(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
09 de noviembre de 2017 (09.11.2017) WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2017/191345 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61L 27/54 (2006.01) *A61K 35/12* (2015.01)
A61L 27/58 (2006.01) *C12N 15/00* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2017/070262

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de abril de 2017 (28.04.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201630565 02 de mayo de 2016 (02.05.2016) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES).

(72) Inventores: **GARCIA FUENTES, Marcos**; Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES). **MARTINEZ LEDO, Adriana**; Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES). **VIDAL FIGUEROA, Anxo**; Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES).

(74) Mandatario: **TORRENTE VILASANCHEZ, Susana**; Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

(54) **Title:** BIODEGRADABLE SCAFFOLD COMPRISING MESSENGER RNA

(54) **Título:** ANDAMIO BIODEGRADABLE QUE COMPRENDE ARN MENSAJERO

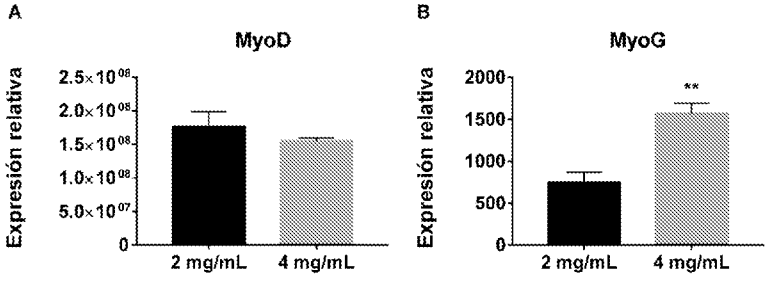


FIGURA 17

A / B Relative expression

(57) **Abstract:** The invention relates to a biodegradable scaffold comprising messenger RNA. More specifically, the invention relates to the scaffold, the production method thereof and the use of same. A biodegradable scaffold comprising a biodegradable polymer, an isolated mRNA encoding a transcription factor and transfection agents.

(57) **Resumen:** Andamio biodegradable que comprende ARN mensajero. Esta invención de 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.

WO 2017/191345 A1

Andamio biodegradable que comprende ARN mensajero

Campo de la invención

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

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 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.

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 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 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 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.

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

(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).

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).

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.

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.

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.

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.

Figura 6: Evaluación de ratios de 3DFectIN:mRNA/pDNA con la secuencia reportera YFP y la línea celular U87MG en geles de fibrina de 4 mg/mL. Micrografías de fluorescencia y visibles representativas correspondientes a experimentos de transfección llevados a cabo con 1 µg mRNA (izquierda) y pDNA (derecha) complejado con 3DFectIN usando las proporciones de 3DFectIN:mRNA/pDNA de 2:1 (arriba), 3:1 (medio), 4:1 (abajo).

Figura 7: Evaluación de la dosis de mRNA por andamiaje llevada a cabo en geles de fibrina de 4 mg/mL sembrados con células U87MG. Micrografías de fluorescencia y visibles representativas correspondientes a experimentos de transfección llevados a cabo con 1 y 2 µg de mRNA complejado con 3DFectIN en proporciones 3DFectIN:mRNA 3:1 (izquierda) y 4:1 (derecha).

Figura 8: Cinética de expresión proteica de la secuencia reportera YFP en andamiajes activados con mRNA y pDNA. Micrografías de fluorescencia y visibles representativas correspondientes a experimentos de transfección llevados a cabo con 1 µg de mRNA/pDNA y el ratio 3DFectIN:mRNA/pDNA 3:1 (µL:µg). La transfección de las células se evaluó a las 24 h, 48 h, 72 h y a los 5 días.

Figura 9: Estudio de citotoxicidad con células U87MG cultivadas en andamiajes de fibrina (4 mg/mL de fibrina) activados con complejos 3DFectIN/mRNA o pDNA en relaciones 2: 1 y 3: 1 se ensayaron para marcar la expresión del gen SOX9 (A). Andamiajes no activados fueron utilizados como control (etiquetado "C" en la figura). La mejor condición 3:1 se seleccionó para comparar la transfección de mRNA y pDNA (B). La expresión de SOX9 se cuantificó mediante análisis qRT-PCR de las células transfectadas relativas a la expresión de GAPDH y β-actin. La citotoxicidad de los andamiajes se midió mediante un ensayo de MTT a las 24 h y 48 h (C) y 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.

Figura 10: (A) Transfección de células madre mesenquimales humanas (hMSCs) en los andamiajes de fibrina activados con complejos de mRNA a las 24 h (1 μg 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 trasmitida 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 con mRNA ("Tratamiento") se compara con los mismos andamiajes sin complejos 3DFectIN/mRNA ("Control").

Figura 11: (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 12: Efecto de la concentración de fibrinógeno y el tipo de material genético sobre la cinética de expresión de SOX9 en células mesenquimales humanas (hMSCs) encapsuladas en andamiajes de fibrina. (A) Expresión de SOX9 24 h después de encapsulación de hMSCs en geles de fibrina de 2 y 4 mg/mL activados con SOX9. (B) Curvas de proliferación a las 48 h para geles de fibrina de 2 y 4 mg/mL. (C) Cinética de expresión de SOX9 en hMSCs encapsuladas en geles de fibrina con 2 mg/mL y (D) 4 mg/mL activados con mRNA y pDNA. Los niveles de expresión de genes se midieron mediante qRT-PCR y normalizado a la expresión de β-actin. Los niveles máximos de expresión se asignaron de modo arbitrario como 100% en las gráficas C y D. Los datos se muestran como media y desviación estándar de tres experimentos independientes con dos réplicas por experimento.

Figura 13: Expresión génica relativa de marcadores de diferenciación condrogénica en hMSC transfectadas en andamiajes de fibirina (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 14: 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.

Figura 15: Expresión de marcador condrogénico de hMSCs encapsuladas en hidrogeles de fibrina 2 y 4 mg/mL activados con mRNA y pDNA cultivados durante 7 y 21 días en medio condrogénico completo. Expresión de (A) SOX9, (B) agrecano, (C) colágeno tipo II, a los 7 y 21 días. Los niveles de expresión génica fueron medidos mediante qRT-PCR, normalizado a expresión de GAPDH y comparado con los niveles en hMSCs antes de la encapsulación. Los datos se muestran como media y desviación estándar de dos réplicas en un experimento. Se muestra como comparativa un cultivo de pellet estándar.

Figura 16. Expresión de marcador miogénico después de la transfección de hMSCs en andamiajes de fibrina 2 mg/mL (izquierda) y 4 mg/mL (derecha) activados con MyoD mRNA (1 μg, 3:1 3DFectIN/mRNA) mantenido durante 48 h en medio de crecimiento. Los niveles de expresión de génica fueron medidos a 12, 24 y 48 h mediante qRT-PCR normalizado a expresión de GAPDH y comparados con los niveles en hMSCs antes de la encapsulación.

Figura 17. Expresión de los marcadores miogénicos de hMSCs encapsuladas en hidrogeles de fibrina 2 y 4 mg/mL activados con MyoD mRNA. Las células se cultivaron durante 14 días en medio sérico reducido y se midieron las expresiones de MYOD (A) y MYOG (B) mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de génica fueron normalizados a expresión de β-actin y comparados con los niveles en hMSCs antes de la encapsulación. Los datos se muestran como media y desviación estándar de tres réplicas en un experimento.

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 9C, 10C y 10D). 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 6, figura 9A y 9B); incluso la transfección fue efectiva en células mesenquimales humanas (ejemplos 6 y 7 y figura 12A).

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 9A, 9B y 12A).

Además, hemos confirmado que los andamios de la invención activados con mRNA pueden modificar el perfil de expresión génico de las células residentes, conduciendo *per*

se a la diferenciación de hMSCs hacia un linaje condrogénico (ejemplos 8, 9 y 10; figuras 13, 14 y 15) y linajes miogénicos (ejemplos 11 y 12; figuras 16 y 17).

"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 μm) 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.

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 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.

"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 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-co-imida), polianhídridos entrecruzados, poli(propilenfumarato), 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 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 secuencias de mRNA con alta estabilidad y traducibilidad. Las características estructurales del mRNA como un 5' Cap, una cola 3' poliadenina son algunas de las más importantes para asegurar una estabilidad apropiada y así permitir la

elevada capacidad de traducción. Esta cola de poliadenina puede sintetizarse mediante polimerización de poli(A) después de la transcripción in vitro o durante el paso de elongación de la propia transcripción in vitro. Para la segunda opción, es preferida la inclusión de un tramo 3' de oligotimidina en el plásmido molde. Esta opción es potencialmente útil para evitar la síntesis de colas de poliadenina de diferentes longitudes que pueden generar problemas de reproducibilidad. Una opción preferida es el uso de 5'-Cap, en particular se prefiere el uso de un Cap análogo anti-reverso (ARCA), que permite sintetizar exclusivamente RNAs capeados en la orientación correcta (Stepinski, 2001, RNA 7(10):1486-95 y Peng, 2002, Org Lett 4(2):161-4) y mejorar el rendimiento de las reacciones de transcripción in vitro.

En cuanto a la traducción, se prefiere incluir una señal fuerte de iniciación de la traducción Kozak antes del marco de lectura abierto (ORF) del gen de interés, y flaquear esta secuencia con regiones no traducibles (UTRs) de genes de elevada traducción en los extremos 3'y 5'. .

Algunos UTRs de genes de elevada traducción incluyen, pero no se limitan a los que codifican las proteínas α y β-globina.

Por lo tanto, una realización particular de la invención está dirigida a un mRNA que tiene un 5'-Cap, más preferiblemente un 5'-ARCA. 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', preferiblemente una región no traducida de un gen altamente traducido, como por ejemplo, α y β-globina. Y otra realización particular se refiere a un mRNA que tiene una región no traducida 3', preferiblemente una región no traducida de un gen altamente traducido como α y β-globina.

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 del gen objetivo. 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 lipoplexos deberían de ser positivos a pH fisiológico, como medida de du 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. 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 condenstante 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 anadamio 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.

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 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.

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 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, 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.

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,

(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,

(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 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 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 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.

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.

