

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 503**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2013 PCT/EP2013/003301**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2013 E 13786423 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2916881**

54 Título: **Hidrogeles de alginato sulfatados para cultivo celular y terapia**

30 Prioridad:

07.11.2012 EP 12007560
19.11.2012 EP 12007934

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2020

73 Titular/es:

ETH ZURICH (100.0%)
Raemistrasse 101/ETH Transfer
8092 Zurich, CH

72 Inventor/es:

ZENOBI-WONG, MARCY;
PALAZZOLO, GEMMA;
MHANNA, RAMI;
BECHER, JANA;
MÖLLER, STEFANIE y
SCHNABELRAUCH, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 769 503 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hidrogeles de alginato sulfatados para cultivo celular y terapia

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a hidrogeles de alginato sulfatados y a su uso en ingeniería tisular y en medicina regenerativa.

10 **Antecedentes**

La curación de lesiones del cartílago con las terapias basadas en células disponibles actualmente está impedida por la desigual retención y crecimiento de las células trasplantadas.

15 Asimismo, la regeneración nerviosa después del daño está inhibida por múltiples señales procedentes del microentorno de la cicatriz glial, y los biomateriales con una potente capacidad para estimular la neurogénesis tendrían una elevada importancia clínica.

20 Los alginatos, como un ejemplo de dicho biomaterial, son polímeros naturales que consisten en dos monosacáridos, ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), dispuestos en unas estructuras en bloque homopoliméricas (polimanuronato o poliguluronato) o heteropoliméricas (Fig. 1). Pueden ser extraídos a partir de algas marinas y no ejercen ninguna reacción inmunológica fuerte cuando se inyectan en los tejidos de mamíferos [Suzuki *et al.*, Journal of Biomedical Materials Research. 1998; 39: 317-22].

25 El alginato es completamente biocompatible, está aprobado por la FDA y se usa ampliamente en ingeniería tisular, en medicina regenerativa, en la encapsulación de células y en la administración de fármacos. Sus propiedades pueden ser ajustadas variando la cantidad de ácido α -L-gulurónico (G) y de ácido β -D-manurónico (M) unidos por (1,4), y mediante una funcionalización con factores de crecimiento y moléculas de adhesión, tales como un RGD-péptido (ácido arginilglicil aspártico).

30 El alginato se ha usado ampliamente, junto con otros biomateriales y/o se ha funcionalizado con factores de crecimiento, como un sistema de administración de fármacos y como armazón para la ingeniería tisular. Francis *et al.* muestran que los fibroblastos que expresan el factor neurotrófico derivado del cerebro (Fb/BDNF) pueden ser incorporados en alginato y guiar el crecimiento neurítico de los ganglios de las raíces dorsales (DRG) [Francis *et al.*, Journal of microencapsulation. 2011; 28: 353-62]. Los factores de crecimiento (GF) también pueden unirse directamente al alginato, estando regulada su liberación por la disrupción de los puentes iónicos entre los factores cargados positivamente y el alginato polianiónico. Los hidrogeles de alginato injertado con NGF / ácido poligammaglutámico se han usado para la inducción de la diferenciación neural de células madre pluripotentes inducidas [Kuo y Chang, Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2012; 102C: 405-11]. Además, la sulfatación de los ácidos urónicos de alginato proporciona una unión fuerte y específica a las proteínas de unión a la heparina, algunas de las cuales no se unen normalmente al alginato puro. Por ejemplo, un armazón de sulfato de alginato puede sostener la liberación del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) al medio extracelular [Freeman *et al.*, Biomaterials. 2008; 29: 3260-8], así como la liberación del TGF- β , induciendo el último la diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimatosas humanas [Re'em *et al.*, Biomaterials. 2012; 33: 751-61].

45 Se ha demostrado que el sulfato de alginato posee propiedades anticoagulantes similares a las de la heparina [Ronghua *et al.*, Carbohydrate Polymers. 2003; 52: 19-24].

50 Es el objetivo de la presente invención proporcionar medios y métodos para la ingeniería tisular y para el tratamiento regenerativo, particularmente para los tratamientos de las lesiones del cartílago o de los daños nerviosos.

El objetivo se consigue con la materia objeto de las reivindicaciones independientes.

55 **Sumario de la invención**

Definiciones

60 El término "sulfato de alginato", usado de forma sinónima como "alginato sulfatado" en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un polisacárido que consiste en ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) organizados en estructuras en bloque homo- o heteropoliméricas (Fig. 1). Cada unidad de monosacárido contiene 2 grupos hidroxilo (-OH) disponibles para una sulfatación. El polímero de alginato puede tener un grado de sustitución de la sulfatación (DS) que varía entre 0 y 2 por monómero (unidad de monosacárido, tanto de ácido β -D-manurónico como de ácido α -L-gulurónico) o entre 0 y 4 por unidad de disacárido (bien de ácido β -D-manurónico - ácido- α -L-gulurónico, de ácido β -D-manurónico - ácido β -D-manurónico o de ácido α -L-gulurónico - ácido α -L-gulurónico), lo que significa que entre ninguno y todos los grupos -OH disponibles están sulfatados. El grado de sulfatación dicta las propiedades físicas y biológicas del hidrogel que está formado por dicho polímero de alginato sulfatado.

El término "hidrogel" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una composición en gel de un polímero acuoso que comprende entre un 0,1 y un 5 % (m/m) de polímero. El término "hidrogel de alginato sulfatado", denominado también como "hidrogel de sulfato de alginato" en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un hidrogel según la anterior definición, en el que el polímero es alginato sulfatado.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un método para proporcionar una célula de mamífero incluida, en el que el método comprende las etapas de

- proporcionar un alginato sulfatado en solución acuosa;
- hacer reaccionar el alginato sulfatado para formar un hidrogel en una etapa de gelación,
- proporcionar una célula precursora, en la que particularmente la célula precursora deriva de un mamífero,
- incluir la célula precursora en el hidrogel de alginato sulfatado en una etapa de inclusión, produciendo así una célula incluida en un hidrogel de alginato sulfatado.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un hidrogel de alginato sulfatado, que comprende un alginato sulfatado con un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1 por monómero, particularmente de entre 0,5 y 0,9 por monómero.

En algunas realizaciones de cualquier método o composición en cuestión (hidrogel de alginato sulfatado) aspecto de la invención, el hidrogel de alginato sulfatado tiene un contenido de alginato sulfatado de entre el 0,1 y el 5 % (por masa: m/m 0 % en peso).

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el alginato sulfatado está caracterizado por una fracción molar de ácido β -D-manurónico:ácido α -L-gulurónico de 20:80 (ácido β -D-manurónico:ácido α -L-gulurónico), de 30:70 (ácido β -D-manurónico:ácido α -L-gulurónico), de 40:60 (ácido β -D-manurónico:ácido α -L-gulurónico), de 50:50 (ácido β -D-manurónico:ácido α -L-gulurónico) o de 60:40 (ácido β -D-manurónico:ácido α -L-gulurónico). En algunas realizaciones, el alginato sulfatado está caracterizado por una fracción molar de ácido β -D-manurónico:ácido α -L-gulurónico de 40:60 (ácido β -D-manurónico:ácido α -L-gulurónico).

