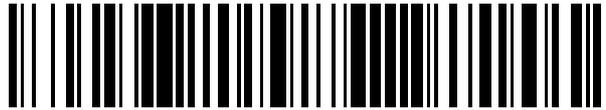


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 107**

21 Número de solicitud: 201630565

51 Int. Cl.:

A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.09.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**GARCIA FUENTES, Marcos;
MARTINEZ LEDO, Adriana y
VIDAL FIGUEROA, Anxo**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASÁNCHEZ, Susana

54 Título: **Andamio biodegradable que comprende ARN mensajero**

57 Resumen:

Andamio biodegradable que comprende ARN mensajero. Esta invención se refiere a un andamio biodegradable que comprende ARN mensajero. Más particularmente, se refiere al andamio, el método de preparación y el uso de los mismos. Un andamio biodegradable comprende un polímero biodegradable, un mRNA aislado que codifica un factor de transcripción y agentes de transfección.

ES 2 584 107 A1

DESCRIPCIÓN

Andamio biodegradable que comprende ARN mensajero

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un andamio biodegradable que comprende ARN mensajero.

5 Más particularmente, se refiere al andamio, el método de preparación y uso de los mismos.

Antecedentes de la invención

Los factores de transcripción (TFs) son proteínas capaces de inducir grandes cambios en la expresión génica (Graf, 2009, Nature 462, 587-594). Dado que el transporte intracelular de

10 proteínas es un gran desafío, una de las principales preocupaciones es cómo ceder estos TFs a su lugar de acción en el interior del núcleo y la forma de integrar estas tecnologías de cesión en sistemas de ingeniería de tejidos o dispositivos implantables. Para estas aplicaciones, por lo general la cesión se realiza a través de la terapia génica, usando andamios activados con vectores virales. Sin embargo, usar un vector viral puede causar

15 problemas de seguridad, incluyendo reacciones inmunes peligrosas y la supresión inmune de los vectores virales. La activación de andamios con ADN plasmídico (pDNA) también es posible (Fang, 1996, PNAS 93, 5753-5758), pero la eficacia de transfección es baja. Los andamios también han sido activados con otros oligonucleótidos tales como microRNA y siRNA, pero estas moléculas sólo pueden producir la inhibición de la expresión génica, y

20 no la expresión forzada de la proteína (Andersen et al., 2010, Mol Ther 18, 2018-2027). Además, estas estrategias tienen todavía dificultades, especialmente en el caso de la transfección *in vivo* realizada en andamios de tejido.

Publicaciones recientes han demostrado que el ARN mensajero (mRNA) puede inducir la expresión forzada de la proteína, y se han aplicado para la codificación de los factores de

25 crecimiento. Así, Lui *et al.* usaron mRNA para la codificación del factor de crecimiento VEGF para la vascularización de tejido, e implantaron esta terapia junto con las células en un andamio de proteína tumoral comercial (Matrigel[®]) (Lui, 2013, Cell Research 23, 1172-1186). Sin embargo, esta tecnología no se puede aplicar en terapia ya que Matrigel se basa en las proteínas tumorales.

Por otro lado, Balmayor *et al.* han cedido un mRNA que codifica para factores de crecimiento a un defecto de fémur en un modelo de rata con buenos resultados (Balmayor, 2016, *Biomaterials* 87, 131–146).

5 Sin embargo, todavía hay una necesidad de proporcionar tecnologías para la cesión de mRNAs, y más específicamente mRNAs que codifican para factores de transcripción que son proteínas intracelulares estrictamente reguladas, con una vida media muy corta. Los mRNAs deben de seguir siendo eficaces tras su cesión, y conseguir una transfección en el entorno tridimensional, que por lo general muestra una eficiencia más baja que en 2D. Estos dispositivos deben ser capaces de producir un efecto biológico claro inducido por la
10 sobreexpresión del factor de transcripción. Este efecto podría ser medido por una sobreexpresión del propio factor de transcripción, pero incluso más importante, de otros genes objetivo regulados por dicho factor de crecimiento. Además, la estructura 3D del andamio debe ser capaz de albergar células adheridas y, si es necesario, permitir su proliferación.

15

Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un andamio biodegradable que está activado con secuencias de mRNA que codifican para factores de transcripción. Este andamio biodegradable puede conducir a la expresión forzada pronunciada del factor de transcripción, mayor que la conseguida con ADN plasmídico. También hemos confirmado
20 que esta expresión forzada de un factor de transcripción induce cambios en los niveles de expresión de otros genes, indicando un claro efecto biológico. Además, este andamio tiene la ventaja de evitar problemas de seguridad, en particular evita vectores virales.

Así, un aspecto de la invención se refiere a un andamio biodegradable que comprende un
25 polímero biodegradable, un mRNA aislado que codifica para un factor de transcripción y un agente de transfección.

Otro aspecto de la invención se refiere a un andamio biodegradable de la invención para uso como medicamento. En una realización particular, el andamio biodegradable de la invención es para uso en tejidos u órganos de terapia regenerativa, preferiblemente el
30 tejido es cartílago, músculo o tejido nervioso. En otra realización particular, el andamio biodegradable de la invención es para uso en el tratamiento de un defecto de cartílago, daño muscular o daño en el tejido nervioso.

En otra realización particular, la invención se refiere al uso del andamio biodegradable de la invención para preparar un medicamento. En otra realización particular, la invención se refiere al uso del andamio biodegradable de la invención para preparar un medicamento para uso en tejidos u órganos en terapia regenerativa, preferiblemente el tejido es cartílago, músculo o tejido nervioso. En otra realización particular, la invención se refiere al uso de del andamio biodegradable de la invención para preparar un medicamento para el uso en el tratamiento de un defecto de cartílago, daño muscular o daño del tejido nervioso.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el andamio biodegradable de la invención descrito previamente.

10 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición cosmética que comprende el andamio biodegradable de la invención descrito previamente.

Un aspecto más de la invención se refiere a un método para preparar el andamio biodegradable descrito antes, que comprende

- 15 (i) mezclar un polímero biodegradable, un mRNA aislado que codifica un factor de transcripción y un agente de transfección, opcionalmente adicionar células seleccionadas del grupo que consiste en células primarias y líneas de células inmortalizadas,
- (ii) incubar la mezcla preparada en (i),
- (iii) inducir la coagulación de la mezcla preparada en (ii).

20

Descripción detallada de las figuras

Figura 1: (A) Estructura del vector plásmidico usado para la transcripción in vitro del mRNA que codifica para la proteína fluorescente YFP. (B) Imagen de fluorescencia de las células U87MG, 24 h después de la transfección con mRNA codificante de YFP usando lipofectamina 2000 (imagen de la derecha). El experimento se realizó en una placa de 24 pocillos. Como referencia se muestra una imagen de luz transmitida de las mismas células (imagen izquierda).

30 Figura 2: (A) Un diagrama ilustrando los andamiajes, las células y el mRNA con un agente de transfección se muestra en la Figura 2A. (B) Las imágenes de microscopía óptica de las células madre mesenquimales humanas cultivadas en andamiajes activados con complejos de 3DFectIN/mRNA. Los andamiajes se prepararon a dos concentraciones de fibrina (2 y 4

mg/mL). (C) Imagen de fluorescencia de andamiajes activados con plásmido, en complejos 3DFectIN/pDNA. Tres proporciones 3DFectIN/pDNA fueron probadas: 2: 1, 3: 1 y 4: 1. El pDNA se marcó con SYBERGold para su observación por microscopía de fluorescencia.

5

Figura 3: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de andamiajes de fibrina (2 mg/mL), tanto sin células (Control) o con células (Sembrado) y a diferentes aumentos. Las barras de escala se integran en cada imagen y se referencian en el lateral.

10 Figura 4: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de andamiajes de fibrina (4 mg/mL), tanto sin células (Control) o con células (Sembrado) y a diferentes aumentos. Las barras de escala se integran en cada imagen y se referencian en el lateral.

15 Figura 5: Andamiajes biodegradables preparados a partir de alginato y poliarginina. A la izquierda, la imagen macroscópica de los geles formados en la parte inferior cónica de tubos Eppendorf, manteniéndose en su posición tras la inversión del tubo. A la derecha, las imágenes de microscopía óptica de dos ejemplo representativos de estos andamiajes sembrados con células U87MG.

20 Figura 6: Transfección de células U87MG en andamiajes de fibrina activados con mRNA (2 µg mRNA, relación 3DFectIN/mRNA 4:1). Se utilizó un mRNA codificante de YFP. La transfección de las células se evaluó a las 24 h, 48 h, 72 h y a los 5 días. Cada panel muestra como referencia imágenes de luz transmitida (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de la misma área.

25

Figura 7: Transfección de células U87MG en andamiajes de fibrina activados con mRNA (1 µg de mRNA, relación 3DFectIN/mRNA 3:1). Se utilizó un mRNA codificante de YFP. La transfección de las células se evaluó a las 24 h, 48 h, 72 h y a los 5 días. Cada panel muestra como referencia imágenes de luz transmitida (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de la misma área.

30

Figura 8: Transfección de células U87MG en andamiajes de fibrina activados con mRNA (1 µg de ARNm, relación 3DFectIN/mRNA 2:1). Se utilizó un mRNA codificante de YFP.

La transfección de las células se evaluó a las 24 h, 48 h y a los 5 días. Cada panel muestra como referencia imágenes de luz transmitida (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de la misma área.

5 Figura 9: Transfección de células U87MG en andamiajes de fibrina activados con pDNA (1 μ g pDNA, relación 3DFectIN/pDNA 3:1). Se utilizó un pDNA codificante de YFP. La transfección de las células se evaluó a las 48 h y a los 5 días. Cada panel muestra como referencia imágenes de luz transmitida (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de la misma área.

10

Figura 10: Estudio de citotoxicidad con células U87MG cultivadas en andamiajes de fibrina (4 mg/mL de fibrina) activados con complejos 3DFectIN/mRNA en relaciones 2: 1 y 3: 1. Andamiajes no activados fueron utilizados como control (etiquetado "C" en la figura). La citotoxicidad de los andamiajes se midió mediante un ensayo de MTT a las 24 h (A) y 48 h (B). (C) La capacidad de los andamiajes de fibrina activados con 3DFectin/mRNA para soportar la proliferación celular se confirmó mediante la cuantificación de la cantidad de DNA en el cultivo a las 0, 3 y 7, medido mediante un ensayo de PicoGreen.

15

20 Figura 11: (A) Transfección de células madre mesenquimales humanas (hMSCs) en los andamiajes de fibrina activados con complejos de mRNA a las 24 h (1 μ g de mRNA, relación de 3DFectIN/mRNA 3: 1). Se utilizó mRNA codificante de YFP. La transfección de las células se evaluó en andamiajes preparados a partir de soluciones de fibrina de 2 y 4 mg/mL. Cada panel muestra la imagen de fluorescencia a la izquierda, y como referencia, la imagen de luz transmitida de la misma zona a la derecha. (B) Estudio de la citotoxicidad de hMSC cultivadas en andamiajes de fibrina (2 o 4 mg / ml de fibrina) activados con mRNA (relación 3DFectIN/mRNA 3:1). Andamiajes no activados se utilizaron como control (etiquetado "C" en la figura). La citotoxicidad de los andamiajes se midió mediante un ensayo de MTT a las 24 h y 48 h. (C) La capacidad de los andamiajes activados con mRNA (2 y 4 mg / ml de fibrina) para soportar la proliferación celular se confirmó mediante la cuantificación de la masa de ADN en el cultivo a 0, 3, 7 y 10 semanas, medido mediante un ensayo PicoGreen. En cada gráfico, la proliferación en el andamiaje activado

25

30

con mRNA ("Tratamiento") se compara con los mismos andamiajes sin complejos 3DFectIN/mRNA ("Control").

Figura 12: (A) Estructura del vector plasmídico usado para la transcripción in vitro de mRNA codificante del factor de transcripción SOX9. (B) Después de la transfección de células HEK293 con este mRNA y con lipofectamina, la expresión de SOX9 fue evaluada por mediante extracción de las proteínas a las 12 y 24 h y la realización de un western blot. Células no transfectadas se utilizaron como control negativo (C-). Las células transfectadas con pDNA codificante de SOX9 se utilizaron como control positivo (C+). La proteína α -tubulina se utilizó como referencia en el western blot.

Figura 13: (A) Expresión relativa de Sox9 24 h después de la transfección de la línea celular U87MG en un andamio de fibrina (4 mg/mL) activado con mRNA o pDNA (1 μ g, relación de 3DFectIN/mRNA y 3DFectIN/pDNA de 2:1 y 3:1). Se utilizó un mRNA codificante de Sox9. La expresión relativa de Sox9 se cuantificó por análisis de RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) de células transfectadas con respecto a los genes de referencia GAPDH y β -actina. (B) Una réplica del experimento anterior de expresión de Sox9 a las 24 h post-transfección en U87MG, pero focalizado en los andamiajes de fibrina activados con mRNA o pDNA (1 μ g) con proporción 3:1. (C) El mismo estudio comparativo del panel (B), pero realizado en células madre mesenquimales humanas.

Figura 14: Cinética de expresión de mRNA de Sox9 tras la transfección de hMSCs en andamiajes de fibrina de (A) 2 mg/mL y (B) 4 mg/mL. Los andamiajes fueron activados con 3DFectIN/mRNA o 3DFectIN/pDNA (1 μ g, proporción 3:1). Se utilizó un mRNA codificante de Sox9. La expresión génica se midió después de 12, 24 y 48 h.

Figura 15: Expresión génica relativa de marcadores de diferenciación condrogénica en hMSC transfectadas en andamiajes de fibrina (4 mg/mL) activados con mRNA o pDNA, o no activados ("C"). Los andamiajes se cultivaron durante 21 días en medio condrogénico incompleto (ICM) o medio condrogénico completo (CCM). La expresión génica relativa de los marcadores (A) Sox9 (A) y (B) agrecano (ACAN) fue medida en estas condiciones tras los 21 días de cultivo.

Figura 16: Expresión génica relativa de los marcadores de diferenciación condrogénica en hMSC transfectadas en andamiajes de fibrina (2 mg/mL y 4 mg/ mL) activados con mRNA, pDNA o no activados (“C”). Los andamiajes fueron cultivados por 28 días en medio condrogénico incompleto (ICM) o medio condrogénico completo (CCM). La expresión génica relativa de los marcadores (A) Sox9 (A) y (B) agrecano (ACAN) fue medida en estas condiciones tras los 28 días de cultivo.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un andamio biodegradable que comprende un polímero biodegradable, un mRNA aislado que codifica un factor de transcripción y un agente de transfección.

Los andamios de la invención tienen la ventaja de que son biocompatibles y no ejercen importante toxicidad a células residentes (ejemplo 4 y figura 10). Además, los andamios de la invención pueden soportar proliferación celular (ejemplo 4) y pueden conducir a elevados niveles de expresión forzada de los factores de transcripción por las células (ejemplo 7, figura 13); incluso la transfección fue efectiva en células mesenquimales humanas (ejemplo 5 y figura 11).