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

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 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 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 Phase Lock Gel Light (5Prime, Alemania), siguiendo 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 78125 células/cm^2 el día antes de la transfección. 4 h antes de la transfección, se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó por 50 μL de OptiMEM (Gibco). Los lipoplexos se prepararon a continuación

en 50 µl de 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 trasmitida fueron transfectadas con éxito (fig. 1B).

Las células U87MG fueron cultivadas rutinariamente en medio completo, que consiste en 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 CO_2. 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 que codifica para los factores de transcripción 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 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 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 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 generan los

andamiajes. Los complejos 3DFectIN/mRNA se mezclan después con 10 µL de OptiMEM 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 µL de OptiMEM añadidos a los complejos de 3DFectIN/mRNA por el mismo volumen de suspensión de células en OptiMEM. Un número de $1{,}5x10^5$ células pueden ser fácilmente incorporados en este volumen. Cuando las células van a ser cultivadas en los andamiajes, se puede 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 37ºC.

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 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 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 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 para ambos andamiajes (2 y 4 mg/mL de fibrinógeno). Sin embargo, se observó mayor agregación para proporciones de 3DFectIN/pDNA más elevadas que eran consistentes con el mayor tamaño del complejo medido por espectroscopía de correlación

de fotón a esas proporciones (tabla 1). El menor tamaño de los complejos 3DFectin/mRNA dificulta la observación de su distribución en los andamiajes.

Tabla 1: Caracterización fisicoquímica de los complejos transfectantes a base de pDNA y mRNA. Tamaño e índice de polidispersión (PDI) obtenido mediante microscopía de correlación fotónica.

Complejos 3DFectIN Ratios 3DFectIN:mRNA/pDNA (μL:μg)						
Material genético	2:1		3:1		4:1	
pDNA	Tamaño (nm) 516±335	PDI 0,3	Tamaño (nm) 1511±428	PDI 0,4	Tamaño (nm) 1420±294	PDI 0,5
mRNA	400±326	0,4	166±10	0,3	154±40	0,3

Se prepararon andamiajes de fibrina (2 mg/mL y 4 mg/mL) tal como se describió anteriormente, y se cargaron con $1,5x10^5$ células U87MG.

Los andamiajes de fibrina activados con mRNA se sembraron con células hMSC, y se 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 $1.5x10^5$ 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 $1.5x10^5$ 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 (37ºC, 5% de CO_2), 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 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 A-B, figura 12A). 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 pDNA.

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 $1.5x10^5$ 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 días y 7 días (37ºC, 5% CO_2).

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 (día 0), tras 3 días y después de 7 días. 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 (2,5%) durante 30 minutos, y a continuación, mediante la incubación de la suspensión resultante durante 20 minutos en SDS 0,1% y 10 minuntos en Triton X-100 1% (ambas soluciones en PBS) 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 9C). Los andamiajes 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 días, aunque no se observó proliferación adicional pasado el día 3.

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 conteniendo $1.5x10^5$ hMSCs. Como control negativo (C), se preparó un andamiaje no activado po5 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 (37ºC, 5% CO_2). 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 se describe en el ejemplo 4. La capacidad del andamiaje para apoyar la proliferación de células a tiempos breves (0, 12, 24 y 48 h) y a largo plazo (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 fibirina como los de 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 a tiempos breves y a largo plazo (Figuras 10E, F y 12B).

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, y una región no traducida 3' de α-globina. UTR 5' de β-globina ya estaba presente en el vector. Se agregó bien una cola de politimidina 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 11. 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 HEK293 en una placa de cultivo de 6 pocillos y se transfectaron con 4 µg 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 µg 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 µl de OptiMEM, se añadió el mismo volumen de este medio conteniendo $1.5x10^5$ 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 µl de suspensión 3DFectIN/mRNA. Después de la formación del hidrogel, se añadió medio de cultivo completo, y las células se cultivaron durante 24 h (37ºC, 5% CO_2).

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 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 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 9A).

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 9B). 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 sembrado). Los resultados mostraron una sobreexpresión de SOX9 en los andamiajes activados con mRNA 150000 veces superior al control, notablemente mejor que el conseguido con pDNA (Figura 12A).

Ejemplo 7

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 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 CO_2. La expresión génica de SOX9 en las células se valoró por qRT-PCR tal como se describe en el ejemplo 6 a 12, 24 y 48 h. Los valores máximos de expresión del gen se ajustaron al 100% arbitrariamente para comparar las cinéticas de mRNA y pDNA a la misma escala. Los valores de expresión de SOX9 se expresaron como relativos a los niveles de las células antes de la encapsulación. Los resultados mostraron un comportamiento similar para andamiajes de 2 y 4 mg/mL de fibrina. Los niveles máximos de expresión se obtuvieron a tiempos cortos en el caso de andamiajes activados con mRNA y a tiempos más largos para andamiajes activados con pDNA (figura 12 C y D).

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). Andamiajes sembrados con hMSCS y no activados se emplearon como control.

Después de la formación del andamiaje por reticulación (1 h a 37ºC 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/estreptomicina (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 37ºC, con un 90% de humedad y 5% de CO_2. 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 13).

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.

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		
	Col2a1	*ActB*	*GAPDH*	*Col2a1*	*ActB*	*GAPDH*	*Col2a1*	*ActB*	*GAPDH*
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

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.

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 sobreexperesado 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 14).

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 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**	
	Col2a1	***GAPDH***	***Col2a1***	***GAPDH***	***Col2a1***	***GAPDH***
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

Ejemplo 10.

En este ensayo de diferenciación, repetimos el mismo experimento que en el ejemplo 9, pero se analizó la expresión del marcador condrogénico después de 7 y 21 días en cultivo. También se testaron dos dosis de mRNA/pDNA por andamiaje (100 µL): 1 y 0,25 µg. Todos los andamiajes se cultivaron en CCM con algunas diferencias en la preparación del medio como se comparó en experimentos previos. No se incluyó ningún andamiaje de control y los niveles de expresión de genes al final del experimento se compararon con los niveles de hMSCs antes de la encapsulación.

A los 7 días, la expresión de SOX9 se reguló en todos los andamiajes activados: andamiajes activados con 1µg de DNA produjeron la mayor regulación positiva de genes seguidos de los andamiajes activados con 1µg RNA. La menor expresión de SOX9 la produjeron DNA 0,25 µg y RNA 0,25 µg aunque sus niveles de expresión fueron todavía

más elevados que aquellos observados en cultivos estándar de micromasa (Pellet). La mayor expresión ACAN a este tiempo se obtuvo para ambos andamiajes activados con RNA, sin diferencias estadísticas entre ellos. Niveles de ACAN para andamiajes de DNA y pellets celular fueron muchos menores que los andamiajes de RNA. Finalmente, en relación a la expresión de Col2A1, los andamiajes de RNA obtuvieron la mayor expresión génica otra vez, seguido de los andamiajes de DNA, y finalmente de los cultivos de micromasa, con una muy baja expresión en comparación. No hubo diferencias estadísticas entre andamiajes de 2 y 4 mg/mL en este punto (Figura 15, izquierda).

A los 21 días, la expresión de SOX9 no cambió cuando se comparó a la expresión encontrada a los 7 días, excepto para los andamiajes activados con 0,25 μg de DNA, que alcanzaron los mismos niveles de expresión que los andamiajes de 1 μg DNA. Las diferencias entre andamiajes de 2 y 4 mg/mL de fibrina aparecieron en este punto: andamiajes de 2 mg/mL indujeron una expresión de ACAN y Col2A1 más elevada que 4 mg/mL para casi todas las condiciones evaluadas. De hecho, los andamiajes de 4 mg/mL no indujeron niveles detectables de Col2A1 para la mayor parte de las condiciones. Las dosis de RNA/DNA no tuvieron un impacto significativo en la inducción de ACAN, consiguiéndose los mismos niveles de ACAN con ambas dosis. Por el contrario, andamiajes activados con 1 μg de RNA y 0,25 μg de DNA se sembraron para promocionar la mayor expresión de Col21A1 (Figura 15, derecha).

Además, estos resultados confirman la capacidad de los andamiajes activados con SOX9 para inducir la expresión de marcadores condrogénicos clave ACAN y Col21A1.

Ejemplo 11.

Este ejemplo constituye un experimento análogo al presentado en el ejemplo 7. Esta vez, intentamos determinar la cinética de expresión de MyoD sobre las transfección de hMSCs dentro de un andamiaje activado con MyoD-mRNA. Andamiajes con 2 y 4 mg/mL de fibrina se activaron con 0,5 μg de MyoD mRNA (3:1 3DFectIN/mRNA) siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero usando mRNA codificando MyoD (Miltenvi Biotec, Alemania). Este es un mRNA comercial modificado químicamente, resistente a la degradación por RNAsas, que induce la diferenciación miogénica a fibroblastos y hMSCs después de transfección. Los andamiajes se cultivaron durante 48 horas en un medio completo, a 37ºC, con 90% de humedad y 5% de CO2. La expresión forzada de MyoD en

hMSCs se siguió mediante PCR cuantitativa a tiempo real a 12, 24 y 48 h. Como se comparó en el experimento descrito en el ejemplo 7, en este experimento también evaluamos las cinéticas de expresión de marcadores miogénicos MyoG y CDH15, genes que regulan positivamente una vez que la diferenciación miogénica en cascada se ha iniciado. La Figura 16 muestra una regulación positiva muy elevada del factor de transcripción transfectado, MyoD, y del factor de transcripción miogénico MyoG, en los hMSCs encapsulados en los andamiajes de la invención. Esta regulación positiva se observa a las 12 h post-transfección. Más importante aún, también se detectó la expresión de un gen miogénico temprano, CDH15, a las 12 h post-transfección. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de marcadores miogénicos entre los andamiajes de fibrina de 2 y 4 mg/mL. Estos resultados sugieren la inducción de diferenciación miogénica en hMSCs encapsuladas con andamiajes de fibrina activados con MyoD mRNA.

Ejemplo 12.

