>10</sup> postprandial < 40  $\mu$ mol/l, <sup>11</sup> < 0,4 mg/dl, <sup>12</sup> 2-3 g/dl.

	cantidad de ARNmq								
	400 $\mu$ g		800 $\mu$ g		1000 $\mu$ g				
	d0	d6	d7	d0	d6	d7	d0	d6	d7
<b>Hemograma</b>									
<b>WBC [G/l]<sup>1</sup></b>	7,4	6,2	7,6*	6,8*	5,2	6,1	4,2	3,6	4,2
	$\pm 2,0$	$\pm 0,6$			$\pm 0,5$	$\pm 0,6$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,7$
<b>HCT [%]<sup>2</sup></b>	48,3	51,7	43,9*	41,5	35,5	40,0	29,5	29,0	36,0
	$\pm 3,3$	$\pm 4,2$		$\pm 0,7$	$\pm 2,1$	$\pm 1,4$	$\pm 6,4$	$\pm 4,2$	$\pm 0,0$
<b>PLT [G/L]<sup>3</sup></b>	409*	500	461*	450	554 $\pm$	562	521	421	564
	$\pm 87$			$\pm 152$	192	$\pm 172$	$\pm 52$	$\pm 25$	$\pm 43$
<b>Riñón</b>									
<b>nitrógeno ureico en sangre 21*</b>	11	7,5	17	13,5	6	14	12	7,5	
<b>[mg/dl]<sup>4</sup></b>	$\pm 0,0$	$\pm 0,7$	$\pm 4,2$	$\pm 3,5$	$\pm 0,7$	$\pm 1,4$	$\pm 2,8$	$\pm 2,1$	
<b>Creatinina [mg/dl]<sup>5</sup></b>	1,1*	1,0	1,1	1,1	1,2	1,1	0,8	0,7	0,7
	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$
<b>Hígado</b>									
<b>fosfatasa alcalina (AP) [U/l]<sup>6</sup></b>	79*	61 $\pm 5$	49 $\pm 9$	102	88	89	69	74	89
				$\pm 38$	$\pm 34$	$\pm 47$	$\pm 21$	$\pm 36$	$\pm 63$
<b>aspartato amino-trasferasa (AST)[U/l]</b>	109*	161	152	99	177	139	81	78 $\pm$	92 $\pm$
		$\pm 23$	$\pm 21$	$\pm 21$	$\pm 55$	$\pm 10$	$\pm 6$	13	35

<b>γ-glutamilttransferasa</b>	<b>75*</b>	<b>68</b>	<b>61</b>	<b>73</b>	<b>78</b>	<b>65 ±1</b>	<b>63</b>	<b>59</b>	<b>57</b>
<b>(γ-GT) [U/l]<sup>8</sup></b>		±5,7	±5,7	±11	±21		±6,4	±4,2	±3,5
<b>glutamato</b>	<b>3*</b>	4,5	7	6	3,5	3	6,5	6,5	6,5
<b>deshidrogenasa</b>		±2,1	±4,2	±1,4	±0,7	±0,0	±0,7	±3,5	±3,5
<b>(GLDH) [U/l]<sup>9</sup></b>									
<b>ácidos biliares [μmol/l]<sup>10</sup></b>	<b>4,3*</b>	8,6	12,4	12	2,7	10,4	4,5	4,6	26,6
		±10,5	±6,9	±9,5	±1,8	±7,6	±3,5	±4,2	±26,
									4
<b>bilirrubina total</b>	<b>0,3*</b>	0,3	0,4	0,2	0,35	0,2	0,3	0,25	0,2
<b>[mg/dl]<sup>11</sup></b>		±0,1	±0,0	±0,0	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,0
<b>albúmina sérica</b>	<b>3,8*</b>	3,7	3,5	3,7	3,8	3,2	3,1	2,9	2,9
<b>[g/dl]<sup>12</sup></b>		±0,4	±0,2	±0,5	±0,8	±0,1	±0,3	±0,3	±0,2

La presente invención se refiere a las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NO. 1:

Secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7) de *Homo sapiens*

Número de registro de Pubmed: NM\_001719

Versión: NM\_001719.2 GI:187608319

AGCGCGTACCACCTCTGGCGCTCCCGAGGGCGGCTCTTGTGCGATCCAGGGCGCACAAAGGCTGGGAGAGCGCCCGG  
GGGCCCTGCTATCCGCGCCGGAGGTTGGAAGAGGGTGGGTGCGCCGCCCGAGGGCGAGAGCGCCAGAGGAGC  
GGGAAGAAGGAGCGCTCGCCCGCCCGCTGCCTCCTCGCTGCCTCCCGGCGTTGGCTCTCTGGACTCCTAGGCT  
TGCTGGCTGCTCCTCCACCCGCGCCCGCTCCTCACTCGCTTTTTCGTTGCGCGGGGCTGCTTTCCAAGCCCTG  
CGGTGCGCCCGGGCGAGTGGGGGGCGAGGGGCCCGGGCCAGCACCGAGCAGGGGGCGGGGGTCCGGGCAGAGCG  
CGGCCGGCCGGGAGGGGCCATGCTGCGCGGGCGCAGCGGGGCCCTGCTGCAGCAAGTGACCGAGCGCGCGG  
ACGGCCGCTGCCCCCTCTGCCACCTGGGGCGGTGCGGGGCCGGAGCCCGGAGCCCGGGTAGCGCGTAGAGCCGG  
CGCGATGCACGTGCGCTCACTGCGAGCTGCGGGCGCCGACAGCTTCGTGGCGCTCTGGGCACCCCTGTTCTGCT  
GCCTCCGCCCTGGCCGACTCAGCCTGGACAACGAGGTGCACTCGAGCTTCATCCACCGGGCGCTCCGCAGCCA  
GGAGCGGGGGAGATGCAGCGCGAGATCCTCTCCATTTTGGGCTTGCCCCACCGCCGCGCCCGCACCTCCAGGG  
CAAGCACAACCTCGGCACCCATGTTTATGCTGGACCTGTACAACGCCATGGCGGTGGAGGAGGGCGGGGGCCCGG  
CGGCCAGGGCTTCTCCTACCCTTACAAGGCCGTCTTCAGTACCAGGGGCCCCCTCTGGCCAGCTGCAAGATAG  
CCATTTCTCACCAGCGCCGACATGGTCATGAGCTTCGTCAACCTCGTGAACATGACAAGGAATTTCTCCACCC  
ACGCTACCACCATCGAGAGTTCGGTTTGTATCTTTCCAAGATCCCAGAAGGGGAAGTGTACGGCAGCCGAATT  
CCGGATCTACAAGGACTACATCCGGGAACGCTTCGACAATGAGACGTTCCGGATCAGCGTTTATCAGGTGCTCCA  
GGAGCACTTGGGCAGGGAATCGGATCCTTCTGCTCGACAGCCGTACCTCTGGGCTCGGAGGAGGGCTGGCT  
GGTGTGACATCACAGCCACCAGCAACCCTGGGTGGTCAATCCGCGGCACAACCTGGGCTGCGAGCTCTCGGT  
GGAGACGCTGGATGGGCAGAGCATCAACCCCAAGTTGGCGGGCTGATGGGCGGCACGGGCCCCAGAACAAGCA  
GCCCTTCATGGTGGCTTTCTTCAAGGCCACGGAGTCCACTTCCGCGAGCATCCGGTCCACGGGGAGCAAACAGCG  
CAGCCAGAACCCTCCAAGACGCCCAAGAACAGGAAGCCCTGCGGATGGCCAACGTGGCAGAGAACAGCAGCAG  
CGACCAGAGGCGCCCTGTAAGAAGCAGAGCTGTATGTGAGCTTCAGAGACCTGGGCTGGCAGGACTGGATCAT  
CCGCGCTGGGAAGTCTCAGCCATGCACGACTCGTTCCAGAGGTAATTTAGAGCGCTACCAGCCAGGCCACCC  
CAACACGCCATCGTGCAGACGCTGGTCCACTTCAACAACCGAAACGGTGCCCAAGCCCTGCTGTGCGCCAC  
GCAGCTCAATGCCATCTCCGCTCTACTTGCATGACAGCTCCAACGTCACTCCTGAAGAAATACAGAAACATGGT  
GGTCCGGGCTGTGGCTGCCACTAGCTCCTCCGAGAATTCAGACCCTTTGGGGCCAAGTTTTTCTGGATCCTCCA  
TTGCTCGCCTTGCCAGGAACAGCAGACCAACTGCCTTTTGTGAGACCTTCCCTCCCTATCCCAACTTTAAA  
GGTGTGAGAGTATTAGGAAACATGAGCAGCATATGGCTTTTGTATCAGTTTTTCAGTGGCAGCATCCAATGAACAA  
GATCCTACAAGCTGTGCAGGCAAAACCTAGCAGGAAAAAACAACGCATAAAGAAAAATGGCCGGGCCAGGTC  
ATTGGCTGGGAAGTCTCAGCCATGCACGACTCGTTCCAGAGGTAATTTAGAGCGCTACCAGCCAGGCCACCC  
AGCCGTGGGAGGAAGGGGGCGTGGCAAGGGGTGGGCACATTGGTGTCTGTGCGAAAGGAAAATTGACCCGGAAGT  
TCCTGTAATAAATGTCAATAAAAACGAATGAATGAAATGGTTAGGACGTACAGATATATTTTCTAAACAAT  
TTATCCCATTTTCTCGGTTTATCCTGATGCGTAAACAGAAGCTGTGTCAAGTGGAGGGCGGGAGGTCCCTCTCC  
ATTCCTACAGTTTTTATCCTGAGGCTTGCAGAGGCCAGTGTTTACCGAGGTTTGCCCAATCCAAGATCTAGT  
GGGAGGGGAAAGAGCAAATGTCTGCTCCGAGGAGGGCGGTGTGTTGATCTTTGGAGGAAAAATATGTTCTGTTGT  
TCAGCTGGATTTGCCGTGGCAGAAATGAACTAGGTGTGTGAAATACCCGACACATTTGGGATGGCTTTTAC  
CTCGCCCCAGTGGTAGTAAATCCATGTGAAATTCAGAGGGGACAAGGACAGCAAGTAGGATGGAACTTGCAACT  
CAACCCGTGTTGTTAAGAAGCACAATGGGCCGGGCACAGTAGCTCCACCTGTAATCCACGACCTTTGGGAGGCT  
GAGGTGGGCGGATCATTTGAGGTGAGGAGTTCGAGACCAGCTGGCCAACATGGTGAACCCCATCTCTACTAAA  
AATACAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCAGCACCTGTAATCCAGCTACTCTGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTG  
CTTGAACCCAGAGGTGGAGGTTGAGTGCAGCAAGATCGTCCACTGCACTCCAGCTTGGGTGACAAAACAAGA  
CTCCATCTCAAAAGAAAAAACAAGCAGCAACATGAAGCCTAGTCTCCACGGGAGTGGGGTGAGCAGGAGCACT  
GCACATCGCCCCAGTGGACCCCTGGTCTTTGTCTGCAGTGGCATTCCAAGGCTGGGCCCTGGCAAGGGCACCCG  
TGGCTGTCTTTCATTTGCAGACCCTGATCAGAAGTCTCTGCAACAAATTTGCTCCTGAATTAAGGGGGAGAT  
GGCATAATAGGAGGTCTGATGGGTGCAGGATGTGCTGGACTTACATTGCAAAATAGAAGCCTTGTGAGGGTGACA  
TCCTAACCAAGTGTCCCGATTTGGAGGTGGCATTCTGACGTGGCTCTTGGTGAAGCCTGCCTTGCTTGGCTG  
GTGAGTCCCATAAATAGTATGCACTCAGCCTCCGGCCACAACACAAGGCCTAGGGGAGGGCTAGACTGTCTGCA  
AACGTTTTCTGCATCTGTAAAGAAAACAAGGTGATCGAAAACCTGTGGCCATGTGGAACCCGGTCTTGTGGGGGAC  
TGTTTTCTCCATCTTGACTCAGACAGTTCCTGGAACACCCGGGCTCTGTTTTTATTTCTTTGATGTTTTCTTC  
TTTAGTAGCTTGGGCTGCAGCCTCCACTCTCTAGTCACTGGGGAGGATATTTTTGTTATGTTTGGTTTCATTT  
GCTGGCAGAGCTGGGGCTTTTTGTGTGATCCCTCTTGGTGTGAGTTTTCTGACCCAACAGCCTCTGGTTAGCAT  
CATTTGTACATTTAAACCTGTAATAGTGTGTACAAAGCAAAGAGATTATTTATTTCCATCCAAAGCTCTTTTGA  
ACACCCCCCCCCCTTAATCCCTCGTTCAGGACGATGAGCTTGCTTTCCTTCAACCTGTTTGTGTTTTCTTATTTAA  
GACTATTTATTTAGTTGGTGGACCAATGTACTCAGAGCTGTTGCGTGCAGCAGTCCCTTAGTGAAAATTTCTGTATAA  
ATAGACAAAATGAAAAGGGTTTGCACCTTGAATAAAAGGAGACGTTTGGTCTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

El ORF (subrayado) de la secuencia anterior puede tener codones optimizados (por ejemplo, por Eurofins).

SEQ ID NO. 2:

Secuencia de ARNm con codones optimizados (formato de ADN) que resulta de la anterior SEQ ID NO. 1

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGCACGTACGCAGTCTTAGGGCTGC  
TGCCCCACACAGCTTTGTGGCCCTGTGGGCACCCCTCTTCTGCTTAGGTCTGCTCTTGCCGACTTTTCACTGGA  
CAACGAGGTCCATTCTCATTATCCACCGTCGACTGAGAAGCCAAAGAGAGCGGGAAATGCAGCGCGAGATTTT  
GTCTATCCTGGGATTGCCCCATAGACCTCGTCCCATCTCCAAGGGAAACACAACCTGCTCCCATGTTTCATGCT  
GGATCTGTACAATGCCATGGCAGTGGAGGAAGGTGGTGGCCAGGAGGACAGGGCTTCTCCTATCCGTACAAGGC  
CGTCTTTCCACCCAAGTCCACCGTTGGCGAGTCTCCAGGATTCCATTCTGACCGATGCGGACATGGTGAT  
GTCATTCGTGAACCTGGTGGAAACACGACAAAGAGTTCTTTCACCCAGGTATCACCACAGAGAGTTCGGCTTCGA  
CTTGAGTAAAAATCCCTGAGGGGAGAAGCCGTTACTGCCCGGAGTTTCGCATTTACAAGGACTACATTCGGGAGAG  
GTTTCGATAACGAAACCTTCCGGATATCCGTGTATCAGGTGCTGCAAGAGCATCTGGGGAGAGAGTCCGATCTCTT  
CCTCCTGGACAGTAGGACACTGTGGGCGTCTGAGGAAGGCTGGCTTGTGTTTCGACATAACTGCCACGAGCAATCA  
CTGGGTTGTAAACCCAAGGCATAACCTGGGGCTTCAGCTGTCTGTGCGAGACACTGGATGGGCAGAGCATCAATCC  
CAAACTGGCTGGTTGATCGGACGCCATGGTCCACAGAACAACAGCCCTTTCATGGTAGCTTTCTTTAAGGCCAC  
AGAAGTGCACCTTCGGAGTATTCGGAGCACTGGCAGCAACAGAGAAGCCAGAATAGATCCAAAGACCCCTAAGAA  
TCAGGAAGCCCTGCGGATGGCAAATGTGGCGGAGAATAGCAGCTCAGATCAGAGACAGGCTTGCAAGAAGCATGA  
ACTGTATGTGCTTTTCGAGATCTCGGATGGCAGGACTGGATTATCGCACCAGAGGGCTATGCTGCCTACTATTG  
CGAAGGCGAGTGCATTCCTCTGAACAGCTACATGAACGCAACCAATCATGCCATTGTCCAAACACTCGTCA  
CTTCATCAATCCGAAACTGTGCCTAAACCCCTGTGTGTCACCTACGCAGCTGAACGCTATATCTGTTCTGTACTT  
TGACGATTCATCAACGTCATCCTCAAGAAGTACCGCAATATGGTTGTCCGAGCATGCGGCTGTCACTGAGATT  
CTGCAGAA  
AAGCGGCC

Las letras mayúsculas representan el ORF de BMP-7.

