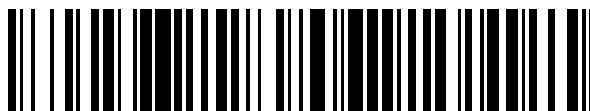


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 858**

51 Int. Cl.:

A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2011 PCT/US2011/055174**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12048165**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2011 E 11831641 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2624873**

54 Título: **Hidrogeles formadores de poros inyectables para terapias celulares basadas en materiales**

30 Prioridad:

06.10.2010 US 390594 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2020

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
 COLLEGE (100.0%)
 17 Quincy Street
 Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**HUEBSCH, NATHANIEL, D.;
 MADL, CHRISTOPHER, M.;
 LEE, KANGWON;
 XU, MARIA M. y
 MOONEY, DAVID, J.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 773 858 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 formadores de poros inyectables para terapias celulares basadas en materiales

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica los beneficios de prioridad según el título 35 del U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional U.S. n.º 61/390.594, presentada el 6 de octubre de 2010.

Declaración sobre investigación con patrocinio federal

Esta invención se realizó con apoyo del gobierno mediante la NIH R37DE013033 concedida por los National Institutes of Health y la MRSEC DMR-0820484 concedida por la National Science Foundation. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 Campo de la invención

Esta invención se refiere a composiciones de hidrogel biocompatible.

Antecedentes de la invención

Durante las últimas décadas, se han usado polímeros biocompatibles para formar armazones que actúan como portadores para trasplante celular o para agrupar poblaciones de células hospedadoras en el dispositivo.

15 Compendio de la invención

La invención proporciona composiciones y métodos para formar hidrogeles porosos. Por ejemplo, los poros se forman in situ en hidrogeles después de la inyección de hidrogel a un sujeto. Los poros que se forman in situ mediante la degradación de porógenos sacrificiales en el hidrogel circundante (hidrogel bruto) facilitan el agrupamiento o liberación de células. Por ejemplo, el poro resultante está dentro del 5 % del tamaño del porógeno inicial.

20 Se divulga en la presente memoria un material que no es inicialmente poroso, pero que se vuelve macroporoso con el tiempo de residencia en el cuerpo de un animal receptor tal como un sujeto mamífero. Estas composiciones están asociadas con ventajas significativas frente a composiciones de armazón anteriores. Los hidrogeles descritos en la presente memoria son bien adecuados para proteger inicialmente células trasplantadas de respuestas inflamatorias del hospedador, y liberar entonces las células trasplantadas después que haya remitido la inflamación (p. ej., después de 12 horas, o 1, 3, 5, 7 o 10 días o más después del trasplante, concretamente de residencia en el cuerpo del receptor). Los hidrogeles descritos en la presente memoria también se desdoblán como agente de relleno quirúrgico, minimizando adicionalmente la inflamación en el hospedador, y liberando después células.

30 Por consiguiente, la invención proporciona una composición como se define en las reivindicaciones adjuntas. La composición comprende un hidrogel porogénico y un hidrogel bruto, cuya composición no es inicialmente macroporosa y se vuelve macroporosa con el tiempo cuando reside en el cuerpo de un receptor, en la que el hidrogel porogénico se degrada al menos un 10 % más rápido (p. ej., al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 % o al menos un 50 % más rápido) que el hidrogel bruto después de la residencia en dicho sujeto, dejando macroporos que tienen un diámetro de más de 20 µm en su lugar, y en la que (a) dicho hidrogel porogénico comprende alginato oxidado o (b) dicho hidrogel porogénico comprende un polímero más corto que dicho hidrogel bruto. Por ejemplo, el primer hidrogel es un porógeno y el poro resultante después de la degradación in situ está dentro del 25 % del tamaño del porógeno inicial, p. ej. dentro del 20 %, dentro del 15 %, o dentro del 10 % del tamaño de porógeno inicial. Preferiblemente, el poro resultante está dentro del 5 % del tamaño del porógeno inicial. El hidrogel porogénico se degrada más rápidamente que el hidrogel bruto porque el hidrogel porogénico es más soluble en agua (comprende un índice de solubilidad menor). Como alternativa, el hidrogel porogénico se degrada más rápidamente porque está reticulado con motivos de degradación mediados por proteasa como se describe en el documento USSN 10/980.989 de Zilla.

45 La masa molecular de los polímeros usados para formar la composición de hidrogel porogénico es de aproximadamente 50 kilodáltones (kDa) y la masa molecular de los polímeros usados para formar la composición de hidrogel bruto comprende aproximadamente 250 kDa. Un polímero más corto (p.ej., el de un porógeno) se degrada más rápidamente en comparación con un polímero más largo (p.ej. el de la composición bruta). Como alternativa, se modifica una composición para volverla más hidrolíticamente degradable en virtud de la presencia de grupos de azúcar (p. ej., aproximadamente 3-10 % de azúcar de una composición de alginato). En otro ejemplo, el hidrogel porogénico es más degradable enzimáticamente en comparación con el hidrogel bruto. La composición compuesta (primer y segundo hidrogeles) es permeable a los fluidos corporales, p. ej. tales como una enzima que consigue acceso a la composición para degradar el hidrogel porogénico. En algunos casos, el segundo hidrogel está reticulado alrededor del primer hidrogel, concretamente los porógenos (primer hidrogel) están completamente atrapados físicamente en el hidrogel bruto (segundo).

50 Se encapsulan opcionalmente células o factores bioactivos (p. ej., factores de crecimiento tales como factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),

oligonucleótidos condensados, p. ej. CpG o ADN de plásmido) en la fase porogénica, la fase de hidrogel bruto o en ambas fases. Los porógenos se degradan in situ durante un curso temporal predeterminado por el usuario. Tras la degradación de los porógenos, se liberan las células desde, o pueden migrar hasta, el material. Sin embargo, debido que inicialmente carecen de poros, los hidrogeles formadores de poros son útiles para proporcionar soporte mecánico inmediatamente después de la formación. Los factores bioactivos adecuados incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (p. ej., VEGFA; número de acceso a GenBank: (aa) AAA35789.1 (GI:181971), (na) NM_001171630.1 (GI:284172472)), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF, número de acceso a GenBank: (aa) AAB29057.2 (GI: 13236891), (na) NM_000800.3 (GI:222144219)), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; número de acceso a GenBank: (aa) AAB21432.2 (GI:8250666), (na) A32848.1 (GI:23957592)), factor de crecimiento de placenta (PIGF o PLGF; número de acceso a GenBank: (aa) AAH07789.1 (GI:14043631), (na) NM_002632.4 (GI:56676307)), leptina (número de acceso a Genbank; (aa) CBI71013.1 (GI:285310289), (na) NM_000230.2 (GI:169790920)), factor de crecimiento hematopoyético (p. ej., HGF, número de acceso a Genbank: (aa) AAA64297.1 (GI:337938), (na) NM_000601.4 (GI:58533168)), receptor 1 de VEGF (VEGFR-1, número de acceso a Genbank: (aa) NP_002010.2 (GI:156104876)), VEGFR-2 (número de acceso a Genbank: (aa) AAC16450.1 (GI:3132833), (na) EU826563.1 (GI:194318421)), factor de crecimiento transformante β (TGF- β , número de acceso a Genbank: (aa) AAA36738.1 (GI:339564), (na) NM_000660.4 (GI:260655621)), proteína morfogenética ósea (p. ej., BMP-4, número de acceso a Genbank: (aa) NP_570912.2 (GI: 157276597), (na) NM_001202.3 (GI: 157276592)), factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1, número de acceso a Genbank: (aa) CAA01954.1 (GI:1247519), (na) NM_001111283.1 (GI:163659898)), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; número de acceso a Genbank: (aa) AAA60552.1 (GI:338209), (na) NM_033023.4 (GI:197333759)), factor de crecimiento epidérmico (EGF, número de acceso a Genbank: (aa) AAH93731.1 (GI:62740195)), factor de crecimiento transformante a (TGF-a, número de acceso a Genbank: (na) NM_003236.2 (GI:153791671)), factor de crecimiento nervioso (NGF, número de acceso a Genbank: (aa) AAH32517.2 (GI:34192369), (na) NM_002506.2 (GI:70995318)), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, número de acceso a Genbank: (aa) CAA62632.1 (GI:987872), (na) NM_170731.4 (GI:219842281)), neurotrofina 3 (NT-3, número de acceso a Genbank: (aa) NP_001096124.1 (GI: 156630995), (na) NM_001102654.1 (GI:156630994)), factor neurotrófico ciliar (CNTF, número de acceso a Genbank: (aa) AAB31818.1 (GI:633830), (na) NM_000614.3 (GI:209574322)) y factor neurotrófico derivado de estirpe celular glial (GDNF, número de acceso a Genbank: (aa) CAG46721.1 (GI:49456801), (na) NM_000514.3 (GI:299473777)). Otros factores adecuados incluyen anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-aFGF, anticuerpo anti-bFGF, anticuerpo anti-PIGF, anticuerpo anti-leptina, anticuerpo anti-HGF, anticuerpo anti-VEGFR-1, anticuerpo anti-VEGFR-2, batimastat (BB-94), marimastat (BB-2516), talidomida, O-(cloroacetilcarbamoil)fumagilol (TNP-470), carboxiamidotriazol (CAI, mitoxantrona, doxorubicina, SU5416, anticuerpo anti-TGF- β , anticuerpo anti-BMP, anticuerpo anti-IGF-1, anticuerpo anti-FGF-2, anticuerpo anti-PDGF, anticuerpo anti-EGF, anticuerpo anti-TGF-a y anticuerpo anti-VEGF. Otros factores bioactivos adecuados para encapsulación en cualquiera de fase porogénica, fase de hidrogel bruto o ambas fases incluyen ligando de tirosina cinasa 3 similar a FMS (ligando de Flt3; número de acceso a Genbank:(aa) AAI44040 (GI:219519004), (na) NM_004119 (GI: 121114303)), anti-ligando de flt3, factor de crecimiento de hepatocitos (número de acceso a Genbank: (aa) AAB20169 (GI:237997)) y factor 1 derivado de estroma (SDF-1).

Como alternativa, se encapsula opcionalmente un adenovirus en cualquiera de fase porogénica, fase de hidrogel bruto o ambas fases. Por ejemplo, el adenovirus codifica factor de transcripción relacionado con runt (p. ej., Runx2; número de acceso a Genbank: (aa) CAI13532 (GI:55959066), (na) NM_001024630 (GI:226442782)), un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación osteoblástica. En otro aspecto, el adenovirus codifica MyoD (número de acceso a Genbank: (aa) CAA40000 (GI:34862), (na) NM_002478 (GI:77695919)), una proteína con un papel clave en la regulación de la diferenciación muscular. Como alternativa, el adenovirus codifica proteína morfogenética ósea, p. ej. de referencia BMP-2 (número de acceso a Genbank: (aa) AF040249_1 (GI:6649952), (na) NM_001200 (GI:80861484)) o BMP-4 (número de acceso a Genbank: (aa) NP_570912.2 (GI:157276597), (na) NM_001202.3 (GI: 157276592)). BMP-2 está implicada, entre otros, en reparación ósea, mientras que BMP-4 está implicada en la reparación de tejido cardíaco. En un aspecto, se encapsulan en el hidrogel un adenovirus que codifica Runx y un adenovirus que codifica BMP-2.

Las células adecuadas para encapsularse en la fase porogénica, fase de hidrogel bruto o en ambas fases incluyen citoblastos mesenquimatosos, mioblastos, células progenitoras vasculares (p. ej., una célula endotelial de crecimiento), células diferenciadas derivadas de citoblastos embrionarios o citoblastos pluripotentes inducidos, células pluripotentes inducidas o células que se reprogramaron directamente a partir de un fibroblasto a un estado diferenciado.

En algunos ejemplos, la composición porogénica comprende células, y en otros ejemplos la composición bruta comprende células. Si están presentes células en la composición (p. ej., se han sembrado durante la fabricación), las células se movilizan desde la composición después de administración a un sujeto mamífero. Como alternativa, la composición no comprende células; sin embargo, tras administración a tejidos de un sujeto mamífero (p. ej., implantación en un paciente humano), se agrupan células en la composición. El mamífero puede ser cualquier mamífero, p. ej. un ser humano, un primate, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo, así como ganado o animales crecidos para el consumo alimentario, p. ej. bovinos, ovejas, cerdos, pollos y cabras. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un animal no mamífero tal como Xenopus, salamandra o tritón.

La invención proporciona métodos de movilización de células de un armazón a tejidos de un sujeto mamífero, que comprenden administrar a un sujeto una composición que comprende un primer hidrogel y un segundo hidrogel, en los que el primer hidrogel se degrada al menos un 10 % más rápido que el segundo hidrogel, y en los que la composición carece de poros en el momento de administración, y en los que la composición comprende poros después de residencia en dicho sujeto, y en los que el primer hidrogel o el segundo hidrogel comprende una célula aislada.