Este experimento tiene relación con la difereciación miogénica de hMSCs encapsuladas en geles de fibrina activadas con MyoD mRNA. Geles de fibrina de 2 y 4 mg/mL (200 μL) se activaron con 0,5 μg de MyoD mRNA y se encapsularon hMSCs dentro de ellos. Los geles se prepararon como en el ejemplo 1 pero la cantidad de todos los componentes se incrementó 2 veces y el gel se preparó al doble de volumen (200 en lugar de 100 μL). Se añadió medio de crecimiento completo (α-MEM + 10% Fetal Bovine Serum, 1% Penicillin-streptomicina y 10 ng/mL FGF-2) sobre los geles durante las primeras 24 h para promocionar la transfección. El día después de la transfección, el medio se cambió por suero DMEM (DMEM glucosa elevada + 1% Horse Serum y 1% Penicillin-streptomicina) para promocionar la diferenciación. Las células se cultivaron durante 14 días, cambiando el medio cada 3 días, y se retiró al final del experimento para permitir la cuantificación de la expresión del marcador miogénico mediate PCR cuantitativo en tiempo real. Como se muestra en la Figura 17, la expresión de MyoD y MyoG se reguló positivamente en hMSCs encapsuladas dentro de andamiajes de fibrina activados con MyoD. La expresión de MyoG fue mayor en andamiajes de 4 mg/mL en comparación a los de 2 mg/mL.

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.
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, Myt1l y NeuroG2.
5. Andamio, según las reivindicaciones 1-2, donde el mRNA codifica para factor de trascripción 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.

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 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.

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 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).

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,

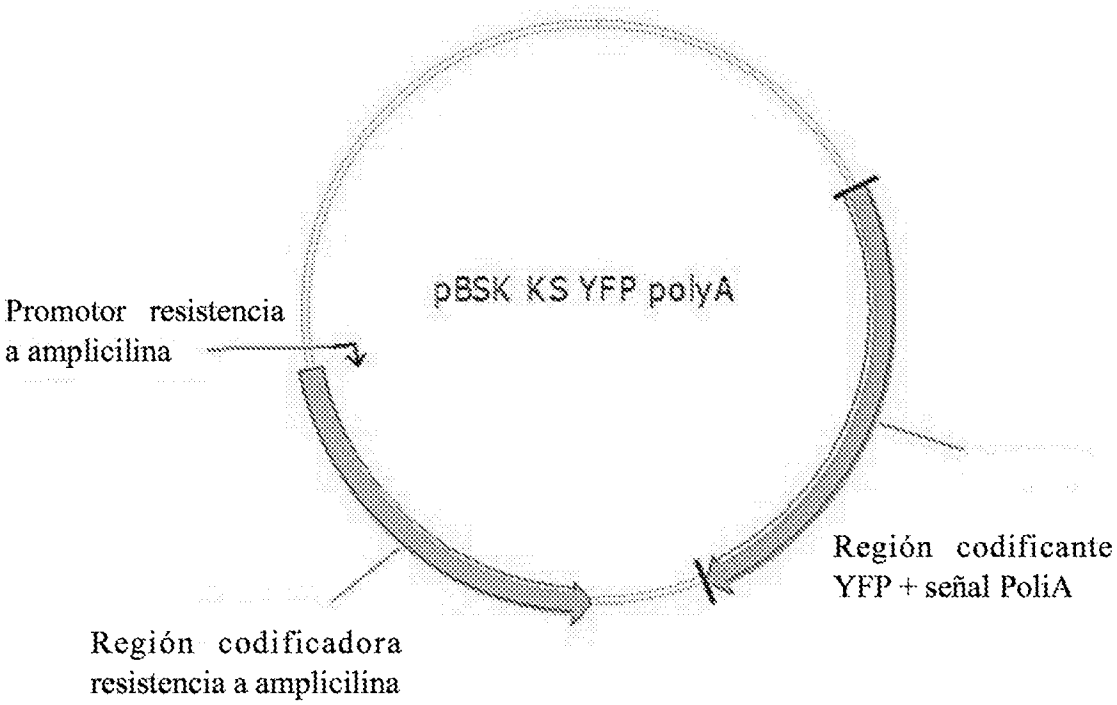
    (ii) Mezclar un mRNA aislado que codifica para un agente de transcripción y un agente de transfección,

(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.

A


pBSK KS YFP polyA
Promotor resistencia a amplicilina
Región codificante YFP + señal PoliA
Región codificadora resistencia a amplicilina

B

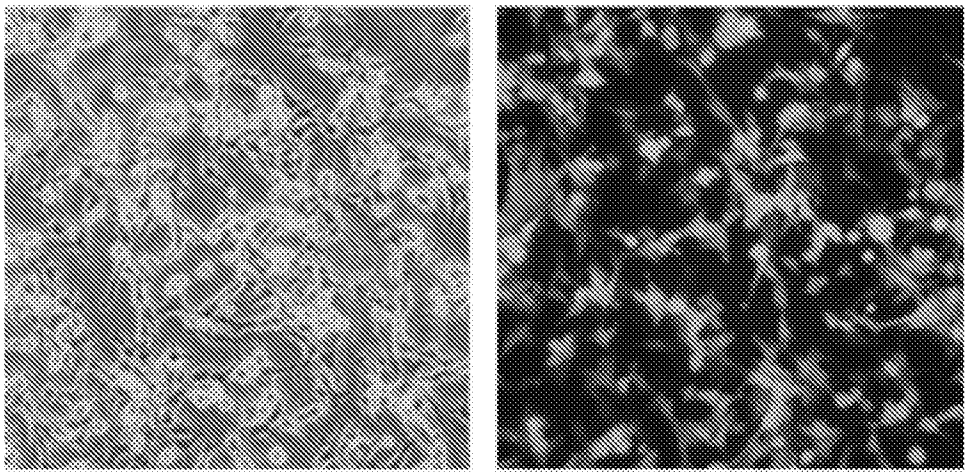


FIGURA 1

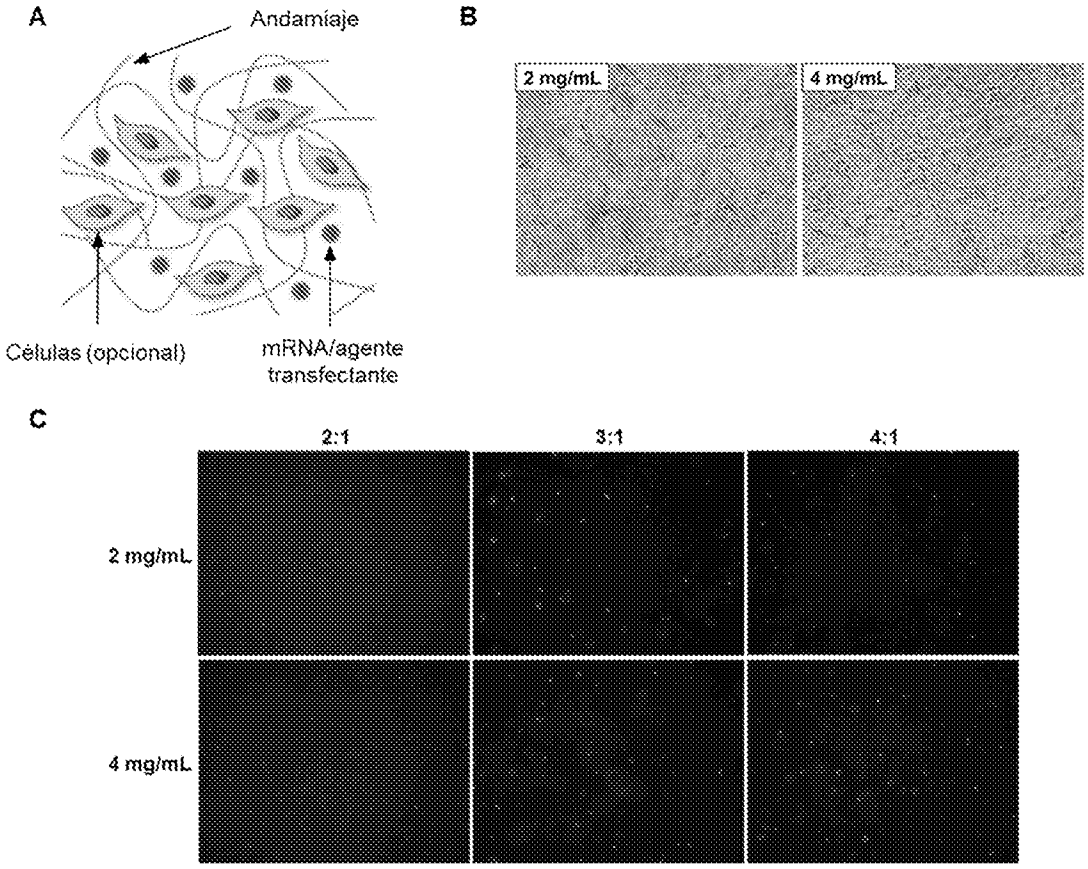

A
Andamiaje
Células (opcional)
mRNA/agente transfectante
B
2 mg/mL
4 mg/mL
C
2:1
3:1
4:1
2 mg/mL
4 mg/mL