SEQ ID NO. 3:

Secuencia de ARNm (formato de ARN) que resulta de la anterior SEQ ID NO. 1

GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACUUAAGCUUGGUACCGAGCUCGGAUCCAUGCACGUACGCAGUCUUAGGGCUGC  
UGCCCCACACAGCUUUGUGGGCCUGUGGGCACCCUCUUCUGCUUAGGUUCUGUCUUCGCCACUUUUCACUGGA  
CAACGAGGUCCAUUCUUAUUUUAUCCACCGUCGACUGAGAAGCCAAAGAGAGCGGGAAAUGCAGCGCGAGAUUUU  
GUCUAUCCUGGUAUUGCCCCAUAGACCUCGUCUCCCAUUCUCCAAGGAAACACAACUCUGCUCCCAUGUUCUAGCU  
GGAUCUGUACAUAUGCCAUGGCGAGUGGAGGAAGGUGUGGCCAGGAGGACAGGGCUUCUUCUUAUCCGUACAAGGC  
CGUCUUUCCACCCAAGGUCCACCGUUGGCGAGUCUCCAGGAUUCCAUUUCCUGACCGAUGCGGACAUGGUGAU  
GUCAUUCGUGAACCUGGUGGAACACGACAAAAGAGUUCUUCACCCAGGUAUCACCACAGAGAGUUCGCUUCGA  
CUUGAGUAAAAUCCCUGAGGGAGAAAGCCGUUACUGCCGCCGAGUUUCGCAUUUACAAGGACUACAUUCGGGAGAG  
GUUCGUAUACGAAACUUCCGGAUAUCCUGUAUACAGGUGUCGCAAGAGCAUUCUGGGAGAGAGUCCGAUCUCUU  
CCUCCUGGACAGUAGGACACUGUGGGCGUCUGAGGAAGGCGUGGCUUGUGUUCGACAUAAUCGCCACGAGCAAUCA  
CUGGUGUUAACCCAAGGCAUAAACUUGGGCUUACGUCUGUCGAGACACUGGAUGGGCAGAGCAUCAAUCC  
CAAAUCUGGCUUGGUUGAUCGGACGCGAUGGUCCACAGAAACAAACAGCCUUUCAUGGUAGCUUUUUAAGGCCAC  
AGAAGUGCACUUUCGGAGUAUUCGGAGCACUGGCAGCAAACAGAGAAGCCAGAAUAGAUCCAAGACCCCUAAGAA  
UCAGGAAGCCUCCGGAUGGCAAAUGUGGCGGAGAAUAGCAGCUCAGAUACAGAGACAGGCUUGCAAGAAGCAUGA  
ACUGUAUGUGUCUUUCGAGAUCUCGGAUGGCAGGACUGGAUUAUCGCACCAGAGGGCUAUGCUGCCUACUUAUG  
CGAAGGCGAGUGCGCAUUUCCUCUGAACAGCUACAUGAACGCAACCAUUAUGCCAUAUGUCCAAACACUCGUUCA  
CUUCAUCAUCCGAAACUGUCCUAAAACCCUGUUGGACCCUACGCAGCUGAACGCUUAUUCUGUUCUGUACUU  
UGACGAUUCUACGUAUCCUCAAGAAGUACCGCAUAUUGGUUUGUCCGAGCAUGCGGCUUGCACUGAGAAUUC  
CUGCAGAA  
AAGCGGCC

Las letras mayúsculas representan el ORF de BMP-7.

**Lista de secuencias**

- <110> etris GmbH
- <120> Uso de ARN en el tratamiento de lesiones de ligamentos o tendones
- <130> U3124 PCT S3
- <150> Documento EP14 17 7302.8
- <151> 16-07-2014
- <160> 3

ES 2 879 606 T3

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 4049

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

agcgcgtacc	actctggcgc	tcccgaggcg	gcctcttgctg	cgatccaggg	cgacacaaggc	60
tgggagagcg	ccccggggcc	cctgctatcc	gcgccggagg	ttggaagagg	gtgggttgcc	120
gccgcccagag	ggcgagagcg	ccagaggagc	gggaagaagg	agcgcctcgcc	cgcccgcctg	180
cctcctoget	gcctccccgg	cgttggctct	ctggactcct	aggcttgctg	gctgctcctc	240
ccaccgcgc	cgctcctcctc	actcgccttt	tcgttcgccc	gggctgcttt	ccaagccctg	300
cggtgcgccc	gggcgagtg	ggggcgaggg	gcccggggcc	agcaccgagc	agggggcggg	360
ggtccgggca	gagcgcggcc	ggccggggag	gggccatgtc	tggcgcgggc	gcagcggggc	420
ccgtctgcag	caagtgaccg	agcggcgcg	acggccgcct	gccccctctg	ccacctgggg	480
cggtgcgggc	ccggagcccc	gagcccgggt	agcgcgtaga	gccggcgcga	tgcacgtgcg	540
ctcaactgca	gctgcggcgc	cgcacagctt	cgtggcgctc	tgggcacccc	tgttcctgct	600
gcgctccgcc	ctggccgact	tcagcctgga	caacgaggtg	cactcgagct	tcatccaccg	660
gcgcctccgc	agccaggagc	ggcgggagat	gcagcgcgag	atcctctcca	ttttgggctt	720
gccccaccgc	ccgcgcccgc	acctccaggg	caagcacaac	tcggcaccca	tgttcctgct	780
ggacctgtac	aacgccatgg	cggtggagga	gggcggcggg	cccggcggcc	agggcttctc	840
ctaccocctac	aaggccgtct	tcagtacca	gggccccct	ctggccagcc	tgcaagatag	900
ccatttcctc	accgacgccc	acatggatcat	gagcttcgctc	aacctcgtgg	aacatgacaa	960
ggaattcttc	caccacgct	accaccatcg	agagttccgg	tttgatcttt	ccaagatccc	1020
agaaggggaa	gctgtcacgg	cagccgaatt	ccggatctac	aaggactaca	tccgggaacg	1080
cttcgacaat	gagacgttcc	ggatcagcgt	ttatcaggtg	ctccaggagc	acttgggcag	1140
ggaatcggat	ctcttcctgc	tcgacagccc	taccctctgg	gcctcggagg	agggctggct	1200
ggtgtttgac	atcacagcca	ccagcaacca	ctgggtggctc	aatccgcggc	acaacctggg	1260

ES 2 879 606 T3

cctgcagctc tccgtggaga cgctggatgg gcagagcatc aacccaagt tggcgggcct 1320  
 gattggggcg cacgggcccc agaacaagca gcccttcatg gtggctttct tcaaggccac 1380  
 ggaggtccac ttccgcagca tccgggtccac ggggagcaaa cagcgcagcc agaaccgctc 1440  
 caagacgccc aagaaccagg aagccctgcg gatggccaac gtggcagaga acagcagcag 1500  
 cgaccagagg caggcctgta agaagcacga gctgtatgtc agcttccgag acctgggctg 1560  
 gcaggactgg atcatcgcgc ctgaaggcta cggcgctac tactgtgagg gggagtgtgc 1620  
 cttccctctg aactcctaca tgaacgccac caaccagcc atcgtgcaga cgctggtcca 1680  
 cttcatcaac ccggaacgg tgcceaagcc ctgctgtgcg cccacgcagc tcaatgccat 1740  
 ctccgtcctc tacttcgatg acagctcaa cgtcatcctg aagaaataca gaaacatggt 1800  
 ggtccgggcc tgtggctgcc actagctcct ccgagaattc agaccctttg gggccaagtt 1860  
 tttctggatc ctccattgct cgccttggcc aggaaccagc agaccaactg ccttttgtga 1920  
 gaccttcccc tccctatccc caactttaaa ggtgtgagag tattaggaaa catgagcagc 1980  
 atatggcttt tgatcagttt ttcagtggca gcattccaatg aacaagatcc tacaagctgt 2040  
 gcaggcaaaa cctagcagga aaaaaaaca acgcataaag aaaaatggcc gggccaggtc 2100  
 attggctggg aagtctcagc catgcacgga ctcgtttcca gaggtaatta tgagcgccta 2160  
 ccagccaggc caccagccg tgggaggaag ggggctggc aaggggtggg cacattggtg 2220  
 tctgtgcgaa aggaaaattg acccggaggt tcctgtaata aatgtcacia taaaacgaat 2280  
 gaatgaaat ggttaggacg ttacagatat attttctaa acaatttatc cccatttctc 2340  
 ggtttatcct gatgcgtaaa cagaagctgt gtcaagtgga gggcggggag gtccctctcc 2400  
 attccctaca gtttcatcc tgaggcttgc agaggcccag tgtttaccga ggtttgcca 2460  
 aatccaagat ctagtgggag gggaaagagc aatgtctgc tccgaggagg gcggtgtgtt 2520  
 gatctttgga ggaaaaatat gttctgttgt tcagctggat ttgccgtggc agaatgaaa 2580  
 ctagggtgtg gaaataccg cagacatttg ggattggctt ttcacctcgc cccagtggta 2640  
 gtaaatccat gtgaaattgc agaggggaca aggacagcaa gtaggatgga acttgcaact 2700  
 caaccctggt gttaagaagc accaatgggc cgggcacagt agctcccacc tgtaatcca 2760  
 gcactttggg aggctgaggt gggcggatca tttgaggtca ggagttcgag accagcctgg 2820  
 ccaacatggt gaaaccccat ctctactaaa aatacaaaaa ttagccgggc atggtggcac 2880  
 gcacctgtaa tcccagctac tctggaggct gaggcaggag aattgcttga accccagagg 2940  
 tggaggttgc agtgagccaa gatcgtcca ctgcactcca gcttgggtga caaaacaaga 3000  
 ctccatctca aaagaaaaa aaaacagcac caatgaagcc tagttctcca cgggagtggg 3060  
 gtgagcagga gcactgcaca tcgccccagt ggacctctg gtctttgtct gcagtggcat 3120  
 tccaaggctg ggcctggca agggcaccg tggctgtctc ttcatttgca gacctgatc 3180

ES 2 879 606 T3

agaagtctct gcaaacaat ttgctccttg aattaagggg gagatggcat aataggaggt 3240  
 ctgatgggtg caggatgtgc tggacttaca ttgcaaatag aagccttggt gagggtgaca 3300  
 tcctaaccaa gtgtcccgat ttggaggtgg catttctgac gtggctcttg gtgtaagcct 3360  
 gccttgccct ggctgggtgag tcccataaat agtatgcact cagcctccgg ccacaaacac 3420  
 aaggcctagg ggagggctag actgtctgca aacgttttct gcatctgtaa agaaaacaag 3480  
 gtgatcghaa actgtggcca tgtggaaccc ggtcttggtg gggactggtt ctccatcttg 3540  
 actcagacag ttcttgaaa caccggggct ctgtttttat tttctttgat gttttcttc 3600  
 tttagtagct tgggctgcag cctccactct ctagtactg gggaggagta ttttttgta 3660  
 tgtttggtt catttgctgg cagagctggg gctttttgtg tgatccctct tgggtgagt 3720  
 tttctgacc aaccagcctc tggtagcat catttgta tttaaacctg taaatagttg 3780  
 ttacaaagca aagagattat ttatttccat ccaaagctct tttgaacacc cccccctt 3840  
 taatccctcg ttcaggacga tgagcttgct ttccttcaac ctgtttggtt tcttatttaa 3900  
 gactatttat taatggttg accaatgtac tcacagctgt tgcgtcgagc agtccttagt 3960  
 gaaaattctg tataaataga caaaatgaaa agggtttgac cttgcaataa aaggagacgt 4020  
 ttggttctgg caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4049

<210> 2

<211> 1489

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm con codones optimizados (formato de ADN) que codifica para BMP-7

<400> 2

gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttgg accgagctcg gatccatgca 60  
 cgtacgcagt cttagggctg ctgccccaca cagctttgtg gccctgtggg caccctctt 120  
 tctgcttagg tctgctcttg cggacttttc actggacaac gaggtccatt cctcatttat 180  
 ccaccgtcga ctgagaagcc aagagaggcg ggaaatgcag cgcgagattt tgtctatcct 240  
 gggattgccc catagacctc gtccccatct ccaagggaaa cacaactctg ctcccatggt 300  
 catgctggat ctgtacaatg ccatggcagt ggaggaaggt ggtggcccag gaggacaggg 360  
 cttctcctat ccgtacaagg ccgtcttttc caccgaaggt ccaccgttgg cgagctcca 420  
 ggattcccat ttctgaccg atgcggacat ggtgatgtca ttcgtgaacc tgggtggaaca 480  
 cgacaaagag ttctttcacc ccaggtatca ccacagagag ttccgcttcg acttgagtaa 540  
 aatccctgag ggagaagccg ttactgccgc cgagtttcgc atttacaagg actacattcg 600  
 ggagaggttc gataacgaaa ccttccggat atccgtgtat caggtgctgc aagagcatct 660

ES 2 879 606 T3

ggggagagag tccgatctct tctcctgga cagtaggaca ctgtgggctg ctgaggaagg 720  
 ctggcttggtg ttcgacataa ctgccacgag caatcactgg gttgtaaacc caaggcataa 780  
 cctggggctt cagctgtctg tcgagacact ggatgggagc agcatcaatc ccaaaactggc 840  
 tgggttgatc ggacgccatg gtccacagaa caaacagcct ttcattgtag ctttctttaa 900  
 ggccacagaa gtgcaacttc ggagtattcg gagcactggc agcaaacaga gaagccagaa 960  
 tagatccaag acccctaaga atcaggaagc cctgcgatg gcaaatgtgg cggagaatag 1020  
 cagctcagat cagagacagg cttgcaagaa gcatgaactg tatgtgtctt ttcgagatct 1080  
 cggatggcag gactggatta tgcaccaga gggctatgct gcctactatt gcgaaggcga 1140  
 gtgctcattt cctctgaaca gctacatgaa cgcaaccaat catgccattg tccaaact 1200  
 cgttcaactc atcaatccgg aaactgtgcc taaaccctgt tgtgcaccta cgcagctgaa 1260  
 cgctatatct gttctgtact ttgacgattc atccaacgtc atcctcaaga agtaccgcaa 1320  
 tatggtgtgc cgagcatgcg gctgtcactg agaattcctg cagaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagcggcc 1489

<210> 3

<211> 1489

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm con codones optimizados (formato de ARN) que codifica para BMP-7

<400> 3

gggagaccca agcuggcuag cguuuuacu uaagcuuggu accgagcucg gauccaugca 60  
 cguacgcagu cuuagggcug cugccccaca cagcuuugug gccuguggg caccuccuu 120  
 ucugcuuagg ucugcucuug ccgacuuuuc acuggacaac gagguccauu ccucauuuau 180  
 ccaccgucga cugagaagcc aagagaggcg ggaaaugcag cgcgagauuu ugucuaucuu 240  
 gggauugccc cauagaccuc guccccaucu ccaagggaaa cacaacucug cucccauguu 300  
 caugcuggau cuguacaauug ccauggcagu ggaggaaggu gguggccag gaggacaggg 360  
 cuucuccuau ccguacaagg ccgucuuuuc cacccaaggu ccaccguugg cgagucucca 420  
 ggauucccau uuccugaccg augcggacau ggugauguca uucgugaacc ugguggaaca 480  
 cgaaaagag uucuuucacc ccagguauc ccaagagag uuccgcuucg acuugaguaa 540  
 aaucuccgag ggagaagccg uuacugccgc cgaguucgc auuuacaagg acuacauucg 600  
 ggagagguuc gauaacgaaa ccuuccggau auccguguau caggugcugc aagagcaucu 660  
 ggggagagag uccgaucucu uccuccugga caguaggaca cugugggcuu cugaggaagg 720  
 cuggcuugug uucgacaaua cugccacgag caaucacugg guuguaaacc caaggcauaa 780

ES 2 879 606 T3

ccuggggcuu	cagcugucug	ucgagacacu	ggaugggcag	agcaucaauc	ccaaacuggc	840
uggguugauc	ggacgccaug	guccacagaa	caaacagccu	uucaugguag	cuuucuuuaa	900
ggccacagaa	gugcacuuuc	ggaguauucg	gagcacuggc	agcaaacaga	gaagccagaa	960
uagauccaag	acccuaaga	aucaggaagc	ccugcggaug	gcaaauuggg	cggagaauag	1020
cagcucagau	cagagacagg	cuugcaagaa	gcaugaacug	uauugucuu	uucgagaucu	1080
cggauggcag	gacuggauua	ucgcaccaga	gggcuaugcu	gccuacuauu	gcgaaggcga	1140
gugcgcauuu	ccucugaaca	gcuacaugaa	cgcaaccaau	caugccaauug	uccaaacacu	1200
cguucacuuc	aucaauccgg	aaacugugcc	uaaacccugu	ugugcaccua	cgcagcugaa	1260
cgcuaauacu	guucuguacu	uugacgauuc	auccaacguc	auccucaaga	aguaccgcaa	1320
uauugguuguc	cgagcaugcg	gcugucacug	agaauuccug	cagaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	1440
aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaagcggcc		1489

**REIVINDICACIONES**

1. Composición líquida que contiene ARN desnudo para su uso en el tratamiento o la prevención de lesiones de ligamentos o tendones, en la que el ARN está disuelto en una disolución de glucosa, y en la que el ARN es ARNm y en la que el polipéptido codificado por el ARNm se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento y diferenciación (GDF), Vegf y proteína morfogenética ósea (BMP).
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido es un polipéptido que es terapéuticamente activo en el proceso de cicatrización de un ligamento o tendón.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que la disolución de glucosa es una disolución de glucosa tamponada.
4. Composición para su uso según la reivindicación 3, en la que la disolución de glucosa tamponada es una disolución de glucosa tamponada con HEPES.
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la concentración del ARN en la composición es de entre 0,1 y 5,0  $\mu$ g/ $\mu$ l.
6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición se administra al ligamento o tendón mediante inyección.
7. Composición para su uso según la reivindicación 6, en la que la inyección se realiza mediante una jeringa con una aguja que tiene un diámetro en el intervalo de 20G a 27G.
8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha composición líquida va a administrarse antes o durante la fase inflamatoria que sigue a dichas lesiones de ligamentos o tendones.
9. Composición terapéutica que contiene ARN en la que el ARN es ARNm que codifica para un polipéptido que es terapéuticamente activo en el proceso de cicatrización de un ligamento o tendón seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), factor de crecimiento epidérmico (EGF), GDF, Vegf y BMP, en la que la composición es una disolución de glucosa que contiene el ARNm en forma desnuda.
10. Composición terapéutica según la reivindicación 9, en la que la disolución de glucosa es una disolución de glucosa tamponada.
11. Composición terapéutica según la reivindicación 10, en la que la disolución de glucosa tamponada es una disolución de glucosa tamponada con HEPES.
12. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o composición terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el GDF es GDF 5, 6 (BMP-13), 7 (BMP-12), o miostatina (GDF-8).
13. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o composición terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la BMP es BMP-6 o BMP-7.