Se lleva a cabo un método de agrupamiento de células en un armazón *in vivo* mediante la administración a un sujeto de una composición que comprende un primer hidrogel y un segundo hidrogel, en el que el primer hidrogel se degrada al menos un 10 % más rápido que el segundo hidrogel y en el que la composición carece de poros en el momento de administración, pero comprende poros después de residencia en el sujeto. Por ejemplo, se crean poros debido a la degradabilidad o solubilidad relativa de una primera composición de hidrogel en comparación con una segunda composición de hidrogel, p. ej. una composición porogénica en comparación con una composición bruta.

La porosidad influye en el agrupamiento y/o salida de las células de la composición. Los poros son nanoporosos, microporosos o macroporosos. Por ejemplo, el diámetro de los nanoporos es menor de aproximadamente 10 nm. Los macroporos están en el intervalo de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 20 μm de diámetro. Los macroporos son mayores de aproximadamente 20 μm (p. ej., mayores de aproximadamente 100 μm o mayores de aproximadamente 400 μm). Los tamaños de macroporo ejemplares incluyen 50 μm , 100 μm , 150 μm , 200 μm , 250 μm , 300 μm , 350 μm , 400 μm , 450 μm , 500 μm , 550 μm y 600 μm . Los macroporos son aquellos de un tamaño que permita a una célula eucariótica atravesar o salir de la composición. En un ejemplo, una composición macroporosa tiene poros de aproximadamente 400 a 500 μm de diámetro. El tamaño de poro preferido depende de la aplicación. Por ejemplo, para la movilización de células y la liberación de células, el diámetro de poro preferido es mayor de 50 μm .

El tamaño del porógeno está relacionado con el tamaño del material compuesto global. Por ejemplo, para que el material quede intacto, el diámetro de porógeno es $< 10\%$ de la dimensión menor del material compuesto global. La densidad de porógenos está entre 10-80 % del volumen global de la composición de material compuesto. Por ejemplo, la densidad de porógeno está entre 15 % y 75 %, entre 20 % y 70 %, entre 25 % y 65 %, entre 30 % y 60 %, o entre 35 % y 55 % del volumen global. Preferiblemente, la densidad de porógenos es al menos un 50 % del volumen global para conseguir un agrupamiento de células en el hidrogel o una liberación de células del hidrogel óptimos.

El hidrogel tiene un módulo elástico de entre aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000.000 pascales (p. ej., de aproximadamente 10 a aproximadamente 100.000 Pa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 150.000 Pa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 200.000 Pa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 300.000 Pa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 400.000 Pa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 500.000 Pa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 600.000 Pa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 700.000 Pa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 800.000 Pa, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 900.000 Pa). Preferiblemente, el hidrogel de degradación lenta comprende un módulo elástico de aproximadamente 20 kPa a 60 kPa, p. ej., 25 kPa a 55 kPa, 30 kPa a 50 kPa, o 35 kPa a 45 kPa. El hidrogel de degradación rápida comprende un módulo elástico de al menos 40 kPa inicialmente para mantener la integridad durante la encapsulación antes de la degradación.

Preferiblemente, el hidrogel de degradación lenta (concretamente, el segundo hidrogel o "bruto") comprende péptidos de alto peso molecular con una secuencia aminoacídica RGD que imita las proteínas de adhesión celular. Como alternativa, el hidrogel de degradación lenta comprende un motivo aminoacídico de péptido adhesivo diferente tal como PHSRN o DGEA. Por ejemplo, los hidrogeles de degradación lenta se modifican preferiblemente con 2-10 péptidos RGD/polímero (p. ej., polímero de alginato).

Se entiende por "hidrogel" una composición que comprende cadenas poliméricas que son hidrófilas. Los hidrogeles ejemplares constan de materiales que son compatibles con la encapsulación celular tales como alginato, polietilenglicol (PEG), PEG-acrilato, agarosa y proteína sintética (p. ej., colágeno o proteínas alteradas por ingeniería (concretamente, hidrogeles basados en péptidos de autoensamblado). Por ejemplo, un hidrogel comercialmente disponible incluye BD™ PuraMatrix™. BD™ PuraMatrix™ Peptide Hydrogel es una matriz sintética que se usa para crear microentornos tridimensionales (3D) definidos para cultivo celular.

Por ejemplo, el hidrogel es una matriz polimérica biocompatible que es biodegradable total o parcialmente. Los ejemplos de materiales que pueden formar hidrogeles incluyen alginatos y derivados de alginato, polímeros de poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), gelatina, colágeno, agarosa, polisacáridos naturales y sintéticos, poliaminoácidos tales como polipéptidos, particularmente polilisina, poliésteres tales como polihidroxibutirato y poli-epsilon-caprolactona, polianhídridos, polifosfazinas, polivinilalcoholes, poli(óxidos de alquileo), particularmente poli(óxidos de etileno), polialilaminas (PAM), poliacrilatos, polímeros de estireno modificados tales como poli-(4-aminometilostireno), polioles plurónicos, polioxámeros, poli(ácidos urónicos), polivinilpirrolidona y copolímeros de los anteriores, incluyendo copolímeros de injerto. Pueden usarse también polímeros sintéticos y polímeros de origen natural tales como, pero sin limitación, colágeno, fibrina, ácido hialurónico, agarosa y geles ricos en laminina.

Es un material preferido para el hidrogel material de alginato o alginato modificado. Las moléculas de alginato constan de monómeros de ácido β -D-manurónico (1-4)-ligados (unidades M) y monómeros de ácido α -L-gulurónico (unidades G), que pueden variar en proporción y distribución secuencial a lo largo de la cadena polimérica. Los polisacáridos de alginato son sistemas polielectrolíticos que tienen una fuerte afinidad por cationes divalentes (p. ej., Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2}) y forman hidrogeles estables cuando se exponen a estas moléculas.

Las composiciones descritas en la presente memoria son adecuadas para uso clínico, p. ej. reparación, regeneración o formación ósea; reparación, regeneración o formación muscular y reparación, regeneración o formación dérmica. Por ejemplo, las composiciones se aplican a fracturas óseas solas o junto con un adhesivo óseo (cemento) o cola o a tejido muscular enfermo o dañado. Los hidrogeles (sembrados con células o sin células) se inyectan en el sitio de enfermedad, lesión o fractura (en el caso de hueso o cartílago). Por ejemplo, los hidrogeles se inyectan en o sobre hueso. Los factores bioactivos ejemplares para uso en la promoción de la reparación, regeneración o formación ósea o de cartílago incluyen BMP-2, BMP-4 o RunX.

En algunos casos, la composición agrupa células para promover la reparación, regeneración o formación ósea o de cartílago. Como alternativa, el primer hidrogel o el segundo hidrogel comprende una célula ósea aislada seleccionada del grupo consistente en un osteoblasto, un osteocito, un osteoclasto y un osteoprogenitor. Como alternativa, el primer hidrogel o el segundo hidrogel comprende una célula de cartílago aislada, en los que la célula de cartílago aislada comprende un condroblasto. La célula ósea aislada o célula de cartílago aislada es una célula autóloga o una célula alogénica.

Para aplicaciones musculares, p. ej. desgarros musculares, distensiones musculares o tirones musculares, los hidrogeles (sembrados con o sin células) se inyectan en el sitio de lesión. Las composiciones adecuadas para aplicaciones musculares incluyen una composición que comprende un primer hidrogel y un segundo hidrogel, en las que el primer hidrogel se degrada al menos un 10 % más rápido que el segundo hidrogel, y en las que el primer hidrogel o el segundo hidrogel comprende un factor bioactivo para uso en reparación, regeneración o formación muscular. Por ejemplo, el factor bioactivo comprende MyoD.

En algunos casos, la composición agrupa células para promover la reparación, regeneración o formación muscular o de cartílago. Como alternativa, el primer hidrogel o el segundo hidrogel comprende una célula muscular aislada seleccionada del grupo consistente en una célula de músculo esquelético, una célula de músculo cardíaco, una célula de músculo liso y una célula mioprogenitora. La célula muscular aislada es una célula autóloga o una célula alogénica.

Para aplicaciones dérmicas, p. ej. quemaduras, abrasiones, laceraciones o enfermedades, los hidrogeles (sembrados con células o sin células) se aplican directamente al sitio como emplasto o apósito para heridas. Preferiblemente, la mayoría de los porógenos (p. ej., más de un 50 %, más de un 60 %, más de un 70 %, más de un 80 % o más de un 90 %) en los hidrogeles brutos están dirigidos hacia la superficie dérmica y al tejido dérmico cuando se aplican directamente al sitio (p. ej. la quemadura). De esta manera, se liberan factores bioactivos o células en la superficie de la piel o capas inferiores de la piel, y no migran de la piel o tejido diana. Es un factor bioactivo ejemplar para uso en la reparación, regeneración o formación dérmica el FGF.

En algunos casos, la composición agrupa células para promover la reparación, regeneración o formación dérmica o de cartílago. Como alternativa, el primer hidrogel o el segundo hidrogel comprende una célula dérmica aislada seleccionada del grupo consistente en un fibroblasto, una célula dérmica, una célula epidérmica o una célula progenitora dérmica. La célula dérmica aislada es una célula autóloga o una célula alogénica.

Se purifican y/o aíslan factores bioactivos tales como polinucleótidos, polipéptidos u otros agentes. Específicamente, como se usa en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido o proteína "aislada" o "purificada" está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Los compuestos purificados son al menos un 60 % en peso (peso seco) el compuesto de interés. Preferiblemente, la preparación es al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 90 % y lo más preferiblemente al menos un 99 % en peso el compuesto de interés. Por ejemplo, es un compuesto purificado aquel que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % (p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide mediante un método estándar apropiado, por ejemplo, análisis por cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Un polinucleótido (ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) purificado o aislado está libre de los genes o secuencias que lo flanquean en su estado de origen natural. Purificado define también un grado de esterilidad que es seguro para administración a un sujeto humano, p. ej. que carece de agentes infecciosos o tóxicos.

De forma similar, se entiende por "sustancialmente puro" un nucleótido o polipéptido que se ha separado de los componentes que lo acompañan naturalmente. Típicamente, los nucleótidos y polipéptidos son sustancialmente puros cuando están al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 99 % en peso libres de las proteínas y moléculas orgánicas de origen natural con las que están naturalmente asociados.

Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de ningún ácido nucleico de origen natural, o a la de ningún fragmento de un ácido nucleico genómico de origen natural que se extiende por más de tres

genes separados. El término cubre, por ejemplo: (a) un ADN que es parte una molécula de ADN genómico de origen natural, pero que no está flanqueado por ambas secuencias de ácido nucleico que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que aparece naturalmente; (b) un ácido nucleico incorporado a un vector o en el ADN genómico de un procarionta o eucarionta de tal manera que la molécula resultante no sea idéntica a ningún vector o ADN genómico de origen natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia nucleotídica recombinante que es parte de un gen híbrido, concretamente, un gen que codifica una proteína de fusión. Las moléculas de ácido nucleico aisladas según la presente invención incluyen adicionalmente moléculas producidas sintéticamente, así como cualquier ácido nucleico que se haya alterado químicamente y/o que tenga esqueletos modificados.

Una molécula pequeña es un compuesto que es menor de 2.000 dáltones en masa. La masa molecular de la molécula pequeña es preferiblemente menor de 1.000 dáltones, más preferiblemente menor de 600 dáltones, p. ej. el compuesto es menor de 500 dáltones, 400 dáltones, 300 dáltones, 200 dáltones o 100 dáltones.

El término transicional “comprende”, que es sinónimo de “incluye”, “contiene” o “caracterizado por” es inclusivo o de extremos abiertos y no excluye elementos o etapas de métodos adicionales no indicados. En contraposición, la frase transicional “consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. La frase transicional “consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y “aquellos que no afecten materialmente a la característica o características básicas y novedosas” de la invención reivindicada.