FIGURA 2

5

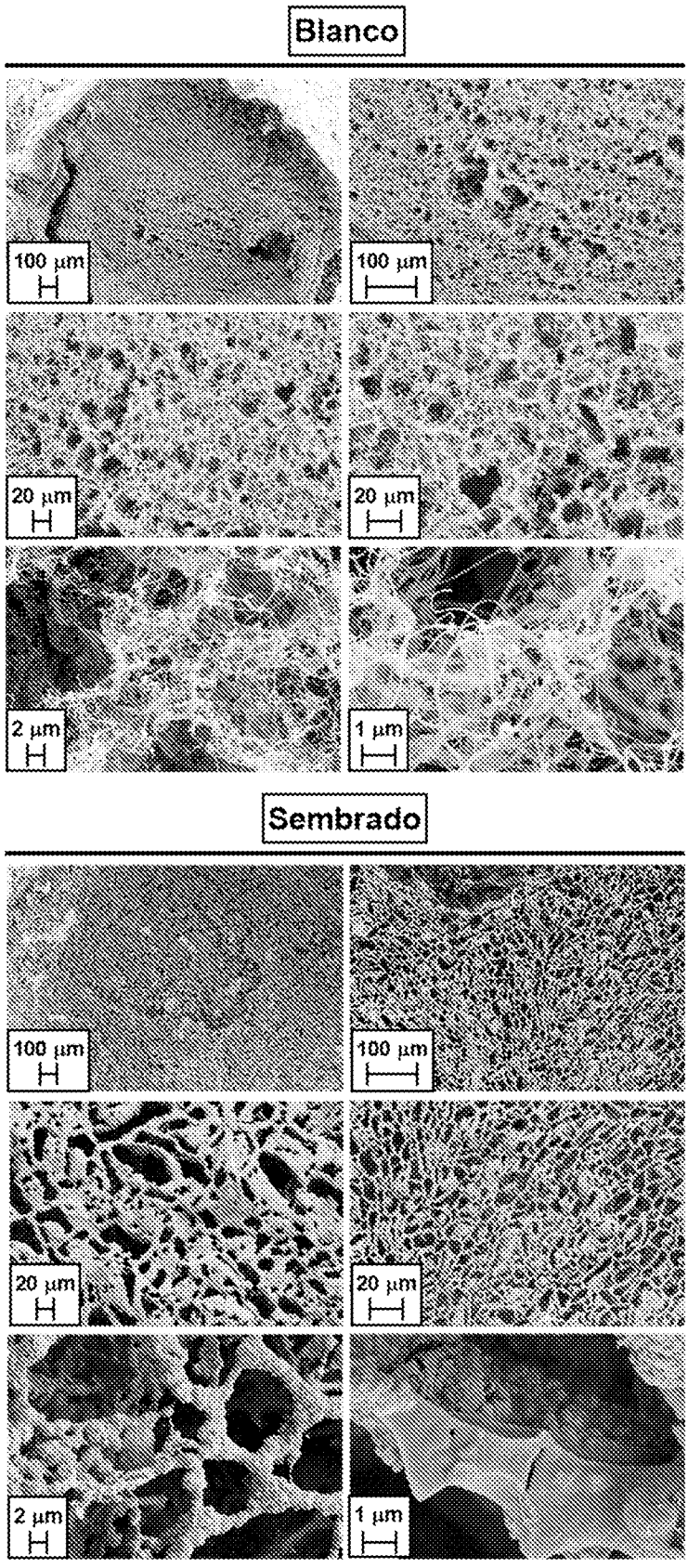

Blanco
100 µm
100 µm
20 µm
20 µm
2 µm
1 µm
Sembrado
100 µm
100 µm
20 µm
20 µm
2 µm
1 µm

FIGURA 3

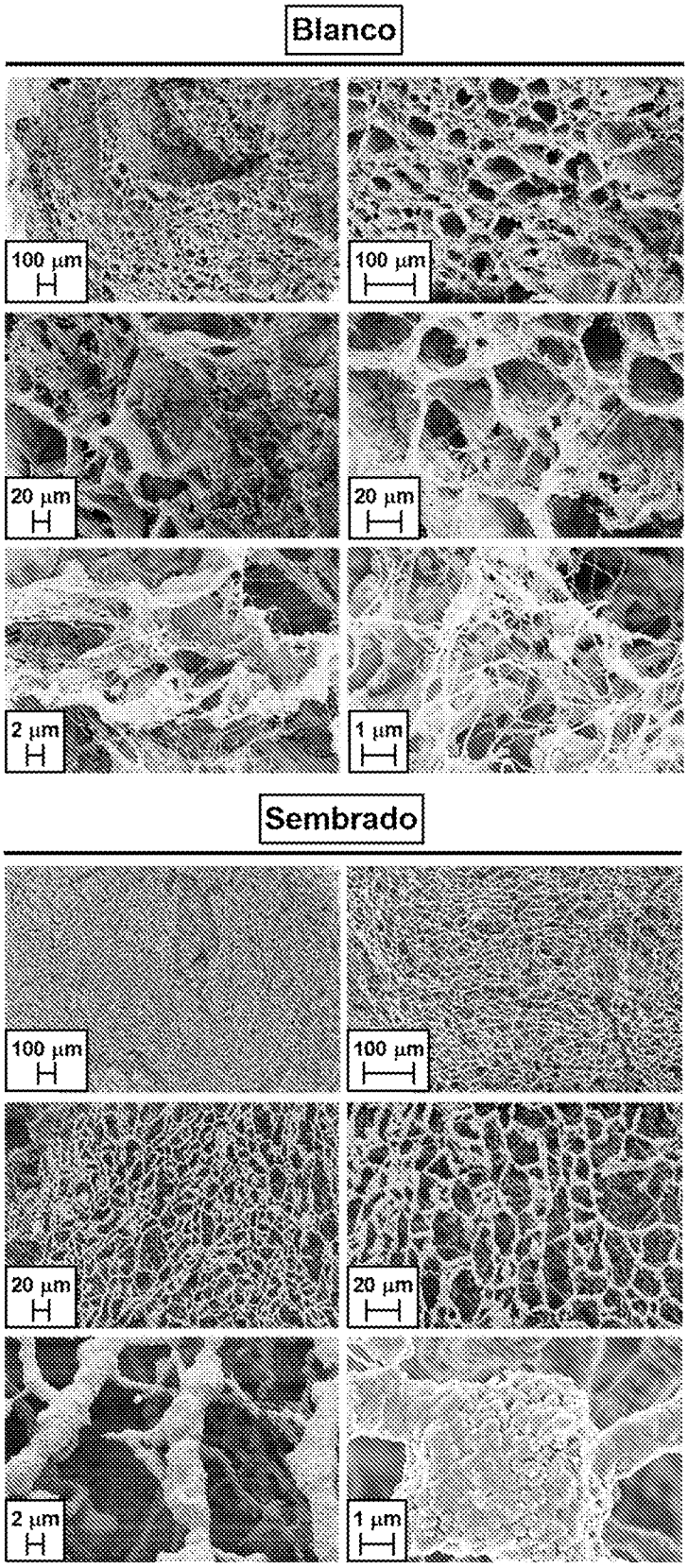

Blanco
100 µm
100 µm
20 µm
20 µm
2 µm
1 µm
Sembrado
100 µm
100 µm
20 µm
20 µm
2 µm
1 µm