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el alginato sulfatado tiene un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1 por monómero, particularmente de entre 0,5 y 0,9 por monómero. En algunas realizaciones, el alginato sulfatado tiene un grado de sulfatación de entre 0,2 y 2 por unidad de disacárido, particularmente de entre 1 y 1,8 por unidad de disacárido.

Una ventaja del hidrogel de alginato sulfatado de la invención es que facilita la formación del gel de alginato sulfatado en presencia de iones Ca^{2+} , lo que previamente no era posible. La presencia de grupos sulfato aumenta la carga negativa de la cadena polimérica del alginato sulfatado, causando la repulsión de las cadenas y una interferencia con la interacción Ca^{2+} /carboxilo, inhibiendo así la formación del gel con los mayores grados de sulfatación. Cuanto mayor es el grado de sustitución o de sulfatación, más blando y poroso se vuelve el hidrogel de alginato sulfatado. Adicionalmente, la presencia de grupos sulfato en el alginato sulfatado es particularmente ventajosa para la diferenciación y el crecimiento de la célula precursora incluida. Las interacciones moleculares entre las dos cadenas de alginato de sulfato son más débiles, y el tamaño de poro global del material aumenta con la sulfatación. Esto proporciona un material más blando, que las células son capaces de deformar y de reorganizar usando sus propios mecanismos de contractilidad.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el alginato sulfatado comprende o está constituido esencialmente por alginato sulfatado que está modificado adicionalmente por fracciones aldehído, fracciones carboxilo, fracciones amino, fracciones vinil sulfona, fracciones tiol, grupos éster o éter saturados o insaturados, en los que particularmente los grupos hidroxilo no sulfatados o los grupos carboxilo del alginato sulfatado están modificados por las anteriores fracciones o grupos mencionados. Una ventaja de la modificación de los grupos hidroxilo o carboxilo del alginato sulfatado es que estas modificaciones pueden usarse para reticular los geles usando una adición de Michael (vinil sulfona, tiol), en cuyo caso no se requiere la gelación del calcio para la formación del hidrogel.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el alginato sulfatado comprende o está constituido esencialmente por alginato sulfatado, en el que no más del 50 % de los grupos hidroxilo están modificados por fracciones aldehído, fracciones carboxilo, fracciones amino, vinil sulfona, fracciones tiol, grupos éster o éter saturados o insaturados, y en los que particularmente el alginato sulfatado tiene un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1 por monómero, particularmente de entre 0,5 y 0,9 por monómero.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el alginato sulfatado comprende o está constituido esencialmente por alginato sulfatado que está modificado adicionalmente por la unión covalente de

grupos éster de acrilato o de metacrilato a grupos hidroxilo no sulfatados del alginato sulfatado. En algunas realizaciones, el grado de acrilación o de metacrilación es de entre 0,1 y 0,5 por monómero, lo que significa que entre el 10 % y el 50 % de los grupos hidroxilo por monómero están modificados por la unión covalente de acrilato o de metacrilato, particularmente un 0,3 por monómero, lo que significa que el 30 % de los grupos hidroxilo por monómero están modificados por la unión covalente de acrilato o de metacrilato, en los que particularmente el alginato sulfatado tiene un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1 por monómero, particularmente de entre 0,5 y 0,9 por monómero.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el alginato sulfatado se proporciona en una mezcla con otros polímeros formadores de hidrogel y armazones. Una ventaja de la adición de un segundo polímero es un aumento en la estabilidad mecánica del hidrogel de alginato sulfatado. Particularmente, un armazón poroso rígido electrotejido o lixiviado por porógeno puede ser rellenado con alginato sulfatado. Algunos ejemplos no limitantes de dicho segundo polímero incluyen poli(ϵ -caprolactona), PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico) y PMMA (poli[metacrilato de metilo]). Otra ventaja de la adición de un segundo polímero es la posibilidad de añadir grupos funcionales, que permiten la adhesión, por ejemplo, a una lesión del cartílago. Particularmente, el alginato oxidado puede ser añadido a la mezcla, para permitir la adhesión a los grupos amino libres del colágeno de la superficie del cartílago. El término "alginato oxidado" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a un alginato en el que uno o más átomos de carbono del alginato portador de un grupo hidroxilo están oxidados a una forma de cetona, en los que particularmente dicho átomo de carbono de la cetona es susceptible de reaccionar con un grupo amino para formar una base de Schiff. Asimismo, el término "alginato sulfatado oxidado" se refiere a un alginato sulfatado en el que uno o más átomos de carbono del alginato sulfatado portador de un grupo hidroxilo no sulfatado están oxidados a la forma de cetona, en los que particularmente dicho átomo de carbono de la cetona es susceptible de reaccionar con un grupo amino para formar una base de Schiff.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el alginato sulfatado se mezcla con un segundo polímero que puede estar reticulado, particularmente mediante una unión covalente a una base de Schiff, una reacción de adición de Michael o una polimerización radicalaria. Un ejemplo no limitante es la mezcla del alginato sulfatado con sulfato de condroitina o con ácido hialurónico que está metacrilatado y puede formar un hidrogel interpenetrante con luz UV y un fotoiniciador. Algunos ejemplos no limitantes adicionales de dichos segundos polímeros incluyen sulfato de condroitina metacrilatado, ácido hialurónico metacrilatado y PEG (polietilenglicol)-diacrilato.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el hidrogel de alginato sulfatado se forma en la etapa de gelación mediante

- a. una reticulación iónica usando iones de calcio, particularmente en forma de cloruro de calcio, carbonato de calcio o sulfato de calcio, o de otros cationes di- o trivalentes,
- b. una unión covalente de una base de Schiff entre un alginato sulfatado oxidado o un alginato sulfatado oxidado comprendido con el alginato sulfatado y un polímero portador de amina o de tiol, tal como quitosano,
- c. una reacción de adición de Michael,
- d. una polimerización radicalaria de sulfato de alginato portador de grupos polimerizables adicionales tales como metacrilato o acrílo.

El término "reticulación iónica" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a una interacción electrostática entre los grupos Ca^{2+} y carboxilo de las dos cadenas del polímero de alginato.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, las interacciones electrostáticas se producen entre los residuos de ácido gúlrónico de dos cadenas del polímero de alginato.

En algunas realizaciones, la formación del hidrogel de alginato sulfatado se inicia mediante el contacto del alginato sulfatado en solución acuosa con iones Ca^{2+} , particularmente con CaCl_2 , en la que particularmente la gelación comienza en la superficie del hidrogel en polimerización y continúa hacia el centro del hidrogel en polimerización según difunden los iones Ca^{2+} en el gel.