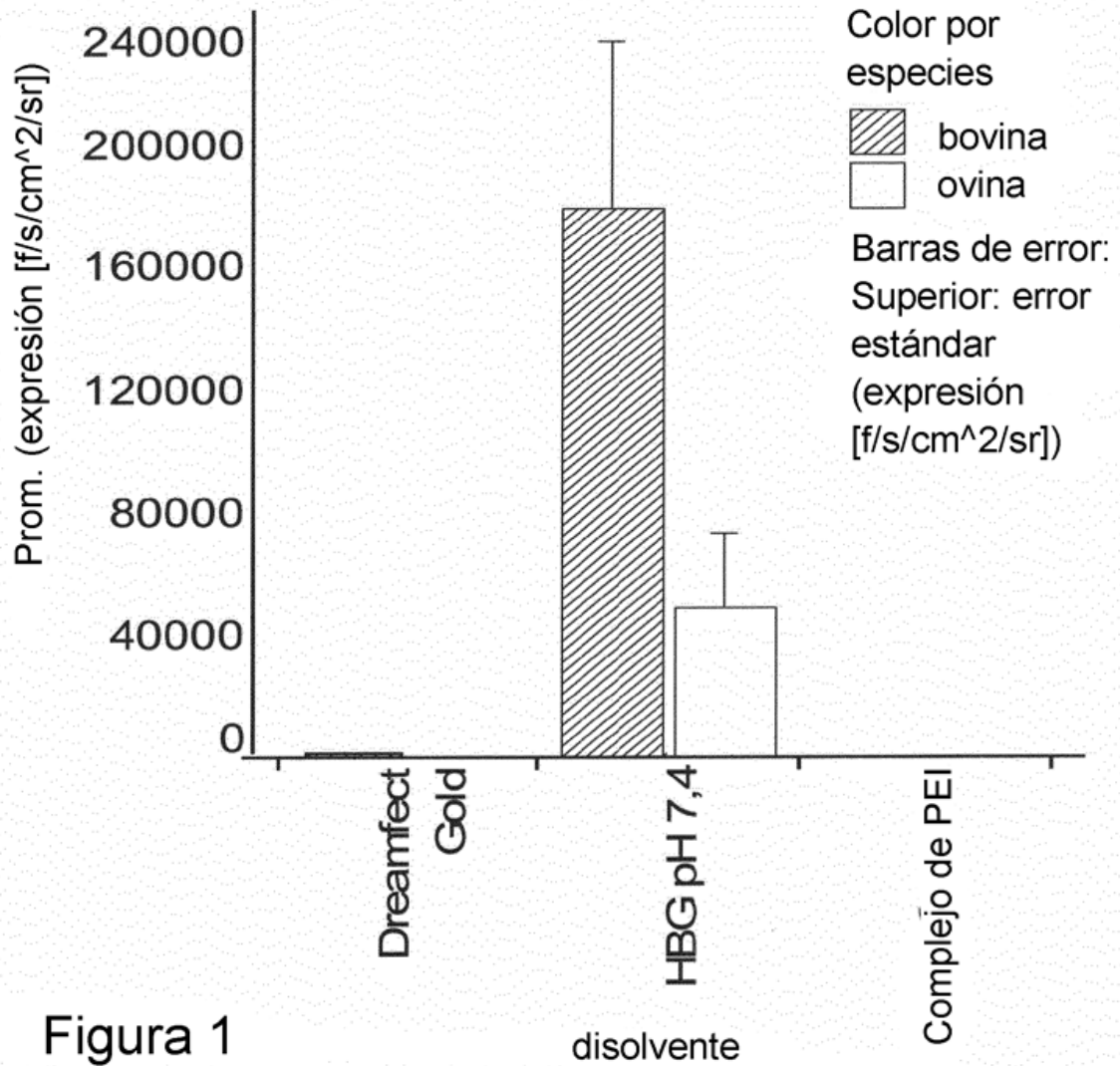
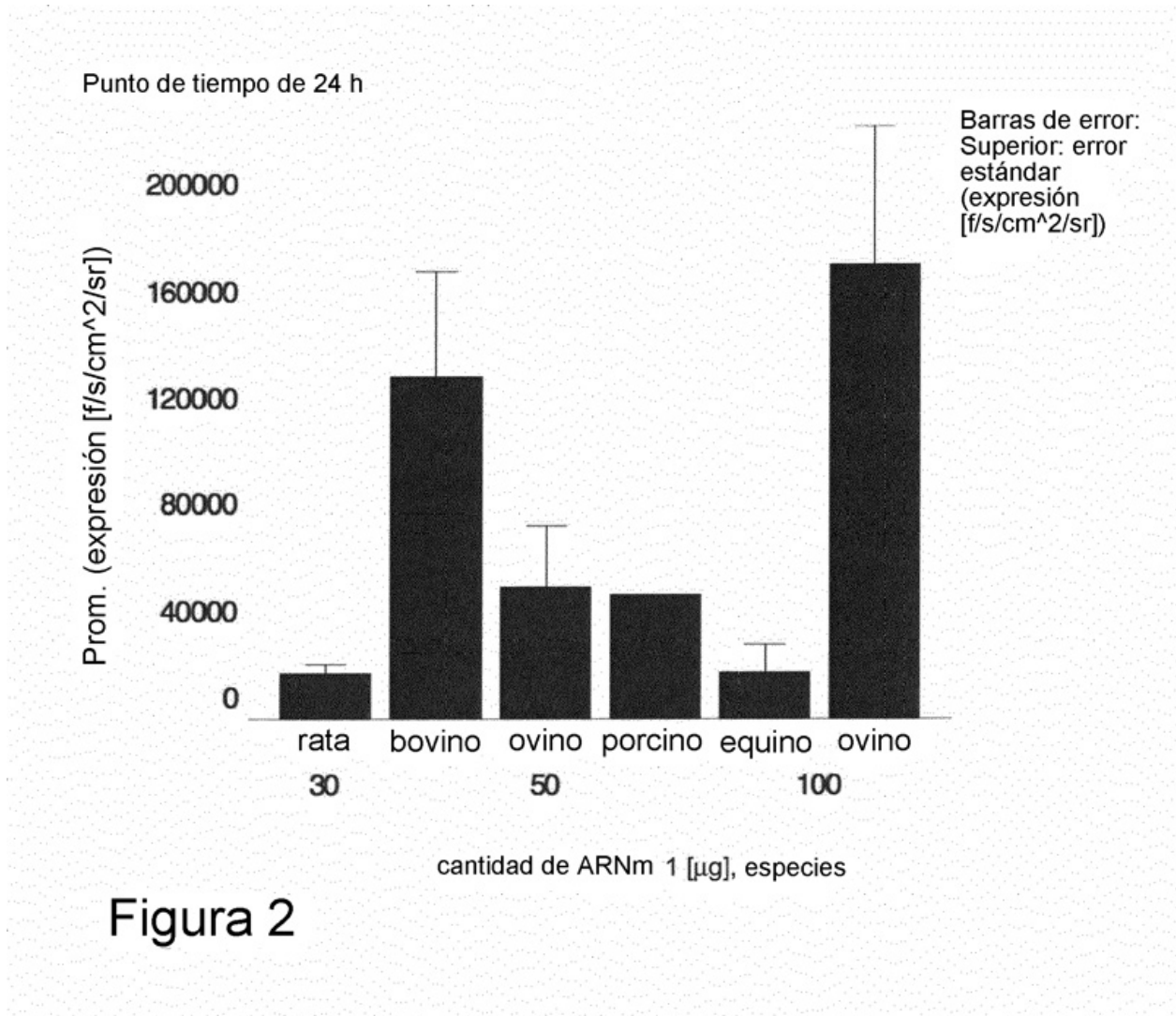