Los andamios de la invención activados con mRNA codificando SOX9 son capaces de conseguir la transfección en un entorno tridimensional, y lograr una expresión significativa de SOX9 en U87MG y también en células humanas mesenquimales (hMSCs). Esta expresión es mucho más elevada que la obtenida cuando se empleó un ADN plasmídico (pDNA) (ejemplo 6, figuras 13A y 13C).

Además, hemos confirmado que los andamios de la invención activados con mRNA pueden modificar el perfil de expresión génica de las células residentes, conduciendo *per se* a la diferenciación de hMSCs hacia un linaje condrogénico (ejemplos 8 y 9).

“Andamio” significa una estructura temporal usada para sostener células en tres dimensiones, mientras reconstruyen un tejido u órgano o realizan otras funciones biológicas. Andamios de tejidos están ampliamente descritos en la bibliografía, y pueden tener dos posibles estructuras, o estructuras intermedias entre extremos: (i) una estructura sólida en forma de matriz que tiene poros interconectados suficientemente grandes (>50 μ m) para permitir penetración celular y hospedaje o (ii) una estructura de hidrogel donde las células pueden ser encapsuladas. Los andamios de la invención son biodegradables y así adecuados para ser reemplazados por tejido natural.

El término “biocompatibilidad” se entiende que se refiere a la capacidad de un material para llevar a cabo con una apropiada respuesta en su hospedador en una situación específica. Para que se considere biocompatible, un dispositivo debería de cumplir con ISO 10993 o un standard similar, y ser testado en animales y en ensayos clínicos.

5 Los materiales que son susceptibles para la preparación de los andamios de la invención, que son biocompatibles y biodegradables y están bien descritos en la bibliografía, se pueden clasificar en materiales inorgánicos, polímeros degradables enzimáticamente y polímeros degradables hidrolíticamente. Ejemplos de materiales inorgánicos biodegradables son, pero no se limitan a, materiales cerámicos tales como apatitas, por
10 ejemplo de hidroxiapatita, y el silicio poroso. Preferiblemente, el material utilizado debe estar libre de residuos de patógenos de origen animal o humano.

“Biodegradable” en relación a la presente invención significa que el material es completamente reabsorbido cuando está en el entorno de un organismo después de 24 horas.

15 “Polímero biodegradable” significa un polímero que se reabsorbe completamente tras la implantación después de 24 horas, y que es adecuado para acomodar o para el crecimiento de células. Preferiblemente, el polímero biodegradable está libre de materiales patogénicos y/o no deriva de muestras patogénicas. Los polímeros biodegradables en esta invención pueden ser polímeros degradables enzimáticamente y polímeros degradables
20 hidrolíticamente. Polímeros degradables enzimáticamente como se entiende en la presente invención son, por ejemplo, colágeno, elastina, péptidos tipo-elastina, albúmina, fibrina, fibroína de seda, quitosano, alginato, ácido hialurónico y sulfato de condroitina. Polímeros degradables hidrolíticamente como se entiende en la presente invención son, por ejemplo poliésteres, poliuretanos, poli(éster amida), poli(orto ésteres), polianhídridos, poli(anhidro-
25 co-imida), polianhídridos entrecruzados, poli(propilénfumarato), poli(pseudoaminoácidos), poli(alquil cianocrilatos), polifosfacenos, polifosfoésteres. Ejemplos de poliésteres útiles comprenden, pero no están limitados a, poliglicólico, poliláctico, poli(láctico-co-glicólico), polidioxanona, policaprolactona y poli(trimetilen carbonato).

En una realización preferida de la invención el polímero biodegradable se selecciona de
30 fibrina, alginato y mezclas de los mismos.

“mRNA aislado” se entiende como una molécula polimérica hecha de ácidos nucleicos capaces de ser traducido en los ribosomas a una secuencia específica de aminoácidos, y por lo tanto, para expresar una o más proteínas, que ha sido aislado por procedimientos

técnicos de un medio biológico o se ha sintetizado anteriormente para ser utilizado en el andamio de la presente invención. Este término también incluye mRNA que puede estar modificado químicamente. Algunos ejemplos de modificaciones químicas de ácidos nucleicos de ARNm, pero no limitado, son: 5-metil-citidina, 2-tio-uridina, 5-methoxyuridine, N-1-metilpseudo-uridina y pseudo-uridina.

El término “ARN mensajero” (“mRNA”) se entiende como una molécula polimérica hecha de ácidos nucleicos capaces de ser traducido en los ribosomas a una secuencia específica de aminoácidos, y por lo tanto, para expresar una o más proteínas. En el contexto de esta invención, el mRNA está codificando al menos para un factor de transcripción (TF).

Preferiblemente, el mRNA empleado en esta invención está optimizado para la traducción en células eucariotas. Preferiblemente, el mRNA empleado en esta invención se sintetiza para un propósito específico y con secuencias específicas. Por lo tanto, conjuntos de mRNA extraídos de organismos vivos naturales, no manipulados o partes de ellos no son preferidos para la presente invención.

Aunque no se limita a estos procedimientos, el mRNA de la invención preferentemente se sintetiza mediante reacciones de transcripción in vitro, a partir de un molde de plásmido, o alternativamente, mediante síntesis química en fase sólida.

Aunque no se limita a las estructuras descritas a continuación, la eficacia de la invención se beneficia de la utilización de mRNA con alta traducibilidad. Las características estructurales del mRNA como un 5' Cap, una cola 3' poliadenina son algunas de las más importantes para asegurar la elevada capacidad de traducción. Además, un tramo corto 3' de oligouridina también es potencialmente útil. Otras estructuras que podrían mejorar la traducción del mRNA son regiones no traducidas, que podrían estar situadas en el 5' y / o en el extremo 3' en relación con la región de codificación.

Por lo tanto, una realización particular de la invención está dirigida a un mRNA que tiene un 5'-Cap. Otra realización particular se refiere a un mRNA que tiene una cola poliadenina. Otra realización particular de la invención está dirigida a un mRNA que tiene una región no traducida 5'. Y otra realización particular se refiere a un mRNA que tiene una región no traducida 3'.

Las secuencias de mRNA pueden generar inmunidad celular, así, para la presente invención es preferido que algunos de los ácidos nucleicos estén modificados químicamente para reducir su reconocimiento inmune. Una realización particular de la invención se dirige a un mRNA que tiene ácidos nucleicos químicamente modificados

seleccionados de la lista que consiste en 5-metil-citidina, 2-tio-uridina, 5-metoxiuridina, N1-metilpseudo-uridina y pseudo-uridina.

El término "factor de transcripción" ("TF") significa una proteína que se une a secuencias específicas de DNA, controlando de este modo la tasa de transcripción de la información genética del DNA al mRNA. A veces los TFs también se llaman "trans-activadores" en bibliografía, siendo ambos términos sinónimos. Los TFs para la presente invención preferiblemente tienen uno o más dominios de unión al DNA. Los TFs han sido clasificados por su superclase en: (1) dominios básicos, (2) dominios de unión al DNA zinc-coordinados, (3) hélice-giro-hélice, (4) factores con estructura beta y contactos en la hendidura menor, (5) otros factores de transcripción. Varias revisiones de la función y la estructura de TF están disponibles en la literatura (Latchman, 1997, *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1305–1312).

La base de datos de descriptores Medical Subject Headings (MeSH) identifica TFs mediante los tres números D12.776.930. Hay varias bases de datos de TF disponibles para buscar secuencias y funciones de TFs, por ejemplo, JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>).

En una realización preferida de la invención, el mRNA codifica para un factor de transcripción condrogénico.

En una realización preferida de la invención, los TFs codificados activan programas genéticos responsables de la diferenciación celular o desdiferenciación. En una realización preferida de la invención, el mRNA codifica para un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en SOX9, MyoD, NeuroD1, c-Myc, Klf4, Nanog, Oct4, SOX2, C/EBP- β , PPAR- γ , Brn2, Lmx1a, Nurr1, Mash1, Myt1l y NeuroG2. En una realización más preferida de la invención, el mRNA codifica para los factores de transcripción seleccionado de SOX9, MyoD, NeuroD1, SOX2, Oct4, Klf4 y c-Myc. En una realización más preferida de la invención, el TF es SOX9.

El término "agente de transfección" se entiende como un compuesto capaz de mejorar la cesión de la secuencia de ARN mensajero (mRNA) al citoplasma. Así, la presencia de un agente de transfección se evidencia por un incremento marcado de la expresión de proteína. El agente de transfección, también llamado sistema de cesión de genes, vehículo de cesión de genes, o matrices activadas de genes, han sido descritos en muchas publicaciones (Borrajo, 2015, In: *Polymers in Regenerative Medicine*, 285-336).

Los agentes de transfección pueden estar hechos de materiales inorgánicos, materiales lipídicos y materiales poliméricos. Aunque no está limitado a estos, una posible lista de

agentes de transfección inorgánicos son sales de fosfato cálcico y nanopartículas de silicio catiónicas.

Agentes de transfección lipídicos se pueden clasificar en lípidos condensantes y no condensantes, siendo los condensantes frecuentemente denominados lipoplejos. Los lípidos no condensantes son emulsiones, nanoemulsiones y liposomas que pueden encapsular el material genético. Los lipoplejos se forman mediante lípidos con una cadena alifática y uno o varios grupos catiónicos. Aunque no está necesariamente limitado a estos, a menudo estos grupos catiónicos son aminas primarias, secundarias o terciarias, o estructuras con una mezcla de estas. La carga neta de los lípidos en los lipoplejos deberían de ser positivos a pH fisiológico, como medida de su potencial zeta, y deberían de ser capaces de unirse a material genético mediante fuerzas electrostáticas.

Agentes de transfección poliméricos también se pueden clasificar como condensantes y no condensantes. Los no condensantes generalmente se unen a material genético mediante alguna técnica de encapsulación o a través de fuerzas débiles.

Los vehículos poliméricos condensantes están formados por polímeros que muestran una carga neta positiva a pH fisiológico, como medida del potencial zeta, y que se pueden unir al material genético, mediante fuerzas electrostáticas.

En una realización preferida de la invención, el agente de transfección se selecciona de entre lípidos catiónicos, polímeros catiónicos, y una sal de fosfato cálcico.

En una realización preferida de la invención, el agente de transfección es un agente condensante lipídico. En una realización más preferida de la invención, el agente condensante lipídico es Lipofectamina o 3DFectin.

En una realización preferida de la invención, el agente de transfección es un agente condensante polimérico. En una realización más preferida de esta invención, el agente polimérico condensante es poliarginina. En otra realización más preferida de la invención, el agente polimérico condensante es poloxamina. En otra realización más preferida de la invención, agente polimérico condensante es un polifosfaceno catiónico.

En una realización particular de la invención, el anadámico biodegradable comprende además células. Aunque una variedad de células se podría beneficiar de la capacidad de esta invención para ejercer control sobre sus funciones, las células primarias son de primer interés. Entre ellas, células progenitoras con alta plasticidad tales como células madre adultas y células madre pluripotentes inducidas podrían ser los mejores candidatos para ser

incluidos a esta invención. Estas células tienen la capacidad de proliferar y pueden recapitular diferentes vías de diferenciación. Las células incorporadas al andamiaje de la invención, pueden proliferar y formar estructuras biológicas en forma 3D incluyendo tejidos en estos andamios.

- 5 En una realización particular, las células se seleccionan del grupo que consiste en células primarias y líneas celulares inmortalizadas. En una realización particular, las células no son células madre embrionarias. En una realización preferida, el andamio de la invención es clínicamente útil ya que es biodegradable y biocompatible.

En una realización más preferida de la invención, las células primarias son células progenitoras. En una realización más preferida de la invención, las células primarias son 10 células madre adultas o células madre pluripotentes inducidas. En una realización preferida de la invención, las células madre adultas son células madre mesenquimales.

En otra realización preferida de la invención, las células primarias son fibroblastos o condrocitos.

- 15 En otra realización, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un andamio como se describe arriba.

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende además vehículos farmacéuticamente aceptables.

En otra realización particular, la composición farmacéutica comprende además al menos 20 un ingrediente farmacéutico activo adicional. Así, otros fármacos o compuestos se pueden incorporar a las composiciones para mejorar su actuación o mejorar su presentación para el uso final. En una realización preferida, el ingrediente activo adicional se selecciona de fármacos, como por ejemplo antibióticos, inmunosupresores, anti-inflamatorios, de biológicos como por ejemplo factores de crecimiento, citoquinas, morfógenos, proteínas, 25 polisacáridos de la matriz extracelular; de compuestos para modificar las propiedades mecánicas y de gelificación de los andamios como por ejemplo agentes de entrecruzamiento adicionales.

En otra realización particular, la composición farmacéutica es una solución inyectable, suspensión, hidrogel o una matriz porosa sólida.

- 30 En otra realización particular, la composición farmacéutica es para uso como vacuna.

En otra realización particular, la invención se refiere a un método para preparar el andamio de la invención como se describe arriba, que comprende:

(i) Mezclar un polímero biodegradable, un mRNA aislado que codifica para un factor de transcripción y un agente de transfección, y opcionalmente células seleccionadas de entre el grupo que consiste en células primarias y líneas celulares inmortalizadas,

- 5 (ii) Incubar la mezcla preparada en (i),
(iii) Inducir la coagulación de la mezcla preparada en (ii).

En otra realización particular, la invención se refiere a un método alternativo para preparar el andamio de la invención como se describe arriba, que comprende:

- (i) Preparar un andamio,
10 (ii) Mezclar un mRNA aislado que codifica para un agente de transcripción y un agente de transfección,
(iii) Incubar la mezcla preparada en (ii) sobre el andamio preparado en (i), y opcionalmente añadir células.

En una realización particular, el polímero biodegradable se selecciona de fibrina, alginato
15 y mezclas de los mismos. En una realización preferida, la concentración de fibrina es de entre 1 mg/mL y 5 mg/mL. En una realización más preferida, la concentración de fibrina es de entre 2 mg/mL y 4 mg/mL.

En una realización particular, la coagulación de la etapa (iii), se lleva a cabo mediante la adición de un agente de coagulación. En una realización preferida, el agente de
20 coagulación se selecciona de trombina, sal cálcica y sal de polifosfato.

En una realización particular de la invención, cuando la trombina se usa como agente de coagulación, el rango de trombina que se usa está entre 0.2 U y 1.2 U por mg del fibrinógeno usado.

En el método alternativo, la interacción del andamio y el mRNA/agente de transfección en
25 la etapa (iii) puede ser reforzada mediante secado o liofilización del sistema.

En otra realización, la invención se refiere a un andamio biodegradable obtenido por el método descrito arriba.