En algunas realizaciones, la formación del hidrogel de alginato sulfatado se realiza con CaCO_3 y D-glucono-d-lactona y/o CaSO_4 y D-glucono-d-lactona añadidos a la solución acuosa en la que se proporciona el alginato sulfatado, en la que particularmente los iones de calcio son liberados lentamente desde el CaCO_3 o el CaSO_4 , que no son solubles en agua a pH neutro, y en la que particularmente la D-glucono-d-lactona se hidroliza y acidifica la solución, aumentando así la liberación de los iones de calcio. Una ventaja de estas realizaciones es que se forma un hidrogel más homogéneo como resultado del proceso descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, los grupos acrílico, vinil sulfona maleimida o acrilato que previamente han reaccionado con los grupos hidroxilo del alginato sulfatado representan los aceptores de Michael, mientras que el donante de Michael es un anión tiolato o un grupo tiol presente en otro polímero tal como, por ejemplo, un polímero de polietilenglicol

portador del grupo tiol.

5 En algunas realizaciones, el grupo polimerizable es un grupo metacrilato o un grupo acrílico. En algunas realizaciones, el grupo metacrilato o acrilato reacciona con los grupos hidroxilo del alginato sulfatado. En algunas realizaciones, el grupo polimerizable se usa para generar radicales que son expuestos a luz UV o neón en presencia de un fotoiniciador tal como acilfosfinato de litio LAP o eosina Y, produciendo así una reacción radicalaria en cadena.

10 En algunas realizaciones, el hidrogel de alginato sulfatado comprende o está constituido esencialmente por alginato sulfatado que tiene un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1,8 por monómero, particularmente de entre 0,1 y 1 por monómero, más en particular de entre 0,5 y 0,9 por monómero. En algunas realizaciones, el hidrogel sulfatado comprende o está constituido esencialmente por alginato sulfatado que tiene un grado de sulfatación de entre 0,2 y 2 por unidad de disacárido, particularmente de entre 1 y 1,8 por unidad de disacárido.

15 En algunas realizaciones, el hidrogel de alginato sulfatado está caracterizado por una viscosidad de 200 Pa/S. Dicho hidrogel de alginato sulfatado es preferentemente adecuado para la bioimpresión, mediante lo cual es posible crear estructuras complejas en 2D/3D hechas de múltiples materiales, tipos celulares y moléculas.

20 En algunas realizaciones, la célula precursora es una neurona primaria central, una neurona primaria periférica, una célula glial, un condrocito primario, un fibroblasto, un osteoblasto, un hepatocito, una célula madre adulta, una célula pluripotente inducida o una célula de una línea de cultivo celular.

25 En algunas realizaciones, la célula precursora es una célula condroprogenitora. En algunas realizaciones, la célula condroprogenitora es un miembro de una línea celular condroprogenitora, en la que particularmente la línea celular condroprogenitora deriva de un feto.

En algunas realizaciones, el alginato sulfatado se forma mediante la reacción del alginato con ácido clorosulfónico o con sulfurtrioxido, en la que particularmente los grupos hidroxilo de la cadena del polímero de alginato están sustituidos por grupos sulfato.

30 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un hidrogel de alginato sulfatado que comprende un alginato sulfatado con un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1 por monómero, particularmente de entre 0,5 y 0,9 por monómero.

35 En algunas realizaciones, el hidrogel de alginato sulfatado tiene un contenido de alginato sulfatado de entre el 0,1 y el 5 % (m/m).

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para el cultivo de una célula de mamífero, en el que el método comprende un método para proporcionar una célula de mamífero incluida según la invención y adicionalmente, y posteriormente, las etapas de

40 - mantener la célula precursora en unas condiciones de cultivo celular en una etapa de cultivo celular, produciendo una célula producto

- aislar la célula producto.

45 En algunas realizaciones, la etapa de gelación se produce antes de la etapa de inclusión, por lo tanto, la célula precursora es sembrada en el hidrogel, y después de la etapa de cultivo celular, y la célula producto es aislada mediante la despolimerización o la degradación del hidrogel de alginato sulfatado. En algunas realizaciones, la célula precursora es incluida en el alginato sulfatado antes de la gelación y se cultiva en unas condiciones *in vivo* en el hidrogel de alginato sulfatado. En algunas realizaciones, la célula precursora es incluida en el alginato sulfatado antes de la gelación y después es liberada desde el gel de alginato sulfatado, particularmente con fines de implantación, en las que particularmente el alginato sulfatado experimenta una gelación, y después de la implantación, el hidrogel de alginato sulfatado queda infiltrado por células migratorias del hospedador, por ejemplo, células madre mesenquimatosas residentes o condrocitos para el cartílago, y células progenitoras neurales para el tejido nervioso.

55 En algunas realizaciones, la despolimerización se realiza mediante la eliminación del ion Ca^{2+} , particularmente mediante un aclarado o poniendo en contacto el hidrogel de alginato sulfatado con un agente de unión del Ca^{2+} tal como citrato, EDTA, EGTA o una resina catiónica, o poniendo en contacto el hidrogel sulfatado con un tampón de citrato de sodio disolvente, que comprende opcionalmente EDTA.

60 Según otro aspecto más de la invención, se proporciona un injerto celular que comprende una célula de mamífero incluida en el hidrogel de alginato sulfatado.

En algunas realizaciones, el injerto celular se obtiene o es obtenible mediante un método según la invención o que comprende un hidrogel de alginato sulfatado según la invención.

65 En algunas realizaciones, la célula de mamífero, excluyendo las células germinativas y las células totipotentes de

origen humano, es una neurona primaria central, una neurona primaria periférica o una célula glial.

En algunas realizaciones, la célula de mamífero, excluyendo las células germinativas y las células totipotentes de origen humano, es un condrocito primario o una célula madre mesenquimatosa.

5 En algunas realizaciones, la célula de mamífero, excluyendo las células germinativas y las células totipotentes de origen humano, es un fibroblasto, un osteoblasto, un hepatocito, una célula madre adulta o una célula pluripotente inducida.

10 Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un injerto celular según la invención para el tratamiento de un daño o de una degeneración neural.

En algunas realizaciones, el injerto celular de la invención es insertado o inyectado en un sitio de daño o de degeneración neural después de un daño en el SNC o en el SNP.

15 En algunas realizaciones, se proporciona el uso de un injerto celular de la invención para el tratamiento de una lesión de cartílago mediante el trasplante del injerto celular, como un aumento del procedimiento de implantación de condrocitos autólogos (ACI).

20 En algunas realizaciones, el hidrogel de alginato sulfatado es reticulable con el tejido del cartílago a través de una unión covalente basada en Schiff de un alginato oxidado o de un alginato sulfatado oxidado comprendido en el hidrogel de alginato sulfatado.

25 Las siguientes figuras y ejemplos ilustran adicionalmente la invención y las realizaciones preferidas de la misma. Las figuras y los ejemplos no deben ser interpretados como delimitantes de la invención.

Dondequiera que se establezcan las alternativas para las características separables individuales en el presente documento como "realizaciones", debe entenderse que dichas alternativas pueden combinarse libremente para formar realizaciones individuales de la invención divulgada en el presente documento.