Figura 1



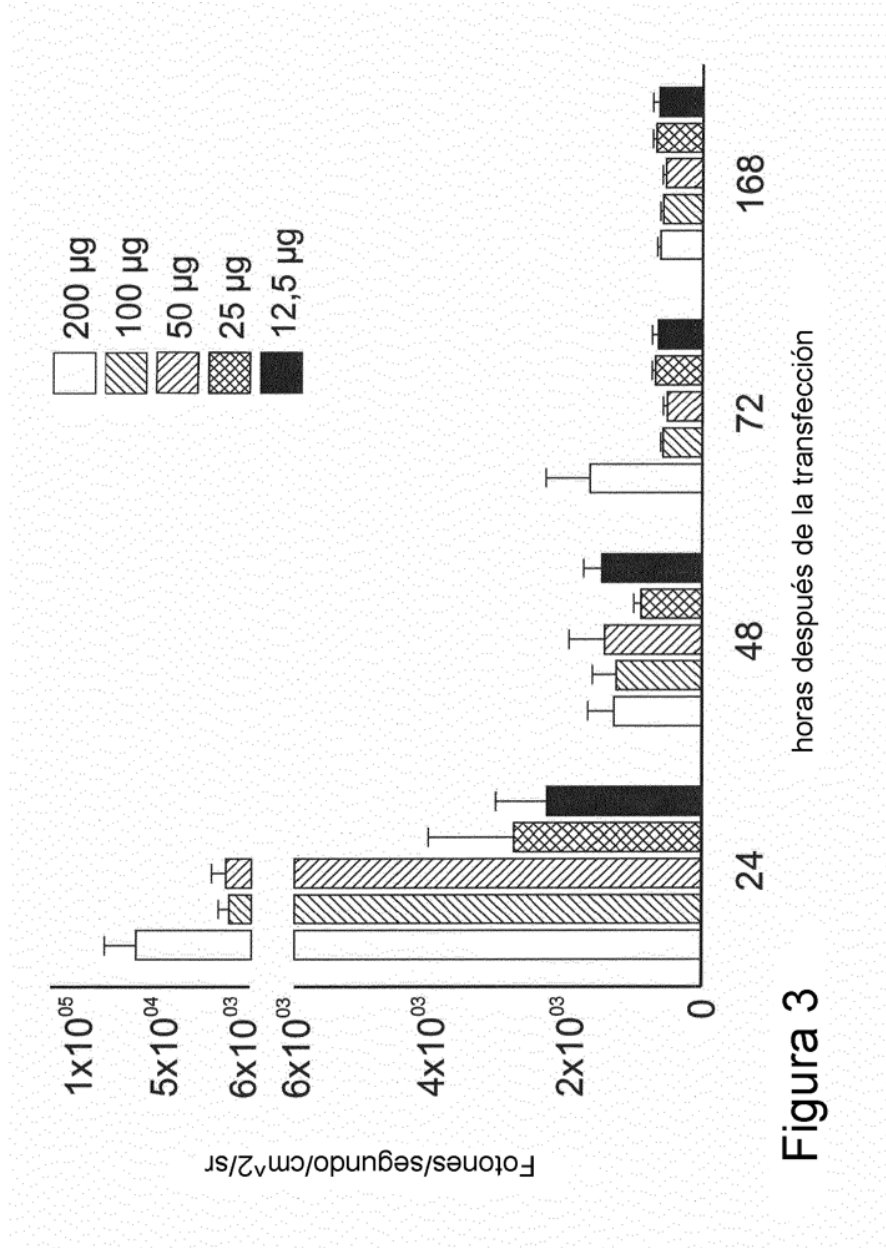


Figura 3

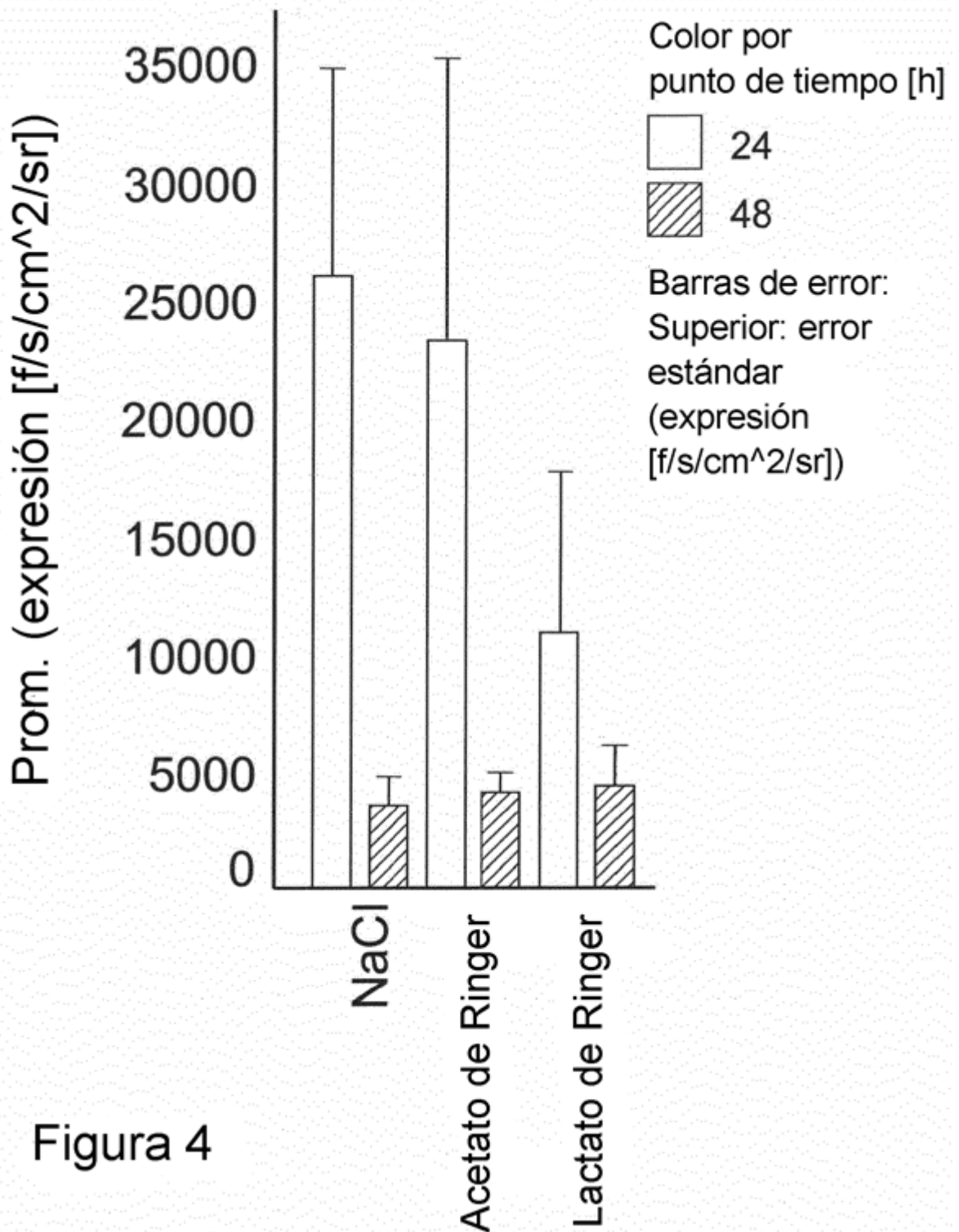
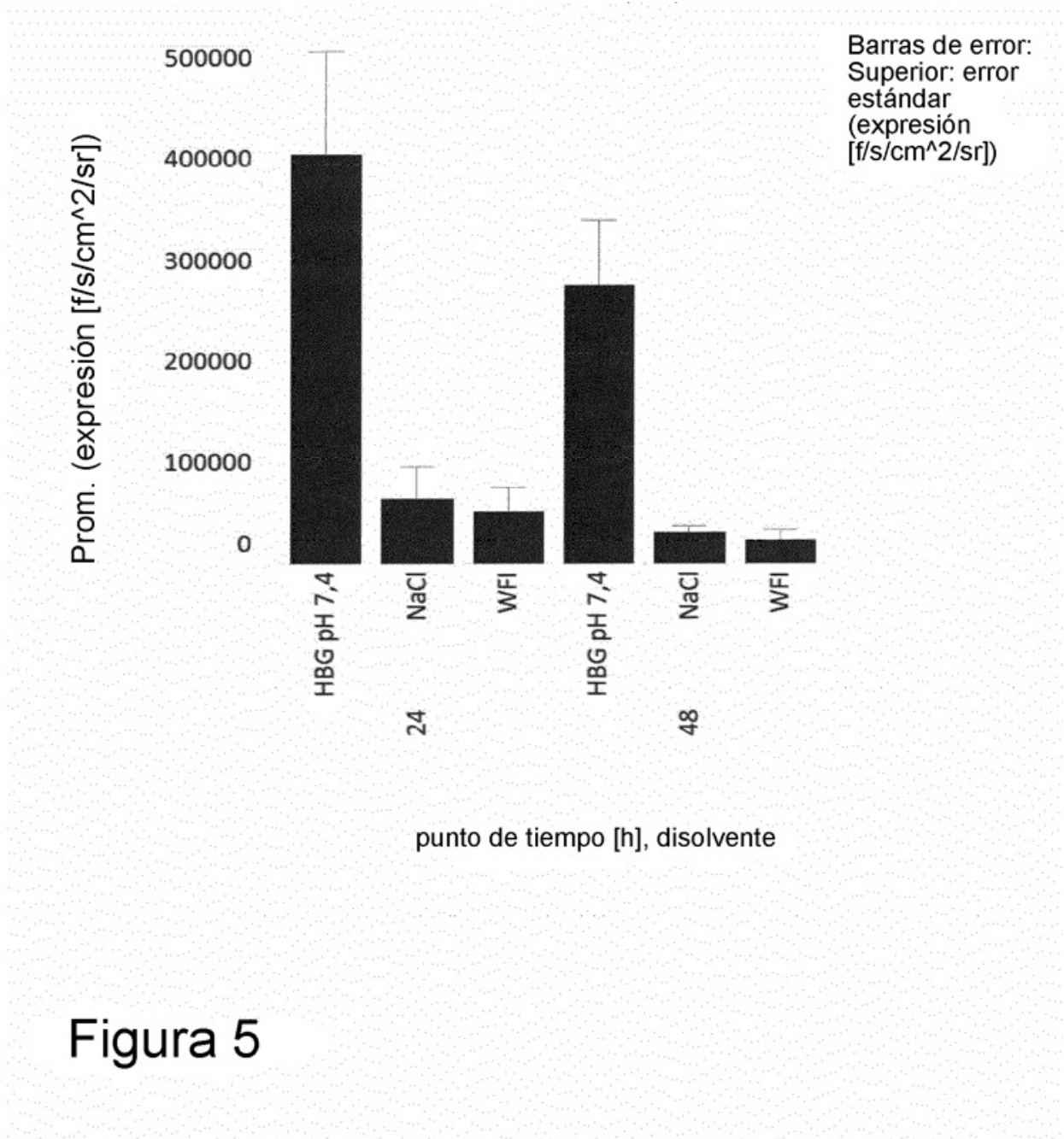
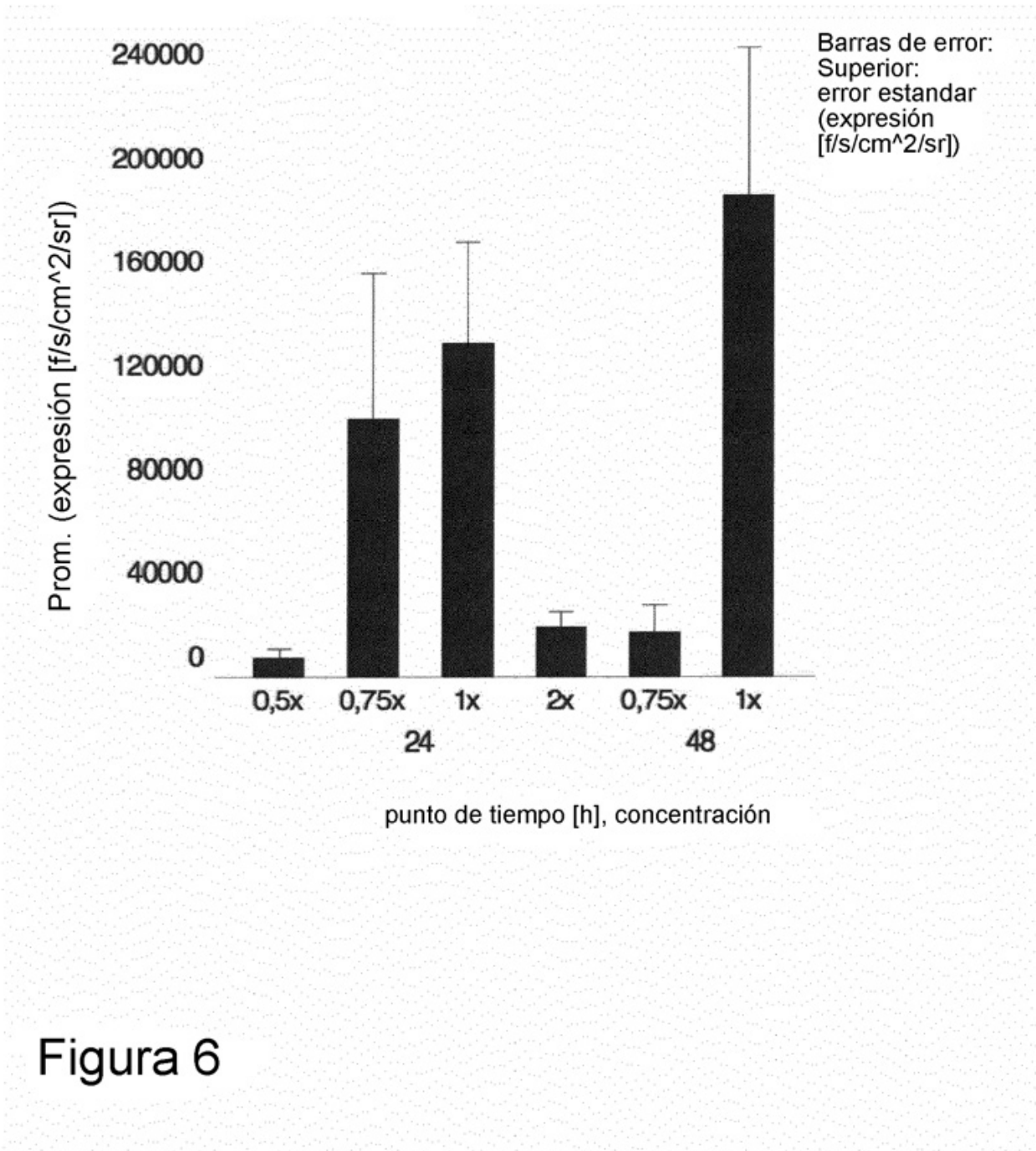


Figura 4





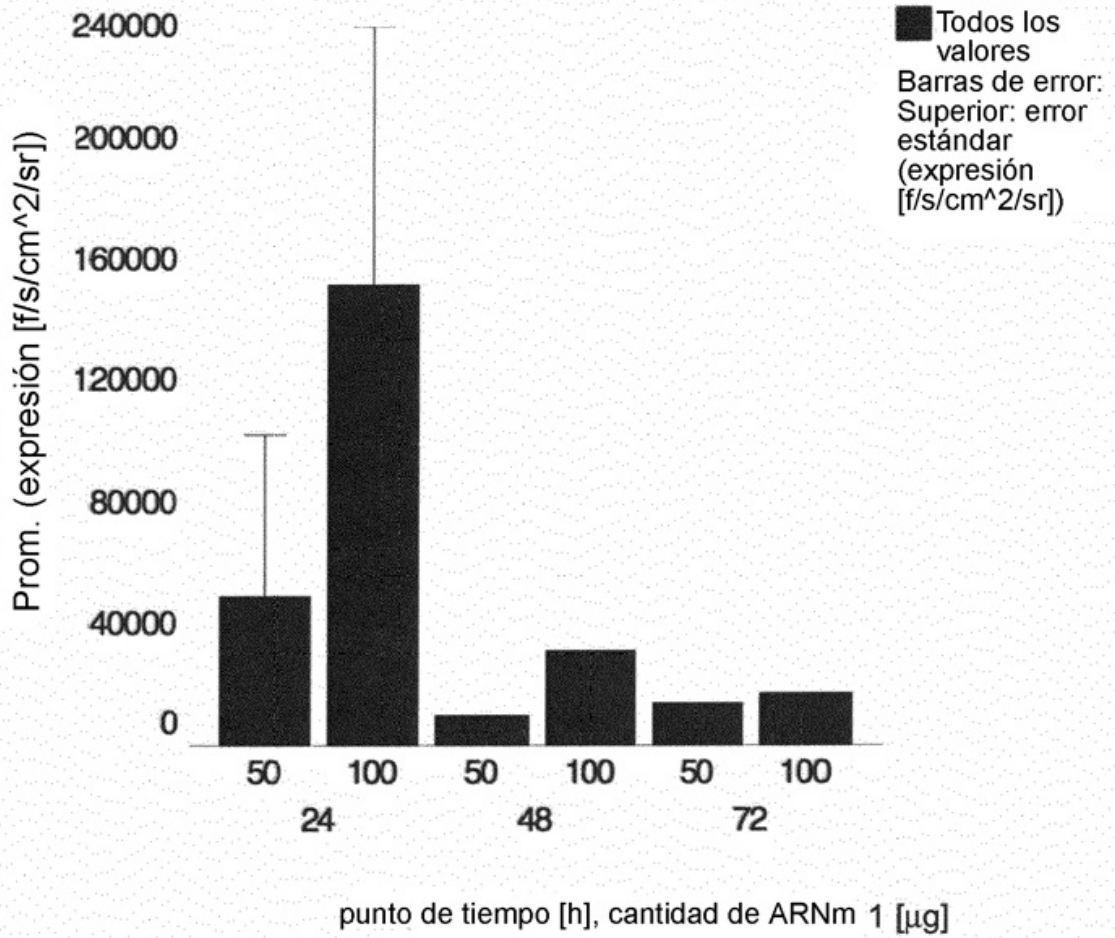
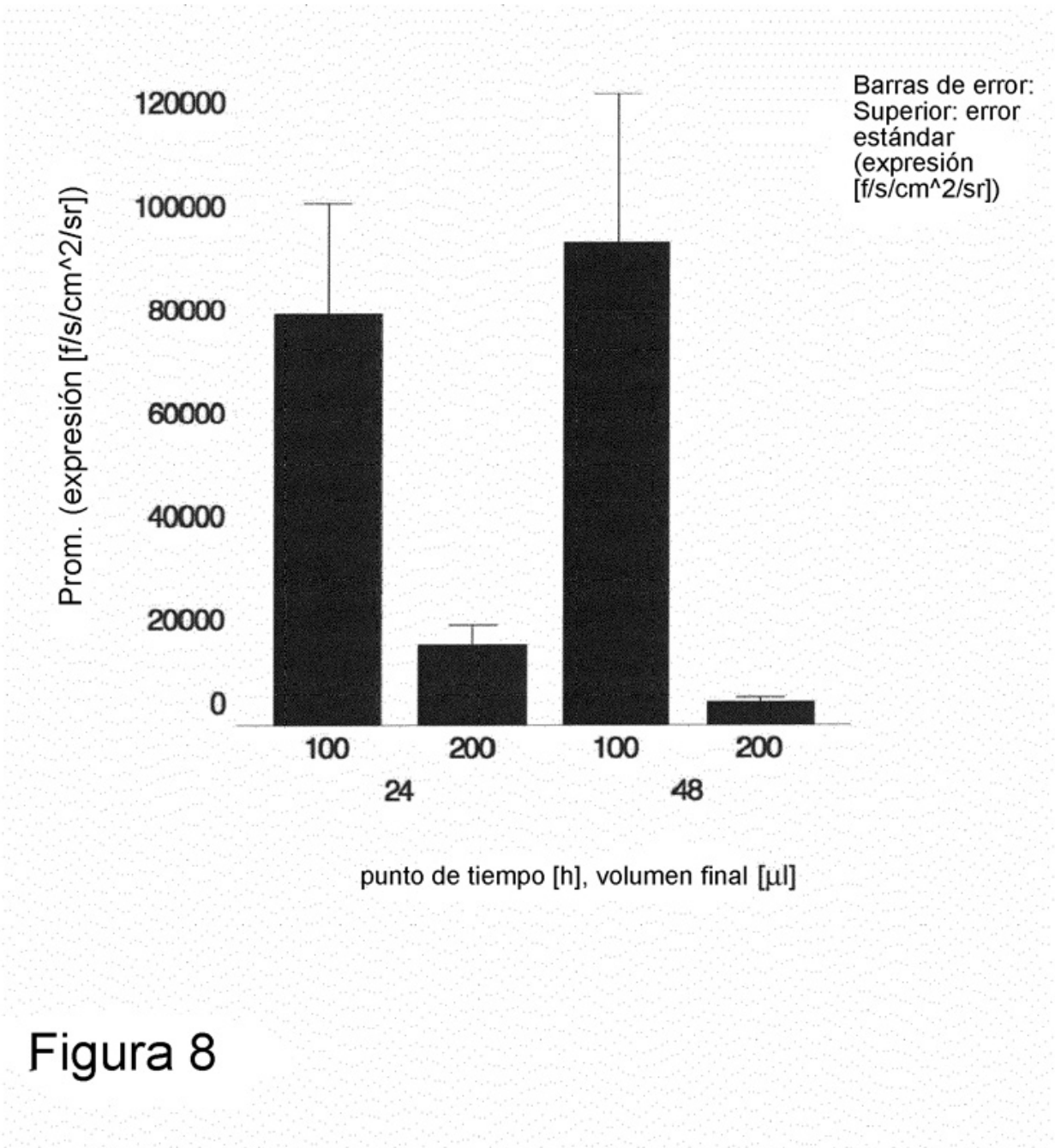
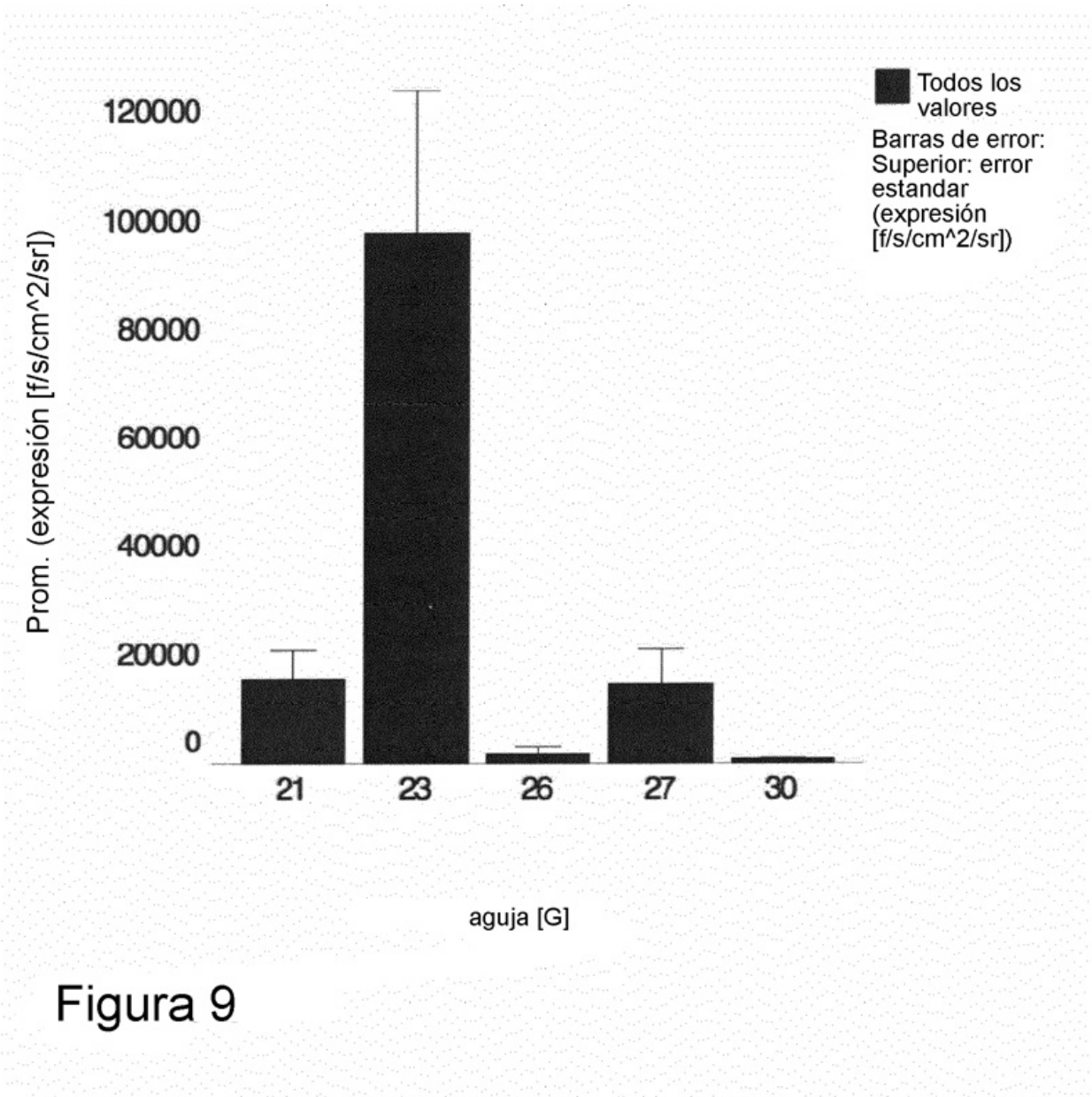