En otra realización, la invención se refiere al uso de un andamio de la invención, como un reactivo de diferenciación in vitro o como implante cosmético.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un andamio biodegradable como se describe arriba como dispositivo para la regeneración de tejido y órganos. En una realización preferida de la invención, el andamio biodegradable se usa como dispositivo para regeneración de cartílago.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un andamio biodegradable definido arriba para propósitos cosméticos.

Un último aspecto de la invención se refiere al uso de un andamio biodegradable como se define arriba como un fármaco para prevenir, paliar o curar enfermedades.

5

A continuación se describen algunos ejemplos ilustrativos de la invención; sin embargo, no deben de ser consideradas como limitaciones impuestas a la misma.

10 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Síntesis de mRNA codificante de la proteína fluorescente YFP: Un plásmido para la transcripción in vitro de mRNA fue diseñado basado en el plásmido pBluescript KS (pBSK
 15 KS, Stratagene, EE.UU.), con un promotor de la transcripción de T7. En este plásmido, la secuencia de YFP y una señal de poliadenilación fue clonada a partir de un plásmido pIRES YFP (Clontech, Alemania), utilizando los sitios de restricción SmaI y XhoI. El diseño correcto se verificó a través de su escisión en sitios de restricción, y análisis por ensayos de migración en gel y secuenciación. La estructura del plásmido utilizado se
 20 representa en la Figura 1A. El mRNA se sintetizó con un Cap análogo anti-reverso (ARCA) a través del kit ultra mMACHINE T7 (Ambio), siguiendo las instrucciones del fabricante. El mRNA se puede aislar por un método de extracción estándar de fenol-cloroformo. Sin embargo, se consigue una mejor reproducibilidad entre lotes de mRNA si la extracción se realiza con un tubo Pharme Lock Gel Light (5Prime, Alemania), siguiendo
 25 las instrucciones del fabricante.

Para verificar la actividad del mRNA, las células U87MG fueron transfectadas con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. las células U87MG se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 26300 células/cm² el día antes de la transfección. Los lipoplexos se prepararon a continuación en 100 µl de
 30 OptiMEM (Gibco), con 0,5 µg de mRNA y con una proporción de mRNA: lípido de 2:1; los complejos preparados se añadieron a las células. Después de 6 h de incubación, el medio con lipoplexos se eliminó y se reemplazó con medio de cultivo fresco. La presencia de células fluorescentes se verificó mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus)

24 h después de la transfección. Los resultados confirmaron que una alta fracción de las células que pueden ser observadas con luz transmitida fueron transfectadas con éxito (fig. 1B).

las células U87MG fueron cultivadas rutinariamente en medio completo, que consiste en
5 Dulbecco's Modified Eagle's Medium con alta glucosa (D5671 Sigma) suplementado con
10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina y 100 mg/L de penicilina-estreptomicina
(Sigma-Aldrich). El cultivo se mantuvo a 37 ° C y bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Un
esquema del andamiaje, las células, los mRNA y el agente de transfección se representa en
la Figura 2A; la ilustración representa un andamiaje biodegradable activado con mRNA
10 que codifica para los factores de transfección y complejado este a un agente de
transfección. La inclusión de las células en el andamiaje podría ser una opción interesante
para algunas aplicaciones, pero se considera como opcional en la presente invención.

Preparación de los andamiajes de fibrina activados con 1 o 2 µg de mRNA y 3DFectIN
como agente de transfección: En primer lugar, 1 µg o 2 µg de mRNA fueron diluidos hasta
15 25 µl en OptiMEM (para andamiajes activados con 1 o 2 µg de mRNA, respectivamente).
A continuación, esta disolución de mRNA se mezcló con otra fase de 25 µl de 3DFectin
(OZ Biosciences, Francia) en OptiMEM. Para andamiajes con 1 µg de mRNA, esta
segunda fase tenía 2, 3 o 4 µl de 3DFectIN (correspondiente a las relaciones 2:1, 3:1 o 4:1,
respectivamente) diluido hasta 25 µL en OptiMEM. Para los andamiajes con 2 µg de
20 mRNA, esta segunda fase tenía 4, 6 o 8 µl de 3DFectIN (correspondiente a las relaciones
2:1, 3:1 o 4:1, respectivamente) y diluido hasta 25 µL en OptiMEM. El mRNA y las fases
3DFectIN se mezclaron y se dejaron interactuar durante 20 minutos. Esta reacción da lugar
a 50 µL de fase 3DFectIN/mRNA.

Además de esta fase 3DFectIN/mRNA, se prepararon otras dos disoluciones. Una
25 disolución de fibrinógeno de 20 µL a 10 o 20 mg/mL se preparó para generar andamiajes
de 2 o 4 mg/mL de concentración final. Una solución de trombina de 20 µL a 12,5 U/mL
fue preparada también como reticulante del fibrinógeno. La disolución de fibrinógeno se
pipetea después en un pocillo de cultivo o en el lugar donde se pretende generar los
andamiajes. Los complejos 3DFectIN/mRNA se mezclan después con 10 µL de OptiMEM
30 y la suspensión resultante se mezcla con el fibrinógeno mediante pipeteo. A continuación,
esta fase se mezcla con una disolución de trombina para la gelificación. Después de 1 h de
incubación a 37 ° C con la trombina, todas estas posibles combinaciones de sistemas han
formado un hidrogel.

Las células se pueden integrar en esta composición, cambiando los 10 μ L de OptiMEM añadidos a los complejos de 3DFectIN/mRNA por el mismo volumen de suspensión de células en OptiMEM. Un número de $1,5 \times 10^5$ células pueden ser fácilmente incorporados en este volumen. Cuando las células van a ser cultivadas en los andamiajes, se puede
5 añadir medio celular completo a los andamiajes después de su formación, es decir, después de 1 h de incubación del fibrinógeno y la trombina a 37°C .

las células madre mesenquimales humanas (hMSC) se incorporaron a los andamiajes de fibrina activados con mRNA codificante de YFP. La observación mediante microscopia óptica muestra que hMSCs están perfectamente integradas en estas matrices en 3D, y
10 pueden ser cultivadas tanto en andamiajes de fibrina de 4 mg/mL como en andamiajes de 2 mg/mL (Figura 2B).

Andamiajes activados con ADN plasmídico (pDNA): como referencia, se prepararon también andamiajes de fibrina activados con pDNA codificante de YFP. El plásmido usado para estos experimentos era el mismo que utilizamos para la transcripción in vitro de
15 mRNA (Figura 1), ya que el plásmido pBSK KS tiene también un promotor de la transcripción eucariótica. Estos andamiajes se pueden preparar exactamente de la misma manera que los activados con mRNA, pero cambiando mRNA por la misma cantidad de pDNA. Los andamiajes activados con pDNA mostraron exactamente las mismas propiedades morfológicas y mecánicas. Esperamos que los complejos de 3DFectin/pADN
20 tendrán una distribución similar en los andamiajes a los complejos de 3DFectin/mRNA. Debido a esto, marcamos los andamiajes activados con pDNA mediante SYBRGold (Thermo Fisher Scientific, Inc.), y observamos la distribución de la fluorescencia en los andamiajes sin células (Figura 2C). La fluorescencia estuvo presente en todas las áreas del andamiaje. Sin embargo, se observó que las relaciones 2:1 3DFectin/pDNA daban lugar a
25 aglomeraciones de la fluorescencia. Esta aglomeración era menos prominente en la proporción de 3:1 y no detectable en la relación 4: 1.

Se prepararon andamiajes de fibrina (2 mg/mL y 4 mg/mL) tal como se describió anteriormente, y se cargaron con $1,5 \times 10^5$ células U87MG.

Los andamiajes de fibrina activados con mRNA se sembraron con células hMSC, y se
30 cultivaron durante una semana a 37°C con medio completo (90% de humedad, 5% de CO_2). Después de una semana, los andamiajes se liofilizaron, se metalizaron con oro-paladio al vacío, y se estudiaron por microscopía electrónica de barrido (SEM, LEO 435VP-SEM, Soluciones SEMTECH, Reino Unido). Las imágenes de SEM confirmaron

que los hidrogeles de fibrina forman una estructura altamente porosa (Figura 3 y 4). Contrariamente a nuestras expectativas, el tamaño de poro fue mayor en los hidrogeles de fibrina de 4 mg/mL que en los de 2 mg/mL. Las micrografías sugieren una estructura diferente para los andamiajes sembrados con células en comparación con andamiajes control. Esto podría estar relacionado con la contracción mecánica del andamiaje inducida por la adhesión celular y por la deposición de matriz extracelular por parte de dichas células.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe la síntesis de andamiajes de alginato activados con mRNA y dos polímeros catiónicos, poliarginina y protamina. Para los ejemplos actuales, se utilizó mRNA que codifica YFP, preparado tal como se describe en el ejemplo 1. En un primer paso, 1 o 2 µg de mRNA se mezclaron con una solución de 10 µl de poliarginina o protamina (1 o 2 mg) . La solución se dejó a interactuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 50 µl de alginato (8 o 16 mg) a esta suspensión y se mezcló. Después, se añadió a la disolución una suspensión de 10 µl con tiene 1.5×10^5 células U87MG. El sistema formó una estructura de tipo hidrogel después de la adición de 70 µl de la primera mezcla sobre 30 µl de una solución de CaCl_2 (243 o 486 mM). Los hidrogeles se estabilizan por incubación a 37 ° C, 5% de CO_2 y con un 95% de humedad durante 5 minutos. Después de este punto, se puede añadir medio completo de cultivo celular sobre los andamiajes.

Todos hidrogeles formaron estructuras estables y mecánicamente competentes, como se evidencia por pruebas de inversión de tubo (Figura 5, izquierda). Las células se integraron con éxito en los andamiajes, y pudieron ser cultivadas durante al menos cuatro días en estas estructuras (Figura 5, a la derecha).

Se comprobó que el prototipo con un 0,2% de protamina y 1,6% de alginato dio lugar a la expresión forzada de YFP.

Ejemplo 3

Se prepararon andamiajes de fibrina (4 mg /mL) activados con 3DFectIN/mRNA (1 o 2 µg de mRNA, proporciones 2:1, 3:1 y 4:1), usando un mRNA codificante de YFP según el método descrito en el ejemplo 1, pero antes de la adición de la trombina, en lugar de 10 µl de OptiMEM, se añadió el mismo volumen de este medio conteniendo 1.5×10^5 células

U87MG. Como referencia, se preparó un andamiaje de fibrina (4 mg/ mL) activado con 3DFectin/pDNA (1 µg de pDNA, relación 3:1) y con la misma concentración de células U87MG. Después de la formación de hidrogel, se añadió medio de cultivo completo y las células se cultivaron durante 5 días (37°C, 5% de CO₂), con cambios en el medio cada dos días.

La transfección celular se evaluó a través de un microscopio de fluorescencia a 24 h, 48 h, 72 h y 5 días (5 d) después de la preparación del andamiaje. Se tomaron imágenes ópticas de la misma área como referencia. Los resultados mostraron una alta transfección celular en todos los andamiajes activados con mRNA independientemente de la relación 3DFectin/mRNA y del la punto de tiempo de observación (Figuras 6-8). La transfección de los andamiajes activados con mRNA fue claramente mayor que la observada para los andamiajes activados con pDNA (Figura 9). Este resultado fue una primera indicación de que los andamiajes activados con mRNA podían lograr niveles de expresión génica forzada superiores a los obtenidos con los andamiajes activados con pADN.

15

Ejemplo 4

Se prepararon andamiajes de fibrina (4 mg/mL) activados con 3DFectIN/mRNA (1 µg de mRNA, relaciones 2:1 y 3:1) codificando YFP tal como se describe en el ejemplo 1, pero antes de añadir la trombina, en lugar de 10 µl de OptiMEM, se añadió el mismo volumen de este medio conteniendo 1.5×10^5 células U87MG. Como control negativo (C), se preparó un andamiaje no activado utilizando el mismo procedimiento, pero añadiendo sólo OptiMEM en lugar de la suspensión de 50 µl 3DFectIN/mRNA en OptiMEM. Después de la formación de hidrogel, se añadió medio de cultivo completo y las células fueron cultivadas durante 24, 48 h, 3 semanas y 7 semanas (37°C, 5% CO₂).

La viabilidad celular a las 24 y 48 h se midió mediante un ensayo MTT siguiendo las instrucciones del fabricante. La capacidad de los andamiajes para sostener la proliferación celular se evaluó midiendo el contenido de DNA en los cultivos al inicio (semana 0), tras 3 semanas y después de 7 semanas. Los andamiajes con relación 3:1 fueron los prototipos seleccionados para este ensayo de proliferación. El contenido de DNA en los andamiajes se midió, después de la extracción de ADN, mediante un ensayo PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción del DNA para su cuantificación se realizó mediante la incubación de los andamiajes con una solución de 100 µL tripsina (5%) durante 30 minutos, y a continuación, mediante la

incubación de la suspensión resultante durante 20 minutos en SDS 0,1% bajo intensa agitación.

Los resultados del ensayo MTT demostraron que los andamiajes activados con el complejo 2:1 no eran tóxicos bajo cualquiera de las condiciones (Figura 10). Los andamiajes
5 activados con la relación 3:1 no mostraron toxicidad a las 24 h y mostraron signos de toxicidad menores a las 48 h. El ensayo de contenido de DNA confirmó que el andamiaje 3:1 puede soportar la proliferación y el cultivo de células durante un período de 7 semanas, aunque no se observó proliferación adicional pasada la semana 3.

10 **Ejemplo 5**

Se prepararon andamiajes de fibrina (2 y 4 mg/mL) activados con mRNA (1 µg de mRNA, relación 3:1) codificante de YFP tal como se describe en el ejemplo 1, pero antes de añadir la trombina, en lugar de 10 µl de OptiMEM, se añadió el mismo volumen de este medio
15 conteniendo 1.5×10^5 hMSCs. Como control negativo (C), se preparó un andamiaje no activado por el mismo procedimiento, pero utilizando sólo OptiMEM en lugar de los 50 µl de la suspensión de 3DFectIN/mRNA. Después de la formación de hidrogel, se añadió medio de cultivo completo y las células fueron cultivadas durante 24 y 48 h (37°C, 5% CO₂). Se evaluó la transfección de hMSCs a las 24 h tal como se describe en el ejemplo 3. Se evaluó la toxicidad del andamiaje a las 24 y 48 h mediante un ensayo de MTT tal como
20 se describe en el ejemplo 4. La capacidad del andamiaje para apoyar la proliferación de células a los 0, 3, 7 y 10 días fue evaluada mediante un ensayo de cuantificación de DNA tal como se describe en el ejemplo 4.

El experimento mostró que los andamiajes activados con mRNA pueden generar una transfección eficaz en hMSCs, tanto para prototipos con 2 mg/mL de fibrina como los de
25 4 mg/mL de fibrina. Las pruebas de MTT indicaron que todos los andamiajes de fibrina mostraron una toxicidad menor a las 24 h, y ausencia de toxicidad a 48 h. La cuantificación de DNA apoya la capacidad de estos andamiajes para soportar la proliferación celular. Esto fue particularmente visible para los andamiajes de 2 mg/mL de fibrina (Figura 11).