30 **Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1 Estructura química del sulfato de alginato. El grado de sulfatación (DS) por monómero varía entre $0 < DS < 2$

35 Fig. 2 Imagen confocal de neuronas corticales primarias de rata E17 cultivadas en sulfato de alginato al 2 % (DS = 1) durante 7 días. Las neuritas comienzan a alargarse poco después de la encapsulación y puede observarse una densa red el día 7 en el cultivo. La imagen en vivo se obtuvo mediante la tinción de las neuronas durante 3 días después de la encapsulación con un trazador celular: el fluorescente rojo lejano, la carbocianina lipófila DiD (Life Technologies);

40 Fig. 3 Esquema de las posibles interacciones electrostáticas entre los grupos sulfato entre el sulfato de alginato y los receptores de la membrana presentes en las células murales, que se transforman en una inducción del alargamiento de la neurita;

45 Fig. 4 Imágenes del microscopio óptico de los condrocitos primarios en geles de sulfato de alginato cultivados hasta 7 días, con una potente inducción de la proliferación celular, según se evidencia por los agregados celulares presentes;

50 Fig. 5 Expresión génica de los condrocitos primarios cultivados en hidrogeles de sulfato de alginato a lo largo de 7 días mediante un ensayo de qRT-PCR para el colágeno 2 y el colágeno 1. El sulfato de alginato puede reprimir la alta expresión del colágeno 1 que es típica de los condrocitos cultivados en plástico. La DO se refiere a la expresión génica de las células recién aisladas;

55 Fig. 6 Ensayo de proliferación de BrdU de condrocitos en hidrogeles de alginato sulfatados. Absorbancia normalizada por la cuantificación relativa del valor del absorbancia (450 nm - 540 nm después de descontar el valor del blanco) a geles de alginato al 2 %;

60 Fig. 7 La actividad RhoA de los condrocitos cultivados en geles de sulfato de alginato al 2 % en comparación con plástico de cultivo tisular (TCP) y alginato al 0,4 % ha sido evaluada mediante un ensayo de Rho G-LISA (Cytoskeleton, Inc.) en cultivos de 7 días. La actividad RhoA estaba aumentada por la encapsulación de las células en el sulfato de alginato en comparación con el alginato sin modificar y el plástico de cultivo tisular.

65 **Descripción detallada de ciertas realizaciones**

Aquí se describe una invención en la que la adición de un grupo sulfato en el alginato polisacárido puede alterar

potentemente el fenotipo de las células primarias que están encapsuladas en el material. En particular, los condrocitos primarios encapsulados en el hidrogel sulfatado muestran una morfología más extendida, y la proliferación está aumentada cuatro veces en comparación con las células del alginato no modificado, que conservan una morfología redonda y se dividen muy lentamente. Adicionalmente, el sulfato de alginato previene la desdiferenciación de los condrocitos primarios, por oposición al cultivo bidimensional. También, las neuronas primarias y las células pluripotentes inducidas (iPSC) cultivadas en alginato sulfatado experimentan una amplia formación de neuritas. La sulfatación del alginato es un material barato, abundante, fácilmente manipulable y fácilmente procesado, que puede controlar potentemente el destino tanto de las células primarias como de las madre en un entorno tridimensional. El sulfato de alginato también es adecuado para ser mezclado con otros polímeros y composites generativos.

La presente invención proporciona el uso de un biomaterial basado en sulfato de alginato para el control de la diferenciación y la proliferación de células primarias y madre usadas en medicina regenerativa.

Este material ofrece las ventajas de ser:

- derivable de una fuente natural, muy abundante y económicamente disponible, muy biocompatible y con una gelación reversible adecuada para la encapsulación de una gama de células que incluye, pero no se limita a, neuronas, condrocitos, hepatocitos, fibroblastos, células pluripotentes inducidas, células madre adultas y embrionarias;
- fácilmente manipulado y procesado;
- ajustable en términos de propiedades mecánicas, particularmente la rigidez, que varía entre 0,5-6 kPa, particularmente entre 2-6 kPa (matriz extracelular cerebral) hasta 100 KPa (cartílago), en el que particularmente el ajuste puede conseguirse variando el grado de sulfatación, el método de reticulación con calcio, la proporción de la composición de glurónico/manurónico o la estructura, mediante la adición de biopolímeros adicionales tales como un armazón poroso rígido formado por un polímero tal como PLGA, PCL, PMMA para el relleno, o un biopolímero tal como sulfato de condroitina metacrilatado, ácido hialurónico metacrilatado y PEG-diacrilato, que pueden usarse particularmente para la reticulación del hidrogel sulfatado;
- un potente promotor del crecimiento neuronal para la regeneración de las células del sistema nervioso central y periférico;
- un potente promotor de la proliferación de las células del tejido conectivo en un entorno tridimensional, en el que particularmente los grupos sulfato introducidos en el polímero de alginato interfieren con la reticulación del calcio para producir una estructura que es a la vez más blanda y tiene una estructura de poro más abierta, particularmente la reticulación iónica produce un material que es más plegable y deformable para las células que los geles reticulados covalentemente, y particularmente los grupos sulfato introducidos proporcionan unos motivos biológicos con los que las células pueden interactuar directamente, algo que no se puede hacer con un alginato sin modificar;
- adecuado para la bioimpresión, por ejemplo, según se describe en el documento US20120116568A1, y otros métodos de prototipado rápido para crear patrones complejos de sulfatación con múltiples materiales, células y moléculas;
- combinable con otros biopolímeros para producir estructuras tridimensionales en las que las células neurales son guiadas a lo largo de trayectorias definidas de alta sulfatación y requeridas por las regiones de baja sulfatación;
- obtenible con diferentes grados de sulfatación que tienen unos efectos dependientes de la dosis sobre la diferenciación y la proliferación (véase la fig. 6);
- un biomaterial que proporciona unos motivos de unión al ligando específicos con los que pueden interactuar los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de las fosfatasa de tirosina de proteína);
- capaz de proporcionar una gelación mediante múltiples métodos que incluyen, pero no se limitan a, 1) una reticulación iónica usando cationes divalentes, por ejemplo, Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} en forma de una solución salina o de un carbonato, 2) una unión a una base de Schiff (por ejemplo, alginato sulfato oxidado unido con un polímero portador de amino como quitosano), 3) unido por s con un aceptor de electrones (por ejemplo, aminas, tioles), a través de una reacción de adición de Michael y 4) una polimerización de radicales libres del alginato metacrilatado sulfatado en presencia de luz y de un fotoiniciador.