Resultarán evidentes otros rasgos y ventajas de la invención a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma, y a partir de las reivindicaciones. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un especialista en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En el caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una serie de esquemas, fotografías, gráficos de barras y gráficos lineales que muestran la formación de poros *in situ* en hidrogeles como se demuestra mediante imagenología y ensayo de propiedades mecánicas. La Figura 1A es un esquema que ilustra la formación de hidrogeles. Izquierda: microperlas que constan de hidrogeles rápidamente degradables (esferas rojas) y citoblastos mesenquimatosos (MSC, verdes). Medio: microperlas y MSC se mezclan con un segundo hidrogel que forma material polimérico (“gel bruto”, gris), que está reticulado alrededor de las perlas. Derecha: después de la degradación de las microperlas *in situ*, permanece una red de hidrogel intacta con una red de poros a través de los cuales se liberan MSC. La Figura 1B es una micrografía de fluorescencia de porógenos marcados con fluoresceína (verde) inmediatamente después de la fabricación. La Figura 1C es una micrografía de fluorescencia de porógenos marcados con fluoresceína (verde) después de encapsulación en una red de hidrogel de alginato. La Figura 1D es un gráfico de barras que ilustra las medidas de módulo elástico de hidrogeles estándares (barras azules) o hidrogeles formadores de poros (barras rojas). El día 0, no hay diferencia estadísticamente significativa en la rigidez global de los hidrogeles compuestos formadores de poros y los estándares debido a que no se han formado poros; sin embargo, después de 4 días, el módulo del material compuesto cae sustancialmente debido a la formación de poros. La Figura 1E es una serie de micrografías electrónicas de barrido que representan hidrogeles formadores de poros inmediatamente después de la formación (día 0) que muestran una red manifiestamente intacta, 5 días después de la fabricación o 10 días después de la fabricación, en cuyo momento se ha observado una formación de poros significativa. La Figura 1F y la Figura 1G verifican que el módulo elástico del material compuesto (50 % de la fracción en volumen del porógeno) no es sustancialmente diferente del módulo elástico de un hidrogel estándar (sin porógenos), pero que a medida que se forman huecos, el módulo del material compuesto cae sustancialmente. La disminución del módulo elástico del material compuesto a una semana corresponde a la densidad de huecos, y a baja densidad de porógeno, hay una relación lineal entre la densidad de huecos y la disminución del módulo elástico del material compuesto. Las Figuras H e I ilustran que la tenacidad a la fractura del material compuesto (25 % de fracción en volumen del porógeno) es inicialmente similar a la tenacidad a la fractura de un hidrogel estándar sin porógeno, pero disminuye enseguida a una fracción del valor inicial. Como con el módulo elástico, la disminución de la tenacidad a la fractura se ajusta a la densidad del porógeno, aunque de manera no lineal. Barras de escala: (B, C y E): 1 mm.

La Figura 2 es una serie de fotografías, gráficos lineales y esquemas que ilustran la movilización de citoblastos mesenquimatosos *in vitro*. Específicamente, la Figura 2 demuestra la liberación de citoblastos a partir de hidrogeles formadores de poros *in vitro*, lo que muestra también que la liberación puede adaptarse variando la composición de los porógenos y la compartimentalización de las células en los porógenos frente al material bruto. La Figura 2A es un gráfico lineal que muestra la cinética de formación de huecos interconectados valorada con un ensayo capilar (las barras de error son error estándar de la media, $n = 3-4$). Los huecos interconectados se formaban durante los primeros 7 días a menos que estuviera presente una fracción muy alta de porógenos (por encima del límite de percolación: 80 %). No se observó formación sustancial de huecos interconectados con una densidad de porógenos subpercolación.

La Figura 2B es una serie de esquemas y fotografías que muestran reconstrucciones tridimensionales de células teñidas con calceína-AM distribuidas por los hidrogeles formadores de poros. Los cambios sustanciales en la morfología celular representan la capacidad de las células de migrar y proliferar en los hidrogeles formadores de poros, mientras que las células permanecían dispersas y redondeadas en hidrogeles estándares. La inmunofluorescencia de Ki-67 (verde) indica una proliferación aumentada, mientras que la contratinción nuclear (Hoescht, azul) una mayor celularidad en hidrogeles formadores de poros en comparación con hidrogeles estándares. La Figura 2C es un conjunto de micrografías de fluorescencia que muestran los efectos de la formación de huecos sobre la celularidad y la morfología celular en hidrogeles formadores de poros. Específicamente, se tiñeron en micrografías de fluorescencia de hidrogeles formadores de poros los citoblastos mesenquimatosos (MSC) vivos (calceína-AM, verde) o células muertas (homodímero de etidio, rojo) después de 4-10 días *in vitro*. La morfología celular esférica denota células confinadas en un material nanoporoso, y está presente en marcos temporales cortos en ambos materiales, pero solo en hidrogeles estándares en marcos temporales más largos. La Figura 2D es un gráfico lineal que muestra el número acumulado de MSC liberados después de 12 días en función de la densidad de volumen de porógenos. La Figura 2E es un gráfico lineal y esquema que ilustra la cinética de movilización de MSC encapsulados en la fase bruta, la fase porogénica de los armazones formadores de poros o en hidrogeles estándares. Se prepararon los porógenos con alginato oxidado al 7,5 % y reticulado en CaCl_2 100 mM. La Figura 2F es un gráfico lineal que muestra la cinética de movilización de MSC a partir de la fase porogénica de hidrogeles formadores de poros en función de las condiciones de fabricación de porógenos para células D1 encapsuladas en porógenos. La Figura 2G es un gráfico de barras que muestra que el análisis cuantitativo de la incorporación de ^3H -timidina indica una proliferación celular potenciada, de manera dependiente de RGD. La Figura 2H es una serie de gráficos lineales que muestran los efectos del grado de oxidación de alginato sobre la liberación celular. A un nivel constante de calcio para reticular porógenos (100 mM), aumentar el grado de oxidación de 3-7,5 % aumentaba sustancialmente el número global de células liberadas, mientras que rebajar el grado de oxidación retardaba ligeramente la liberación celular. A un grado constante de oxidación de porógeno (7,5 %), aumentar la concentración del calcio usada para reticular porógenos de 25-100 mM rebajaba el número global de células liberadas y retardaba ligeramente el inicio de la liberación celular. Barras de escala: (A): 100 μm

La Figura 3 es una serie de fotografías y gráficos lineales que muestran los resultados de controlar la movilización, injerto y proliferación *in vivo* de citoblastos mesenquimatosos. Específicamente, la Figura 3 demostraba la liberación de citoblastos a partir de hidrogeles formadores de poros *in vivo* en el espacio subcutáneo de ratones atímicos. La Figura 3A es una fotografía que muestra imágenes representativas de ratones atímicos en que se movilizaron 2×10^6 MSC que expresan mCherry, 7 o 30 días después de inyección en hidrogeles estándares (izquierda), hidrogeles formadores de poros en que los porógenos se reticulaban con CaCl_2 100 mM (centro) o solución salina (derecha). Se modificó el componente bruto de hidrogeles con 2 RGD/cadena polimérica. Inicialmente, se injertaban más células en la condición solo con solución salina, pero en puntos temporales posteriores había menos células en esta condición y eventualmente se injertaban sustancialmente más células cuando se liberaban de hidrogeles formadores de poros. La Figura 3B es un gráfico lineal que muestra la cuantificación de la eficacia radiante relativa (proporcional a la densidad celular) de mCherry-MSC inyectados en hidrogeles formadores de poros, hidrogeles estándares o solución salina. La Figura 3C es un gráfico lineal que muestra que disminuir la densidad del calcio usado para reticular porógenos disminuía sustancialmente la densidad global de las células liberadas, y retardaba ligeramente la cinética de movilización (las barras de error son EEM, $n=4-6$). La Figura 3D es una serie de fotografías que muestran la capacidad de hidrogeles formadores de poros de potenciar la regeneración ósea mediada por citoblastos mesenquimatosos humanos usando un modelo de defectos craneales de rata atímica. Se formaron defectos de tamaño crítico en los cráneos de ratas atímicas (Charles River). Inmediatamente después de la formación de defectos, se trasplantaron citoblastos mesenquimatosos humanos comercialmente disponibles (Lonza) al espacio de defecto, en solución salina ("solo células"), un hidrogel estándar (2 RGD/polímero de alginato, 60 kPa) o un hidrogel formador de poros. Se tomaron secciones transversales representativas de análisis tomográficos microcomputerizados de formación de hueso nuevo en defectos craneales 4 semanas después del implante. Se forma sustancialmente más hueso nuevo en los defectos en que se suministraron células por hidrogeles formadores de poros.

La Figura 4 es una serie de fotomicrografías que representan el uso de hidrogeles formadores de poros para liberar distintas poblaciones en diferentes momentos. La Figura 4A-Figura 4C son micrografías fluorescentes de mioblastos que expresan GFP y células endoteliales de crecimiento (OEC) adherentes a plástico de cultivo celular después de 4 días de cultivo en hidrogeles formadores de poros en que se varió la química usada para formar porógenos y se colocaron los diferentes tipos celulares inicialmente en compartimentos distintos: (Figura 4A): mioblastos en componente bruto, OEC en componente porogénico; (Figura 4B): mioblastos en componente de perla; OEC en componente porogénico; (Figura 4C): tanto mioblastos como OEC en componente bruto. La Figura 4D es una micrografía representativa de un sustrato plástico sobre el que se sembraron iguales números de GFP-mioblastos y OEC. Los mioblastos sobrepasaban los OEC. Se tiñeron las células con homodímero de etidio (rojo) de forma que los GFP-mioblastos aparezcan amarillos y los OEC aparezcan rojos. Imágenes tomadas a 10x aumentos.

La Figura 5 es una serie de fotomicrografías que representan el uso de hidrogeles formadores de poros para el agrupamiento celular mediado por quimiocinas. Específicamente, la Figura 5 muestra el control del agrupamiento celular mediado por quimiocinas por hidrogeles formadores de poros *in vivo*. Se oxidó primer el alginato y se redujo entonces con borohidruro de sodio para dar grupos alcohol que reemplazan lo que originalmente eran azúcares. La Figura 5A y la Figura 5B son micrografías fluorescentes del agrupamiento de células dendríticas en gel de alginato

inyectable estándar (Figura 5A) e hidrogel formador de poros (Figura 5B). Se cargaron ambos conjuntos de hidrogeles con 2 pg de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos. Las Figuras 5C y 5D son micrografías fluorescentes del agrupamiento de células dendríticas en hidrogeles formadores de poros fabricados con porógenos oxidados (Figura 5C) o reducidos (Figura 5D). No se añadió quimiocina. Para histología, se tiñeron en las células dendríticas CD11c (verde) y NIHC-II (rojo) con contratinción nuclear de Hoechst (azul). En la Figura 5C y la Figura 5D, se efectuó solo tinción nuclear (blanco). Esta figura muestra la diferencia en el agrupamiento de células hospedadoras por materiales con porógenos formados a partir de alginato oxidado frente a alginato reducido. Barras de escala: 100 pm.

La Figura 6 es una serie de gráficos lineales, diagramas de barras y fotografías que demuestran el control de la proliferación de citoblastos en hidrogeles formadores de poros, la movilización desde hidrogeles y la capacidad de regenerar hueso variando la composición de la fase bruta. Las Figuras 6A y 6B son gráficos lineales que muestran el análisis de la incorporación de ^3H -timidina de 24 h (proporcional a la síntesis de ADN) por citoblastos mesenquimatosos (D1; curva roja) o la movilización acumulada de MSC (curvas azules) por hidrogeles formadores de poros después de 7 días de cultivo en función de la densidad de péptidos RGD en geles brutos con módulo de 60 kPa (Figura 6A) o del módulo elástico de hidrogeles brutos (Figura 6B) que presentan 10 péptidos RGD/polímero de alginato (los datos son media \pm EEM, n= 3-5). La densidad de RGD tenía efectos significativos sobre la proliferación celular, mientras que el módulo elástico tenía efectos tanto sobre la proliferación como la liberación ($p < 0,05$, ANOVA). La Figura 6C es un gráfico de barras que muestra el análisis de la síntesis de ADN en función de la formación de poros. La Figura 6D es una serie de fotografías que muestran la tinción por Ki-67 (marcador de proliferación, verde) en células D1 en hidrogeles formadores de poros crioseccionados después de 50 días de cultivo. Las Figuras 6E y 6F son un gráfico lineal que muestra el control de la movilización, injerto y proliferación *in vivo* de citoblastos mesenquimatosos. La Figura 6E es un gráfico lineal que muestra la cuantificación de la eficacia radiante relativa (proporcional a la densidad celular) de mCherry-MSC inyectados en hidrogeles formadores de poros en que la fase bruta se modificó con 2 (\blacklozenge), o 10 (\blacksquare) péptidos RGD por polímero de alginato. Como alternativa, se inyectaron las células en un hidrogel estándar con 2 péptidos RGD/polímero de alginato (\blacktriangle). La Figura 6F muestra la cuantificación del porcentaje de curación (formación de hueso nuevo debida a MSC humanos trasplantados en defectos craneales de rata atímica) en función del método de suministro de MSC. Las barras de error son EEM, n= 4-6.

La Figura 7 es una serie de gráficos lineales y diagramas de frecuencia en barra que muestran las propiedades mecánicas y la degradación *in vitro* de hidrogeles formados a partir de alginatos binarios. La Figura 7A y la Figura 7B muestran los módulos elásticos (Figura 7A) y la degradación (Figura 7B) de hidrogeles brutos formados reticulando combinaciones binarias de alginato oxidado (5 % de grado teórico de oxidación) a una densidad constante de 20 mg/ml con alginato de alto Mw no modificado. Se valoró la degradación comparando la masa seca después de 4 días *in vitro* con la masa seca inicial. La Figura 7C es un histograma de diámetros de porógenos formados a partir de mezclas binarias de alginato oxidado 20 mg/ml con alginato no modificado 7,5 mg/ml. Se midió el diámetro de porógeno procesando micrografías fluorescentes de porógenos preparadas a partir de alginatos marcados con aminofluoresceína. Las barras de error son DE, n= 3-4.

La Figura 8 es un esquema de un biomaterial implantable que imita ciertos aspectos de nichos de citoblastos en que activa células progenitoras trasplantadas a proliferar y las programa para diferenciarse en células que migran a tejidos dañados para participar en la regeneración.