FIGURA 4

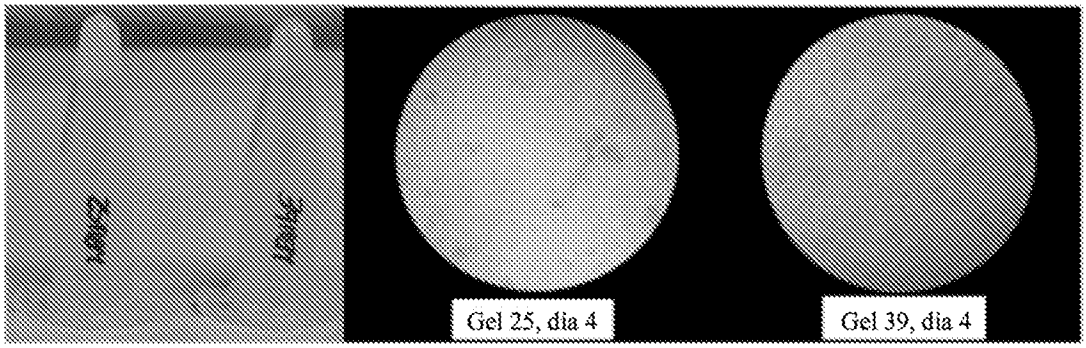


FIGURA 5

5

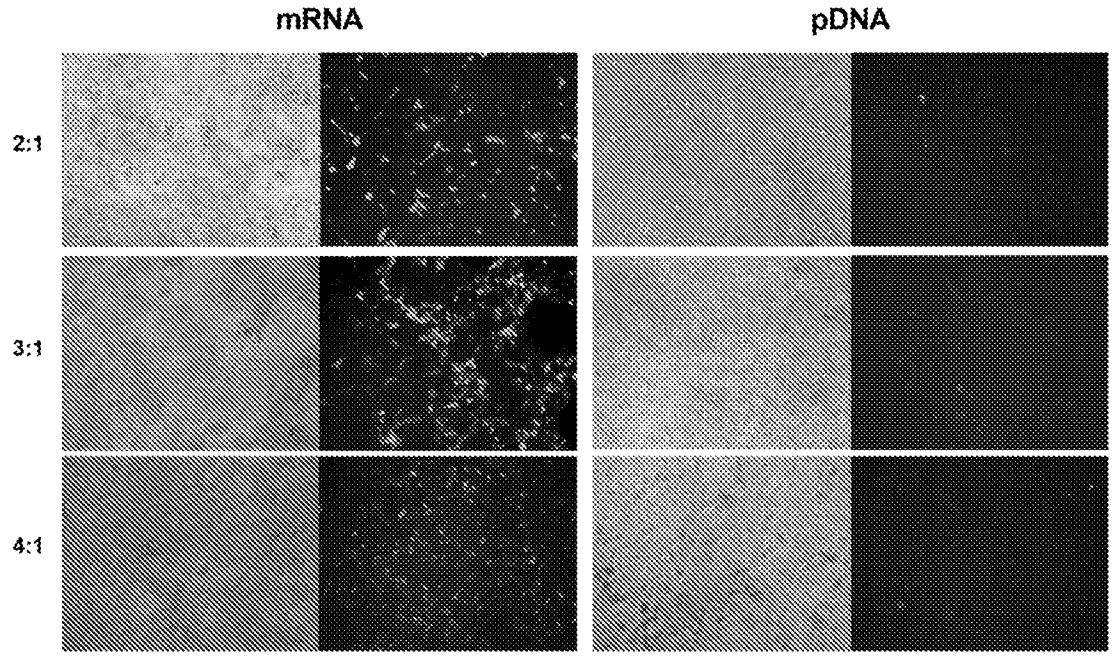


FIGURA 6

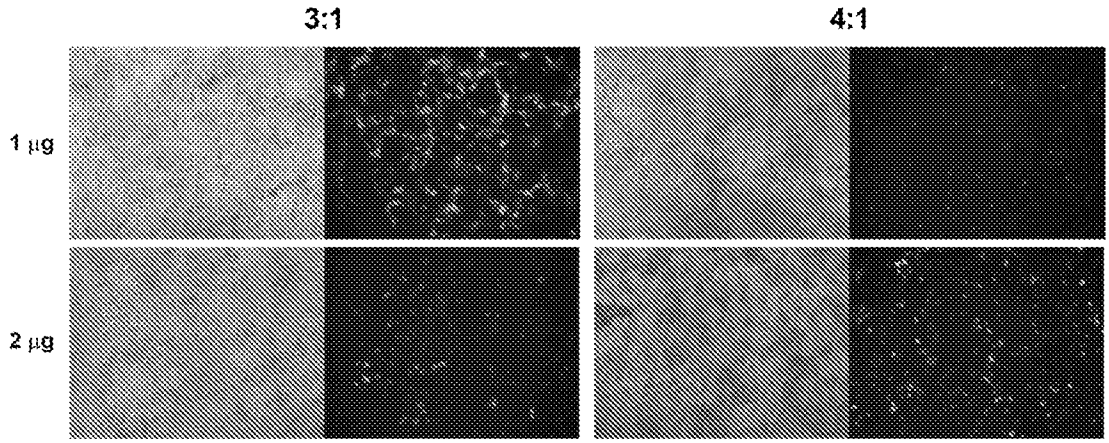


FIGURA 7

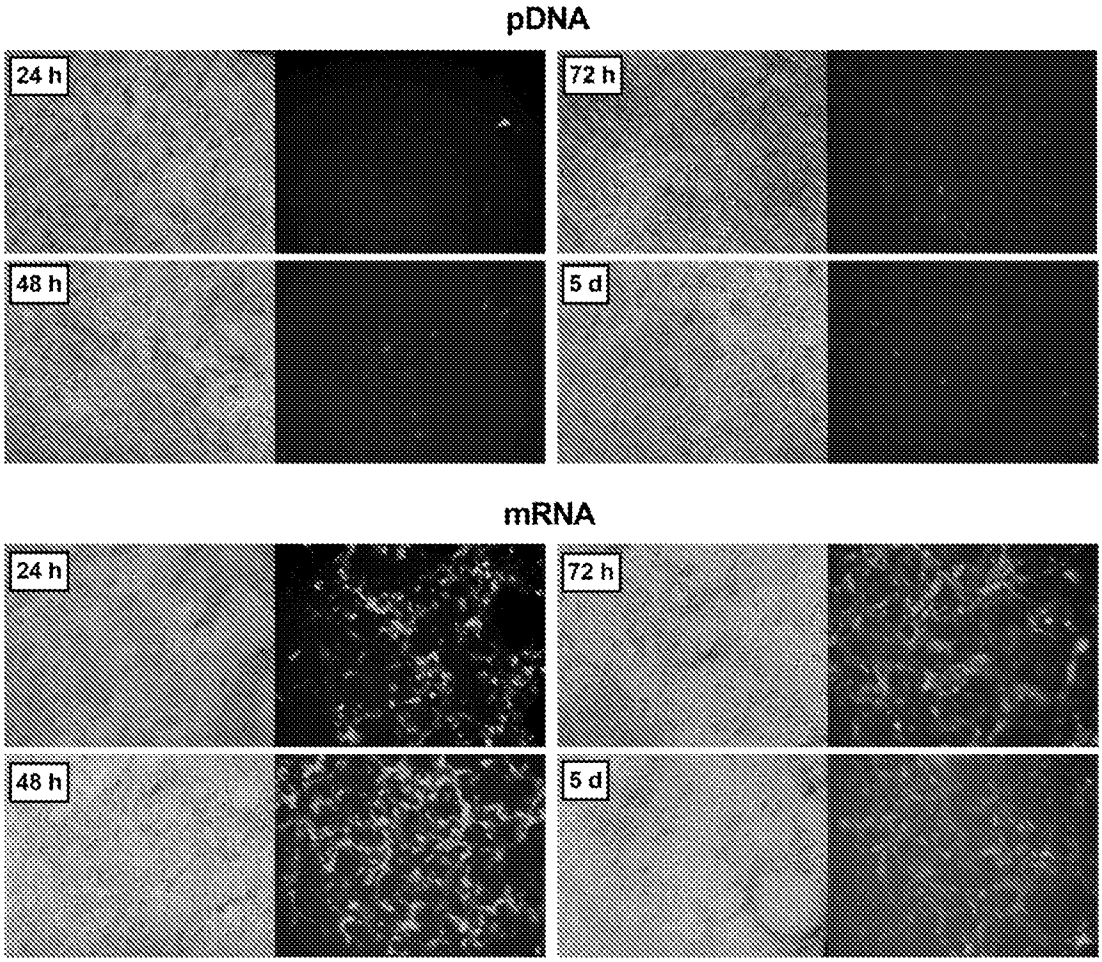


FIGURA 8

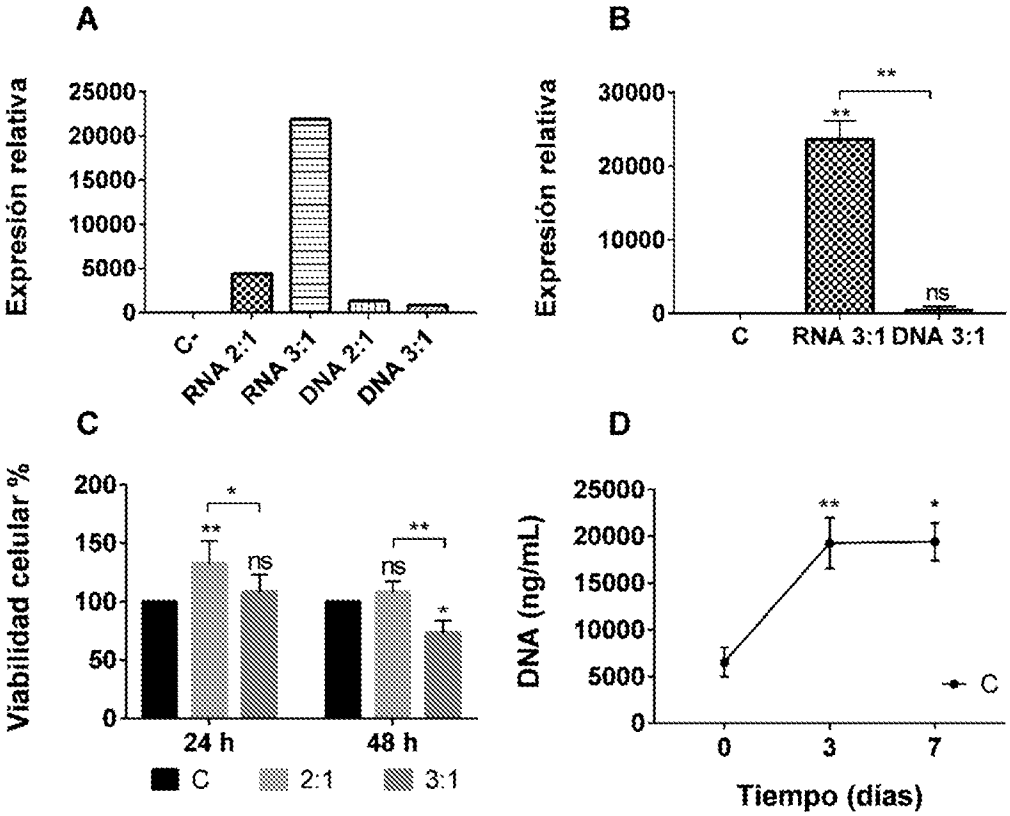

A
Expresión relativa
25000
20000
15000
10000
5000
0
C-
RNA 2:1
RNA 3:1
DNA 2:1
DNA 3:1
B
Expresión relativa
30000
20000
10000
0
**
**
ns
C
RNA 3:1
DNA 3:1
C
Viabilidad celular %
200
150
100
50
0
*
**
ns
**
ns
*
24 h
48 h
C
2:1
3:1
D
DNA (ng/mL)
25000
20000
15000
10000
5000
0
**
*
C
0
3
7
Tiempo (días)