Sin desear estar ligados a la teoría, los inventores especulan que el sulfato de alginato tiene unas propiedades que mimetizan el sulfato de heparán. Los proteoglicanos del sulfato de heparán (HSPG) influyen positivamente en el crecimiento y la diferenciación neuronales a través de diversos mecanismos. Uno implica la unión de los HSPG presentes en la matriz extracelular al receptor de tipo II de las fosfatasa de tirosina de proteína (RPTP) que se localizan en el cono de crecimiento axonal y regulan el crecimiento y el guiado neuronal [Coles *et al.*, Science. 2011; 332: 484-8]. Recientemente se han descrito análogos del sulfato de heparán (HS) como buenos candidatos para la reparación de tejidos. Los análogos del HS son estructural y funcionalmente similares al HS, pero muestran la ventaja de ser resistentes a la degradación enzimática. Por ejemplo, se han usado eficazmente nanofibras anfifílicas peptídicas (PA) para la inducción del crecimiento de las neuritas junto con laminina [Mammadov *et al.*, Acta biomaterialia. 2012; 8: 2077-86]. Se ha demostrado que la sulfatación del sulfato de heparán es crucial para el establecimiento de la estirpe neural durante el desarrollo temprano. De hecho, la subsulfatación del heparán restringe el potencial de diferenciación de las células madre embrionarias de ratón, impidiendo la formación de los tejidos adiposo y neural [Forsberg *et al.*,

J. Biol. Chem. 2012; 287: 10853-62]. Los HSPG también son unos reguladores clave de los factores de crecimiento angiogénico, controlando por lo tanto el desarrollo vascular [Ferrerías *et al.*, Journal of Biological Chemistry. 2012; 287: 36132-46] que puede mejorar la regeneración nerviosa. Debido a la elevada afinidad del alginato sulfatado por las proteínas de unión a la heparina, puede ser considerado un análogo de los HSPG, con un gran potencial en el crecimiento y el guiado neural. Una patente reciente sobre guías nerviosas degradables para la reparación nerviosa resume las propiedades de un gran número de polímeros que incluyen la heparina, el sulfato de heparán, el sulfato de dextrano y el alginato sobre la formación de un hidrogel. Se recubren nanofibras con diversas moléculas de la matriz extracelular que incluyen laminina y heparina, y se injertan uno o más factores neurotróficos en el hidrogel [Hoke A, Lim SH, Liu X, Mao HQ. Hydrogel-grafted degradable nerve guides. Estados Unidos: The Johns Hopkins University, Baltimore; 2011]. Debido a que el sulfato de heparán también se encuentra en otros tejidos, tales como el hígado, el sulfato de alginato puede ser considerado útil en una amplia gama de aplicaciones en la regeneración tisular. Adicionalmente, los inventores especulan que (también en los siguientes ejemplos) la acción del sulfato de alginato puede ser debida a su analogía con los glicosaminoglicanos sulfatados presentes en los tejidos corporales.

Cuando se implantaron esponjas de alginato sin modificar en un modelo *in vivo* de sección medular completa en ratas, se observó el crecimiento de axones desde la médula espinal dañada en el hidrogel [Kataoka *et al.*, Tissue engineering. 2004; 10:493-504]. Aunque esta prueba experimental sugiere que el alginato puede estimular la extensión axonal, el alginato sulfatado es mucho más potente. En términos de reparación del cartílago, los condrocitos proliferan muy lentamente en el alginato sin modificar. En el alginato sulfatado, la proliferación de las células está fuertemente inducida.

Se cultivaron neuronas corticales e hipocampales primarias de rata E17 en sulfato de alginato (0,8-1 de DS) durante un periodo de 21 días y se extendió una densa red de neuritas ya observada el día 7 (Fig. 2). La interacción entre el sulfato de alginato y las neuronas podía ser atribuida al enlace electrostático entre el sulfato y los receptores de la membrana de la célula (Fig. 3) como se describió para los HSPG [Coles *et al.*, Science. 2011; 332: 484-8].

Para aplicaciones en ingeniería de cartílago, el sulfato de alginato tenía una potente influencia sobre la proliferación, según se evidenció mediante mediciones de la bromodesoxiuridina (BrdU) (Fig. 6). La encapsulación de los condrocitos en el sulfato de alginato indujo la diseminación de las células después de 3-4 días. Sin embargo, el efecto más potente es sobre la proliferación, particularmente existe un aumento dependiente de la dosis en la proliferación al aumentar las cantidades de alginato sulfatado. El material proporciona una forma de cultivar las células con *in vitro* o *in vivo*, de tal forma que mantiene su fenotipo mejor que la extensión bidimensional en plástico. Adicionalmente, el sulfato de alginato indujo la actividad de la GTPasa de RhoA (Fig. 7), lo que puede explicar el aumento en el crecimiento celular.

En conclusión, el sulfato de alginato es un biomaterial abundante, que es fácilmente modificado, procesado y manipulado, y es útil para una amplia gama de aplicaciones en la regeneración tisular.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de una sal de tetrabutil amonio de alginato y de sulfato de alginato

Se disuelven 2 g de alginato en 400 ml de agua, y se añaden 40 g del intercambiador iónico DOWEX que previamente se habían cargado con cloruro de tetrabutil amonio. La mezcla se agita durante una noche, se filtra y se aísla mediante una liofilización.

Se suspende 1 g de la sal de alginato de tetrabutil amonio en 100 ml de DMF seca. Ahora se añade un exceso de 12 veces de SO₃/DMF por unidad repetitiva de disacárido, y la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 1 h. La solución opaca se precipita en acetona, se lleva hasta un pH de 12 durante 10 minutos y posteriormente se neutraliza. El precipitado se filtra, se disuelve en agua y se purifica mediante una diálisis. La liofilización proporciona el producto puro. El grado de sulfatación se determinó mediante un análisis elemental como DS = 1,1 (por unidad de disacárido).

Ejemplo 2

Preparación de metacrilato de alginato

Se disuelve 1 g de alginato en 100 ml de agua y se añade un exceso de 10 veces de metacrilato de glicidilo por unidad repetitiva de disacárido. La mezcla se agita durante 24 h a 50 °C. Ahora se añaden 2 ml de una solución al 20 % de glicina en agua y la solución se agita durante otros 30 min a 50 °C. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, el producto se purifica y se aísla mediante una diálisis y una liofilización. El grado de metacrilación DS_{MA} se estimó sobre la base de los espectros de RMN-¹H como de 0,6 (por unidad de disacárido).

Ejemplo 3

Preparación de sulfato de alginato usando ácido clorosulfónico

5 Se añadió alginato seco (1 g) a ácido clorosulfónico y formamida para un volumen de 40 ml, y se hizo reaccionar hasta 4 h a entre 50-70 °C. El alginato se precipitó a través de la adición de acetona y se recogió a través de una centrifugación. El alginato se suspendió en un medio acuoso, se purificó a través de una diálisis y se liofilizó. El grado de sulfatación fue estimado mediante un análisis elemental.

Ejemplo 4

10 Encapsulación de neuronas primarias y de iPSC en sulfato de alginato

15 Pueden encapsularse neuronas hipocampales o corticales primarias disociadas derivadas de embriones de rata E17-18 o iPSC en hidrogeles blandos que contienen sulfato de alginato. En particular, las neuronas primarias son encapsuladas a una densidad de e7 células/ml en sulfato de alginato al 2-5 % o en mezclas de alginato:sulfato de alginato al 0,1 % - 2 % (1:0-1:5). Las neuroesferas de iPSC son encapsuladas en forma de 3-6 agregados / 30 microlitros de gel. Para generar cultivos tridimensionales, la solución del gel se prepara en NaCl 150 mM y se mezcla con las células antes de la gelación. Las mezclas de células-hidrogel se ponen en una moldeadora (Q-gel) y esto se empapa con un tampón (NaCl 150 mM o medio de cultivo) complementado con CaCl (desde 10 mM hasta 100 mM) durante 10 min. A continuación, los geles se mueven a placas de cultivo y se incuban en las mismas condiciones durante los siguientes 10 min. Después, los cultivos tridimensionales se ponen en medio reciente sin ningún cloruro de calcio adicional y se mantienen en cultivo hasta 21 días.