La Figura 9 es un esquema de un armazón de hidrogel (izquierda, arriba) que controla el destino de células trasplantadas mediante la presentación de señales específicas, pero que evita que las células trasplantadas migren fuera, y las células hospedadoras migren dentro, del material. Abajo: datos ejemplares que representan la capacidad de un hidrogel nanoporoso de controlar el destino de citoblastos mesenquimatosos, en este caso mediante el módulo elástico. Derecha, arriba: esquema de una esponja macroporosa que controla el destino trasplantado mediante la presentación de señales específicas, mientras que permite también a las células hospedadoras migrar dentro, y a las células trasplantadas migrar fuera, del material.

La Figura 10 es una serie de imágenes que representan una estrategia alternativa para producir hidrogeles macroporosos. Como se describe en el esquema (centro, derecha), los porógenos se embeben en un hidrogel "bruto" o se aplican técnicas fotolitográficas para proporcionar regiones no reticuladas del hidrogel bruto. Después de reticular el hidrogel bruto, se retiran las porciones no reticuladas del hidrogel y porógenos usando disolventes tales como acetona. Izquierda: imagen de un hidrogel macroporoso.

La Figura 11 es un esquema y un diagrama de barras que representa una estrategia para crear porógenos de hidrogel basado en alginato de degradación rápida. Arriba a la izquierda: esquema de la reacción química para oxidar alginato a dialdehído de alginato con NaIO_4 . Arriba a la derecha: esquema que representa la pérdida de porciones reticulables ricas en ácido gulurónico de alginato (segmentos cortos rectos) y la disminución global del Mw del polímero debido a oxidación por peryodato de sodio. Abajo: datos que representan la pérdida de masa seca con el tiempo a partir de hidrogeles elaborados con alginato no modificado 20 mg/ml (cuadrados), dialdehído de alginato 20 mg/ml (5 % de grado de oxidación; rombos) o una mezcla binaria de dialdehído de alginato 20 mg/ml con alginato no modificado 7,5 mg/ml (triángulos).

La Figura 12 es un esquema que ilustra la fabricación y caracterización de porógenos.

La Figura 13 es un esquema que muestra el control del agrupamiento de células hospedadoras con hidrogeles formadores de poros. Específicamente, se muestra en esta Figura un esquema de un sistema biomaterial implantable que imita el microentorno de una infección, permitiendo el agrupamiento, programación y posterior orientación de células dendríticas presentadoras de antígeno activadas a los nódulos linfáticos para participar en una potente respuesta antitumoral.

La Figura 14 es una serie de fotomicrografías que muestran cómo los polímeros usados para comprender la fase porogénica afectan a la degradación y procesamiento de los porógenos. Específicamente, se muestra en esta figura micrografías de fluorescencia de porógenos formados usando dialdehído de alginato marcado con fluoresceína. Inmediatamente después de la reticulación en CaCl_2 100 mM, (arriba) los porógenos están manifiestamente intactos, tanto los elaborados usando dialdehído de alginato 20 mg/ml (arriba a la izquierda) como una mezcla binaria de dialdehído de alginato 20 mg/ml con alginato no modificado 7,5 mg/ml. Sin embargo, después de las etapas de procesamiento usadas para purificar porógenos y retirar el CaCl_2 en exceso, los porógenos elaborados únicamente con dialdehído de alginato estaban dañados, dando como resultado un cambio sustancial de morfología y la liberación de polímeros marcados con fluoresceína en solución procurando un nivel sustancial de fluorescencia de fluoresceína de fondo (abajo a la izquierda). En contraposición, las mezclas binarias de dialdehído de alginato 20 mg/ml con alginato no modificado 7,5 mg/ml daban como resultado porógenos que podían soportar las etapas de procesamiento.

Descripción detallada de la invención

Durante las últimas décadas, se han usado polímeros biocompatibles para formar armazones que actúan como portadores para trasplante celular, o para agrupar poblaciones de células hospedadoras en el dispositivo. Generalmente, se usan esponjas tales como poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) o hidrogeles sintéticos tales como alginato. Sin embargo, ambos conjuntos de materiales tienen desventajas. Por ejemplo, las esponjas adsorben típicamente proteínas séricas, así que es difícil controlar la presentación de proteínas o péptidos adhesivos (por ejemplo, RGD) a partir del material. Los materiales de esponja típicamente tampoco son susceptibles de inyección, requieren una cirugía invasiva para el implante, y también exponen las células trasplantadas o células hospedadoras a un entorno hospedador que puede ser inicialmente hostil (por ejemplo, neutrófilos presentes durante la inflamación pueden atacar a los citoblastos). Por otro lado, los hidrogeles sintéticos son típicamente inyectables, permitiendo un suministro mínimamente invasivo, y no interaccionan con proteínas. Sin embargo, antes de la invención descrita en la presente memoria, el tamaño de poro de los hidrogeles era típicamente mucho menor que el diámetro de una célula eucariótica, haciendo difícil expandir una población de células trasplantadas, liberar células trasplantadas para permitirles reparar tejidos dañados o agrupar células hospedadoras en el dispositivo.

Se describe en la presente memoria un método para formar poros *in situ* en hidrogeles después de inyección del hidrogel. Los poros se forman *in situ* mediante la degradación de porógenos sacrificiales encapsulados en el hidrogel circundante. La cinética e inicio de la formación de poros se controlan manipulando el material usado para formar porógenos, y las células se encapsulan en los porógenos mismos o el hidrogel que los rodea. Los ejemplos demuestran la movilización, proliferación y diferenciación *in vitro* de citoblastos, así como la movilización de citoblastos *in vivo* y el agrupamiento celular mediado por quimiocinas. El sistema media la movilización controlada de células fuera, o el agrupamiento local de células dentro, de una matriz polimérica mediante la formación de poros en esta matriz. El tamaño, distribución y cinética de formación de los poros se predeterminan por el usuario, mientras que la integridad de la matriz circundante de los poros, junto con las células o factores biológicos dentro de esta matriz, no cambian.

Por consiguiente, se describe en la presente memoria el uso de señales insolubles tales como presentación de ligando de adhesión a hidrogel y/o módulo elástico (concretamente, rigidez) para generar materiales que son 1) inyectables; 2) permiten al usuario controlar el destino celular usando señales insolubles y 3) forman poros con el tiempo para movilizar o agrupar células. Específicamente, los métodos descritos en la presente memoria crean hidrogeles formadores de poros usando un proceso que permite encapsular las células en la fase formadora de poros (a la que se hace referencia de aquí en adelante como "porogénica") o la fase de no degradación o degradación lenta (a la que se hace referencia de aquí en adelante como "bruta").

Se describen en la presente memoria métodos para un enfoque generalizado para crear hidrogeles formadores de poros que permitan la encapsulación celular, y un medio para controlar la cinética de movilización celular fuera, o el agrupamiento dentro, del hidrogel. Se forman "porógenos" de microperlas de hidrogel y se encapsulan a continuación en un segundo hidrogel "bruto". La composición de polímeros usada para formar hidrogeles porogénicos y brutos puede variar; sin embargo, el porógeno debe degradarse más rápidamente (p. ej., un 10 %, 20 %, 50 %, 2X, 5X, 10X, 20X o más rápido) que el hidrogel bruto. Las células o factores bioactivos (p. ej., factores de crecimiento tales como factor estimulante de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), oligonucleótidos condensados, p. ej. CpG o ADN de plásmido) se encapsulan opcionalmente en la fase porogénica, la fase de hidrogel bruto o en ambas fases. Los porógenos se degradan *in situ* durante un curso temporal predeterminado por el usuario, en cuyo momento se liberan células o pueden migrar al material. Sin embargo, debido a que carecen inicialmente de poros, los hidrogeles formadores de poros son útiles para proporcionar soporte mecánico inmediatamente después de la formación (Figura 1).

La liberación o agrupamiento celular se manipula controlando la cinética de degradación de porógenos. Por ejemplo, los polímeros de alginato se oxidan para producir dialdehído de alginato, y el número total de células liberadas aumenta

a medida que aumenta la extensión de la oxidación (Figura 2, Figura 3). Como alternativa, se alteran las condiciones usadas para reticular los porógenos para manipular el tiempo en que empieza a ocurrir una degradación de porógeno y liberación celular significativas (Figura 2). La química de porógenos puede variar adicionalmente para facilitar o inhibir la interacción con proteínas hospedadoras (Figura 5).

- 5 La liberación celular y el destino celular se controlan manipulando las propiedades biofísicas y bioquímicas (p. ej., módulo elástico y densidad de péptidos de adhesión de unión a integrina tales como RGD) del hidrogel bruto. Por ejemplo, formación de poros, densidad de RGD del hidrogel bruto y elasticidad del hidrogel bruto afectan todos a la proliferación celular en estos materiales (Figura 2, Figura 6). El procesamiento ortogonal de porógenos y material bruto separados entre sí potencia la capacidad de adaptar el sistema para manipular la liberación celular y el destino celular.
- 10 Por ejemplo, la asignación de linaje de citoblastos se modula variando el módulo elástico o la densidad de RGD, independientemente de la cinética de la formación de poros. En contraposición, otras técnicas usadas para formar materiales macroporosos (p. ej., extracción basada en disolvente de porógenos) no son compatibles con la encapsulación celular, y afectan típicamente a las propiedades físicas de ambas fases porogénica y bruta. Las propiedades físicas y bioquímicas de materiales de hidrogel bruto que se degrada rápidamente cambian
- 15 continuamente en el transcurso de la degradación. Estos parámetros se aprovechan para diseñar la fase bruta para regular el destino celular.

Composiciones de hidrogel

- Los hidrogeles comprenden una red de cadenas poliméricas que son hidrófilas. El hidrogel (también llamado acuagel) se encuentra a veces como un gel coloidal en que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son polímeros naturales o sintéticos altamente absorbentes (pueden contener más de un 99,9 % de agua). Los hidrogeles poseen también un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su significativo contenido de agua. El hidrogel consta de polímeros reticulados. Los hidrogeles ejemplares constan de materiales que son compatibles con la encapsulación celular tales como alginato, polietilenglicol (PEG), PEG-acrilato, agarosa y proteína sintética (p. ej., colágeno o proteínas alteradas por ingeniería) (concretamente, hidrogeles basados en péptidos de autoensamblaje).
- 20 Por ejemplo, un hidrogel comercialmente disponible incluye BD™ PuraMatrix™ Peptide Hydrogel, que es una matriz sintética que se usa para crear microentornos tridimensionales (3D) definidos para cultivo celular.

- Por ejemplo, el hidrogel es una matriz polimérica biocompatible que es biodegradable total o parcialmente. Los ejemplos de materiales que pueden formar hidrogeles incluyen alginatos y derivados de alginato, polímeros de poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), gelatina, colágeno, agarosa, polisacáridos naturales y sintéticos, poliaminoácidos tales como polipéptidos, particularmente polilisina, poliésteres tales como polihidroxibutirato y poli-épsilon-caprolactona, polianhídridos, polifosfazinas, polivinilalcoholes, poli(óxidos de alquileño) particularmente poli(óxidos de etileno), polialilaminas (PAM), poliacrilatos, polímeros de estireno modificados tales como poli-(4-aminometilostireno), polioles plurónicos, polioxámeros, poli(ácidos urónicos), polivinilpirrolidona y copolímeros de los anteriores, incluyendo copolímeros de injerto. Pueden usarse también
- 30 polímeros sintéticos y polímeros de origen natural tales como, pero sin limitación, colágeno, fibrina, ácido hialurónico, agarosa y geles ricos en laminina.