30

Ejemplo 6

Síntesis de mRNA codificante de SOX9: se diseñó un plásmido para la transcripción in vitro de mRNA basado en un plásmido pCMVTnT[®], en el cual se introdujo el gen SOX9

junto con una secuencia de consenso Kozak para iniciar la traducción, una región UTR 5' de β -globina y una región UTR 3' de α -globina. Se agregó bien una cola de politimina o una señal de poliadenilación tardía de SV40 en 3' para la síntesis de mRNA con una cola de poliadenina. El plásmido diseñado tenía también un sitio de la transcripción eucariótica, ya que se usó el mismo como control en los andamiajes activados pDNA codificante de SOX9. La estructura del plásmido utilizado se muestra en la Figura 12. La síntesis y aislamiento del mRNA a partir del plásmido se realizó mediante el método descrito en el ejemplo 1. Para validar la bioactividad de la secuencia de SOX9, se cultivaron células U87MG en una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectaron con 1 μ g de este mRNA. La expresión de SOX9 en las células cultivadas 12 y 24 h después de la transfección fue validada mediante western-blot tras la extracción de proteínas (anticuerpos anti-SOX9, Santa Cruz Biotech, USA). Las células no transfectadas se utilizaron como control negativo (C-) y las células transfectadas con el plásmido se utilizaron como control positivo (C+). Los resultados del western blot confirmaron la bioactividad del mRNA sintetizado.

Los andamiajes de fibrina (4 mg/mL) activados con 3DFectIN/mRNA o 3DFectIN/ pDNA (1 μ g de mRNA/pDNA, relaciones 2:1 y 3:1) codificando SOX9 se prepararon como se describe en el ejemplo 1, pero antes de añadir la trombina, en lugar de 10 μ l de OptiMEM, se añadió el mismo volumen de este medio conteniendo 1.5×10^5 células U87MG. Como control negativo (C-), se preparó un andamiaje sin mRNA/pDNA ni 3DFectIN por el mismo procedimiento, pero utilizando sólo OptiMEM en lugar de la 50 μ l de suspensión 3DFectIN/mRNA. Después de la formación del hidrogel, se añadió medio de cultivo completo, y las células se cultivaron durante 24 h (37°C, 5% CO₂).

La capacidad de los andamiajes activados con mRNA o pDNA para inducir expresión forzada de SOX9 se midió mediante una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR, C1000 termociclador, Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.), utilizando sondas para los genes SOX9, GAPDH y β -actina (Taqman, Thermo Fisher Scientific, Inc.). La expresión relativa se evaluó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se utilizó para evaluar la expresión relativa, usando GAPDH y β -actina (ACTB) como los genes de referencia. La expresión relativa del control (C) es 1 en todos los gráficos, pero no es visible en los gráficos debido a la escala requerida para representar el resto de los datos.

El experimento demostró la capacidad de generar una regulación positiva extrema de la expresión de SOX9 con los andamiajes activados con mRNA. La expresión con el

andamiaje activado mRNA con una relación 2:1 fue de alrededor de 5000 veces la del control, mientras que la proporción de 3:1 llegó a 20000 veces el control. La regulación positiva generada con andamiajes activados con pDNA fue órdenes de magnitud menor que la obtenida con mRNA, aunque significativamente superior al control negativo (Figura 5 13A).

El mismo experimento se repitió, con un mayor número de replicados, pero sólo para los andamiajes activados con mRNA o pDNA en la relación 3:1 (Figura 13B). Finalmente, el mismo experimento se repitió para los andamiajes activados con mRNA y pDNA en la relación 3:1, pero utilizando hMSCs en lugar de las células U87MG (misma densidad de 10 sembrado). Los resultados mostraron una sobreexpresión de SOX9 en los andamiajes activados con mRNA 40000 veces superior al control, notablemente mejor que el conseguido con pDNA (Figura 13C).

Ejemplo 7

15 En este experimento se intentó establecer la cinética de expresión de SOX9 a tiempos cortos tras la transfección de hMSC en andamiajes activados con mRNA o pDNA. Para ello, andamiajes con 2 y 4 mg/mL de fibrina y activados con 1 µg de mRNA o pDNA (relación 3:1 de 3DFectIN/mRNA o 3DFectIN/pDNA) se prepararon con hMSCs siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero utilizando mRNA codificante de 20 Sox9 (ver síntesis en ejemplo 7). Los andamiajes se cultivaron durante 48 h en medio completo, a 37°C, con 90% de humedad relativa y 5% de CO₂. La expresión génica de SOX9 en las células se valoró por qRT-PCR tal como se describe en el ejemplo 6. Los resultados mostraron un comportamiento diferente para andamiajes de 2 y 4 mg/mL de fibrina. La activación con pDNA fue tan eficiente o incluso más eficiente en algún caso 25 que la activación con mRNA en los andamiajes con 2 mg/mL de fibrina. Por otra parte, la activación con mRNA fue claramente más eficiente en los andamiajes con 4 mg/mL de fibrina (Figura 15).

La cinética de la expresión del gen parece estar afectada tanto por el polinucleótido utilizado para la activación, mRNA o pDNA, como por la concentración de fibrina en los 30 andamiajes. Para el mRNA, se alcanzaron valores máximos a las 12 y 24 h después de la siembra de las células, independientemente de las condiciones. Para el pDNA, la expresión fue más constante, pero se pudo observar un pico a las 24 h para los andamiajes de 2 mg/mL y a las 48 h para los de 4 mg/mL (Figura 14).

Ejemplo 8

En este experimento, se probó la capacidad de los andamiajes activados con mRNA de inducir la diferenciación celular directa hacia un linaje condrogénico. Andamiajes de fibrina (4 mg/mL) se activaron con mRNA codificante para SOX9 (relación 3:1) y se sembraron con hMSCs, siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 6. Como referencia, se utilizó un andamiaje sembrado con hMSCs y activado con pDNA (también relación 3:1).

Después de la formación del andamiaje por reticulación (1 h a 37°C después de la adición de la trombina), se añadió medio de cultivo celular a las placas de cultivo donde fueron colocados los andamiajes. El experimento se realizó cultivando las células en los andamiajes en dos medios diferentes: (i) medio condrogénico incompleto (ICM) y (ii) medio condrogénico completo (CCM). El ICM contenía DMEM con alta glucosa (Sigma), 100 nM de dexametasona, 50 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato, 40 µg /mL de L-prolina, 1% de suplemento Premix ITS (Becton Dickinson), 1 mM piruvato sódico (Sigma) y 1% de penicilina/estreptomina (Sigma). El CCM contenía ICM y 10 ng/mL de TGF-β3 (Peprotech, UK). Los andamiajes se cultivaron durante 21 días, con 3 cambios de medio a la semana, a 37°C, con un 90% de humedad y 5% de CO₂. Después de 21 días, se evaluó la expresión de genes marcadores de diferenciación condrogénica Sox9, agrecano (ACAN) y colágeno de tipo II (Col2a1).

Los resultados mostraron que los andamiajes, tanto activados con mRNA como con pDNA, producen cantidades mucho más grandes que los controles del regulador condrogénico maestro SOX9 después de 21 días, independientemente del medio de cultivo (ICM o CCM). Los andamiajes activados con mRNA fueron también capaces de inducir la expresión de ACAN en comparación con los controles en ICM, aunque su efecto parecía ser negativo para este gen en los andamiajes cultivados en CCM (Figura 15).

También se midió la expresión de Col2a1. Sin embargo, debido a que el gen no se detectó en los andamiajes control, no fuimos capaces de utilizar el procedimiento de cálculo $2^{\Delta\Delta Ct}$. En su lugar, la Tabla 2 presenta el Ct de Col2a1 y los genes de referencia (GAPDH, ActB) para cada muestra. Es reseñable que los andamiajes activados con mRNA fueron el único tipo de muestra donde el Col2a1 se expresó consistentemente, y que este resultado fue independiente del medio de cultivo empleado (ICM o MCP).

En general, este dato confirma que los andamiajes activados con mRNA pueden inducir por si mismos la diferenciación de hMSC hacia un linaje condrogénico.

5 Tabla 2: Valores de Ct de Col2a1 y de los genes de referencia (GAPDH, ActB) expresados por hMSCs cultivadas en ICM o MCP durante 21 días en andamiajes de fibrina (4 mg/mL) no activados (C-), activados con 3DFectIN/mRNA (relación 3:1) o activados con 3DFectIN/pDNA (relación 3:1). N/D = No detectado.

	C-			mRNA 3:1			pDNA 3:1		
	<i>Col2a1</i>	<i>ActB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>Col2a1</i>	<i>ActB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>Col2a1</i>	<i>ActB</i>	<i>GAPDH</i>
ICM	N/D	15,9893	17,57854	37,82298	16,05839	17,91439	N/D	16,05839	17,91439
	N/D	15,95448	17,54497	39,31226	16,09343	17,98782	N/D	16,09343	17,98782
	N/D	16,06559	17,65261	32,98505	16,0598	17,81497	35,54242	16,0598	17,81497
CCM	N/D	15,00767	17,28146	31,41614	15,41693	17,09681	N/D	14,95397	16,98424
	N/D	14,99462	17,26188	29,41751	15,44408	17,28308	N/D	15,04821	17,0261
	N/D	15,06974	17,27417	30,63256	15,42	17,09684	28,43756	15,07596	17,07207

10

Ejemplo 9

En esta prueba, se repitió el mismo experimento que en el ejemplo 8, pero utilizando andamiajes con dos concentraciones de fibrina (2 mg/mL y 4 mg/mL), preparadas como en el ejemplo 6. Además, en este experimento los marcadores de diferenciación se analizaron después de 28 días de cultivo.

15 A los 28 días, Sox9 estaba claramente sobreexpresado en los andamiajes activados con mRNA en comparación con los controles, y este resultado fue independiente de la concentración de fibrina en el andamiaje (2 mg/mL o 4 mg/mL) y del medio de cultivo (ICM o CCM). A los 28 días, ACAN también estaba sobreexpresado en comparación con el control en los andamiajes activados con mRNA de 2 mg/mL, y este resultado también era independiente del medio de cultivo utilizado. Para los andamiajes de 4 mg/mL, los prototipos activados con mRNA mostraron niveles similares a los controles con ambos medios (Figura 16).

20 El análisis de la expresión génica Col2a1 solamente se realizó con andamiajes cultivados en CCM. Los resultados confirmaron que los andamiajes activados con mRNA fueron los

25

únicos capaces de producir la expresión consistente de este gen. En este experimento, todos los andamiajes con 4 mg/mL de fibrina fueron capaces de expresar Col2a1. Sin embargo, sólo los andamiajes activados con mRNA mostraron expresión de mRNA en los prototipos con 2 mg/mL de fibrina (Tabla 3). Este dato confirma que los andamiajes activados con mRNA pueden inducir la diferenciación de hMSC hacia un linaje condrogénico, ya sea por sí mismo, o en combinación con medios clásicos de diferenciación con factores de crecimiento.

Tabla 3: Los valores de Ct de Col2a1 y del gen de referencia(GAPDH) expresados por hMSCs cultivadas en CCM durante 28 días en andamiajes de 2 o 4 mg/mL de fibrina, no activados (C-), activados con 3DFectIN/mRNA (relación 3:1), o activados con 3DFectIN/pDNA (relación 3:1). N/D = No detectado.

	C-		RNA 3:1		DNA 3:1	
	<i>Col2a1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>Col2a1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>Col2a1</i>	<i>GAPDH</i>
2 mg/mL	N/D	19,80034	N/D	19,96768	N/D	20,62754
	N/D	19,78157	38,71413	20,16157	N/D	20,70585
	N/D	19,78686	38,71413	19,96851	N/D	20,68075
4 mg/mL	26,98096	18,42884	38,62078	17,79144	39,60755	17,98131
	26,98096	18,33812	35,16769	17,75767	39,60755	18,12178
	38,62078	18,22016	35,16769	17,81862	N/D	18,13876

REIVINDICACIONES

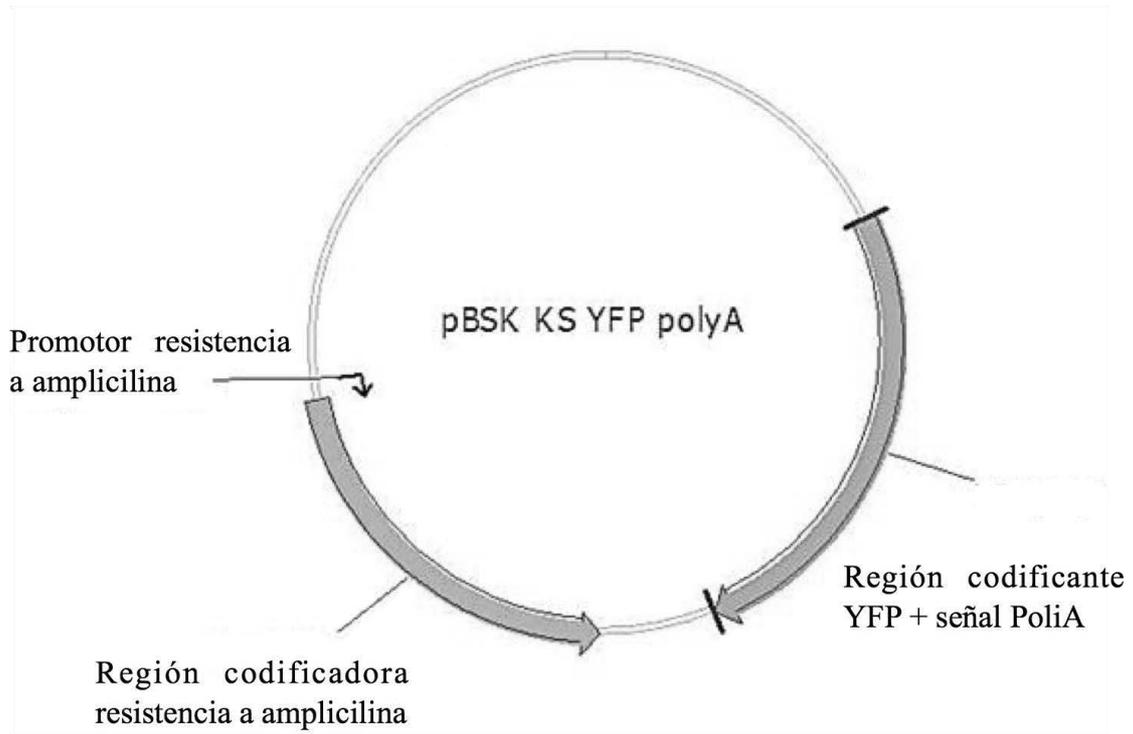
1. Andamio biodegradable que comprende un polímero biodegradable, un mRNA aislado que codifica para un factor de transcripción y un agente de transfección.
2. Andamio, según la reivindicación 1, que además comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células primarias y líneas celulares inmortalizadas, con la condición de que dichas células no son células madre embrionarias.
3. Andamio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el mRNA codifica para un factor de transcripción condrogénico.
4. Andamio, según las reivindicaciones 1-2, donde el mRNA codifica para un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en SOX9, MyoD, NeuroD1, c-Myc, Klf4, Nanog, Oct4, SOX2, C/EBP- β , PPAR- γ , Brn2, Lmx1a, Nurr1, Mash1, Myt11 y NeuroG2.
5. Andamio, según las reivindicaciones 1-2, donde el mRNA codifica para factor de transcripción de desdiferenciación.
6. Andamio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el mRNA codifica para un factor de transcripción seleccionado de SOX9, MyoD, NeuroD1, SOX2, Oct4, Klf4 y c-Myc.
7. Andamio, según las reivindicaciones 2-6, donde las células primarias son células madre pluripotentes inducidas o células madre adultas.
8. Andamio, según las reivindicaciones 2-6, donde las células primarias son fibroblastos o condrocitos.
9. Andamio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero biodegradable se selecciona de fibrina, alginato y mezclas de los mismos.
10. Andamio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el agente de transfección se selecciona de un lípido catiónico, un polímero catiónico, y una sal de fosfato cálcico.
11. Andamio, según la reivindicación 10, donde el polímero catiónico es poliarginina o un polifosfaceno catiónico.
12. Andamio, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso como medicamento.
13. Andamio, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso en terapia regenerativa de tejidos u órganos.