Ejemplo 5

25 Encapsulación de condrocitos primarios recién aislados en sulfato de alginato

30 Los condrocitos primarios aislados a partir de rodillas bovinas/humanas pueden ser encapsulados en hidrogeles de sulfato de alginato. Se disuelve el sulfato de alginato en NaCl 150 mM a una concentración que varía entre el 2-5 % p/v. Los condrocitos se resuspenden en sulfato de alginato con una densidad de entre 1 millón y 10 millones por mililitro de solución de polímero. Para la gelación, se ponen 30 microlitros de la suspensión celular en una moldeadora Q-gel y se empapan con una solución de CaCl₂ 102 mM y se incuban durante 10 minutos. Después, los geles formados se extraen de la moldeadora y se incuban adicionalmente en una solución de CaCl₂ 50 mM. Finalmente, los geles se transfieren a una placa de 24 pocillos con un medio que contiene CaCl₂ 3 mM y se cultivan durante hasta tres semanas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para proporcionar una célula de mamífero incluida, que comprende las etapas de
 - 5 - proporcionar un alginato sulfatado que tiene un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1 por monómero en solución acuosa;
 - hacer reaccionar dicho alginato sulfatado para formar un hidrogel constituido esencialmente por un alginato sulfatado que tiene un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1 por monómero en una etapa de gelación,
 - 10 - proporcionar una célula precursora,
 - incluir dicha célula precursora en dicho hidrogel de alginato sulfatado en una etapa de inclusión,
 produciendo así una célula incluida en un hidrogel de alginato sulfatado.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho hidrogel de sulfato de alginato tiene un contenido de alginato sulfatado de entre el 0,1 y el 5 % (m/m).

3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sulfato de alginato comprende o está constituido esencialmente por sulfato de alginato que está modificado adicionalmente por fracciones aldehído, fracciones carboxilo, fracciones amino, fracciones vinil sulfona, fracciones tiol, grupos éster o éter saturados o insaturados.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sulfato de alginato comprende o está constituido esencialmente por alginato sulfatado que está modificado adicionalmente por grupos éster de acrilato o de metacrilato.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho hidrogel de alginato sulfatado se forma mediante
 - a. una reticulación iónica usando iones de calcio en forma de cloruro de calcio, de carbonato de calcio o de sulfato de calcio o de otros cationes di- o trivalentes,
 - b. la unión covalente de una base de Schiff entre un sulfato de alginato oxidado o un alginato oxidado comprendido en dicho alginato sulfatado y un polímero portador de una amina o de un tiol,
 - c. una reacción de adición de Michael, en la que los grupos acrílicos o vinilsulfona que previamente reaccionaron con los grupos hidroxilo no sulfatados de dicho alginato sulfatado representan los aceptores de Michael, mientras que el donante de Michael es un grupo tiol presente en otro polímero.
 - d. una polimerización radicalaria del alginato sulfatado portador de grupos polimerizables adicionales.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho hidrogel de alginato sulfatado está **caracterizado por** una viscosidad de entre 180 y 220 Pa/s.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha célula precursora se selecciona entre
 - a. una neurona primaria central, una neurona primaria periférica, una célula glial, un condrocito primario, un fibroblasto, un osteoblasto, un hepatocito, una célula madre adulta, una célula pluripotente inducida o una célula de una línea de cultivo celular, o
 - b. una célula condroprogenitora.

8. Un método para el cultivo de una célula de mamífero, método que comprende proporcionar una célula de mamífero incluida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y que, adicionalmente y posteriormente, comprende las etapas de
 - mantener dicha célula precursora en unas condiciones de cultivo celular en una etapa de cultivo celular, produciendo una célula producto,
 - aislar dicha célula producto.

9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha etapa de gelación se produce antes de dicha etapa de inclusión, por lo tanto, dicha célula precursora es sembrada en dicho hidrogel, y posteriormente a dicha etapa de cultivo celular, dicha célula producto es aislada mediante la despolimerización o la degradación de dicho hidrogel.

10. Un injerto celular que comprende una célula de mamífero, excluyendo las células germinativas y las células totipotentes de origen humano, incluida en un hidrogel de alginato sulfatado constituido esencialmente por un alginato sulfatado que tiene un grado de sulfatación de entre 0,1 y 1 por monómero, y un contenido de alginato sulfatado de entre el 0,1 y el 5 % (m/m).

11. El injerto celular según la reivindicación 10, en el que dicha célula de mamífero no embrionaria se selecciona entre:

- a. una neurona primaria central, una neurona primaria periférica o una célula glial;
- b. un condrocito primario o una célula madre mesenquimatosa; o
- c. un fibroblasto, un osteoblasto, un hepatocito, una célula madre adulta o una célula pluripotente inducida.

- 5
12. El injerto celular de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento del daño o de la degeneración neurales.
- 10
13. El injerto celular para su uso en el tratamiento del daño o de la degeneración neural según la reivindicación 12, en donde el injerto es administrado mediante la inserción o la inyección de dicho injerto en un sitio de daño o de degeneración neurales después de un daño en el SNC o en el SNP.
14. El injerto celular de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de una lesión de cartílago mediante el trasplante de dicho injerto celular, como un aumento del procedimiento de implantación de condrocitos autólogos.
- 15
15. El uso de un injerto celular para su uso en el tratamiento de una lesión de cartílago según la reivindicación 14, en el que dicho hidrogel de alginato sulfatado es reticulable con el tejido del cartílago a través de una unión covalente basada en Schiff de un alginato oxidado o de un alginato sulfatado oxidado comprendido en dicho hidrogel de alginato sulfatado.