Figura 7





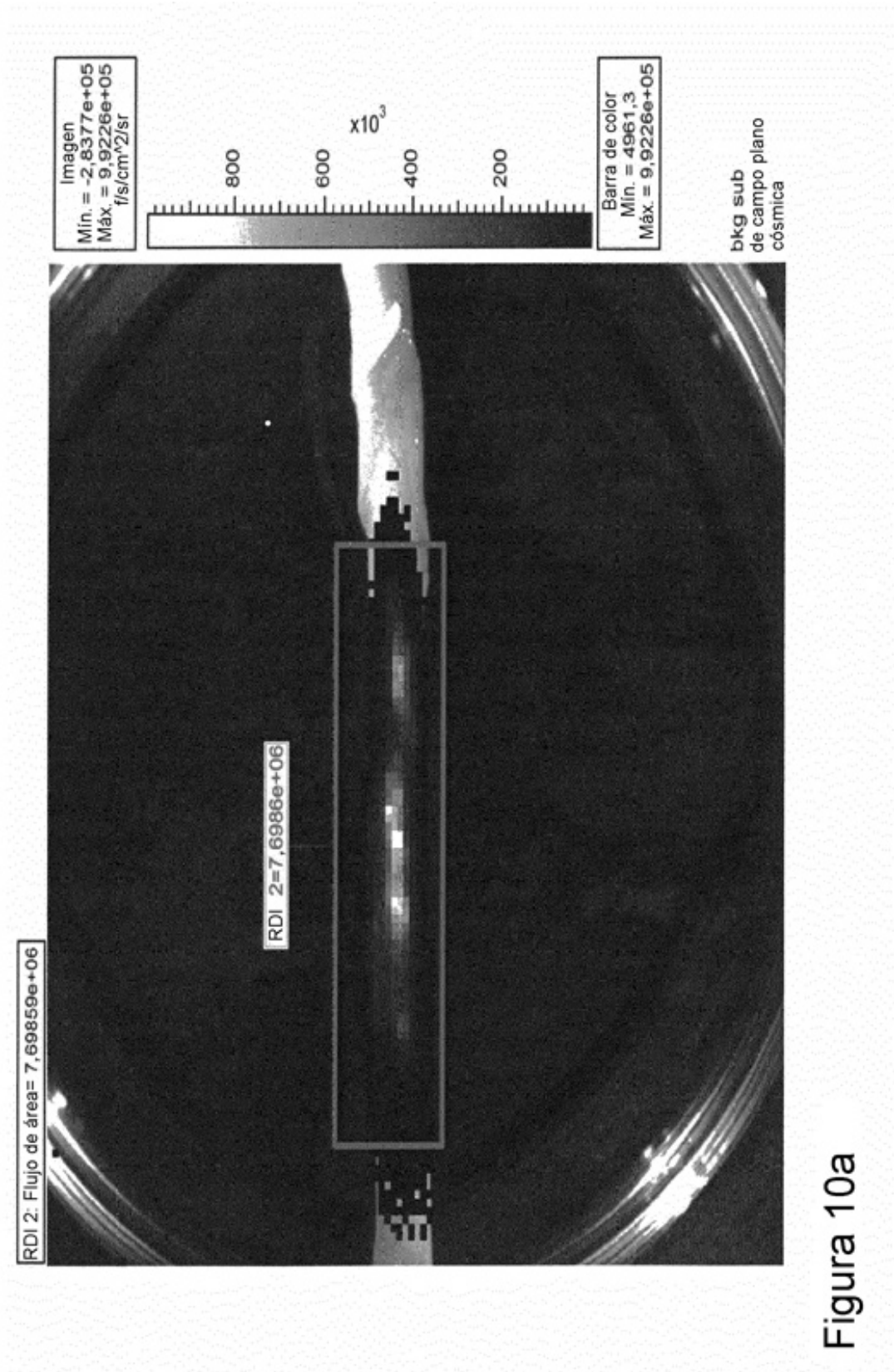
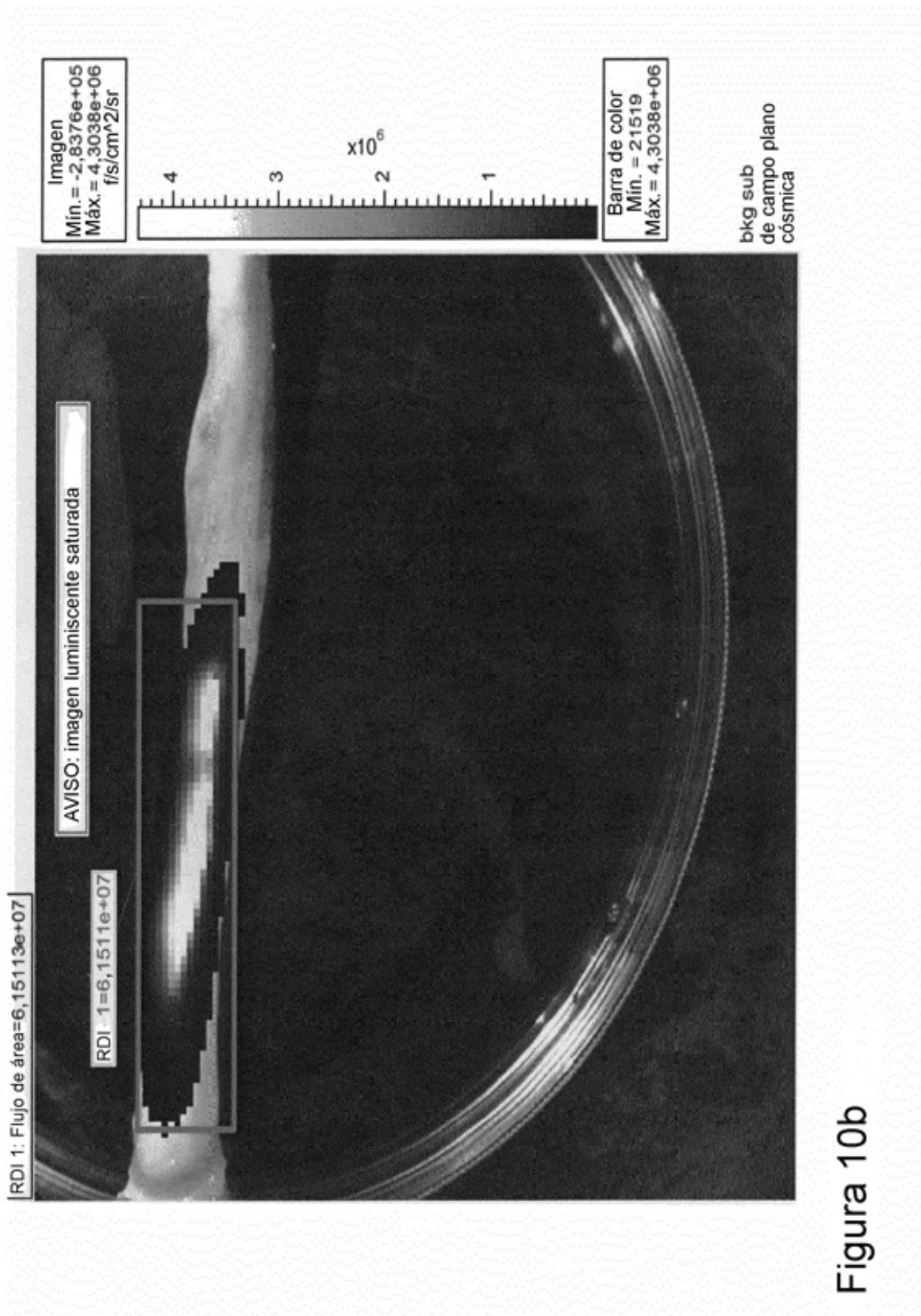