- Un material preferido para el hidrogel es material de alginato o alginato modificado. Las moléculas de alginato constan de monómeros de ácido β -D-manurónico (1-4)-ligados (unidades M) y de ácido α -L-gulurónico (unidades G), que pueden variar en proporción y distribución secuencial a lo largo de la cadena polimérica. Los polisacáridos de alginato son sistemas polielectrolíticos que tienen una fuerte afinidad por cationes divalentes (p. ej., Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2}) y forman hidrogeles estables cuando se exponen a estas moléculas.
- 40

- Los hidrogeles sintéticos son típicamente inyectables, permiten un suministro mínimamente invasivo y no interaccionan con proteínas. Por ello, la presentación de proteínas o péptidos de adhesión se controla precisamente. Además, los hidrogeles sintéticos tienen típicamente un tamaño de malla de poro que es mucho menor que las células (< 10 nm, mientras que las células son > 10 μm), lo que evita que las células hospedadoras ataquen las células trasplantadas. Sin embargo, este pequeño tamaño de poro evita también que las células trasplantadas proliferen extensamente en el material, e impide también su eventual liberación para afectar a diversas funciones (por ejemplo, regeneración de tejido funcional o destrucción de tejido dañado).
- 45

- Se han introducido varias técnicas para combinar los rasgos deseables de hidrogeles y esponjas, por ejemplo, se han encapsulado microesferas rígidas en hidrogeles y se han extraído entonces con disolventes (p. ej., acetona) para dejar detrás un hidrogel macroporoso, y se ha aplicado liofilización para generar hidrogeles macroporosos. Los hidrogeles pueden modificarse para degradarse rápidamente *in vivo* liberando células hospedadoras. Sin embargo, antes de la invención descrita en la presente memoria, ninguno de los enfoques permitía la combinación de un componente material sin degradación (o con degradación lenta) con encapsulación celular. Las propiedades mecánicas y la composición bioquímica de los materiales de hidrogel afectan fuertemente al destino celular, y la degradación dentro y fuera misma puede regular intrínsecamente el destino celular.
- 50
- 55

Composiciones formadoras de poros

Se forman microperlas de hidrogel ("porógenos"). A continuación, se encapsulan porógenos en un hidrogel "bruto" que es no degradable o que se degrada a una tasa lenta en comparación con los porógenos. Se encapsulan opcionalmente las células en el componente porogénico o bruto. Inmediatamente después de la formación de hidrogel, o la inyección en el sitio deseado *in vivo*, el material compuesto carece de poros, y sirve como agente de relleno quirúrgico. Posteriormente, la degradación de porógenos hace que se formen poros *in situ* y las células encapsuladas se movilizan a partir del material compuesto y a sus tejidos circundantes o tejidos remotos, p. ej. nódulos linfáticos, en el cuerpo. El tamaño y distribución de poros se controlan durante la formación de porógenos y mezclado con los polímeros que forman el hidrogel bruto.

- 5
- 10 Como alternativa, se inyecta el hidrogel sin células encapsuladas y se usa la formación de poros como medio de agrupamiento de células hospedadoras, en combinación con o independientemente de las quimiocinas liberadas del componente bruto o porogénico. Los porógenos constan de cualquier polímero biocompatible, a condición de que se degraden más rápidamente que el material usado para formar el hidrogel "bruto", e inicialmente son suficientemente estables mecánicamente para soportar mezclarse con el polímero que forma la fase de hidrogel bruto. El "material bruto" consta de cualquiera polímero formador de hidrogel.
- 15

Composiciones de alginato

Los polímeros utilizados en las composiciones y métodos son de origen natural o elaborados sintéticamente. En un ejemplo, tanto los hidrogeles porogénicos como brutos se forman a partir de alginato. "Alginato", como se usa aquí ese término, hace referencia a cualquier serie de derivados de ácido alginico (p. ej., sales de calcio, sodio o potasio, o alginato de propilenglicol). Véase, p. ej., el documento PCT/US97/16890.

- 20
- Los polímeros de alginato adecuados para la formación de porógenos tienen un peso molecular en dáltones de 5.000 a 500.000 Da. Adicionalmente, los polímeros se modifican opcionalmente (p. ej., por oxidación con peryodato de sodio (Bouhadir *et al.*, 2001, Biotech. Prog. 17: 945-950), para facilitar una degradación rápida. En los ejemplos descritos a continuación, se reticularon los polímeros por extrusión a través de un nebulizador con flujo de aire coaxial en un baño de catión divalente (por ejemplo, Ca^{2+} o Ba^{2+}) para formar microperlas de hidrogel. Cuanto mayor es el caudal de aire, menor el diámetro de porógeno.
- 25

La concentración de iones divalentes usada para formar porógenos puede variar de 5 a 500 mM, y la concentración de polímero de 1 a 5 % en peso. Sin embargo, es adecuado cualquier método que produzca porógenos que sean significativamente menores que la fase bruta. La química de porógenos puede manipularse además para producir porógenos que tengan cierta interacción con las proteínas y células hospedadoras (p. ej., alginatos oxidados hasta el punto de que > 5 % de los residuos de azúcar interaccionan significativamente con las células hospedadoras, Figura 5), o para inhibir esta interacción (p. ej., los alginatos oxidados que se reducen con NaBH_4 exhiben una interacción mínima con proteínas o células hospedadoras, Figura 5).

- 30
- Los polímeros de alginato adecuados para la formación del hidrogel bruto tienen un peso molecular en dáltones de 5.000 a 500.000 Da. Los polímeros pueden modificarse adicionalmente (por ejemplo, por oxidación con peryodato de sodio) para facilitar la degradación, a condición de que el hidrogel bruto se degrade más lentamente que el porogénico. Los polímeros pueden modificarse también para presentar señales biológicas para controlar respuestas celulares (p. ej., péptidos de adhesión de unión a integrina tales como RGD). Los porógenos o el hidrogel bruto pueden encapsular también factores bioactivos tales como oligonucleótidos, factores de crecimiento o fármacos para controlar adicionalmente las respuestas celulares. La concentración de iones divalentes usados para formar el hidrogel bruto puede variar de 5 a 500 mM, y la concentración de polímero de 1 a 5 % en peso. El módulo elástico del polímero bruto se ajusta, p. ej., para controlar el destino de las células encapsuladas.
- 35
- 40

Ejemplo 1: Formación de poros *in situ* en hidrogeles

Se muestra en la Figura 1 la formación de poros *in situ* en hidrogeles como se demuestra mediante ensayos de imagenología y propiedades mecánicas. Como se muestra en la Figura 1A, se mezclaron microperlas que constan de hidrogeles de degradación rápida (esferas rojas) con un material polimérico que forma un segundo hidrogel, que se reticula alrededor de las perlas. Después de la degradación de las microperlas *in situ*, permanecía una red de hidrogel intacto (rosa) con una red de poros. Se determinaron las medidas de módulo elástico de los hidrogeles estándares (barras izquierdas) o hidrogeles formadores de poros (barras derechas) (Figura 1D). El día 0, no había diferencia estadísticamente significativa en la rigidez global de los materiales compuestos formadores de poros y los hidrogeles estándares porque no se han formado poros; sin embargo, después de 4 días, el módulo del material compuesto cae sustancialmente debido a la formación de poros.

- 45
- 50

Los métodos adicionales relevantes para generar los hidrogeles descritos en la presente memoria son los siguientes. Bouhadir *et al.* Polymer 1999; 40: 3575-84 describe la oxidación de alginato con peryodato de sodio, y caracteriza la reacción. Bouhadir *et al.* Biotechnol. Prog. 2001; 17: 945-50 describe la oxidación de alginato de alto peso molecular para formar dialdehído de alginato (el dialdehído de alginato es alginato de alto Mw en que un cierto porcentaje (p. ej. 5 %) de azúcares en el alginato se oxidan formando aldehídos), y la aplicación para elaborar hidrogeles que se degradan rápidamente. Kong *et al.* Polymer 2002; 43: 6239-46 describe el uso de irradiación gamma para reducir el

- 55

peso molecular medio ponderado (Mw) de alginatos ricos en ácido glucurónico (GA) sin reducir sustancialmente el contenido de GA (p. ej., la irradiación gamma ataca selectivamente los bloques de ácido manurónico, MA, del alginato). El alginato consta de bloques de GA y bloques de MA, y son los bloques de GA los que dan al alginato su rigidez (módulo elástico). Kong *et al.* Polymer 2002; 43: 6239-46 muestra que las combinaciones binarias de alginato de alto Mw rico en GA con alginato de bajo Mw rico en GA irradiado se reticular con calcio formando hidrogeles rígidos, pero que se degradan más rápidamente y tienen también menor viscosidad en solución que los hidrogeles elaborados a partir de la misma concentración en peso global de solo alginato de alto Mw rico en GA. Alsberg *et al.* J Dent Res 2003; 82(11): 903-8 describe perfiles de degradación de hidrogeles elaborados a partir de alginato de bajo Mw rico en GA irradiado, con aplicación en la alteración por ingeniería de tejidos óseos. Kong *et al.* Adv. Mater 2004; 16(21): 1917-21 describe el control del perfil de degradación de hidrogeles combinando el procedimiento de irradiación gamma con la reacción de oxidación, y la aplicación a alteración por ingeniería de cartílagos.

Las técnicas para controlar la degradación de biomateriales de hidrogel son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, Lutolf MP *et al.* Nat Biotechnol. 2003; 21: 513-8 describe materiales basados en polietilenglicol alterados por ingeniería para degradarse por enzimas de mamífero (MMP). Bryant SJ *et al.* Biomaterials 2007; 28(19): 2978-86 (US 7.192.693 B2) describe un método para producir hidrogeles con poros a macroescala. Se encapsula un molde de poro (p. ej., perlas de poli(metacrilato de metilo) en un hidrogel bruto y se usan entonces acetona y metanol para extraer el porógeno dejando el hidrogel bruto intacto. Silva *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci USA 2008; 105(38): 14347-52; US 2008/0044900 describe la movilización de células progenitoras endoteliales a partir de esponjas de alginato. Las esponjas se elaboran formando hidrogeles de alginato y entonces liofilizándolos (los cristales de hielo forman los poros). Estos materiales mejoran el efecto terapéutico de las células (en comparación con las células suministradas solas), pero estos materiales deben implantarse quirúrgicamente (concretamente, no son inyectables), no son susceptibles de encapsulación celular (las células mueren cuando se liofilizan) y esta estrategia hace difícil controlar el destino celular controlando el módulo elástico. Ali *et al.* Nat Mater 2009 describe el uso de armazones porosos para agrupar células dendríticas y programarlas para desencadenar respuestas antitumorales. Huebsch *et al.* Nat Mater 2010; 9: 518-26 describe el uso del módulo elástico de hidrogeles para controlar la diferenciación de citoblastos mesenquimatosos encapsulados.

Se describe en la presente memoria el uso de señales insolubles tales como presentación de ligando de adhesión a hidrogel y/o módulo elástico (concretamente rigidez) para generar materiales que son 1) inyectables, 2) permiten al usuario controlar el destino celular usando señales insolubles y 3) forman poros con el tiempo para movilizar o agrupar células. Específicamente, los métodos descritos en la presente memoria crean hidrogeles formadores de poros usando un proceso que permite encapsular las células en la fase formadora de poros (a la que se hace referencia de aquí en adelante como "porogénica") o la fase sin degradación o de degradación lenta (a la que se hace referencia de aquí en adelante como "bruta"). En los métodos descritos en la presente memoria, el porógeno se degrada por hidrólisis en lugar de por disolventes, lo que significa que las células se encapsulan en el gel porogénico o bruto alrededor de las mismas, y hay muy poca opción de que las proteínas u otros compuestos bioactivos encapsulados en el gel se desnaturalicen.

Como se describe con detalle a continuación, los porógenos quedaban intactos durante la encapsulación, pero se degradaban rápidamente procurando huecos que eran visibles por microscopía electrónica de barrido, y daban como resultado la pérdida de módulo elástico y tenacidad a la fractura de los materiales compuestos. Específicamente, las micrografías electrónicas de barrido (SEM) mostraban que los hidrogeles formadores de poros inmediatamente después de la formación (día 0) poseían una red manifiestamente intacta; sin embargo, a los 10 días después de la fabricación, se observó una formación de poros significativa (Figura 1E). El módulo elástico del material compuesto (50 % de la fracción en volumen del porógeno) no era sustancialmente diferente del módulo elástico de un hidrogel estándar (sin porógenos); sin embargo, a medida que se forman huecos, el módulo del material compuesto cae sustancialmente (Figura 1F y Figura 1G). La disminución en el módulo elástico del material compuesto a una semana corresponde a la densidad de huecos y, a una baja densidad de porógenos, hay una relación lineal entre la densidad de huecos y la disminución del módulo elástico del material compuesto. La tenacidad a la fractura del material compuesto (25 % de la fracción en volumen del porógeno) era inicialmente similar a la tenacidad a la fractura de un hidrogel estándar sin porógeno, pero disminuía a una fracción del valor inicial (Figuras H e I). Como con el módulo elástico, la disminución de la tenacidad a la fractura se ajusta a la densidad del porógeno, aunque de manera no lineal. Estos resultados demuestran que los porógenos quedan intactos durante la encapsulación y se degradan in situ formando huecos.

Ejemplo 2: Liberación *in vitro* e *in vivo* de células

Se formaron hidrogeles formadores de poros encapsulando porógenos de alginato degradables, junto con citoblastos estromales de médula ósea (D1) en gel de alginato bruto de alto peso molecular. Se formaron los porógenos con una mezcla binaria de dialdehído de alginato 20 mg/ml (oxidación teórica de 7,5 % de residuos de azúcar de alginato en alginato de alto Mw y alto contenido de ácido gulurónico) y alginato de alto Mw y alto contenido de ácido gulurónico (GA) 7,5 mg/ml. Esta mezcla polimérica se extruyó a través de un nebulizador de gas con flujo de aire con nitrógeno coaxial en un baño de CaCl₂ 0,1 M y HEPES 0,1 M para reticular polímeros. Se lavaron extensamente los porógenos con medio de cultivo celular libre de suero. Se formó el hidrogel bruto por alginato de alto Mw y alto contenido de GA 20 mg/ml modificado con 2 péptidos RGD por polímero de alginato. Se mezclaron las células D1 y porógenos en el material de hidrogel bruto usando jeringas y se reticuló entonces el material compuesto con sulfato de calcio. Se

muestra en la Figura 2 el número de células D1 liberadas de este sistema con el tiempo *in vitro*. La cinética de liberación podía modificarse 1) controlando la concentración de CaCl_2 usada para formar porógenos, 2) variando la composición (grado de oxidación) de los porógenos y 3) variando la compartimentalización de células (en el gel porogénico o bruto).