Fig. 1

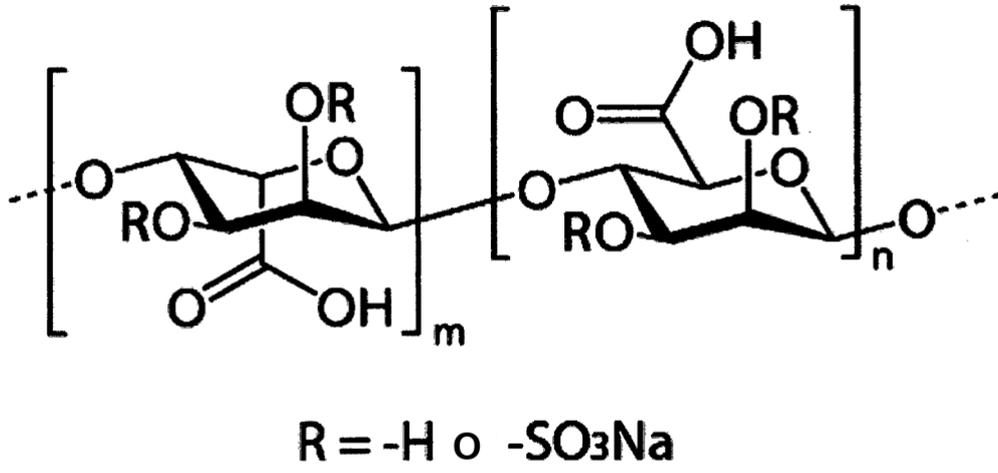


Fig. 2

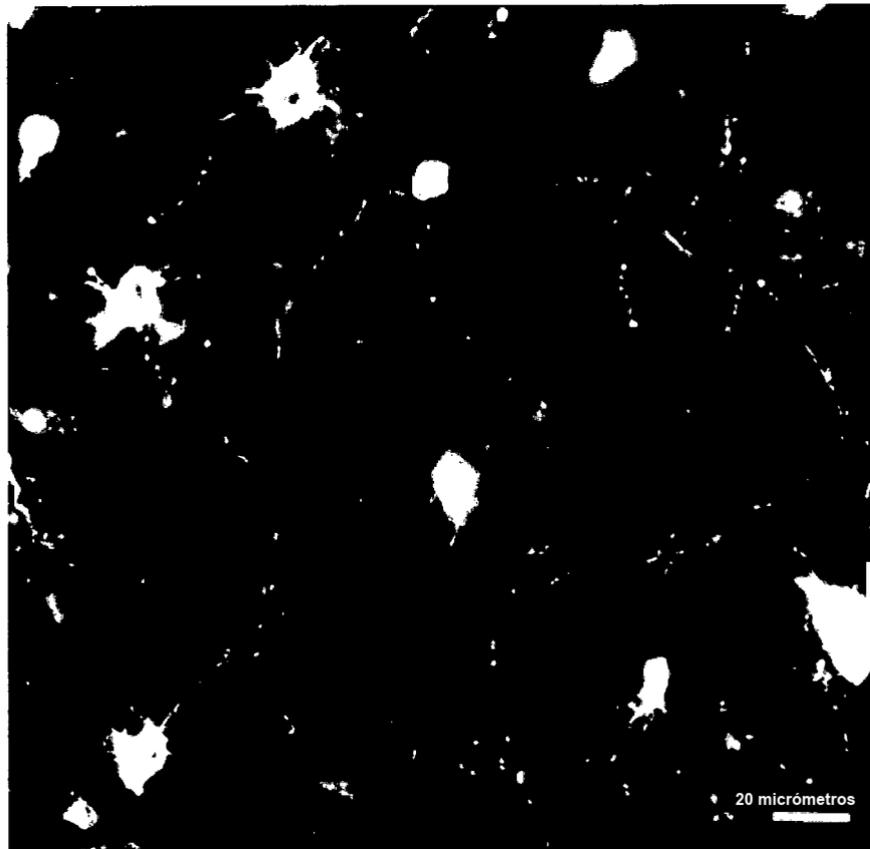


Fig. 3

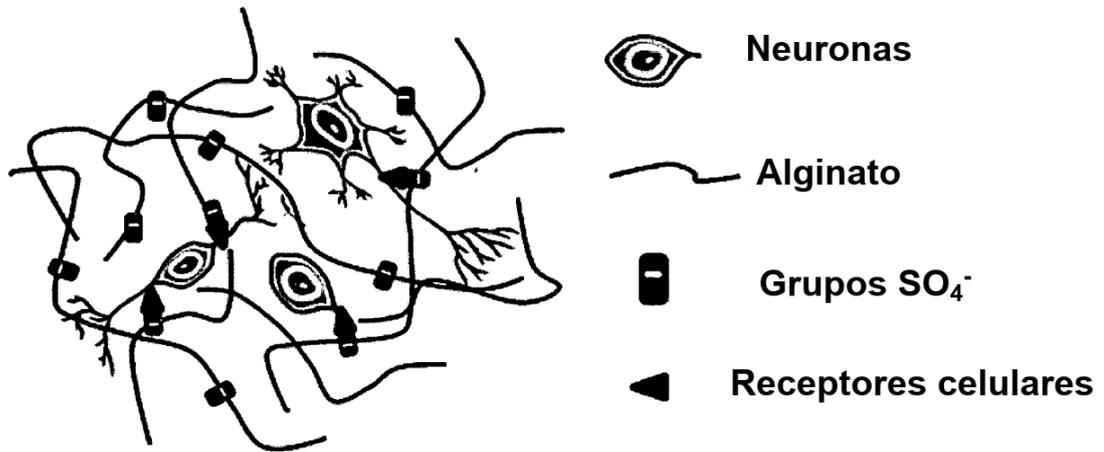


Fig. 4