14. Andamio, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso según la reivindicación 13 donde el tejido es cartílago, músculo o tejido nervioso.
15. Andamio, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso en el tratamiento de un defecto de cartílago, daño muscular o daño en el tejido nervioso.
- 5 16. Composición farmacéutica que comprende el andamio descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, donde además comprende vehículos farmacéuticos aceptables.
18. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 16-17, que
10 además comprende al menos un ingrediente farmacéutico activo adicional.
19. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 16-18, que es una solución inyectable, suspensión, hidrogel o una matriz porosa sólida.
20. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 16-19, para uso como vacuna.
- 15 21. Composición cosmética que comprende el andamio según se describió en cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
22. Un método para preparar el andamio como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende:
 - (i) Mezclar un polímero biodegradable, un mRNA aislado que codifica para
20 un factor de transcripción y un agente de transfección, y opcionalmente células seleccionadas de entre el grupo que consiste en células primarias y líneas celulares inmortalizadas,
 - (ii) Incubar la mezcla preparada en (i),
 - (iii) Inducir la coagulación de la mezcla preparada en (ii).
- 25 23. Método, según la reivindicación 22, donde la etapa de coagulación (iii) se lleva a cabo mediante la adición de un agente de coagulación.
24. Método para preparar el andamio como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende:
 - (i) Preparar un andamio,
 - 30 (ii) Mezclar un mRNA aislado que codifica para un agente de transcripción y un agente de transfección,
 - (iii) Incubar la mezcla preparada en (ii) sobre el andamio preparado en (i), y opcionalmente añadir células.

25. Andamio biodegradable obtenido mediante el método según las reivindicaciones 22-23 o mediante el método según la reivindicación 24.
26. Uso de un andamio según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, como un reactivo de diferenciación in vitro o como implante cosmético.

5

A



B

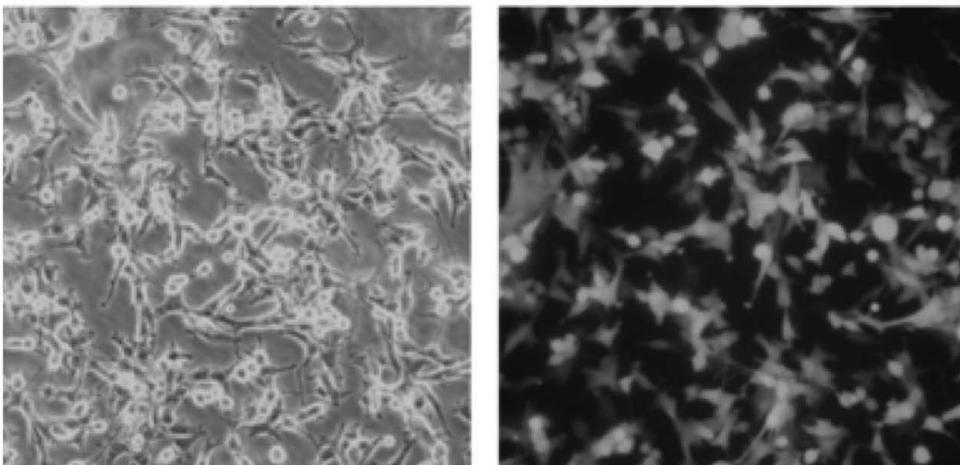


FIGURA 1

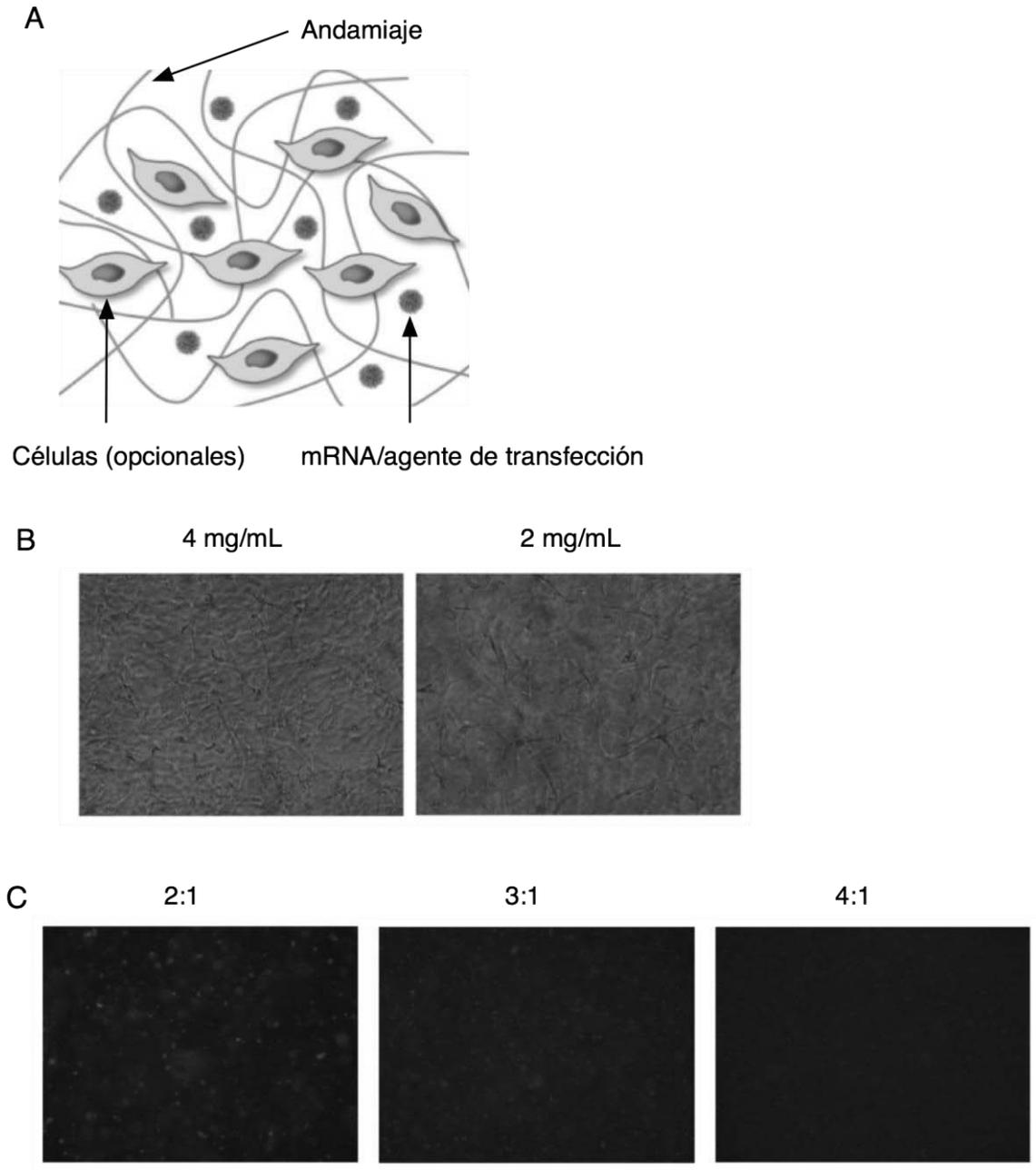
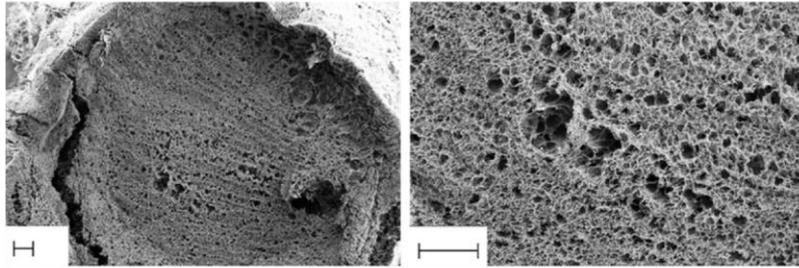


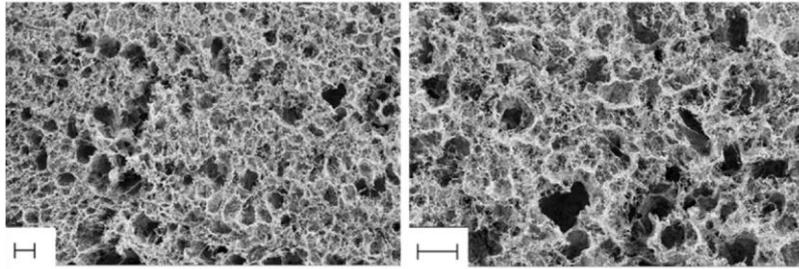
FIGURA 2

Control

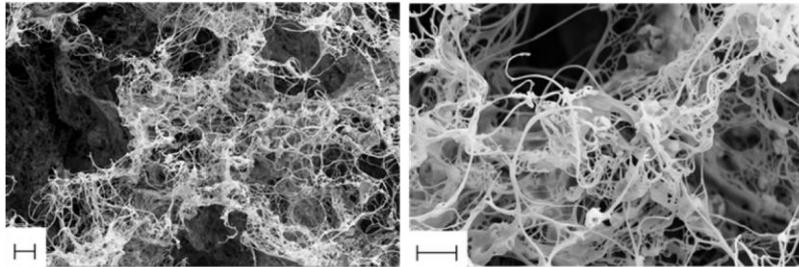
Escala: 100 μm



Escala: 20 μm

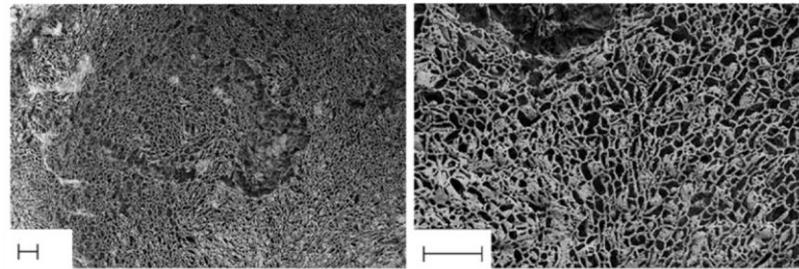


Escalas:
2 μm (izquierda)
1 μm (derecha)

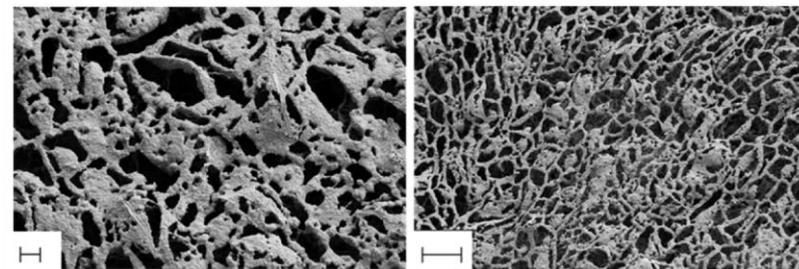


Sembrado

Escala: 100 μm



Escala: 20 μm



Escala:
2 μm (izquierda)
1 μm (derecha)

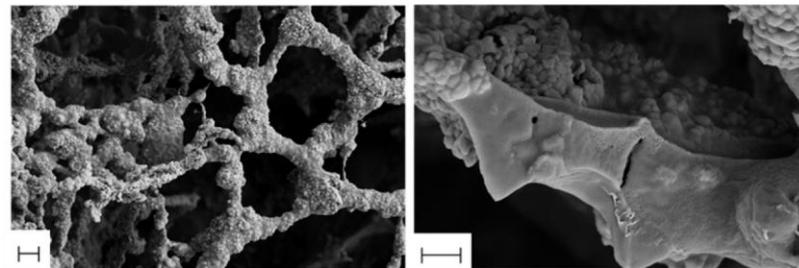
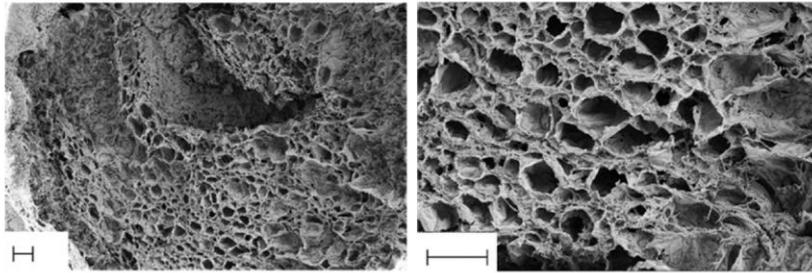