Figura 10a



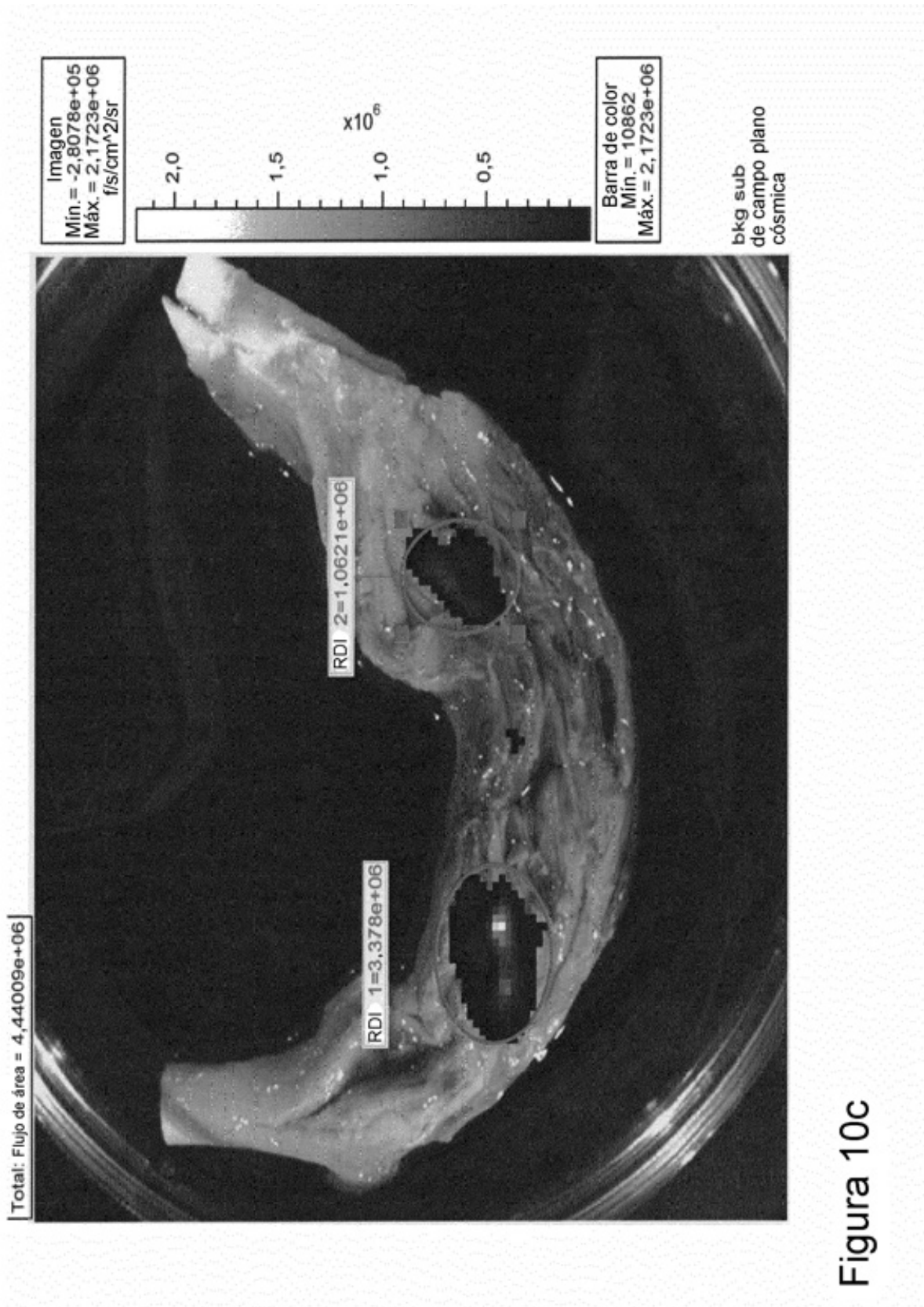


Figura 10c

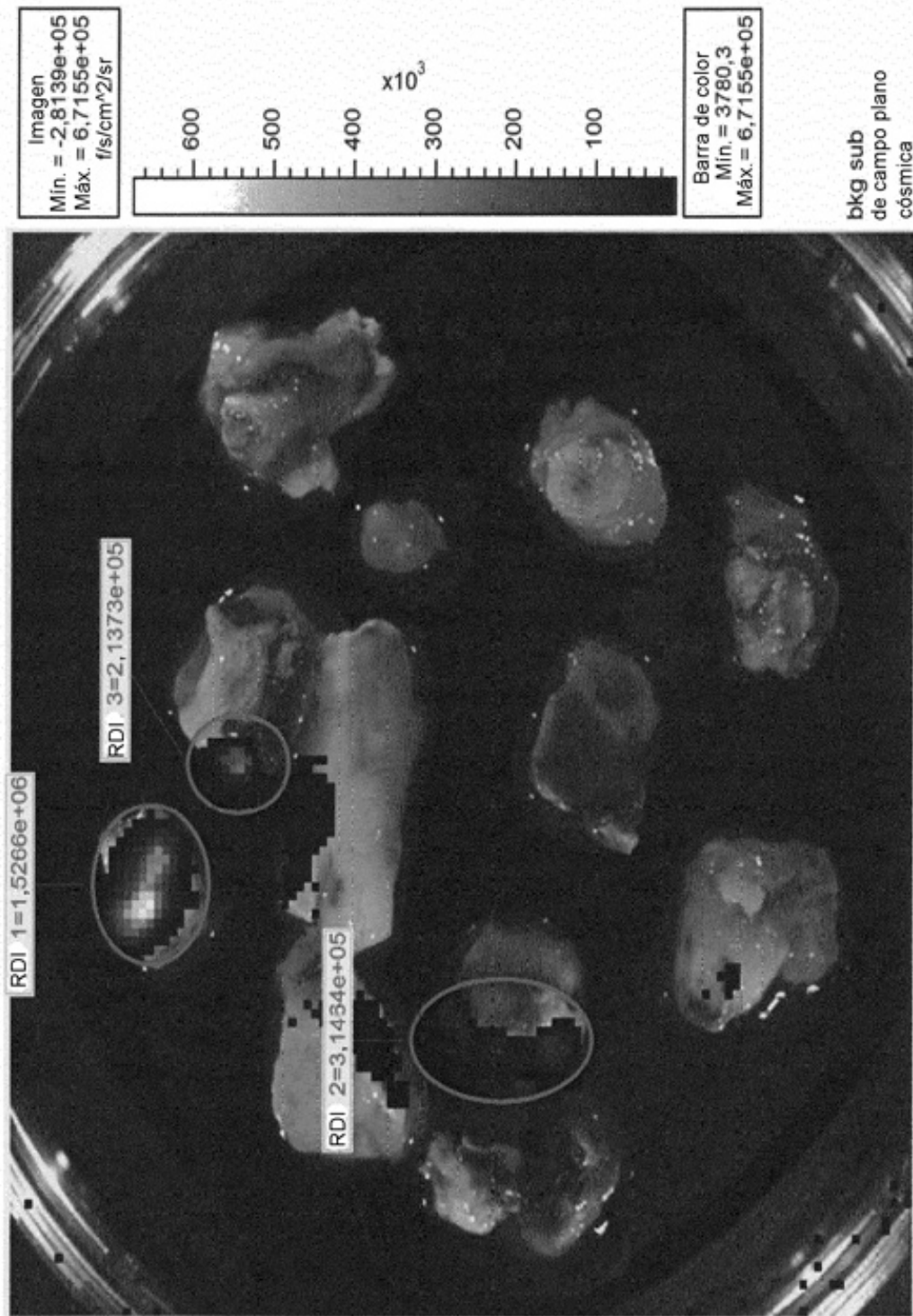
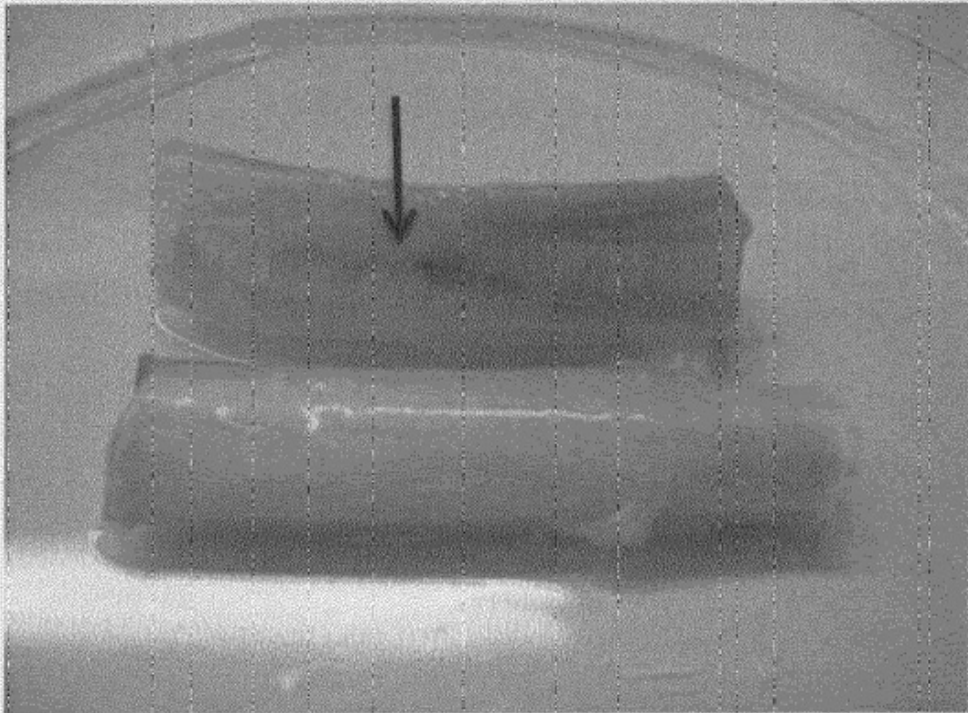


Figura 10d

A.



B.

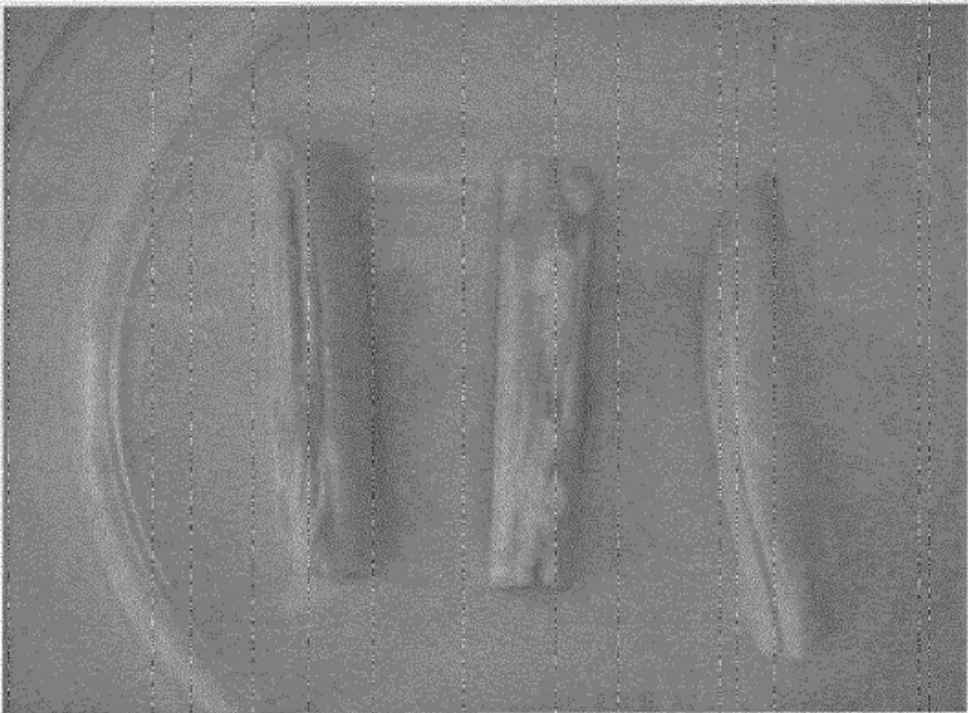


Figura 11 A-B

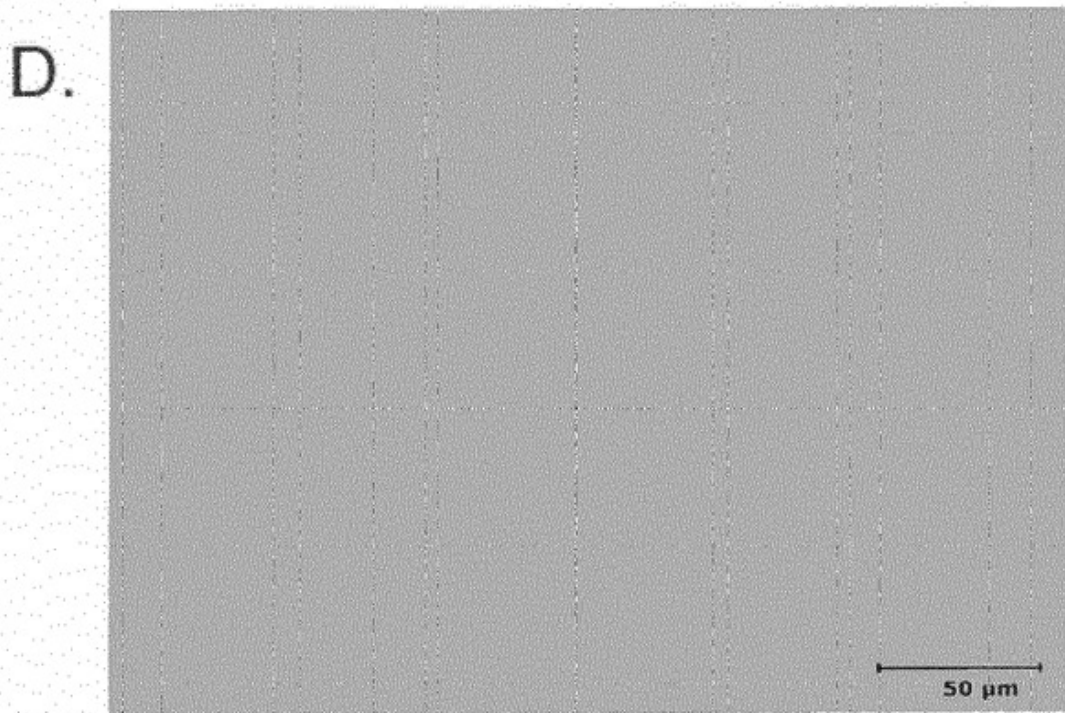
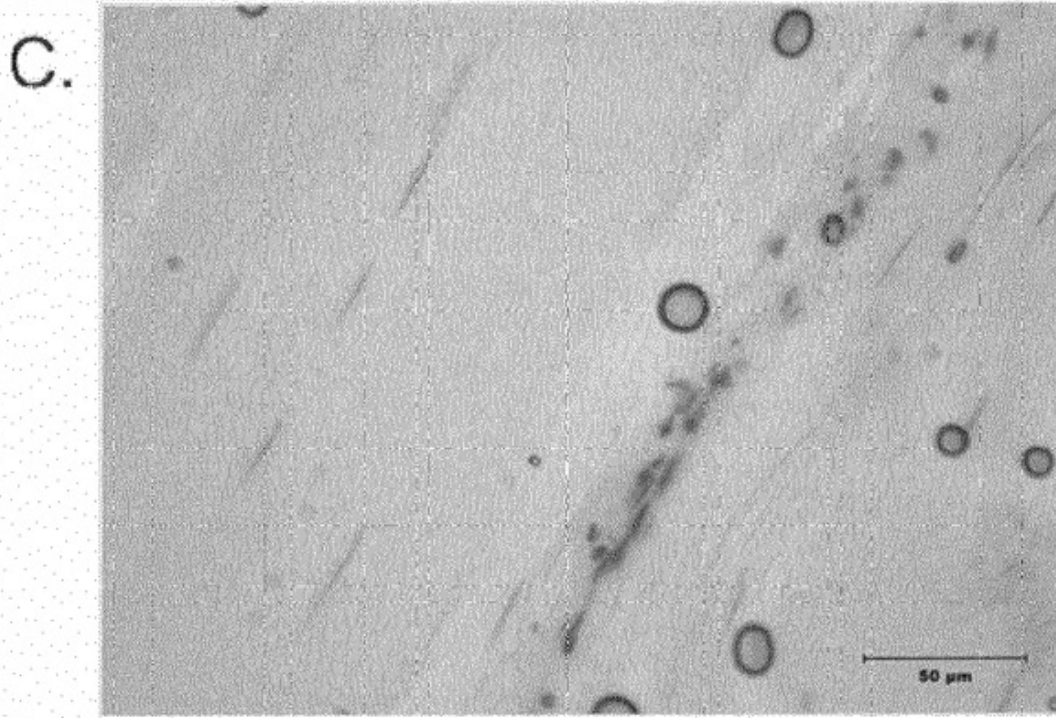
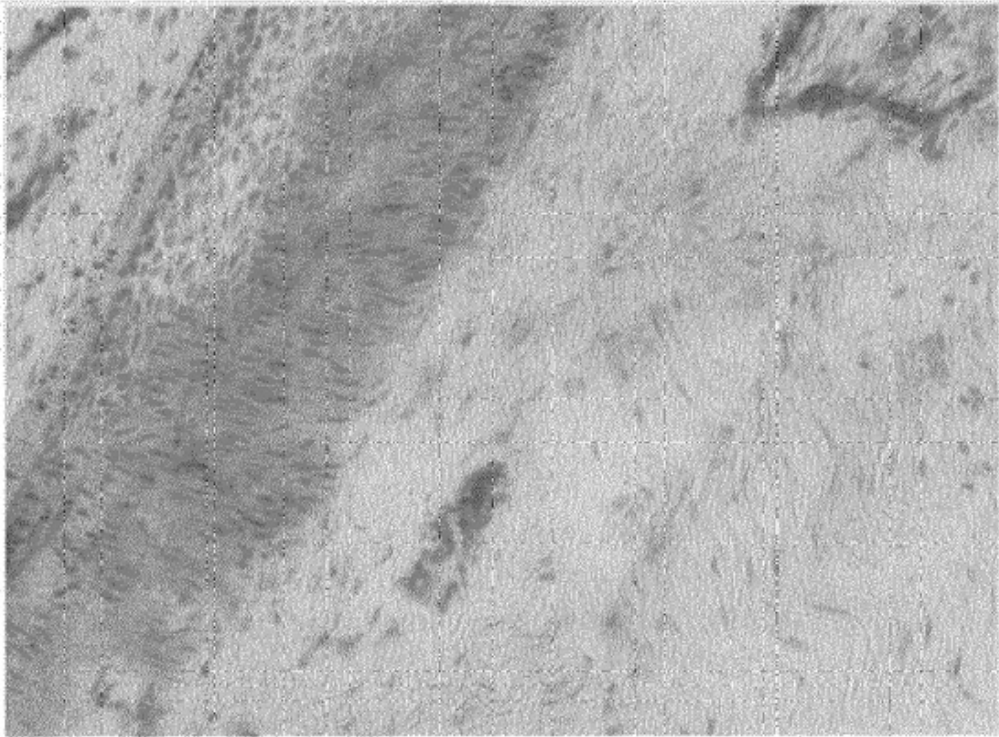


Figura 11 C-D

A.



B.