5 Específicamente, se ilustra en la Figura 2 la movilización *in vitro* de citoblastos mesenquimatosos. Se liberaron citoblastos de los hidrogeles formadores de poros *in vitro*, y esta liberación puede adaptarse variando la composición de los porógenos y la compartimentalización de células en los porógenos frente al material bruto. Se muestran en la Figura 2C los efectos de la densidad de porógenos (0-80 % en volumen) sobre la celularidad y el flujo de salida de hidrogeles formadores de poros. Específicamente, se tiñeron en micrografías de fluorescencia de hidrogeles formadores de poros los citoblastos mesenquimatosos (MSC) vivos (calceína-AM, verde) o las células muertas (homodímero de etidio, rojo) después de 4-10 días *in vitro*. La morfología celular esférica denota células confinadas en un material nanoporoso, y está presente en marcos temporales cortos en ambos materiales, pero solo en hidrogeles estándares en marcos temporales más largos. Se muestra en la Figura 2D el número acumulado de MSC liberados después de 12 días en función de la densidad de volumen de porógenos.

15 Como se muestra en la Figura 2D, el tamaño de los porógenos está relacionado con el tamaño del material compuesto global. Específicamente, para que el material quede intacto, el diámetro de porógeno es $< 10\%$ de la dimensión menor del material compuesto global. La densidad de porógenos está entre 10-80 % del volumen global tanto para agrupamiento celular como liberación celular, p. ej. entre 15 y 75 %, entre 20 y 70 %, entre 25 y 65 %, entre 30 y 60 % o entre 35 y 55 % del volumen global. Preferiblemente, la densidad de porógenos es al menos un 50 % del volumen global.

20 Se efectuaron estudios físicos e *in vitro* para determinar la cinética de la formación de huecos interconectados y la correspondiente cinética de liberación de citoblastos mesenquimatosos (Figura 2A y Figura 2E, respectivamente). Se usó para estos estudios *in vitro* una estirpe de citoblastos mesenquimatosos de ratón disponible comercialmente derivada por clonación (D1). Se usó un ensayo capilar para valorar la formación de huecos. Brevemente, se midió la densidad de huecos interconectados pesando en primer lugar los geles formadores de poros de material compuesto saturados con tampón y volviendo a pesar entonces los geles después de escurrir el agua tocando suavemente la superficie del gel con una toalla de papel. Se calculó la fracción de huecos basándose en el cambio de masa relativo. Para ensayos de liberación celular *in vitro*, se modificó el componente bruto de los hidrogeles formadores de poros con 2 péptidos RGD/polímero de alginato y tenía un módulo elástico de 60 kPa. Se formaron huecos interconectados durante los primeros 7 días a menos que estuviera presente una muy alta fracción de porógenos (por encima del límite de percolación, 80 %). No se observó la formación sustancial de vacíos interconectados con una densidad de porógenos de subpercolación. Se ilustra en la Figura 2F la cinética de movilización de MSC a partir de la fase porogénica de hidrogeles formadores de poros en función de las condiciones de fabricación de porógenos para células D1 encapsuladas en porógenos.

35 Se efectuaron posteriormente estudios de liberación con una estirpe de MSC de ratón. Se observó la liberación celular en proporción a la densidad de poro global y al cambio gradual en la morfología celular, que refleja una pérdida del confinamiento a escala micrométrica. Se efectuaron experimentos para determinar los efectos de la formación de poros sobre la celularidad y la proliferación celular en hidrogeles. Se determinó la celularidad cuantitativamente usando tinción con calceína-AM, mientras que se determinó cualitativamente la proliferación por inmunotinción para expresión de Ki-67 o cuantitativamente midiendo la incorporación de ^3H -timidina. Se presentan en la Figura 2B reconstrucciones tridimensionales de células teñidas con calceína-AM distribuidas por hidrogeles formadores de poros. Los cambios sustanciales en la morfología celular representan la capacidad de las células de migrar y proliferar en hidrogeles formadores de poros, mientras que las células permanecían dispersas y redondeadas en los hidrogeles estándares. La inmunofluorescencia de Ki-67 indicaba una mayor celularidad y proliferación aumentada en hidrogeles formadores de poros en comparación con hidrogeles estándares. El análisis cuantitativo de la incorporación de ^3H -timidina indicaba una proliferación celular potenciada de manera dependiente de RGD (Figura 2G).

45 Se efectuaron estudios 7 días para determinar si variar la composición química o condiciones de reticulación usadas para formar porógenos modularía la cinética de liberación celular (Bouhadir KH, Lee KY, Alsberg E, Damm KL, Anderson KW, Mooney DJ. Degradation of Partially Oxidized Alginate and Its Potential Application for Tissue Engineering. Biotechnol. Prog. 2001; 17: 945-50). La Figura 2H muestra que las cinéticas de liberación celular estaban controladas por la compartimentalización de células en el gel porogénico o bruto que las rodea, y que los porógenos que se reticulaban con una menor concentración de calcio se degradaban más lentamente, liberando células en un punto temporal posterior. La menor concentración de calcio usada para fabricar porógenos conducía a una reticulación más homogénea.

55 Se formaron hidrogeles formadores de poros con un componente bruto constante (2 RGD/polímero, 60 kPa) y una densidad de porógenos constante (50 %), pero variando la composición de porógeno. Se manipuló la composición química de los porógenos variando el grado teórico de oxidación de los polímeros de alginato. Se controló el grado de oxidación variando la relación de peryodato de sodio a alginato durante la reacción de oxidación (Bouhadir 2001). Se usaron mezclas binarias de alginato oxidado 20 mg/ml con alginato de alto Mw no modificado 5 mg/ml para formar porógenos. Se formaron porógenos reticulando en un baño de CaCl_2 25-100 mM. Se muestran en la Figura 2H los efectos del grado de oxidación de alginato sobre la liberación celular. A un nivel constante de calcio para reticular porógenos (100 mM), aumentar el grado de oxidación de 3-7,5 % aumentaba sustancialmente el número global de

células liberadas, mientras que reducir el grado de oxidación retardaba ligeramente la liberación celular. A un grado constante de grado de oxidación de porógenos (7,5 %), aumentar la concentración de calcio usada para reticular porógenos de 25-100 mM reducía el número global de células liberadas y retardaba ligeramente el inicio de la liberación celular.

5 Ejemplo 3: Control de la movilización, injerto y proliferación *in vivo* de citoblastos mesenquimatosos

Finalmente, se efectuaron estudios *in vivo* para determinar si los hidrogeles formadores de poros podían usarse para manipular la cinética de liberación de MSC *in vivo*. Para esto, se trasplantaron subcutáneamente en ratones atímicos MSC de ratón que expresan mCherry. Se observaron el injerto, proliferación y movilización celulares con imagenología de fluorescencia no invasiva. Esto mostró que no solo los geles formadores de poros retardan el injerto en comparación con células suministradas en solución salina, sino que estos materiales conducían en última instancia a más proliferación. Los hidrogeles proporcionan un microentorno susceptible de proliferación después de formarse los poros. Finalmente, como estos materiales eran útiles para promover la liberación y expansión *in vivo* de MSC, se administraron MSC humanos para regenerar defectos craneales en ratas atímicas. Esto condujo a una regeneración mejorada del hueso mineralizado, incluso en un punto temporal temprano.

15 Específicamente, para estudios *in vivo*, se modificaron células D1 para expresar constitutivamente un marcador detectable, p. ej. mCherry o proteína fluorescente verde (GFP), y se encapsularon en geles brutos estándares sin porógenos, hidrogeles formadores de poros o se mezclaron con solución salina. A continuación, se inyectaron las células en los lomos de ratones atímicos a través de agujas de calibre 18. Se monitorizaron la liberación y proliferación celulares con el tiempo mediante la fluorescencia de mCherry observada en un sistema IVIS (Caliper Life Sciences).
20 Estos datos revelaban significativamente más liberación y proliferación celular a partir de hidrogeles formadores de poros que de geles estándares (Figura 3). Además, aunque las células proliferaban si se suministraban por inyección salina sencilla, la movilización a partir de hidrogeles formadores de poros 1) alteraba la cinética de suministro y proliferación de células locales, y 2) eventualmente conducía a un número sustancialmente mayor de células suministradas (Figura 3).

25 Específicamente, se efectuaron experimentos para determinar la capacidad de manipular la cinética de liberación celular *in vivo* variando la composición de porógeno. Como se muestra en la Figura 3, se liberaron citoblastos de hidrogeles formadores de poros *in vivo* en el espacio subcutáneo de ratones atímicos. Se movilizaron 2×10^6 MSC que expresan mCherry en ratones atímicos, 7 o 30 días después de la inyección en hidrogeles estándares (izquierda), hidrogeles formadores de poros en que los porógenos se reticulaban con CaCl_2 100 mM o 50 mM (centro) o solución salina (derecha). Se modificó el componente bruto de los hidrogeles con 2 RGD/cadena polimérica. Inicialmente, se injertaban más células en la condición de solo solución salina, pero en puntos temporales posteriores, había menos células en esta condición y eventualmente se injertaban sustancialmente más células cuando se liberaban de hidrogeles formadores de poros. Se muestra en la Figura 3B la cuantificación de la eficacia radiante relativa (proporcional a la densidad celular) de mCherry-MSD inyectados en hidrogeles formadores de poros, hidrogeles estándares o solución salina. Disminuir la densidad de calcio usada para reticular porógenos disminuía sustancialmente la densidad global de células liberadas, y retardaba ligeramente la cinética de movilización (Figura 3C; las barras de error son EEM, $n=4-6$). Se demostró la capacidad de los hidrogeles formadores de poros de potenciar la regeneración ósea mediada por citoblastos mesenquimatosos humanos en un modelo de defecto craneal de rata atímica (Figura 3D). Se formaron defectos de tamaño crítico en los cráneos de ratas atímicas (Charles River).
40 Inmediatamente después de la formación de defectos, se trasplantaron citoblastos mesenquimatosos humanos comercialmente disponibles al espacio de defecto, en solución salina ("células solo"), un hidrogel estándar (2 RGD/polímero de alginato, 60 kPa), o un hidrogel formador de poros. La fila superior de la Figura 3D muestra secciones transversales representativas de análisis tomográfico microcomputerizado de formación de hueso nuevo en defectos craneales 4 semanas después de la implantación. Se forma sustancialmente más hueso nuevo en los defectos en que se suministraron células mediante hidrogeles formadores de poros. La incorporación de doxiciclina (verde) en hueso de nueva formación a las 12 semanas después de la implantación demuestra que los hidrogeles formadores de poros conducen a una tinción con doxiciclina positiva en el tejido en lugar de tinción por falso positivo de los tejidos subcutáneos.

Ejemplo 4: Liberación *in vitro* de dos poblaciones celulares diferentes en distintos momentos

50 Se formaron hidrogeles formadores de poros como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Se encapsularon números iguales (aproximadamente 106 células/ml de hidrogel formador de poros compuesto) de mioblastos que expresan GFP y células endoteliales de crecimiento (OEC, células progenitoras vasculares) en diferentes compartimentos del material. Después de 5 días de cultivo *in vitro*, se tiñeron con homodímero de etidio (EtD-1; rojo) las células que se liberaban y eran adherentes al plástico de cultivo de tejido. Como se muestra en la Figura 4, el tipo celular encapsulado
55 en el gel bruto se movilizaba más rápidamente. Este patrón de movilización ocurría incluso para OEC, que migran más lentamente y proliferan menos extensamente que los GFP-mioblastos (basado en el análisis de sustratos sobre los que se añadieron números iguales de ambos tipos celulares; Figura 4d).

Específicamente, se muestra en la Figura 4 el uso de hidrogeles formadores de poros para liberar distintas poblaciones en diferentes momentos. Se muestran en las Figuras 4A-4C micrografías fluorescentes de mioblastos que expresan GFP y células endoteliales de crecimiento (OEC) adherentes del plástico de cultivo de tejido después de 4 días de
60

cultivo en hidrogeles formadores de poros en que se varió la química usada para formar los porógenos y se colocaron inicialmente los diferentes tipos celulares en distintos compartimentos. La Figura 4A representa mioblastos en el componente bruto y OEC en el componente porogénico, mientras que la Figura 4B representa mioblastos en el componente de perla y OEC en el componente porogénico. La Figura 4C representa tanto mioblastos como OEC en el componente bruto. Se sembraron iguales números de GFP-mioblastos y OEC sobre un sustrato plástico (Figura 4D). Los mioblastos sobrepasaban los OEC. Se tiñeron las células con homodímero de etidio (rojo) de forma que los GFP-mioblastos aparezcan amarillos y los OEC aparezcan rojos.