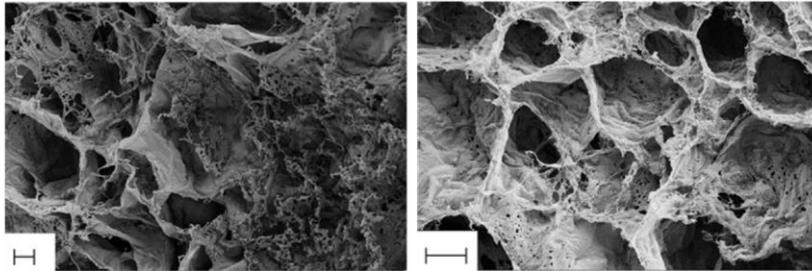
FIGURA 3

Control

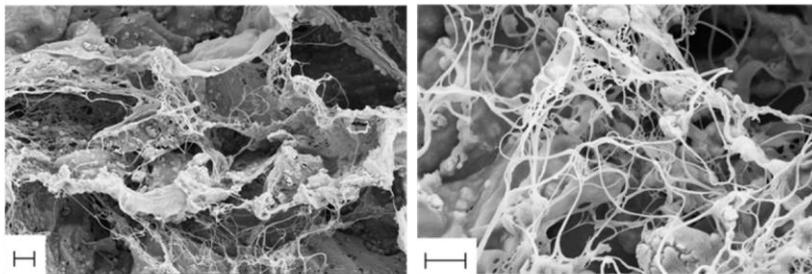
Escala: 100 μm



Escala: 20 μm

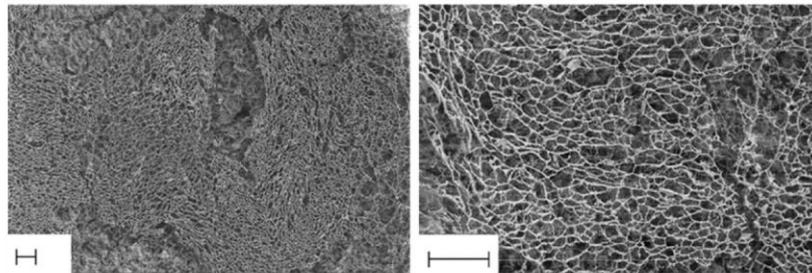


Escalas:
2 μm (izquierda)
1 μm (derecha)

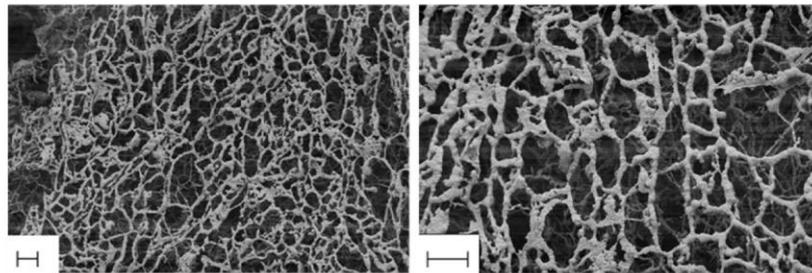


Sembrado

Escala: 100 μm



Escala: 20 μm



Escalas:
2 μm (izquierda)
1 μm (derecha)

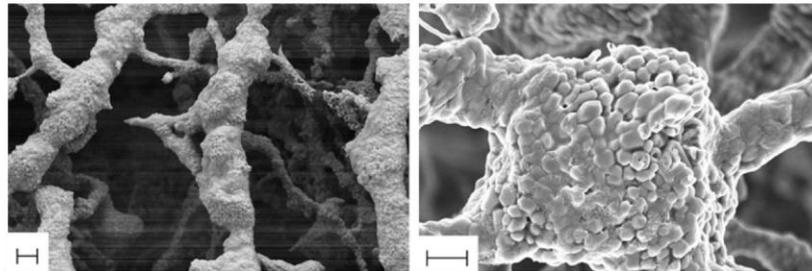


FIGURA 4

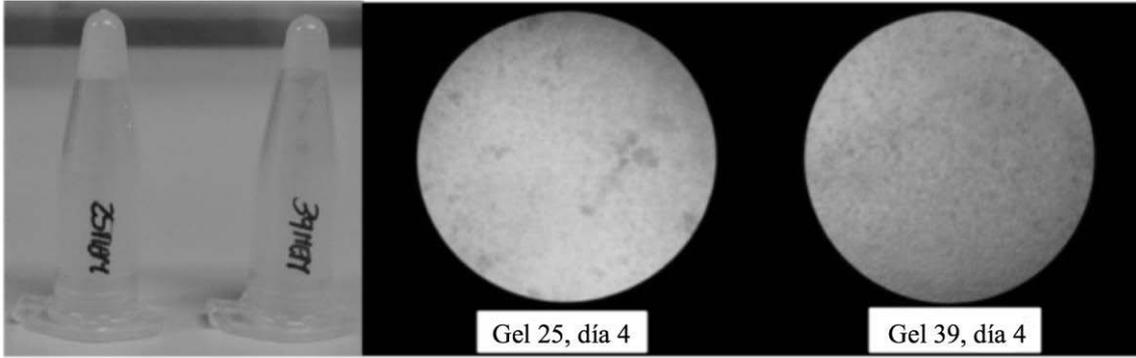
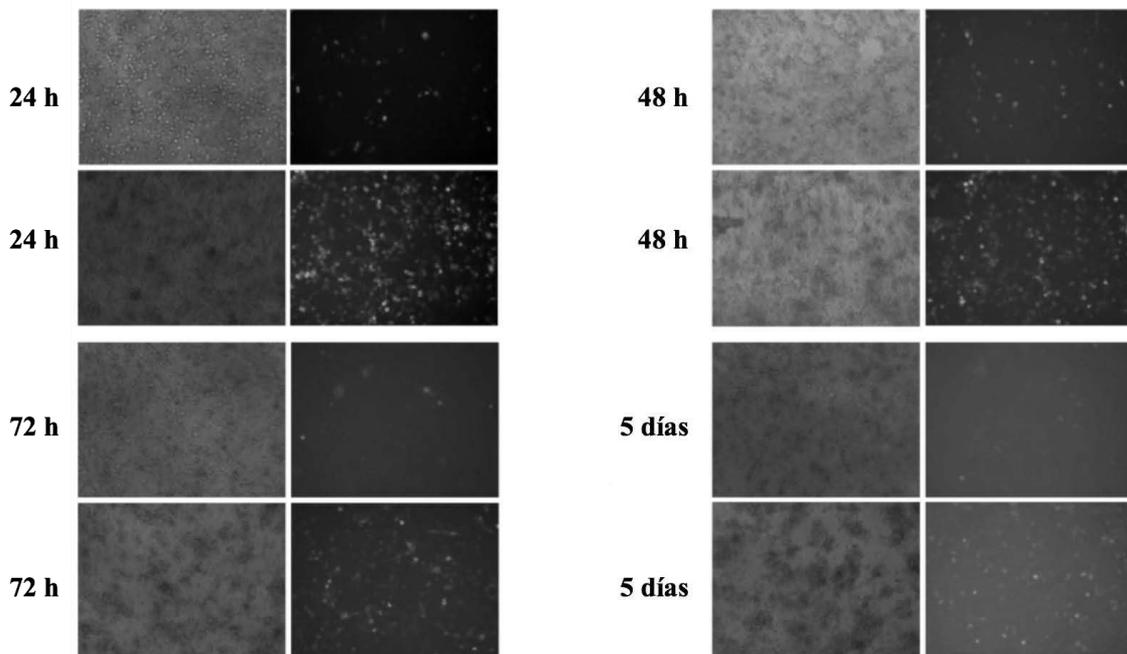