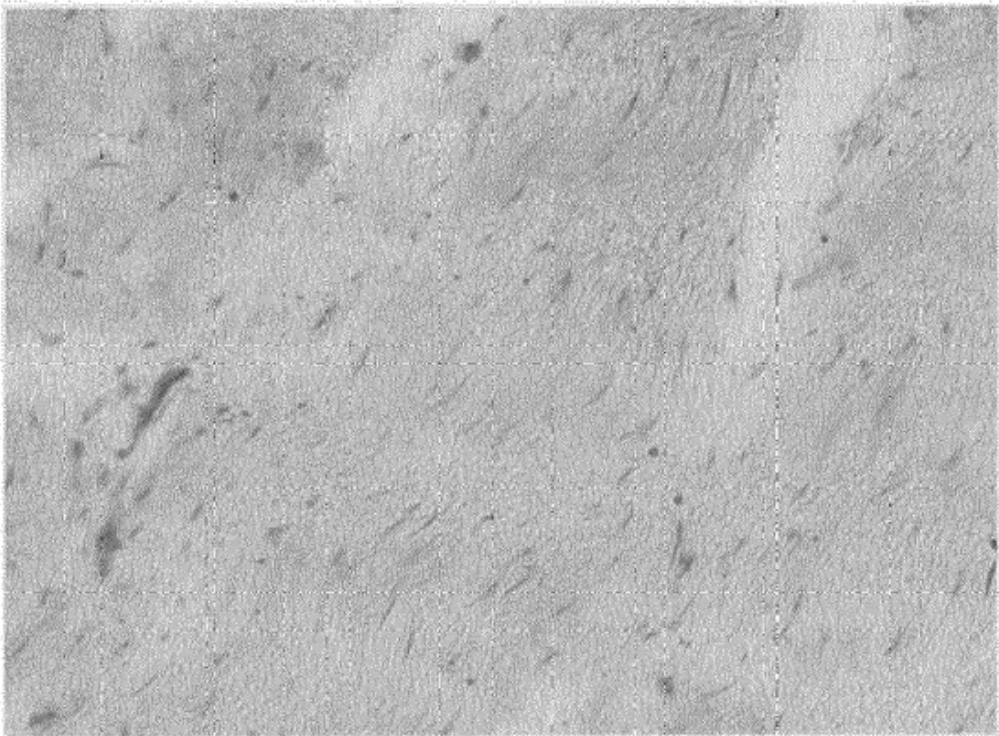


Figura 12 A-B

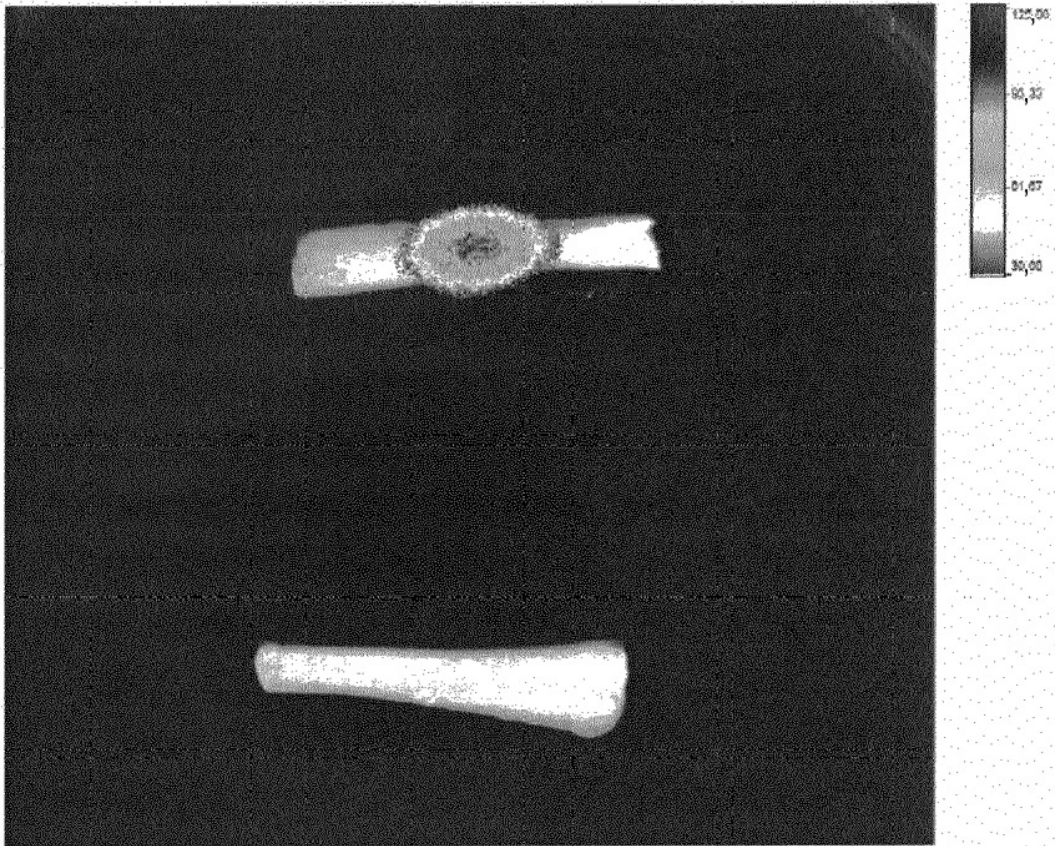


Figura 13

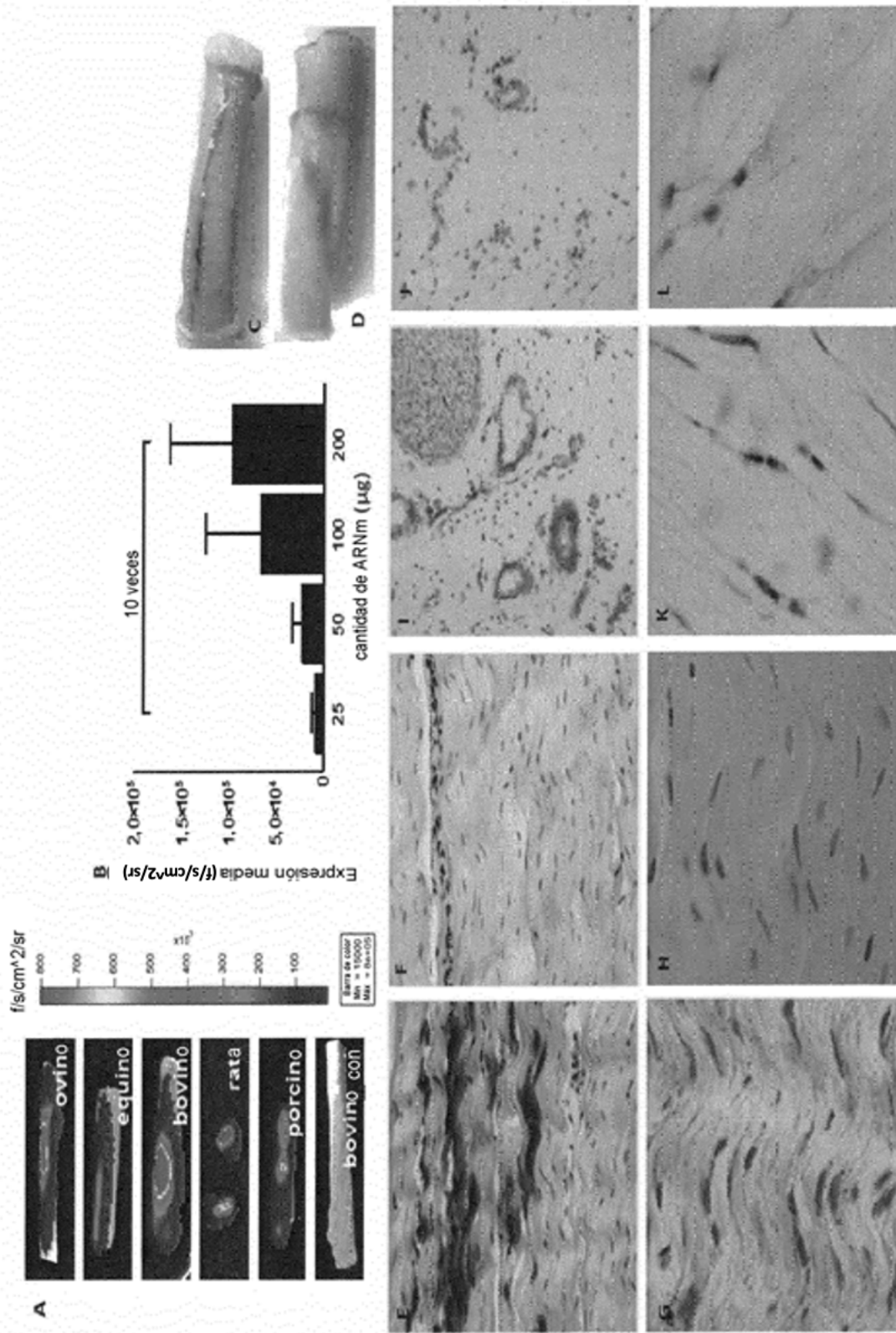


Figura 14

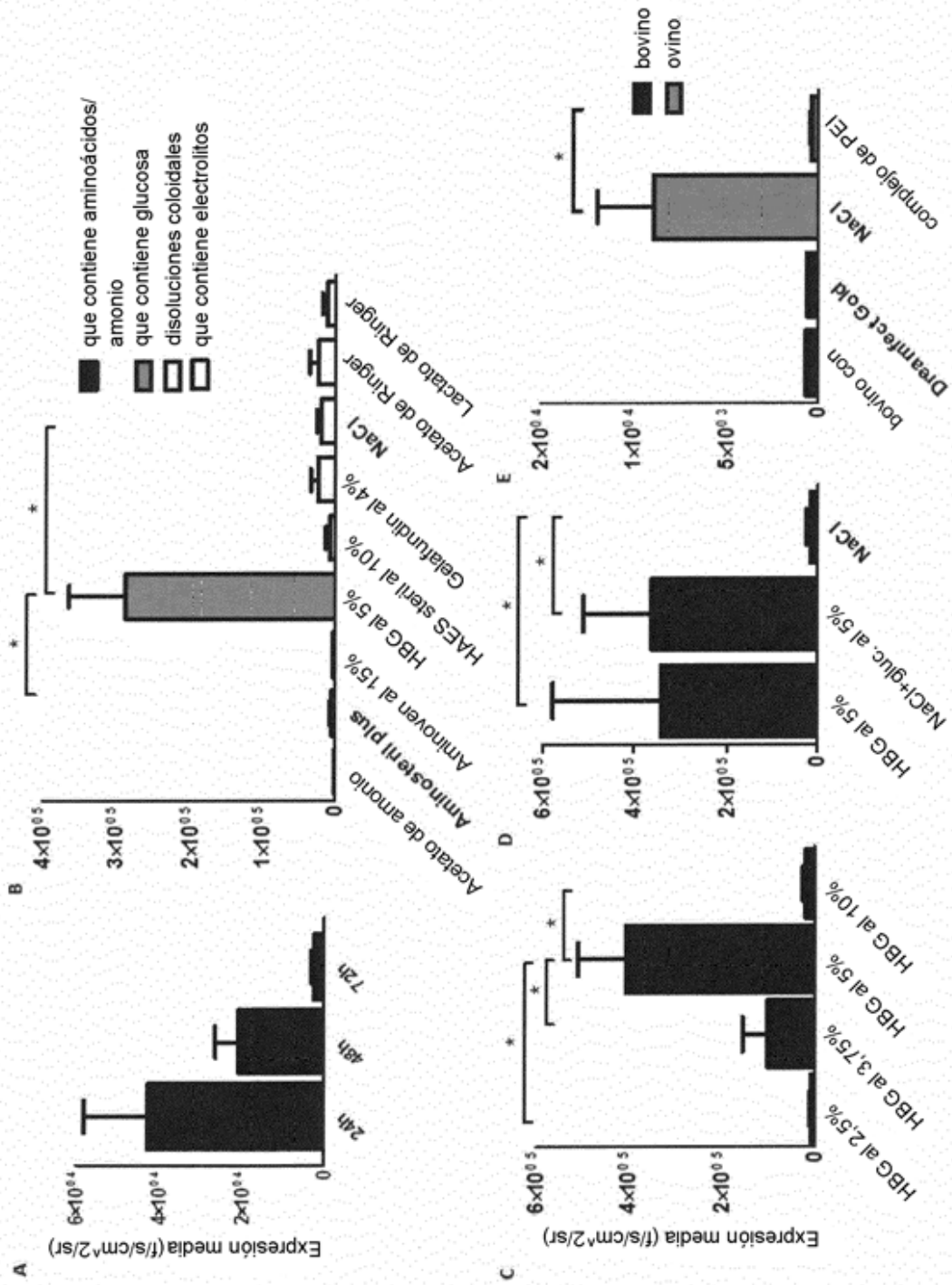


Figura 15

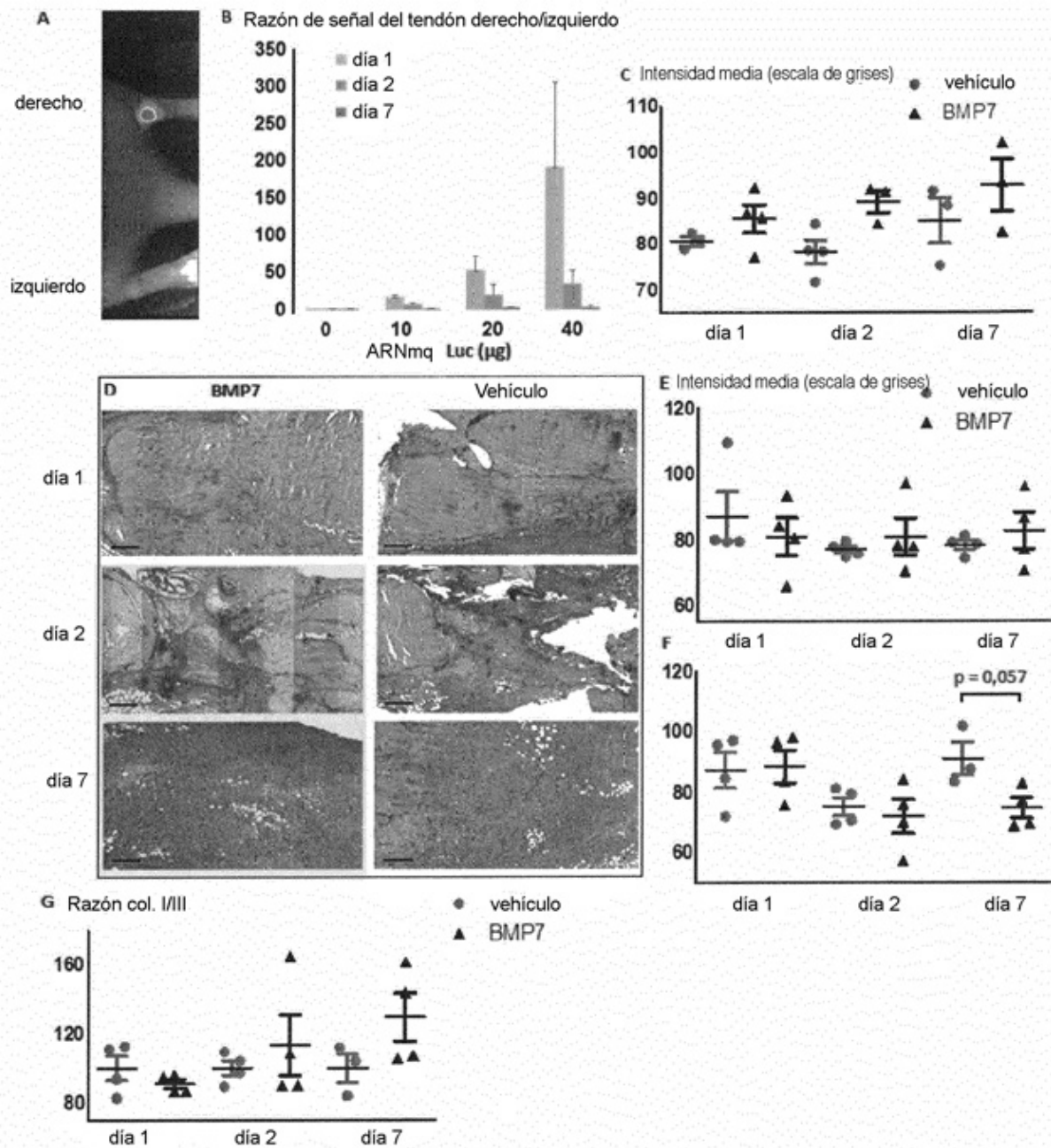


Figura 16