FIGURA 9

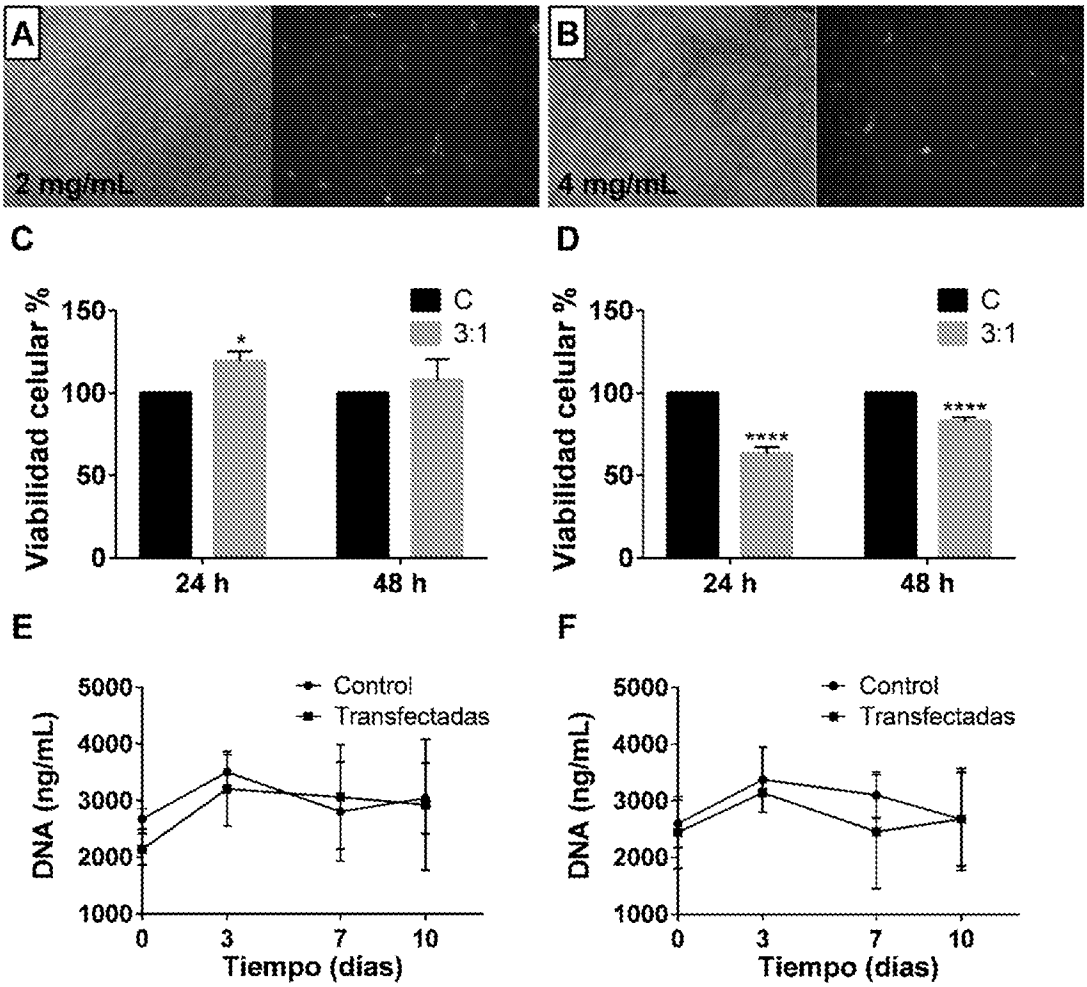
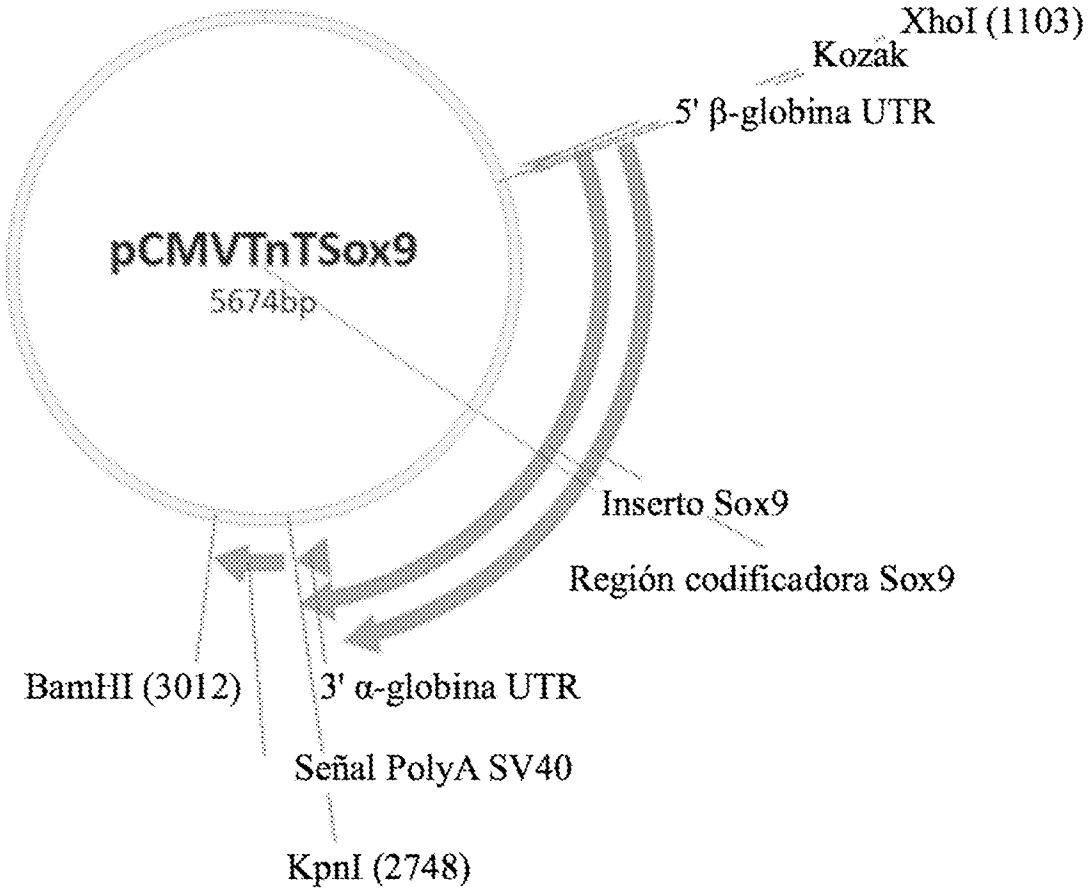

A
2 mg/mL
B
4 mg/mL
C
Viabilidad celular %
150
100
50
0
C
3:1
*
24 h
48 h
D
Viabilidad celular %
150
100
50
0
C
3:1
****
****
24 h
48 h
E
DNA (ng/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
Control
Transfectadas
0
3
7
10
Tiempo (días)
F
DNA (ng/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
Control
Transfectadas
0
3
7
10
Tiempo (días)

FIGURA 10

A


XhoI (1103)
Kozak
5' β-globina UTR
pCMVTnTSox9
5674bp
Inserto Sox9
Región codificadora Sox9
BamHI (3012)
3' α-globina UTR
Señal PolyA SV40
KpnI (2748)

B

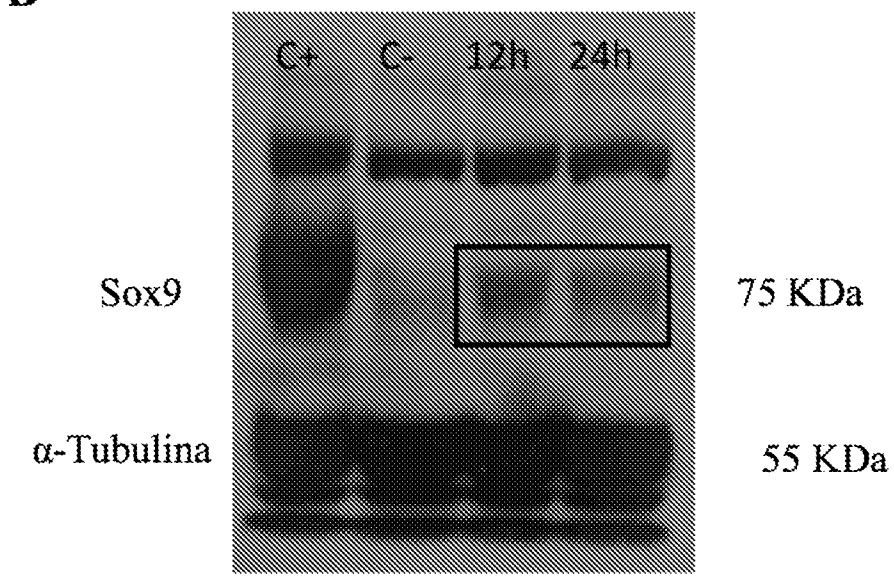

C+
C-
12h
24h
Sox9
75 KDa
α-Tubulina
55 KDa

FIGURA 11

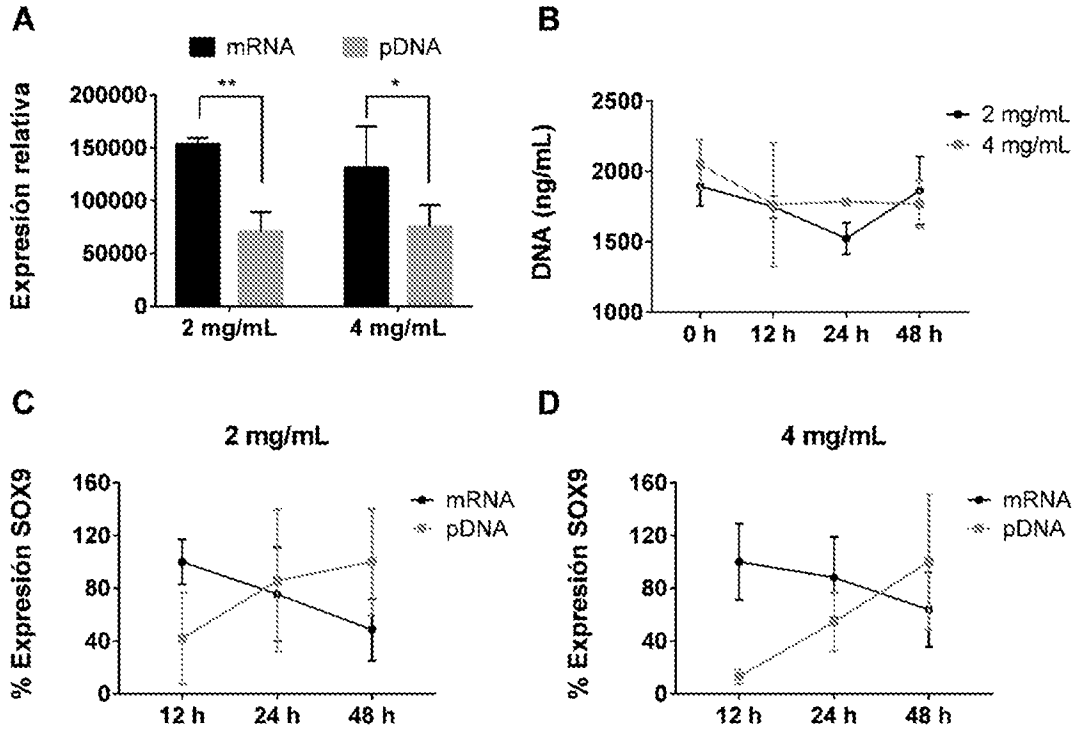

A
mRNA
pDNA
Expresión relativa
200000
150000
100000
50000
0
**
*
2 mg/mL
4 mg/mL
B
DNA (ng/mL)
2500
2000
1500
1000
2 mg/mL
4 mg/mL
0 h
12 h
24 h
48 h
C
2 mg/mL
% Expresión SOX9
160
120
80
40
0
mRNA
pDNA
12 h
24 h
48 h
D
4 mg/mL
% Expresión SOX9
160
120
80
40
0
mRNA
pDNA
12 h
24 h
48 h