FIGURA 5

5

mRNA 4:1 - 2 µg



10 FIGURA 6

mRNA 3:1 - 1 µg

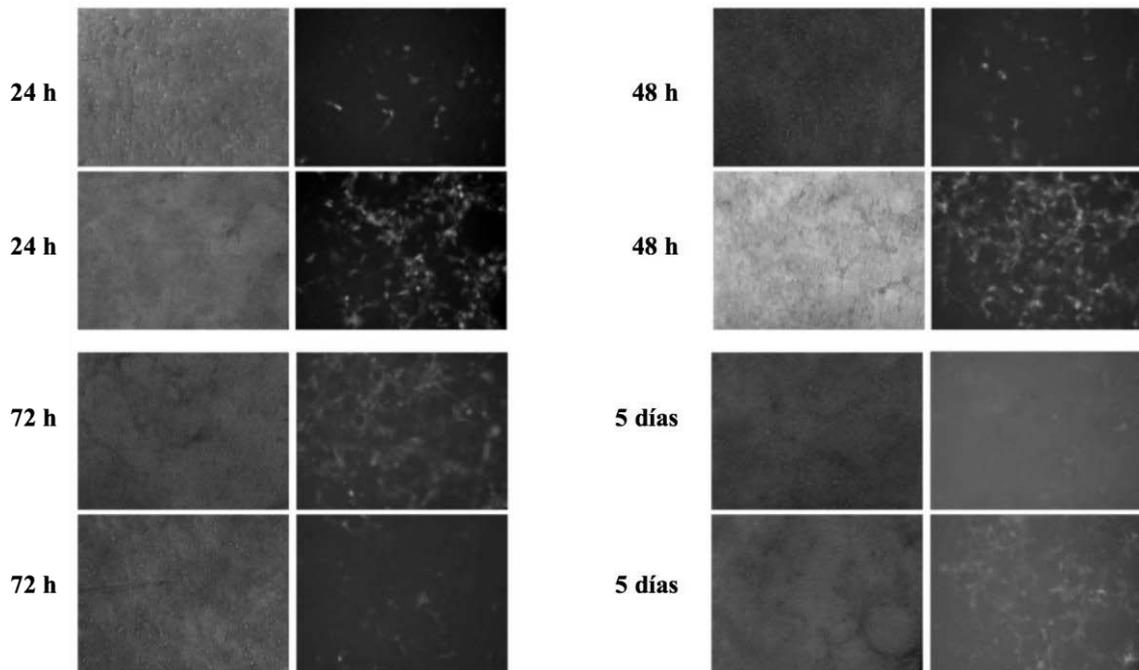


FIGURA 7

5

mRNA 2:1 - 1 µg

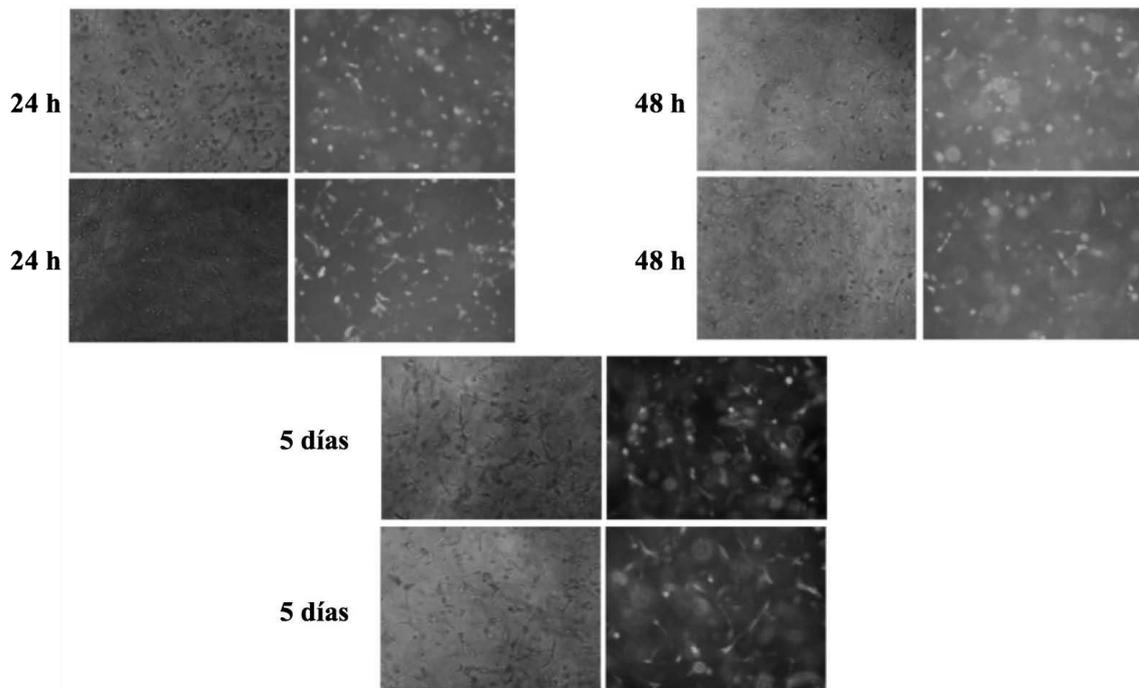


FIGURA 8

pDNA 3:1 - 1 µg

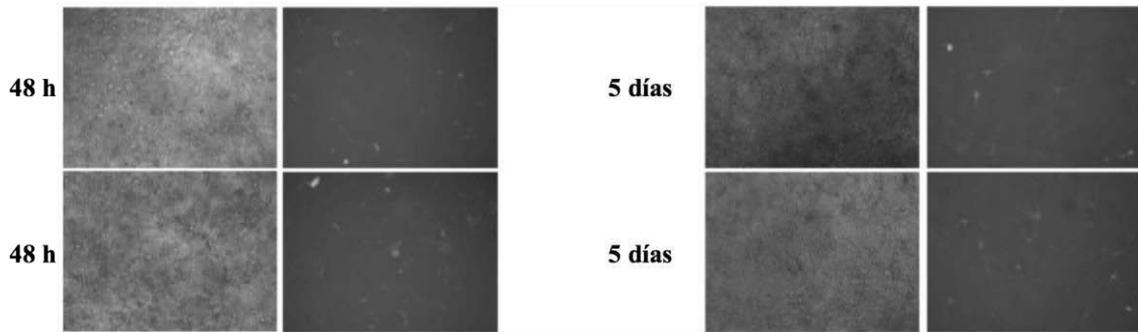


FIGURA 9

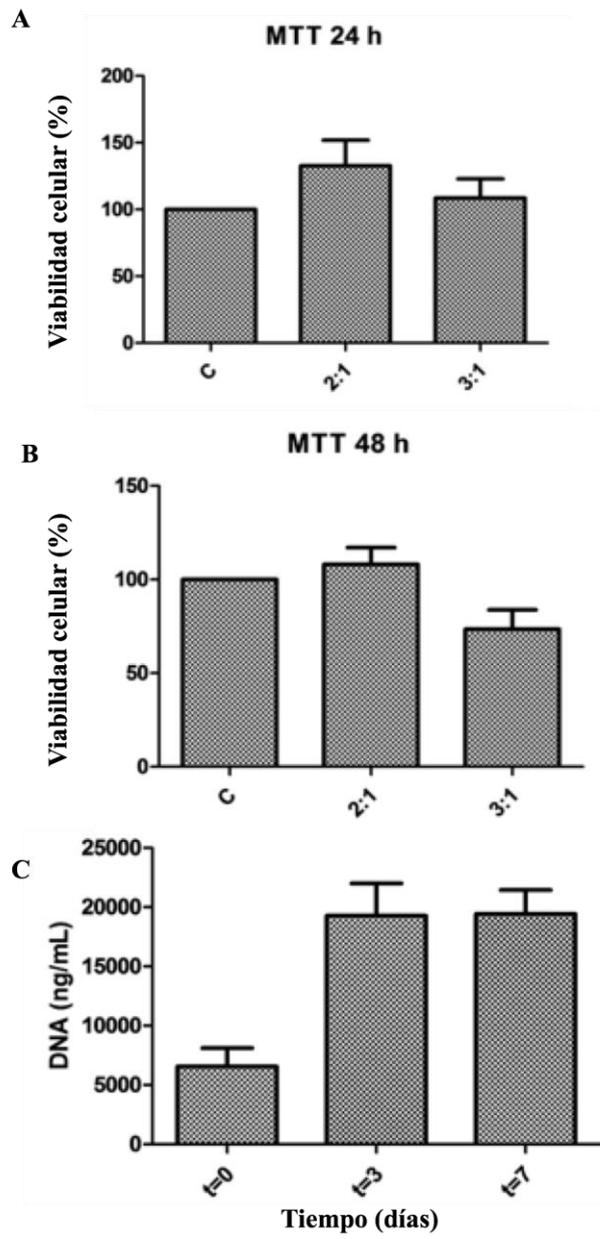


FIGURA 10

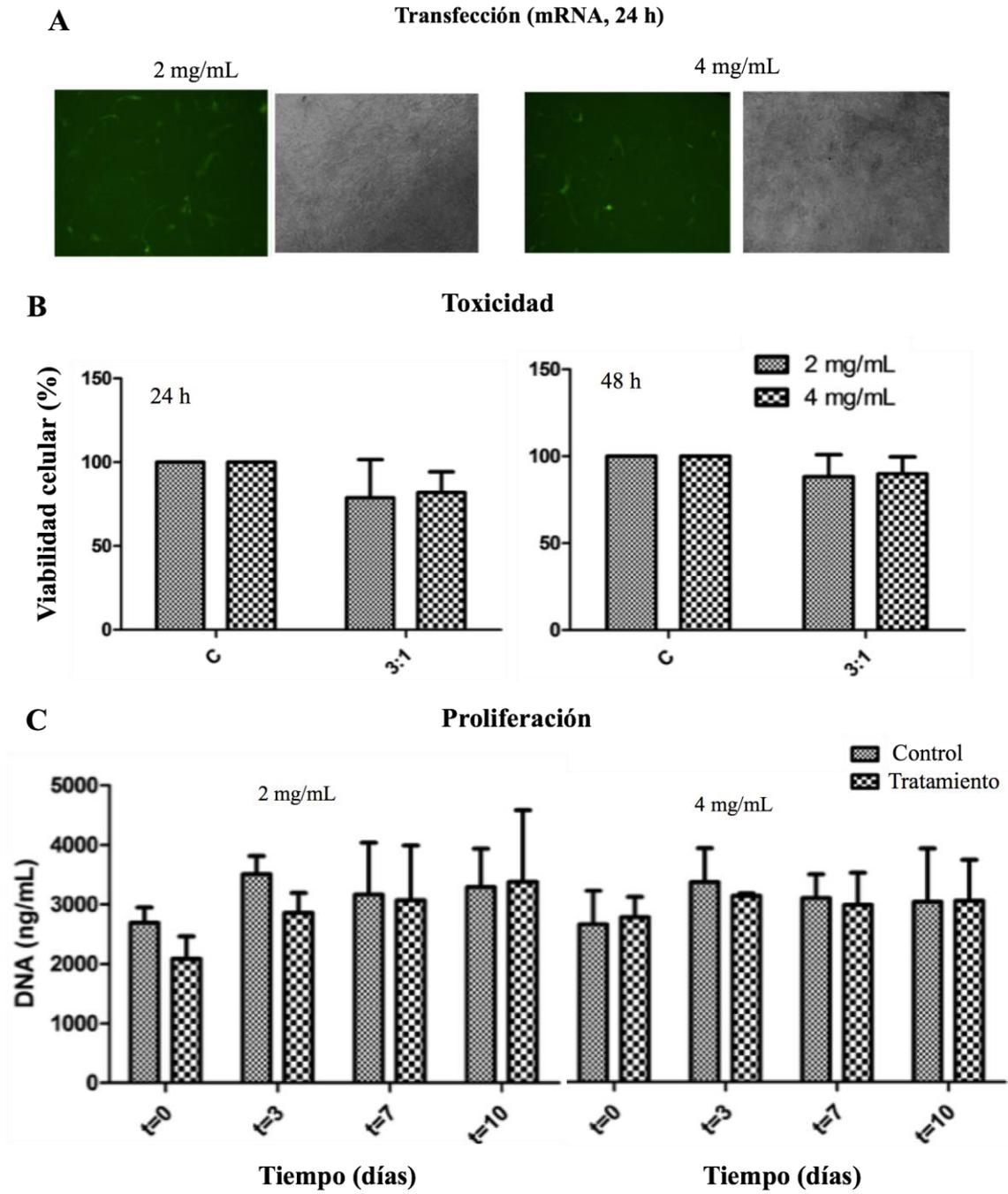
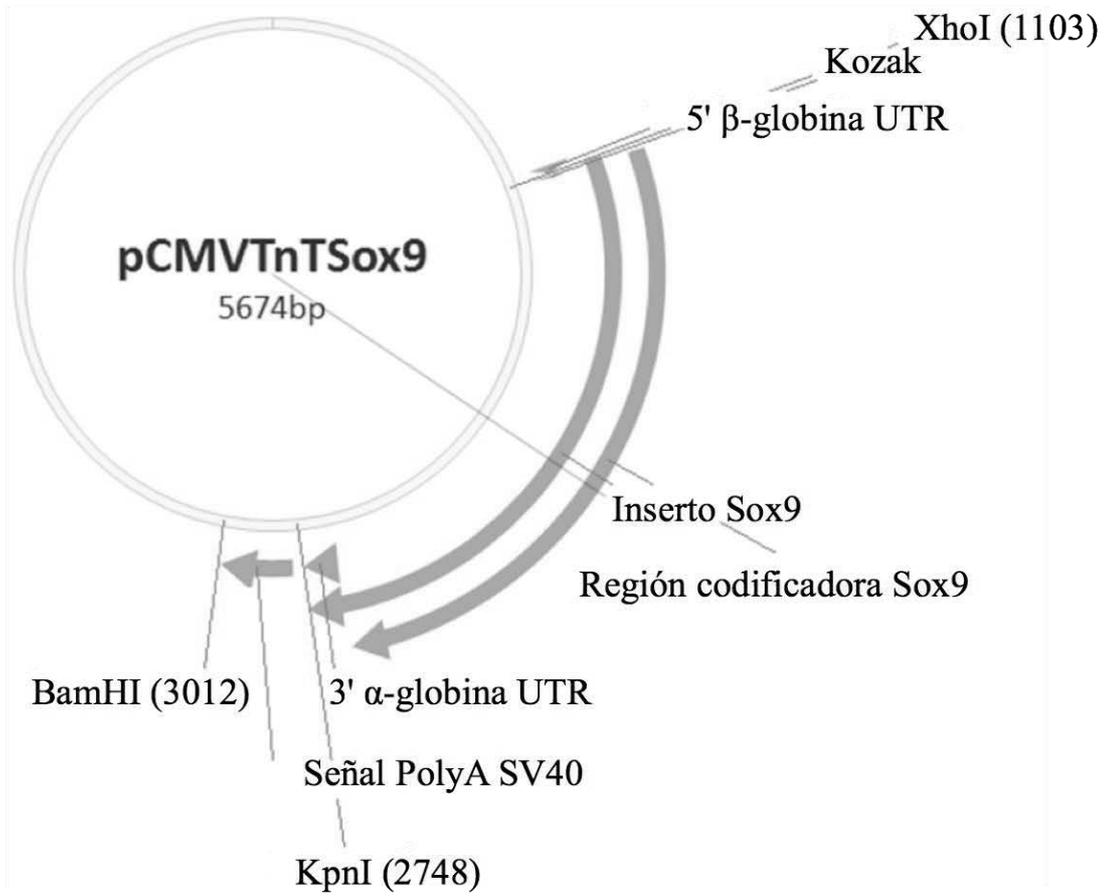


FIGURA 11

A



B

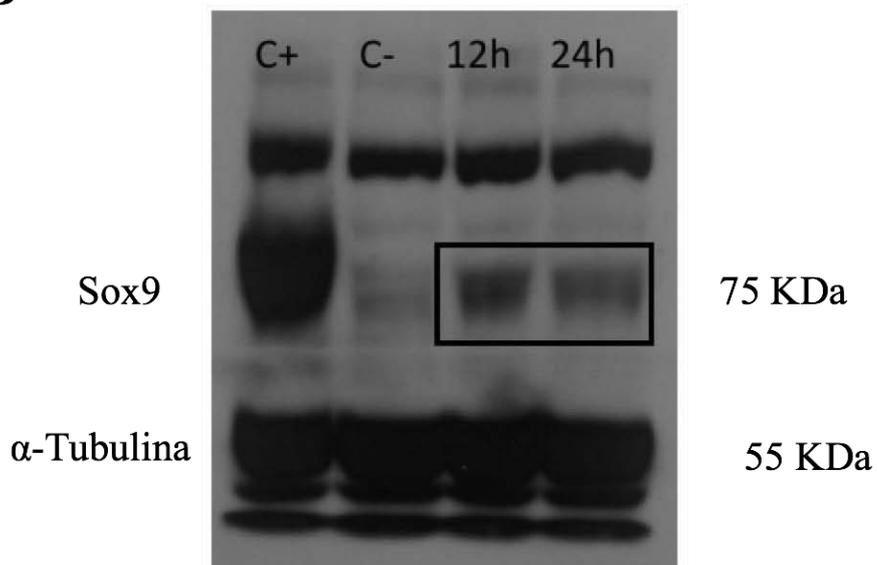
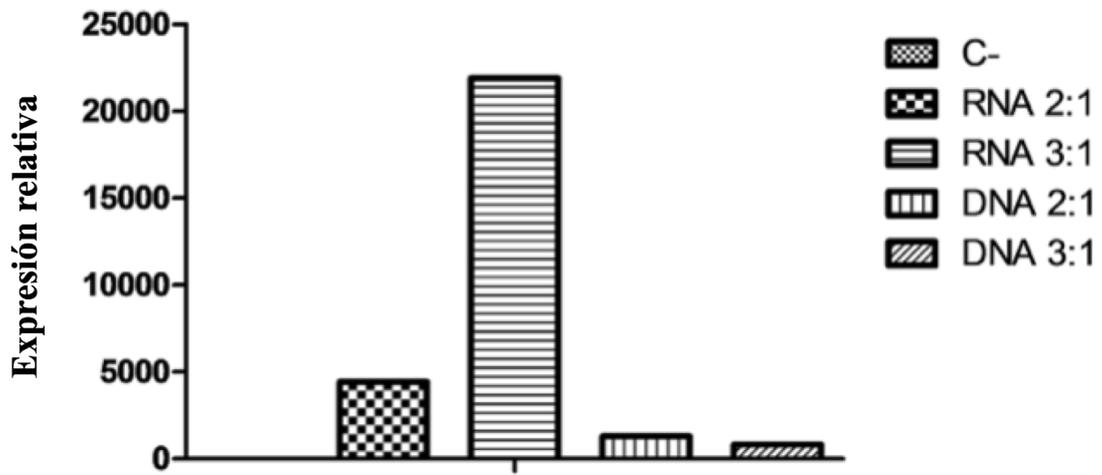
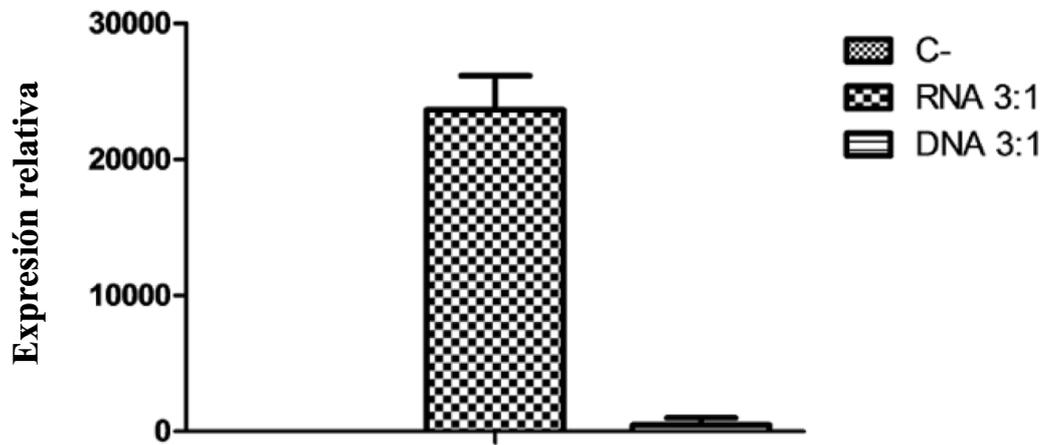


FIGURA 12

A



B



C

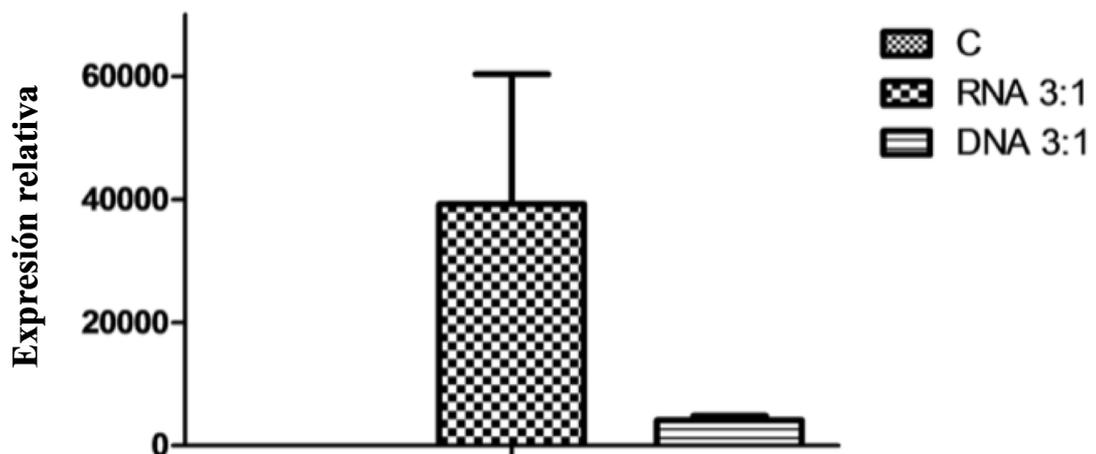
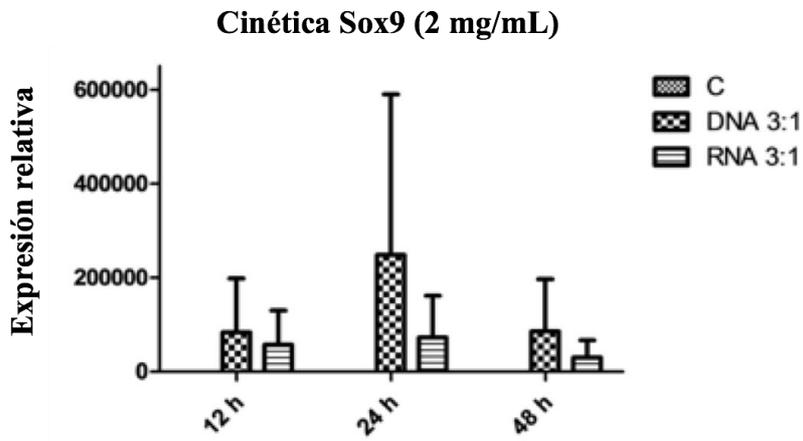