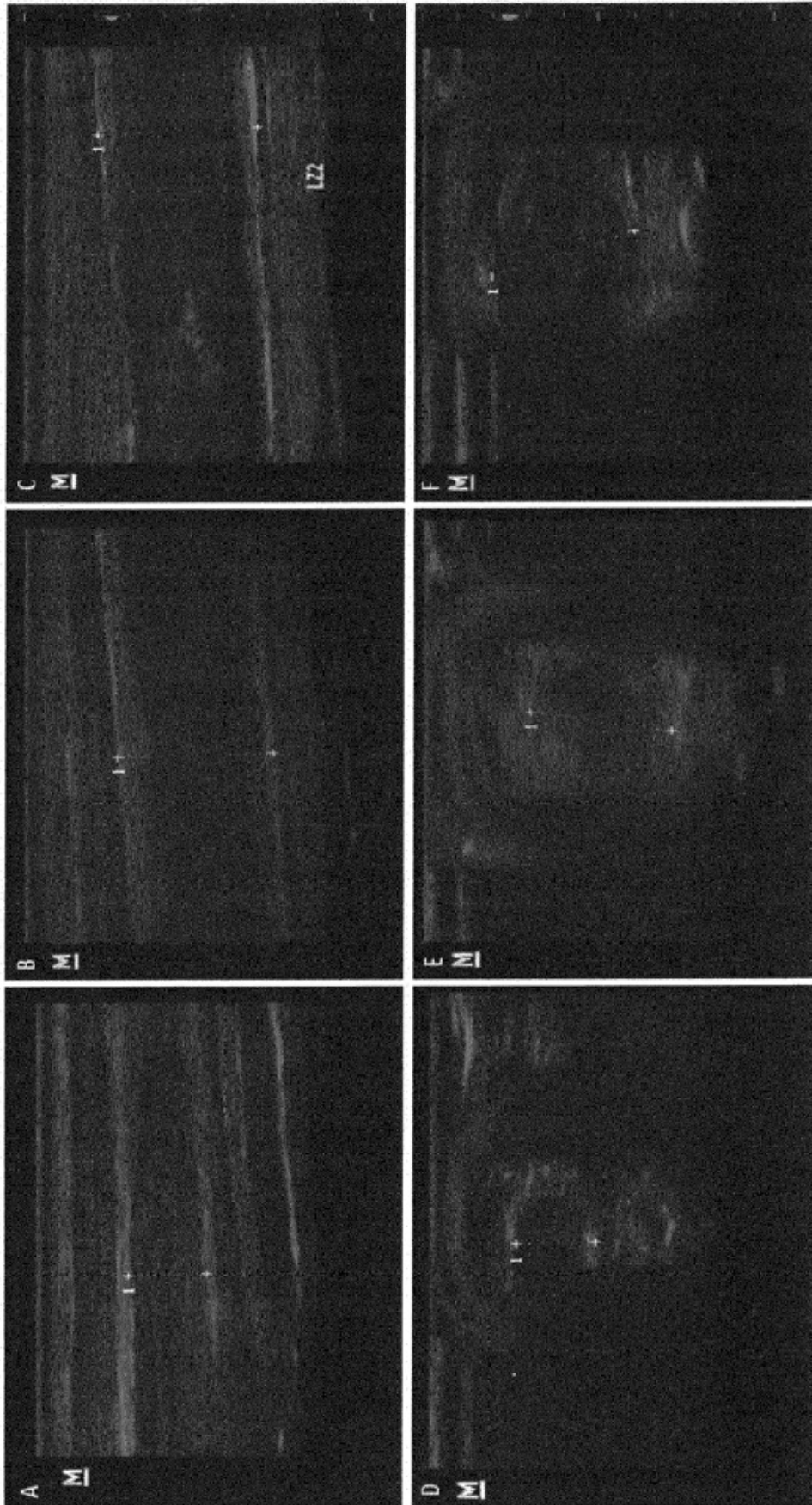


Figura 17

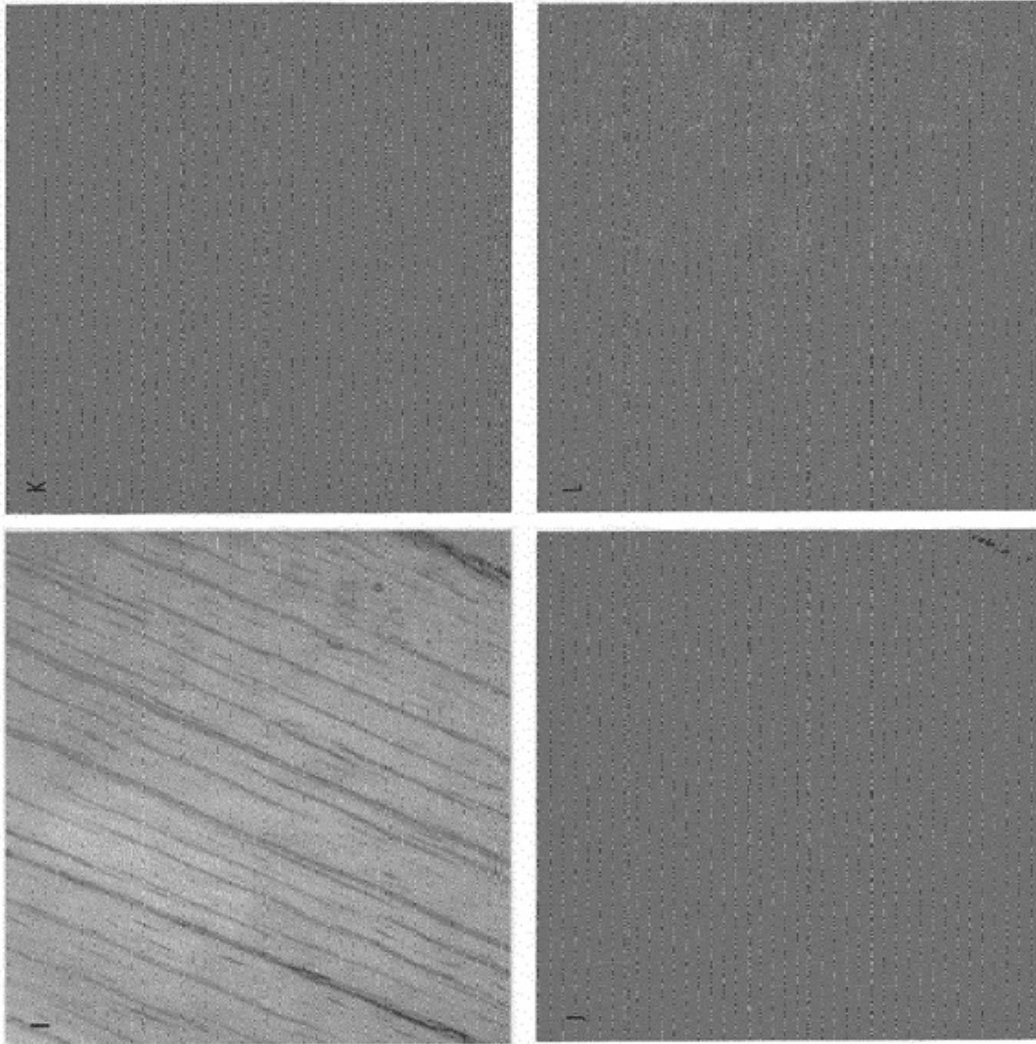
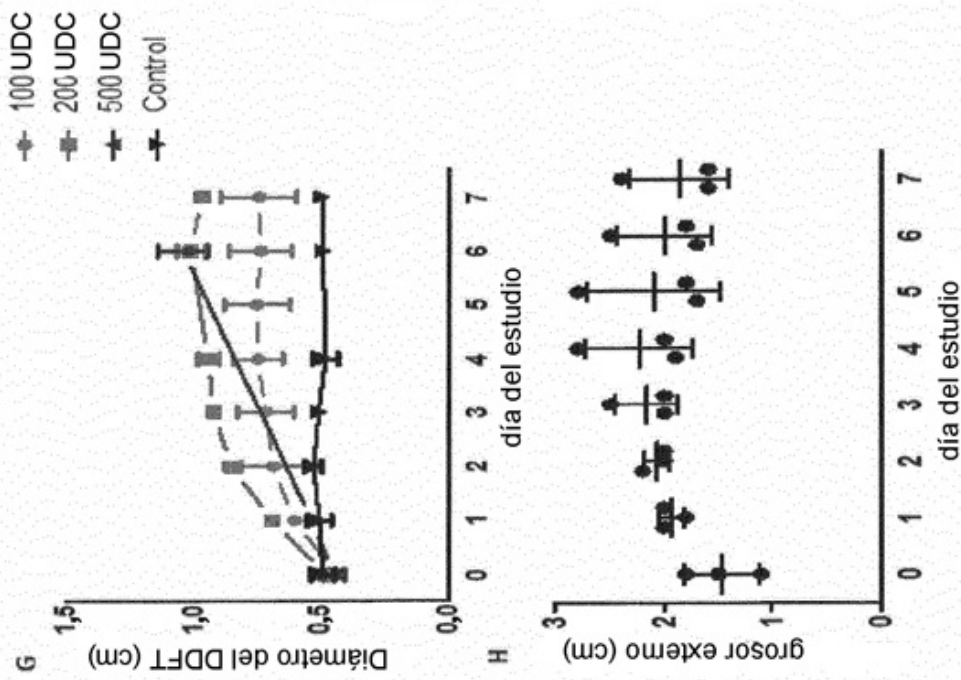


Figura 17 cont.

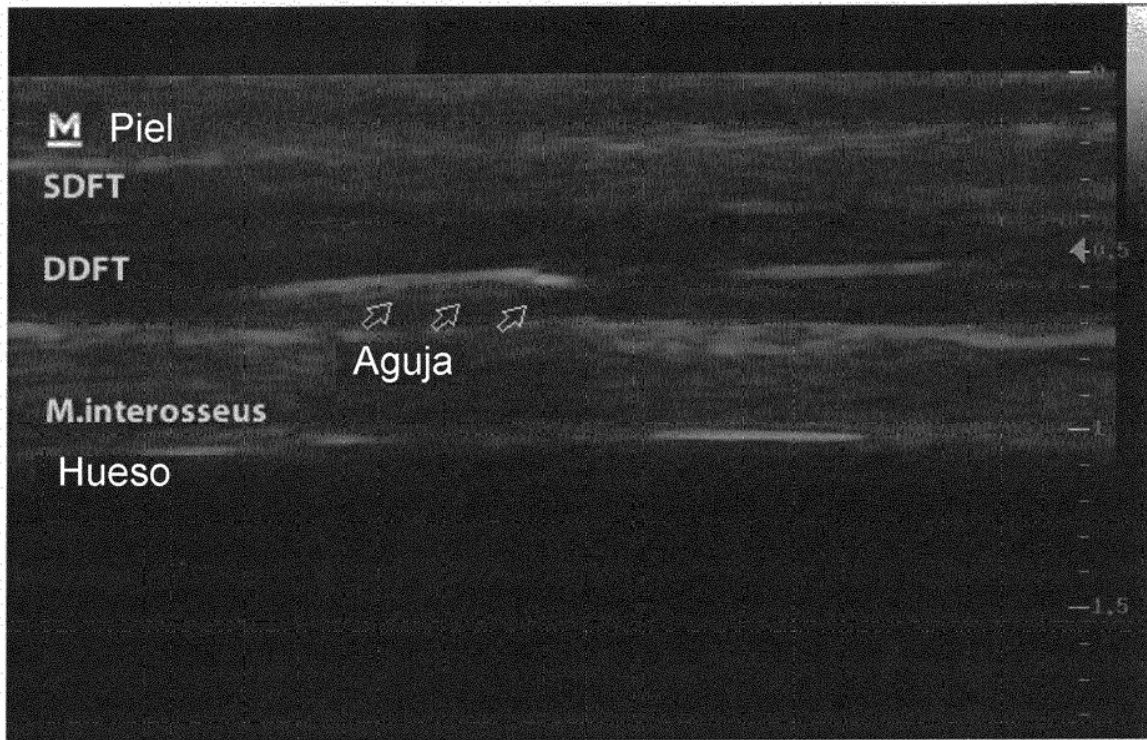


Figura 18

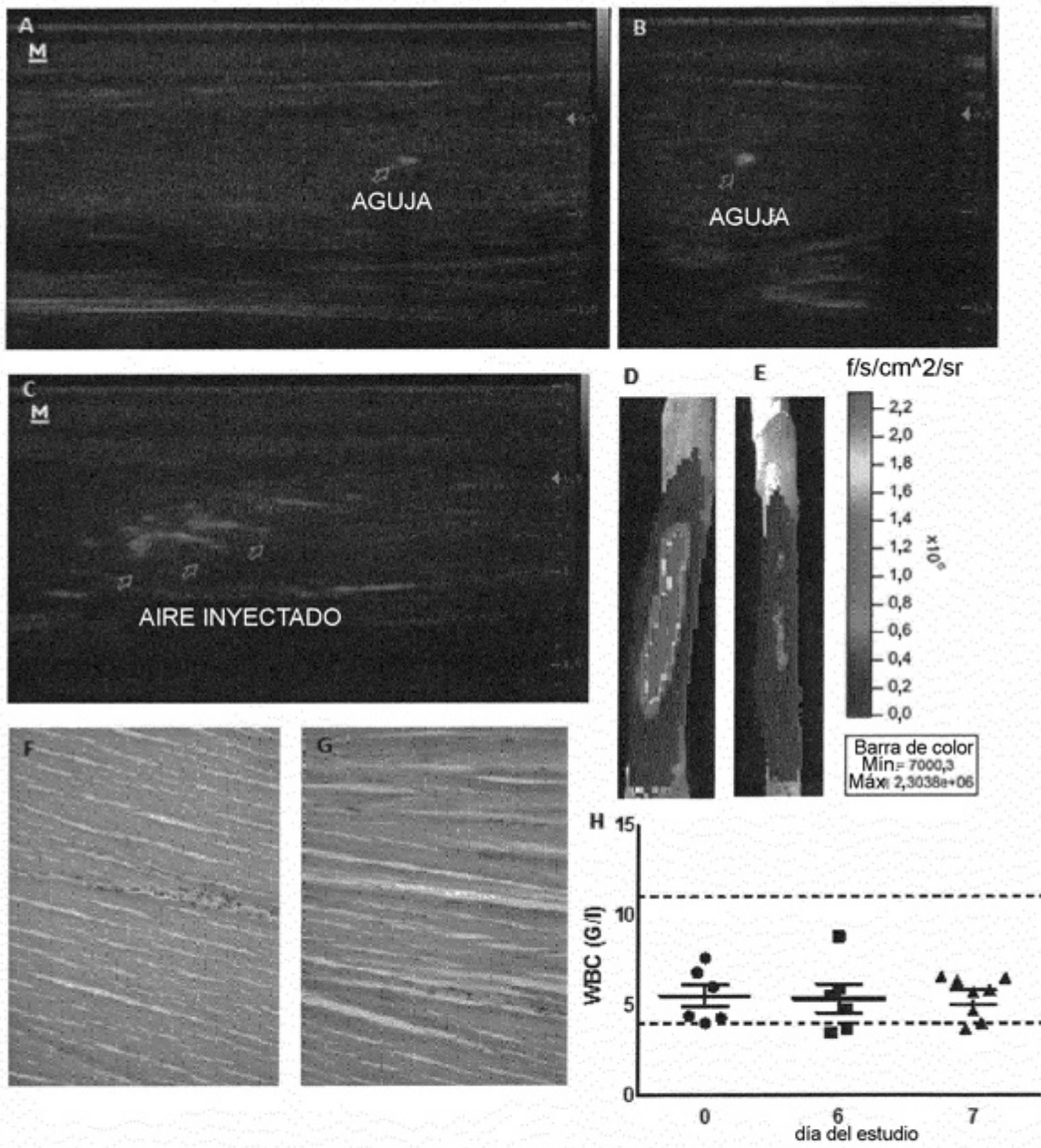


Figura 19

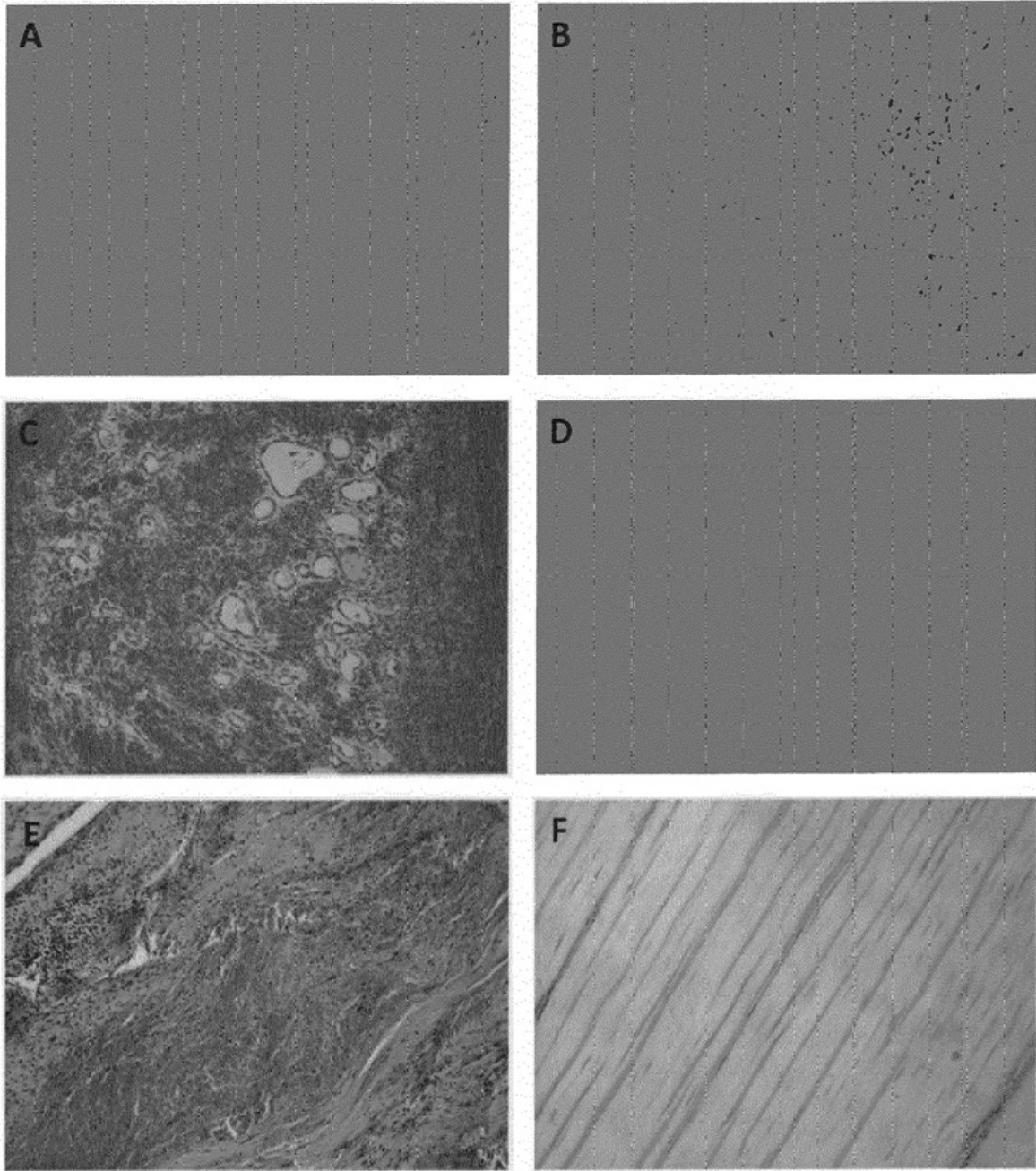


Figura 20