Ejemplo 5: Agrupamiento de linfocitos hospedadores a partir de tejidos subcutáneos por hidrogeles formadores de poros con diferentes formulaciones de porógeno

Se formaron hidrogeles formadores de poros como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Para formar la fase porogénica, se combinó polímero de alginato de alto Mw rico en GA 7,5 mg/ml con dialdehído de alginato 20 mg/ml (7,5 % de grado de oxidación teórico) o dialdehído de alginato en que los grupos aldehído se redujeron a grupos alcohol. Se inyectaron a continuación hidrogeles formadores de poro sin células encapsuladas en los lomos de ratones C57/BL6 o Balb/c. Después de 14 días, se observó agrupamiento de células dendríticas hospedadoras por histología.

Como se describe con detalle a continuación, se utilizaron hidrogeles formadores de poros para agrupamiento celular mediado por quimiocinas. Se oxidó en primer lugar el alginato y se redujo entonces con borohidruro de sodio para dar grupos alcohol que reemplazan los que eran originalmente azúcares. La Figura 5A y la Figura 5B muestran una comparación de agrupamiento de células dendríticas (DC) por un hidrogel de alginato degradable estándar frente a un hidrogel de alginato formador de poros. Se cargaron ambos conjuntos de hidrogeles con 2 ug de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos. Esto indica sustancialmente más infiltración de células a partir del tejido adyacente al hidrogel (área altamente celularizada cerca del borde de la imagen) en el hidrogel formador de poros. Las Figuras 5C y 5D muestran una invasión de DC basal en hidrogeles formadores de poros en que los porógenos se formaron a partir de dialdehído de alginato (Figura 5C) o a partir de dialdehído de alginato reducido (Figura 5D) sin GM-CSF. Ocurrió sustancialmente menos infiltración celular basal en ausencia de GM-CSF. Para histología, se tiñeron en células dendríticas CD11c (verde) y NIHC-II (rojo), con contratinción nuclear de Hoescht (azul). Esta figura muestra la diferencia en el agrupamiento de células hospedadoras por materiales con porógenos formados a partir de alginato oxidado frente a alginato reducido.

Ejemplo 6: Control de la proliferación de citoblastos en hidrogeles formadores de poros variando la composición de la fase bruta

El propósito de este enfoque es manipular la expansión y liberación celulares usando señales insolubles. Por tanto, se determinó si la densidad de ligandos de adhesión y las propiedades mecánicas del hidrogel sin degradación que rodea los porógenos tendrían efectos sobre las células. Como se muestra en la Figura 6, la densidad de los ligandos alteraba significativamente la síntesis de ADN, mientras que la alteración del módulo elástico alteraba tanto la síntesis de ADN como la liberación celular durante 1 semana. Las señales insolubles como densidad de ligandos de adhesión tenían efectos sobre las células en marcos temporales largos, como se muestra por histología en la Figura 6D.

Específicamente, se efectuaron estudios para determinar si la composición del componente bruto de hidrogeles formadores de poros podía modular la proliferación e injerto celulares *in vivo*. Se muestra en la Figura 6A y 6B el análisis de la incorporación de ³H-timidina de 24 h (proporcional a la síntesis de ADN) por citoblastos mesenquimatosos (D1; curva roja) o la movilización acumulada de MSC (curvas azules) a partir de hidrogeles formadores de poros después de 7 días de cultivo en función de la densidad de péptidos RGD en geles brutos con módulo de 60 kPa, o el módulo elástico de hidrogeles brutos que presentan 10 péptidos RGD/polímero de alginato (los datos son media ± EEM, n= 3-5). La densidad de RGD tenía efectos significativos sobre la proliferación celular, mientras que el módulo elástico tenía efectos tanto sobre la proliferación como la liberación (p < 0,05, ANOVA). Se muestra en la Figura 6C el análisis de la síntesis de ADN en función de la formación de poros. Se muestra en la Figura 6D la tinción para Ki-67 (marcador de proliferación, verde) en células D1 en hidrogeles formadores de poros crioseccionados después de 50 días de cultivo.

Control del destino de citoblastos movilizados mediante la composición del hidrogel bruto

Se formaron hidrogeles formadores de poros como se describe en el Ejemplo 1. Manipulando la composición (densidad de péptidos RGD de unión a integrina y módulo elástico) del hidrogel bruto, era posible controlar la proliferación y liberación *in vitro* de citoblastos mesenquimatosos (MSC). *In vivo*, podía aumentarse la densidad global de MSC de ratón marcados con mCherry movilizados en el espacio subcutáneo aumentando la densidad de péptidos RGD de 2 a 10 péptidos por cadena de polímero de alginato (Figura 6E). Para estudios terapéuticos, se movilizaron MSC humanos en defectos craneales de rata atómica. Después de 4 semanas, se sacrificaron las ratas y se valoró el grado de curación (debido a la formación de hueso nuevo) por tinción con hematoxilina/eosina. Brevemente, se dividió el área de hueso nuevo formado en el defecto entre el área total del defecto para generar la métrica "porcentaje de curación". Usando esta métrica cuantitativa, se encontró que suministrar MSC en hidrogeles formadores de poros era sustancialmente mejor que el suministro mediante hidrogeles estándares o solución salina en términos de capacidad de inducir la formación de hueso nuevo (Figura 6F). Además, el módulo elástico del componente hidrogel bruto tenía un efecto sustancial sobre la formación de hueso nuevo a las 4 semanas, ya que la movilización desde un hidrogel

formador de poros con una fase bruta de 10 RGD/polímero de alginato de 60 kPa conducía a una formación de hueso significativamente mayor ($p < 0,05$, prueba de t de 2 colas) que la movilización a partir de un hidrogel formador de poros con una fase bruta de 10 RGD/polímero de alginato de 8 kPa.

5 Por tanto, cuando se movilizaron D1 marcadas con mCherry en los tejidos subcutáneos de ratones atímicos mediante hidrogeles formadores de poros, aumentar la densidad de RGD del componente bruto de 2 a 10 péptidos RGD/polímero de alginato aumentaba sustancialmente el número global de células injertadas sin afectar significativamente a la cinética de movilización celular.

10 Aunque el ejemplo aquí demostraba un efecto de la elasticidad del hidrogel bruto sobre la regeneración de tejido mediada por células, como se describe en la presente memoria, se alteran por ingeniería muchos otros aspectos de la fase de hidrogel bruto, por ejemplo, la presentación de factores de crecimiento unidos a matriz o miméticos peptídicos de los mismos, para influir en la regeneración de tejido mediada por células.

Ejemplo 7: Propiedades mecánicas y degradación *in vitro* de hidrogeles formados a partir de alginatos binarios

15 Se muestran en la Figura 7A y la Figura 7B los módulos elásticos y la degradación de hidrogeles brutos formados por reticulación de combinaciones binarias de alginato oxidado (5 % de grado de oxidación teórico) a una densidad constante de 20 mg/ml con alginato de alto Mw no modificado. Se valoró la degradación comparando la masa seca después de 4 días *in vitro* con la masa seca inicial. Se muestran en la Figura 7C los diámetros de porógenos formados a partir de mezclas binarias de alginato oxidado 20 mg/ml con alginato no modificado 7,5 mg/ml. Se midió el diámetro de porógeno procesando micrografías fluorescentes de porógenos preparados a partir de alginatos marcados con aminofluoresceína.

20 Las bibliografías de patentes y científica a las que se hace referencia en la presente memoria establecen el conocimiento que está disponible para los especialistas en la materia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un hidrogel porogénico y un hidrogel bruto, cuya composición no es inicialmente macroporos y se vuelve macroporosa con el tiempo cuando reside en el cuerpo de un receptor, en la que dicho hidrogel porogénico se degrada al menos un 10 % más rápido que dicho hidrogel bruto después de la residencia en dicho sujeto, dejando macroporos que tienen un diámetro mayor de 20 μm en su lugar, y en la que
 - (a) dicho hidrogel porogénico comprende alginato oxidado; o
 - (b) dicho hidrogel porogénico comprende un polímero más corto que dicho hidrogel bruto.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto o ambos hidrogel comparten un factor bioactivo.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto o ambos hidrogel agrupan una célula en la composición.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto comprende una célula aislada.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que dicho hidrogel bruto está reticulado alrededor de dicho hidrogel porogénico o en la que dicho hidrogel porogénico está físicamente atrapado en dicho hidrogel bruto.
6. La composición de la reivindicación 1, que comprende un factor bioactivo seleccionado del grupo consistente en factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de placenta (PIGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), leptina, factor de crecimiento hematopoyético (HGF), receptor 1 de VEGF (VEGFR-1), VEGFR-2, un miembro de la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), ligando de tirosina cinasa 3 similar a FMS (ligando de Flt3), factor de crecimiento de hepatocitos, factor derivado estromal 1 (SDF-1), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-aFGF, anticuerpo anti-bFGF, anticuerpo anti-PIGF, anticuerpo anti-leptina, anticuerpo anti-HGF, anticuerpo anti-VEGFR-1, anticuerpo anti-VEGFR-2, anticuerpo anti-PDGF, anticuerpo anti-BMP, anti-ligando de Flt3 y anticuerpo anti-IGF.
7. La composición de la reivindicación 4, en la que dicha célula es un citoblasto mesenquimatoso, un mioblasto, una célula progenitora vascular, una célula diferenciada derivada de un citoblasto embrionario o un citoblasto pluripotente inducido, una célula pluripotente inducida o una célula que se reprogramó directamente a partir de un fibroblasto a un estado diferenciado.
8. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho hidrogel porogénico comprende un módulo elástico de entre 20 kPa y 60 kPa.
9. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho hidrogel bruto
 - (a) comprende un péptido que comprende una secuencia aminoacídica PHSRN, DGEA o RGD; o
 - (b) comprende una densidad de péptidos RGD de 2 a 10 péptidos por cadena de polímero de alginato, o
 - (c) comprende un módulo elástico inicial de al menos 40 kPa.
10. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto comprende un factor bioactivo para uso en la promoción de la reparación, regeneración o formación ósea o de cartílago, en la que dicho factor bioactivo comprende opcionalmente BMP-2, BMP-4 o RunX.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto
 - (a) comprende una célula ósea aislada seleccionada del grupo consistente en un osteoblasto, un osteocito, un osteoclasto y un osteoprogenitor; o
 - (b) comprende una célula de cartílago aislada, en la que dicha célula de cartílago aislada comprende un condroblasto; y en la que dicha célula ósea aislada es opcionalmente una célula autóloga o alogénica.
12. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto comprende un factor bioactivo para uso en la reparación, regeneración o formación muscular.
13. La composición de la reivindicación 12, en la que
 - (a) dicho factor bioactivo comprende MyoD; o

- (b) dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto comprende una célula muscular aislada seleccionada del grupo consistente en una célula de músculo esquelético, una célula de músculo cardiaco, una célula de músculo liso y una célula mioprogenitora, en la que dicha célula muscular aislada es opcionalmente una célula autóloga o alogénica.
- 5 14. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto comprende un factor bioactivo para uso en la reparación, regeneración o formación dérmica, en la que dicho factor bioactivo comprende opcionalmente FGF.
- 10 15. La composición de la reivindicación 14, en la que dicho hidrogel porogénico o dicho hidrogel bruto comprende una célula dérmica aislada seleccionada del grupo consistente en un fibroblasto, una célula dérmica, una célula epidérmica o una célula progenitora dérmica, en la que dicha célula dérmica aislada es opcionalmente una célula autóloga o una célula alogénica.
- 15 16. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una célula aislada, para movilizar células a partir de un almacén en tejidos de un sujeto mamífero, en la que dicha composición carece de macroporos en el momento de administración, y en la que dicha composición comprende macroporos después de la residencia en dicho sujeto.
17. La composición de la reivindicación 1 para agrupar células en un almacén *in vivo*, en la que dicha composición carece de macroporos en el momento de administración, y en la que dicha composición comprende macroporos después de la residencia en dicho sujeto.
- 20 18. La composición de la reivindicación 1, en la que el hidrogel porogénico y/o el hidrogel bruto comprende un polímero de alginato reticulado que comprende un catión divalente seleccionado del grupo consistente en Ca^{+2} , Mg^{+2} y Ba^{+2} .
19. La composición de la reivindicación 1, en la que el hidrogel porogénico comprende alginato oxidado, y en la que el hidrogel porogénico es más degradable hidrolíticamente que el hidrogel bruto.
- 25 20. La composición de la reivindicación 19, en la que se oxidan más del 5 % de los residuos de azúcar en el alginato.
21. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho hidrogel porogénico comprende un polímero más corto que dicho hidrogel bruto.
22. La composición de la reivindicación 1, en la que el hidrogel porogénico comprende un polímero de alginato oxidado que tiene un peso molecular de 5.000 a 500.000 dáltones (Da).
- 30 23. La composición de la reivindicación 22, en la que el hidrogel bruto comprende un polímero de alginato que tiene un peso molecular de 5.000 a 500.000 Da.