FIGURA 12

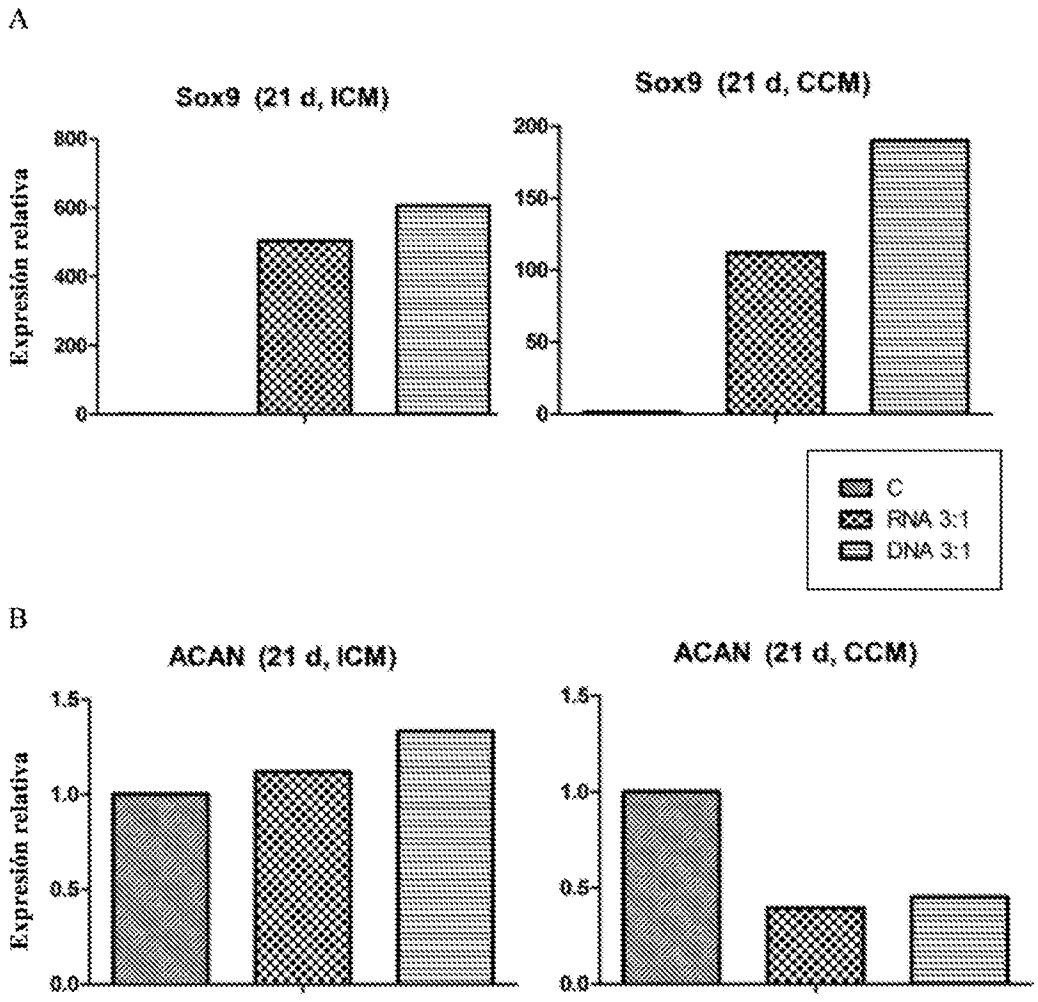
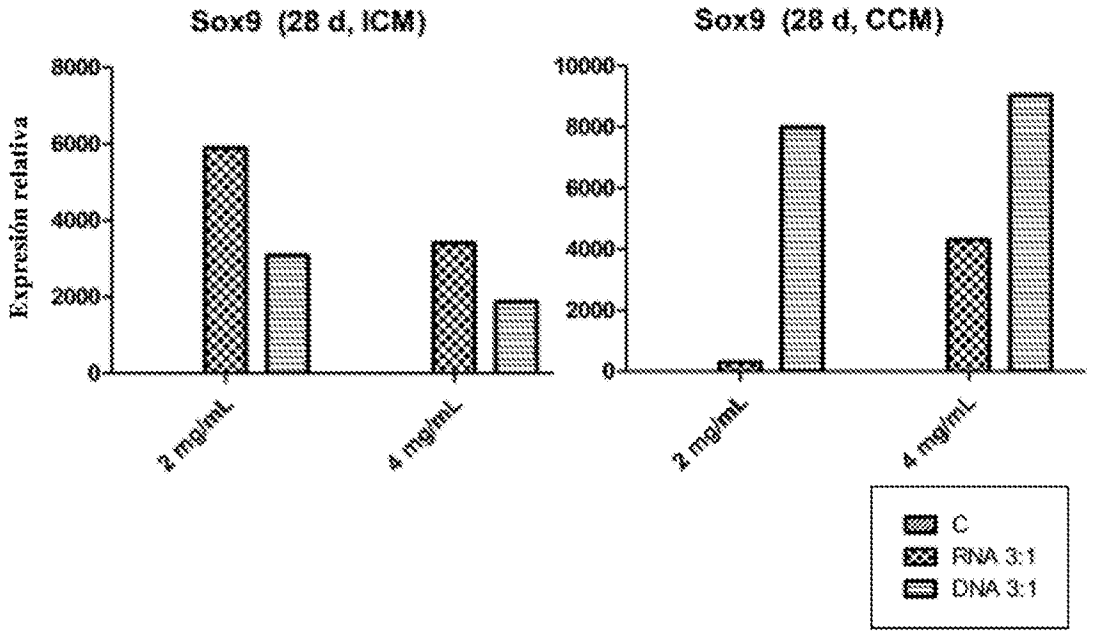

A
Sox9 (21 d, ICM)
Sox9 (21 d, CCM)
Expresión relativa
800
600
400
200
0
200
150
100
50
0
C
RNA 3:1
DNA 3:1
B
ACAN (21 d, ICM)
ACAN (21 d, CCM)
Expresión relativa
1.5
1.0
0.5
0.0

FIGURA 13

A


Sox9 (28 d, ICM)
Sox9 (28 d, CCM)
Expresión relativa
8000
6000
4000
2000
0
10000
8000
6000
4000
2000
0
2 mg/mL
4 mg/mL
2 mg/mL
4 mg/mL
C
RNA 3:1
DNA 3:1

B

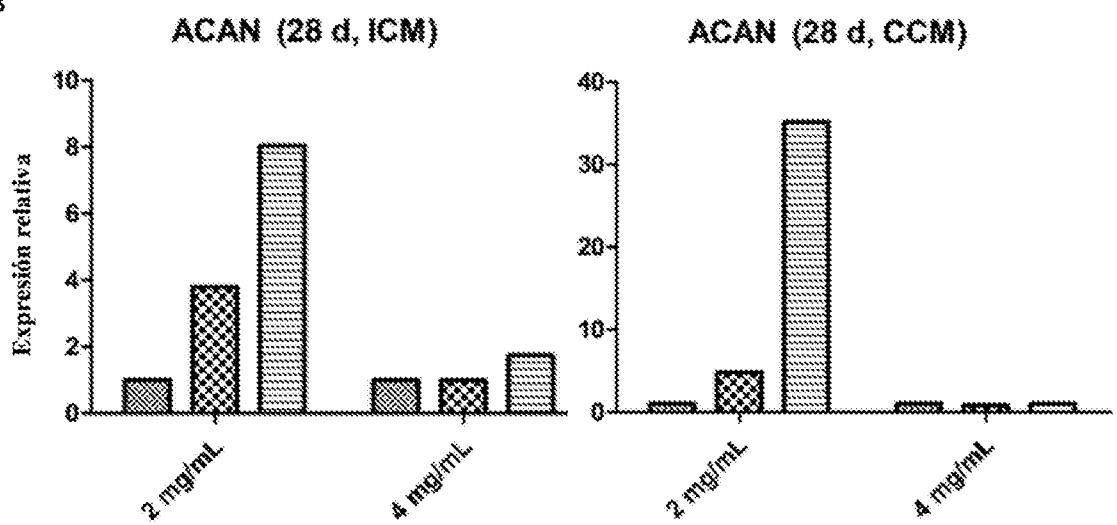

ACAN (28 d, ICM)
ACAN (28 d, CCM)
Expresión relativa
10
8
6
4
2
0
40
30
20
10
0
2 mg/mL
4 mg/mL
2 mg/mL
4 mg/mL