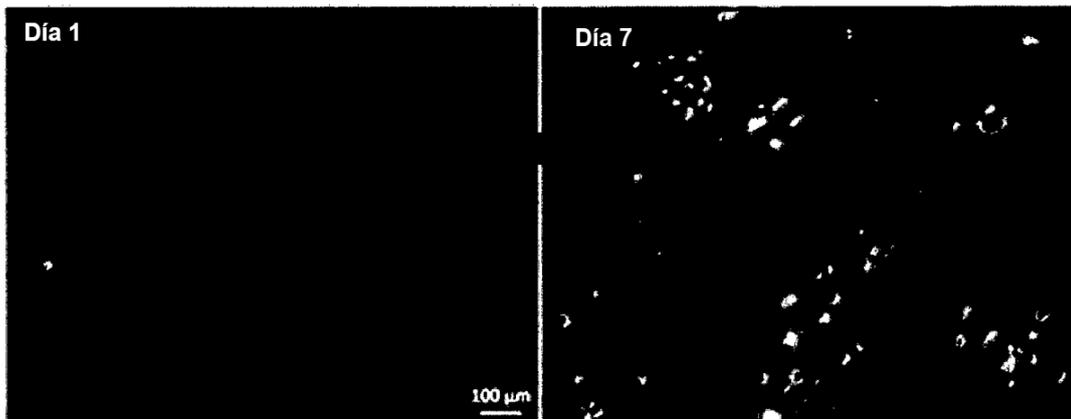


Fig. 5

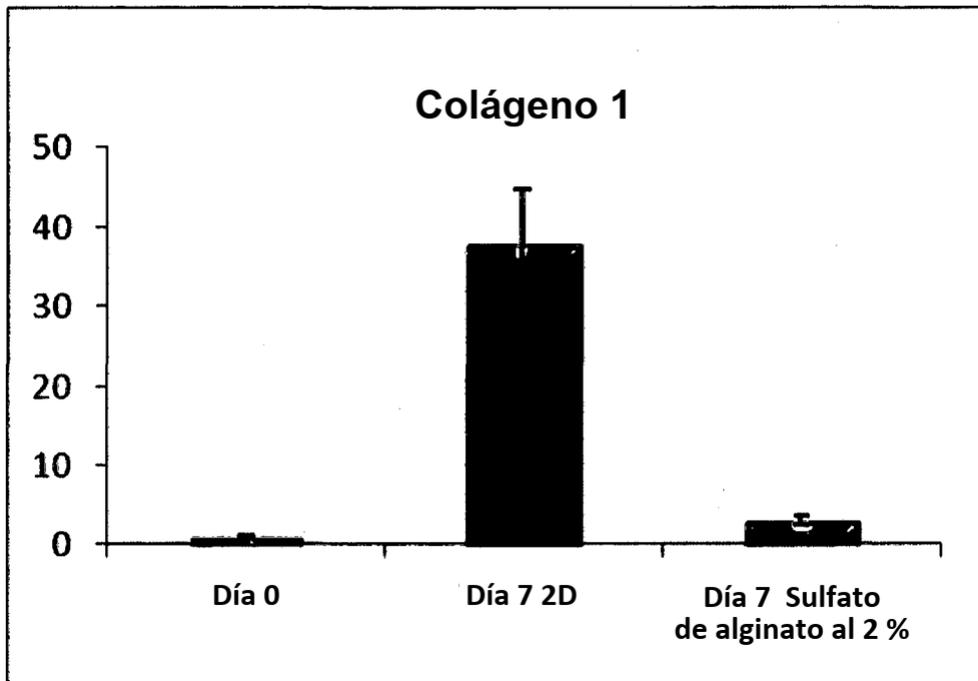
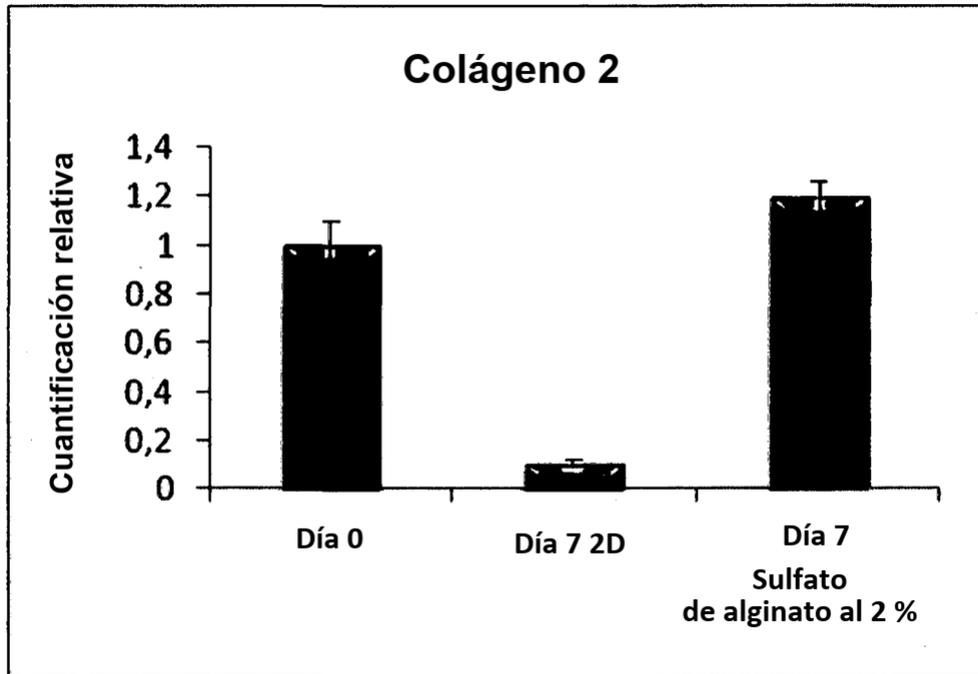


Fig. 6

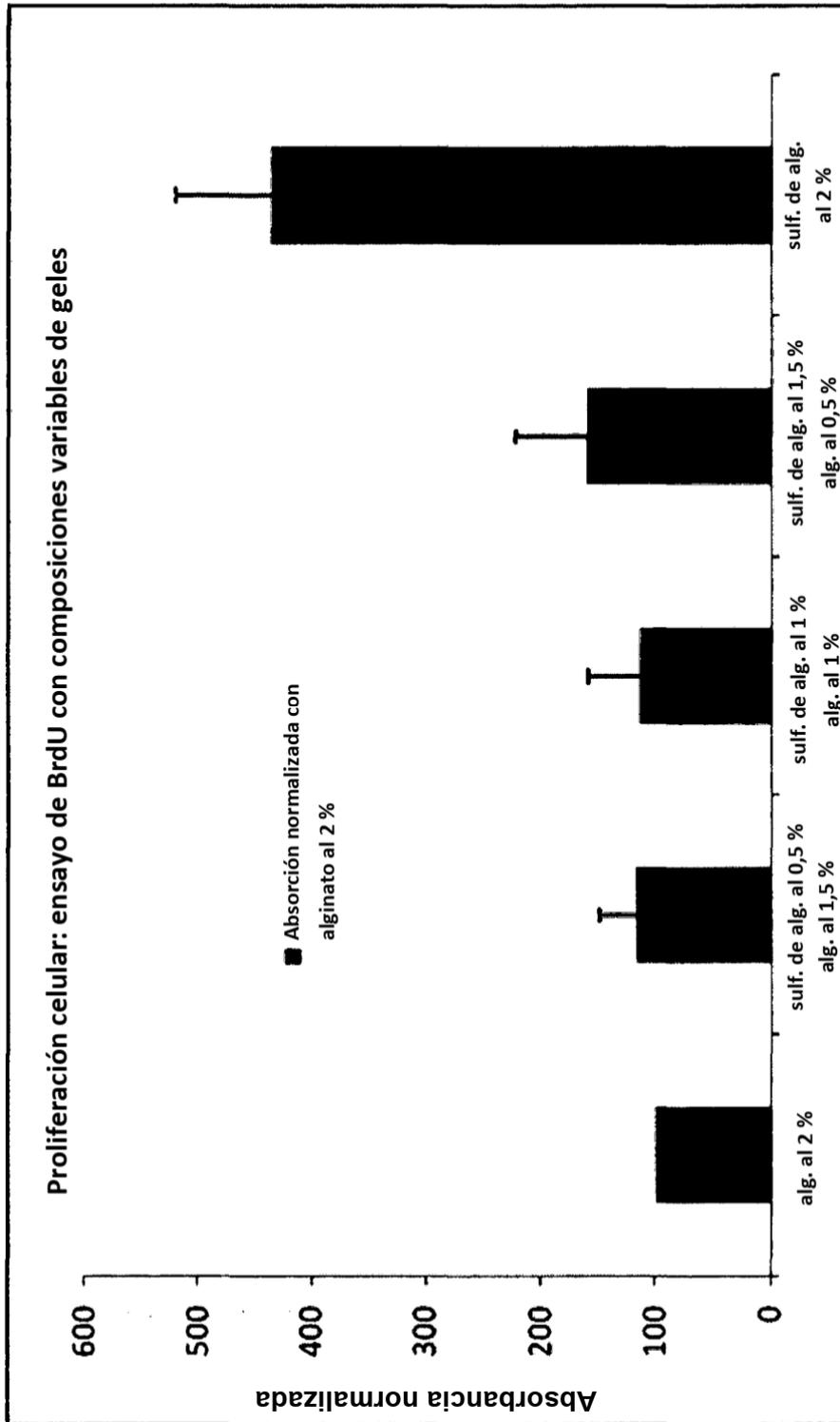


Fig. 7