FIGURA 13

A



B

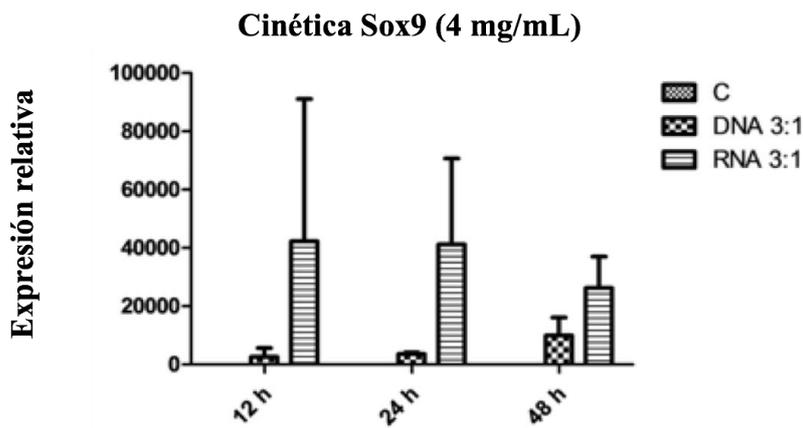
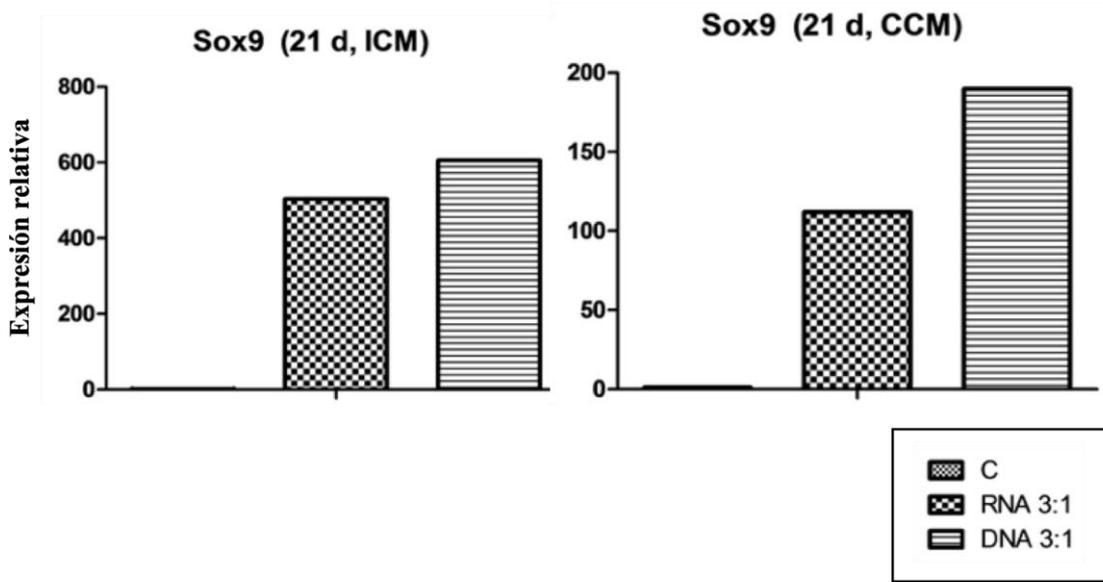


FIGURA 14

A



B

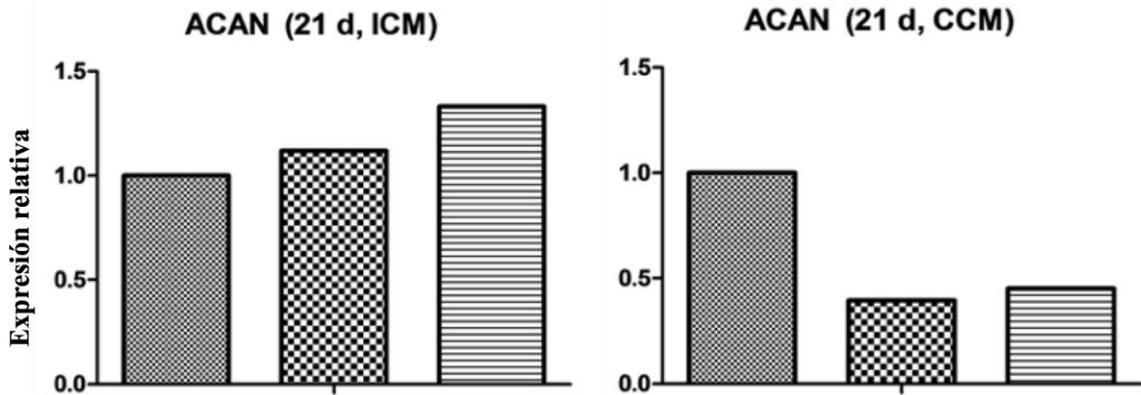
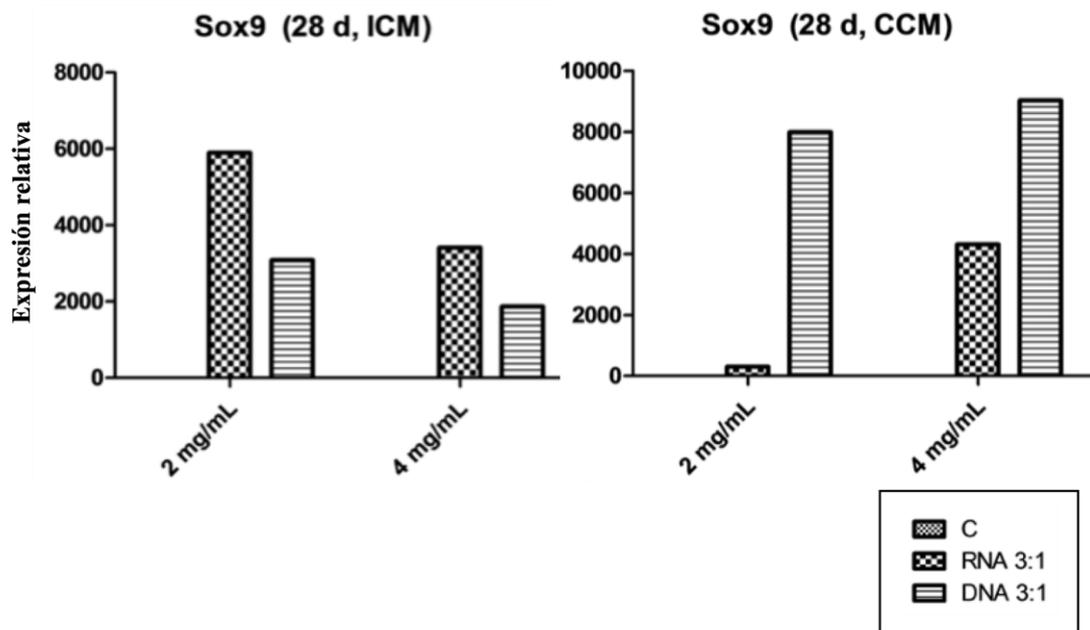


FIGURA 15

A



B

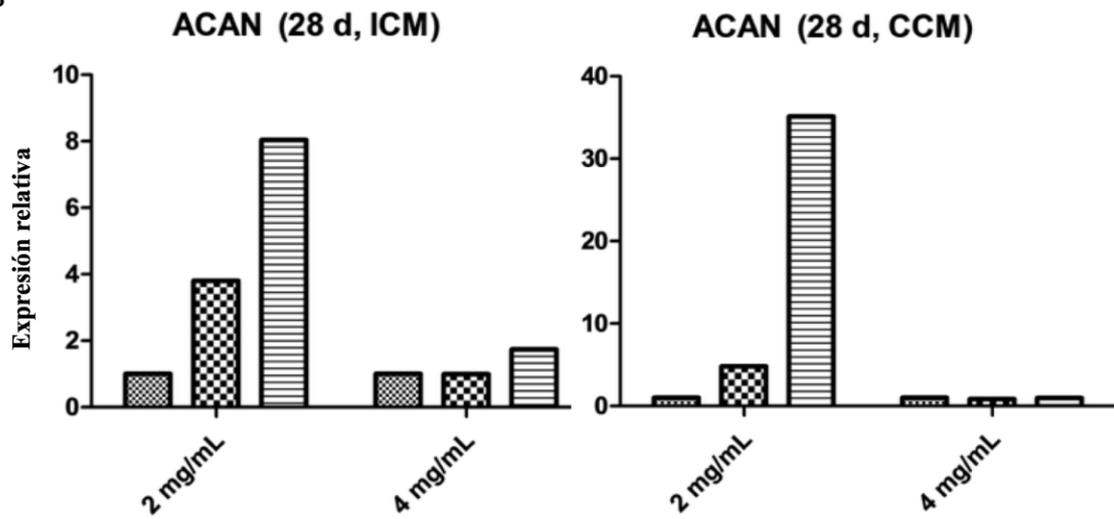


FIGURA 16



②1 N.º solicitud: 201630565

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 02.05.2016

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2015010501 A1 (CRAWFORD KEITH D <i>et al.</i>) 08/01/2015, Párrafos [0007], [0009], [0015], [0020], [0036], [0068] y [0095].	1-26
A	US 2014341870 A1 (ISAEV ARTUR ALEKSANDROVICH <i>et al.</i>) 20/11/2014, Párrafos [0016], [0018], [0019] y [0020].	1-26
A	US 2010189794 A1 (LUO DAN <i>et al.</i>) 29/07/2010, Párrafos [0004], [0007], [0025], [0041], [0050], [0051], [0098], [0107] y [0113].	1-26
A	US 2007031465 A1 (KOJIMA HIROKO <i>et al.</i>) 08/02/2007, Párrafos [0007]-[0010].	1-26
A	HASTINGS CONN L <i>et al.</i> Drug and cell delivery for cardiac regeneration..Advanced drug delivery reviews Netherlands Apr 2015 VOL: 84 Pags: 85 - 106 ISSN 1872-8294 (Electronic) Doi: doi:10.1016/j.addr.2014.08.006 pubmed:25172834. Página 93, columna izquierda, apartado 3.2.2.1.	1-26

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.09.2016

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/54 (2006.01)

A61L27/58 (2006.01)

A61K35/12 (2015.01)

C12N15/00 (2006.01)

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

A61L, A61K, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.09.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2015010501 A1 (CRAWFORD KEITH D <i>et al.</i>)	08.01.2015
D02	US 2014341870 A1 (ISAEV ARTUR ALEKSANDROVICH <i>et al.</i>)	20.11.2014
D03	US 2010189794 A1 (LUO DAN <i>et al.</i>)	29.07.2010
D04	US 2007031465 A1 (KOJIMA HIROKO <i>et al.</i>)	08.02.2007
D05	HASTINGS CONN L <i>et al.</i> Drug and cell delivery for cardiac regeneration..Advanced drug delivery reviews Netherlands.	abril 2015

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 Y 8 DE LA LP**

El documento D01 se refiere a una composición para la reparación de tejidos de discos intervertebrales, para lo que se utilizan células madre adultas ELA. Dichas células madre ELA están caracterizadas por la expresión de uno o más de los genes específicos de célula madre: Oct-4, KFL-4, Naong, Sox2, entre otros (véase párrafo [0007]). La composición es también efectiva para el tratamiento de rodilla, hombro, cadera, tobillo y muñeca (véase párrafo [0009]). Dicha composición incluye, además, un polímero o andamio, que proporciona una estructura estable tridimensional que permite el crecimiento de las células ELA y la formación de tejidos, tales como conectivo, neuronal, cartilaginoso y muscular (véase párrafo [0015]). En algunas realizaciones, la composición puede incluir un agente terapéutico, que puede ser un ácido nucleico, tal como RNA, siendo dicho RNA un mRNA, entre otros (véase párrafo [0020]). El agente terapéutico puede consistir en un factor de transcripción (véase párrafo [0036]). La preparación de células madre ELA, se puede implantar o inyectar incluyendo dicha preparación para su inyección compuestos tales como fibrinógeno, fibrina o alginato, entre otros (véase párrafo [0068]). Y pueden añadirse células adicionales tales como condrocitos (véase párrafo [0095]).

El documento D02 describe un biocompuesto para restaurar tejidos y órganos dañados en mamíferos que comprende: un andamio, al menos un ácido nucleico y células que proporcionan regeneración reparadora (véase párrafo [0016]). El andamio puede estar formado por alginato (véase párrafo [0018]), el ácido nucleico puede ser un RNA 5'-cap-dependiente/independiente (véase párrafo [0019]) y las células pueden ser células madre (véase párrafo [0020]).

El documento D03 hace referencia a hidrogeles de ácidos nucleicos que son biocompatibles y biodegradables y que pueden ser de ácidos ribonucleicos, entre otros (véase párrafos [0004] y [0007]). Se utilizan para distintas aplicaciones, tales como, ingeniería de tejidos (véase párrafo [0041]). Pueden comprender, además, células de mamíferos (véase párrafo [0025]) y encapsular agentes biológicamente activos, como por ejemplo, RNA (véase párrafos [0050] y [0051]). Dichos hidrogeles proporcionan un andamio tridimensional para el crecimiento de células o regeneración de tejidos, *in vitro* o *in vivo*, en el que dichas células liberen uno o más agentes biológicamente activos (véase párrafo [0098]). En una realización de la invención se depositan vectores en dicho hidrogel que codifican diferentes agentes terapéuticos (véase párrafo [0107]). Dichos vectores pueden comprender moléculas de ácido nucleico que codifican para factores de transcripción, tales como SOX2, Klf4, c-Myc (véase párrafo [0113]).

El documento D04 divulga un material biocompatible para la regeneración de tejidos que comprende un vector adenoviral o retroviral que comprende genes que codifican para factores de transcripción tales como SOX9, entre otros (véase párrafos [0007]-[0010]).

EL documento D05 trata sobre distintos métodos de suministro de células y fármacos para la regeneración del tejido cardíaco. Entre todos ellos se describen estrategias terapéuticas de RNA empleando RNA mensajeros modificados, que son capaces de inducir la formación de células madre pluripotentes; y junto con agentes de transfección, tales como lipofectamina, son capaces de transfectar una porción significativa de miocardio de ratón (véase página 93, columna izquierda, apartado 3.2.2.1.)

Por lo tanto, la presente solicitud de patente, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica y tal y como ha sido presentada, parece poseer novedad y actividad inventiva ya que no se ha encontrado ningún documento que haga referencia a un andamio biodegradable que comprenda un polímero biodegradable, un mRNA aislado que codifique para un factor de transcripción y un agente de transfección. Ni tampoco, en los documentos citados existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención contenida en las reivindicaciones 1-26. Por lo que, las reivindicaciones 1-26 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.