FIGURA 14

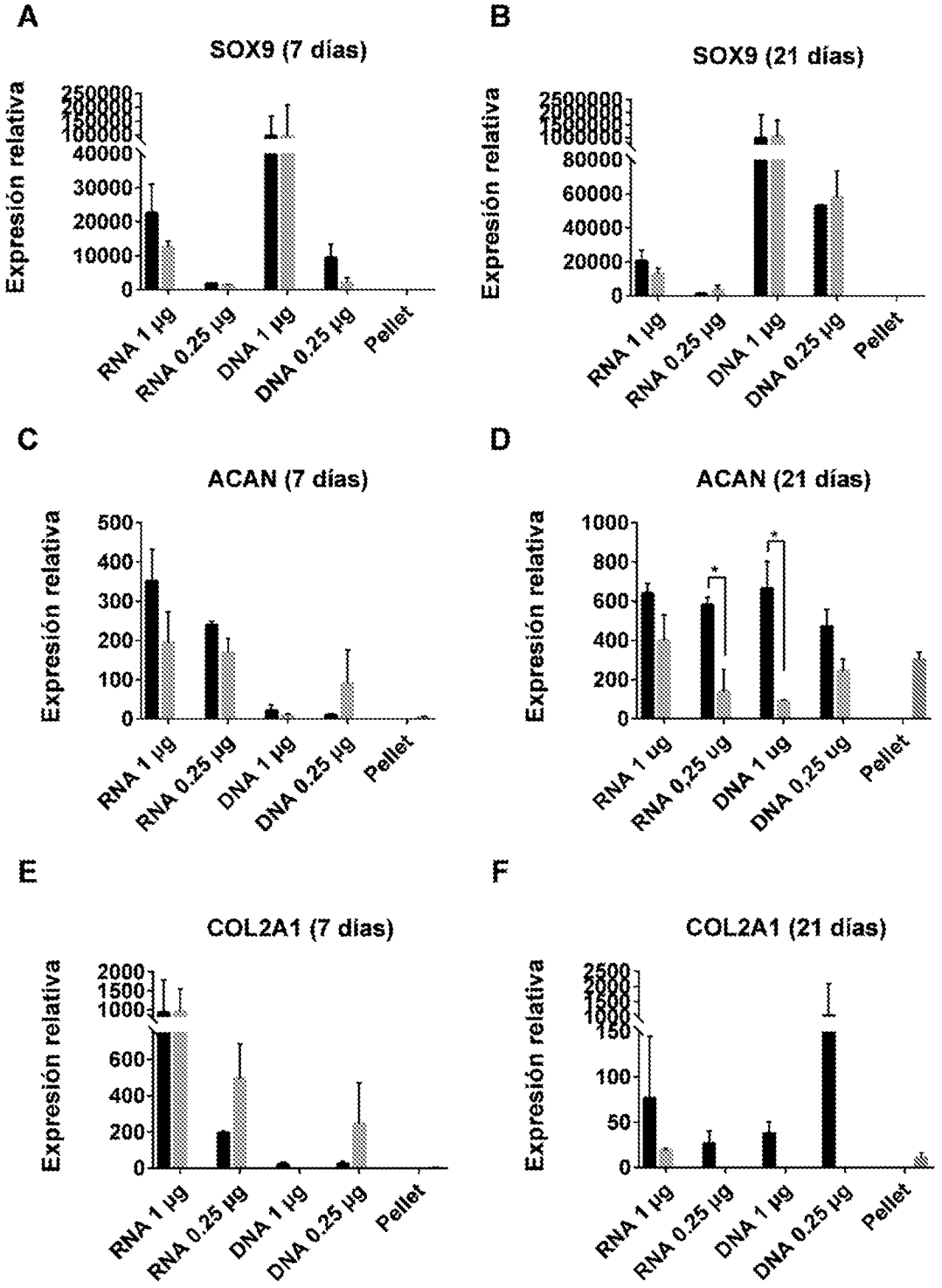

A
SOX9 (7 días)
Expresión relativa
250000
100000
40000
30000
20000
10000
0
RNA 1 µg
RNA 0.25 µg
DNA 1 µg
DNA 0.25 µg
Pellet
B
SOX9 (21 días)
Expresión relativa
2500000
1000000
80000
60000
40000
20000
0
RNA 1 µg
RNA 0.25 µg
DNA 1 µg
DNA 0.25 µg
Pellet
C
ACAN (7 días)
Expresión relativa
500
400
300
200
100
0
RNA 1 µg
RNA 0.25 µg
DNA 1 µg
DNA 0.25 µg
Pellet
D
ACAN (21 días)
Expresión relativa
1000
800
600
400
200
0
*
*
RNA 1 µg
RNA 0,25 µg
DNA 1 µg
DNA 0,25 µg
Pellet
E
COL2A1 (7 días)
Expresión relativa
2000
1500
1000
600
400
200
0
RNA 1 µg
RNA 0.25 µg
DNA 1 µg
DNA 0.25 µg
Pellet
F
COL2A1 (21 días)
Expresión relativa
2500
2000
1500
1000
150
100
50
0
RNA 1 µg
RNA 0.25 µg
DNA 1 µg
DNA 0.25 µg
Pellet

FIGURA 15

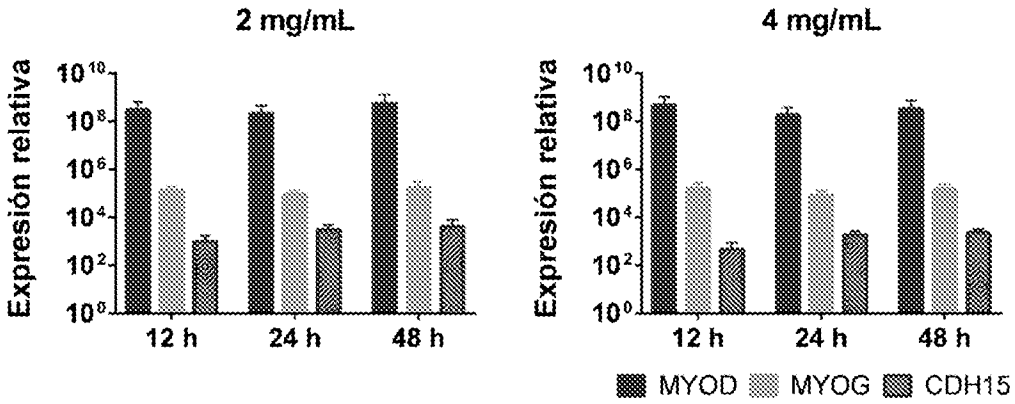


FIGURA 16

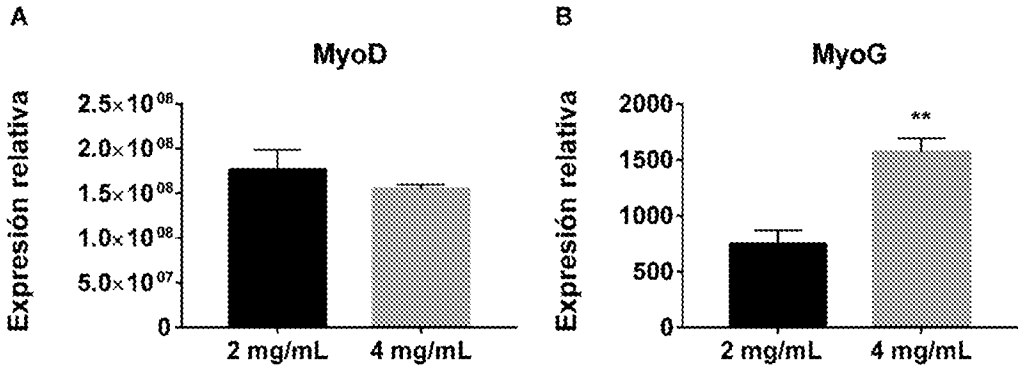


FIGURA 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/070262

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61L, A61K, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, INTERNET.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015010501 A1 (CRAWFORD KEITH D *et al.*) 08/01/2015, paragraphs [0007], [0009], [0015], [0020], [0036], [0068] and [0095].	1-26
A	US 2014341870 A1 (ISAEV ARTUR ALEKSANDROVICH *et al.*) 20/11/2014, paragraphs [0016], [0018], [0019] and [0020].	1-26
A	US 2010189794 A1 (LUO DAN *et al.*) 29/07/2010, paragraphs [0004], [0007], [0025], [0041], [0050], [0051], [0098], [0107] and [0113].	1-26
A	US 2007031465 A1 (KOJIMA HIROKO *et al.*) 08/02/2007, paragraphs [0007]-[0010].	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24/07/2017	**(28/07/2017)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer S. González Peñalba Telephone No. 91 3493025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/070262

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HASTINGS CONN L *et al*. Drug and cell delivery for cardiac regeneration.. Advanced drug delivery reviews Netherlands Apr 2015, Vol. 84, Pages 85 - 106, ISSN 1872-8294 (Electronic), <DOI: doi:10.1016/j.addr.2014.08.006 pubmed:25172834> Page 93, left column, paragraph 3.2.2.1.	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2017/070262

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2015010501 A1	08.01.2015	WO2013148334 A1	03.10.2013
US2014341870 A1	20.11.2014	ES2617338T T3	16.06.2017
		UA112450 C2	12.09.2016
		CN104203285 A	10.12.2014
		CA2866483 A1	04.07.2013
		EA201400401 A1	30.07.2014
		RU2011153873 A	10.07.2013
		RU2519326 C2	10.06.2014
		EP2797633 A2	05.11.2014
		EP2797633 A4	14.01.2015
		WO2013100818 A2	04.07.2013
		WO2013100818 A3	06.09.2013
US2010189794 A1	29.07.2010	US8715732 B2	06.05.2014
US2007031465 A1	08.02.2007	JPWO2005035014 A1	21.12.2006
		JP4426532B B2	03.03.2010
		WO2005035014 A1	21.04.2005
		EP1681067 A1	19.07.2006
		CN1893986 A	10.01.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070262

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/54 (2006.01)
A61L27/58 (2006.01)
A61K35/12 (2015.01)
C12N15/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2017/070262

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61L, A61K, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, INTERNET.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 2015010501 A1 (CRAWFORD KEITH D *et al.*) 08/01/2015, párrafos [0007], [0009], [0015], [0020], [0036], [0068] y [0095].	1-26
A	US 2014341870 A1 (ISAEV ARTUR ALEKSANDROVICH *et al.*) 20/11/2014, párrafos [0016], [0018], [0019] y [0020].	1-26
A	US 2010189794 A1 (LUO DAN *et al.*) 29/07/2010, párrafos [0004], [0007], [0025], [0041], [0050], [0051], [0098], [0107] y [0113].	1-26
A	US 2007031465 A1 (KOJIMA HIROKO *et al.*) 08/02/2007, párrafos [0007]-[0010].	1-26

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
24/07/2017	**28 de julio de 2017 (28/07/2017)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado S. González Peñalba Nº de teléfono 91 3493025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2017/070262

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	HASTINGS CONN L *et a*l. Drug and cell delivery for cardiac regeneration.. Advanced drug delivery reviews Netherlands Apr 2015, Vol. 84, Páginas 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

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070262

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2015010501 A1	08.01.2015	WO2013148334 A1	03.10.2013
US2014341870 A1	20.11.2014	ES2617338T T3	16.06.2017
		UA112450 C2	12.09.2016
		CN104203285 A	10.12.2014
		CA2866483 A1	04.07.2013
		EA201400401 A1	30.07.2014
		RU2011153873 A	10.07.2013
		RU2519326 C2	10.06.2014
		EP2797633 A2	05.11.2014
		EP2797633 A4	14.01.2015
		WO2013100818 A2	04.07.2013
		WO2013100818 A3	06.09.2013
US2010189794 A1	29.07.2010	US8715732 B2	06.05.2014
US2007031465 A1	08.02.2007	JPWO2005035014 A1	21.12.2006
		JP4426532B B2	03.03.2010
		WO2005035014 A1	21.04.2005
		EP1681067 A1	19.07.2006
		CN1893986 A	10.01.2007

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070262

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

A61L27/54 (2006.01)
A61L27/58 (2006.01)
A61K35/12 (2015.01)
C12N15/00 (2006.01)