FIG. 1A

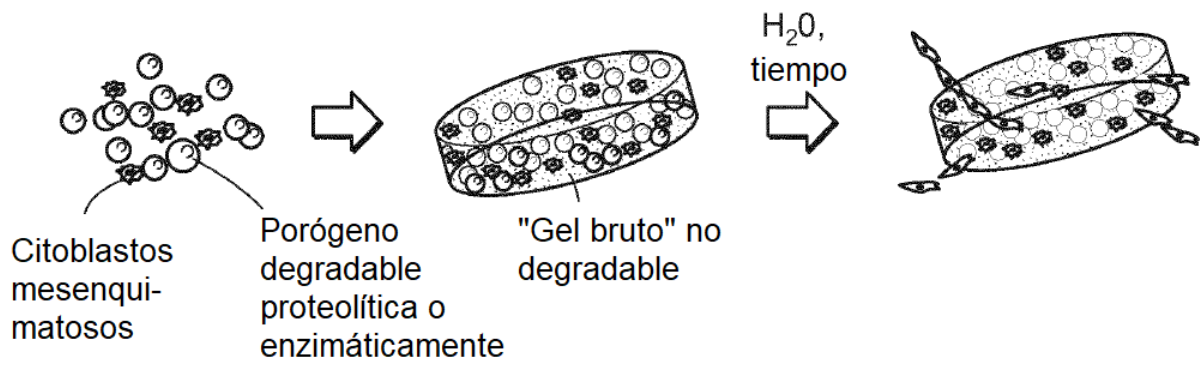


FIG. 1B

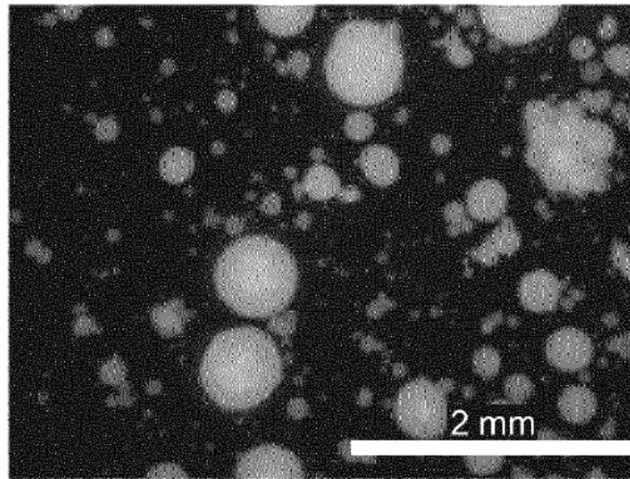


FIG. 1C

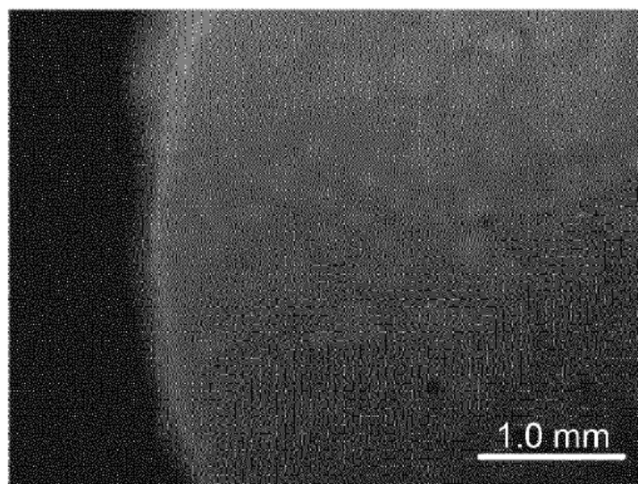


FIG. 1D

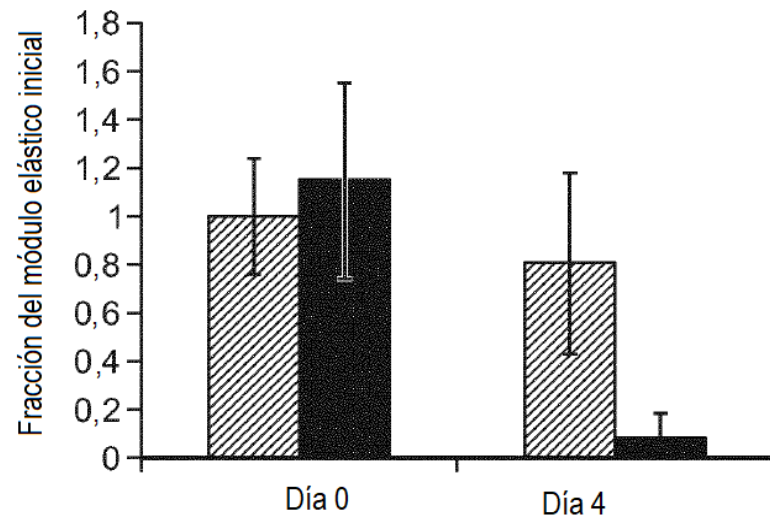


FIG. 1E

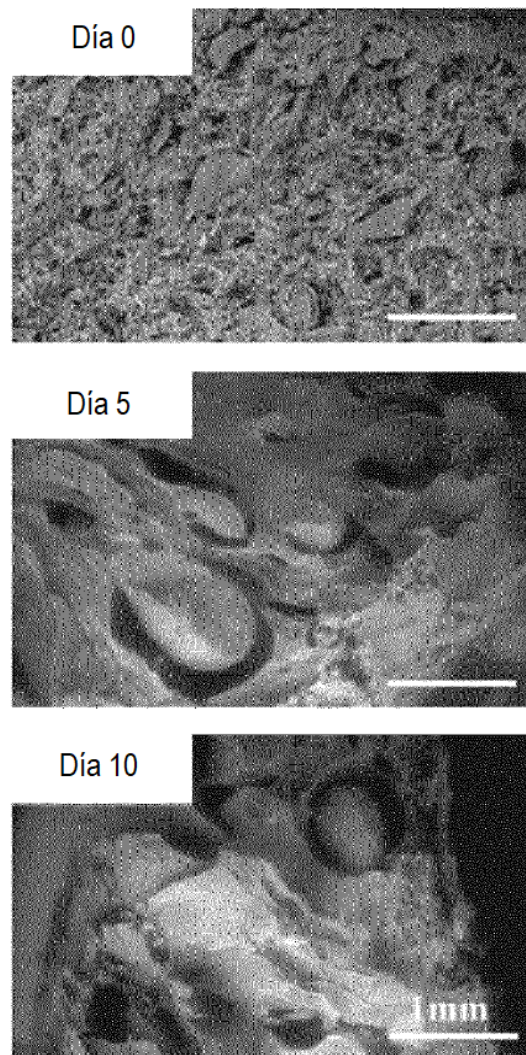


FIG. 1F

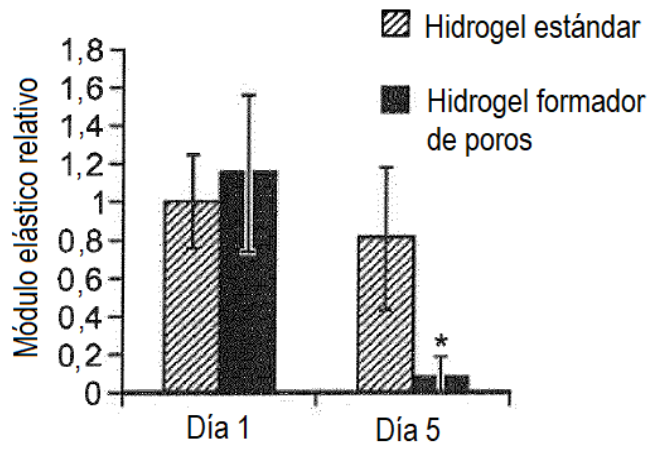


FIG. 1G

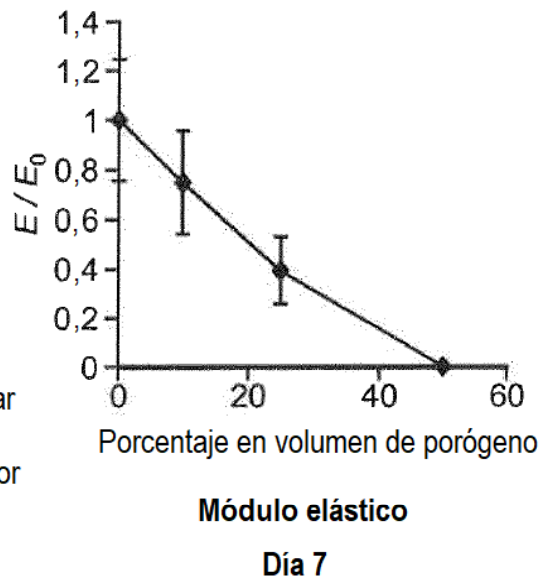


FIG. 1H

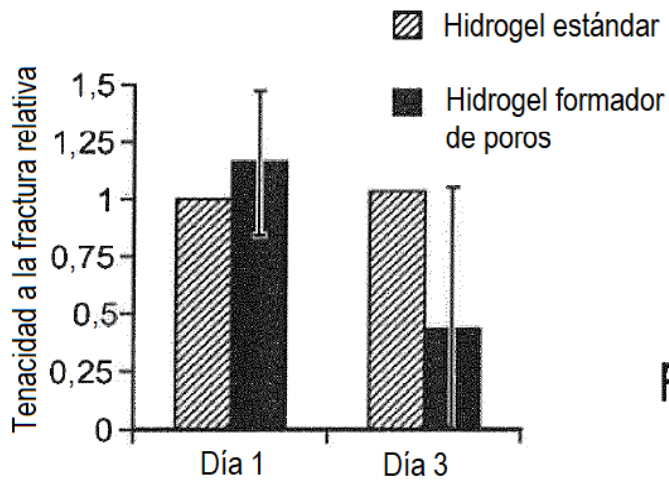


FIG. 1I

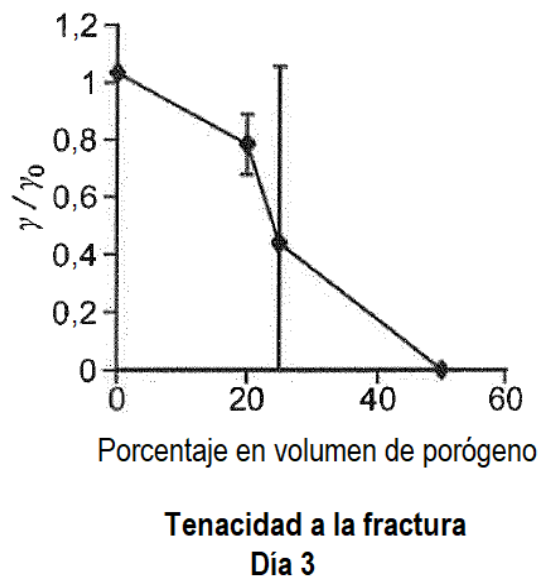
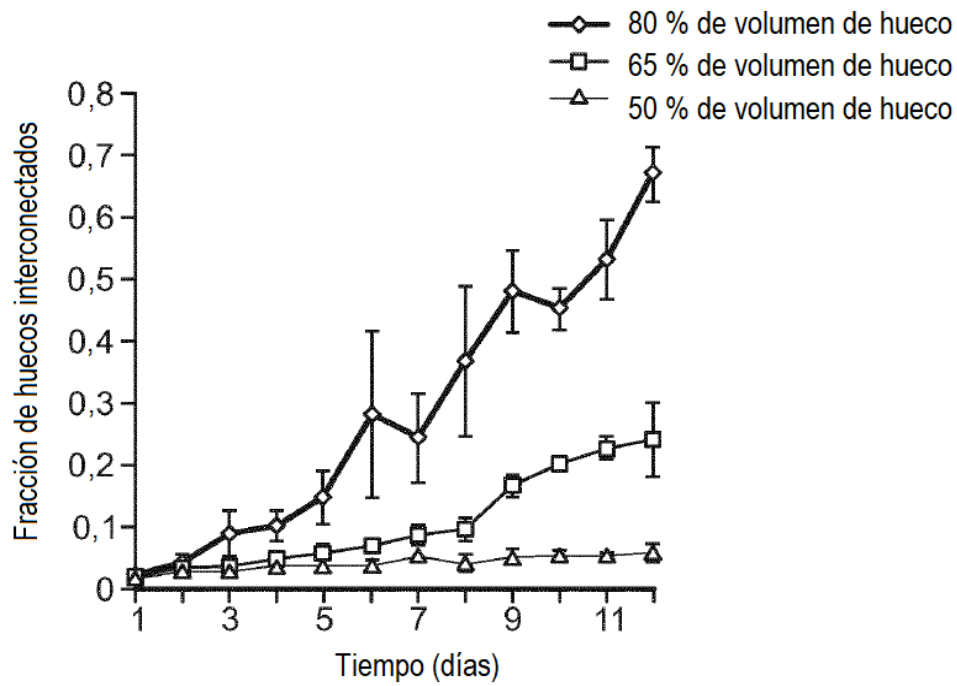


FIG. 2A



formación de huecos in vitro

FIG. 2B

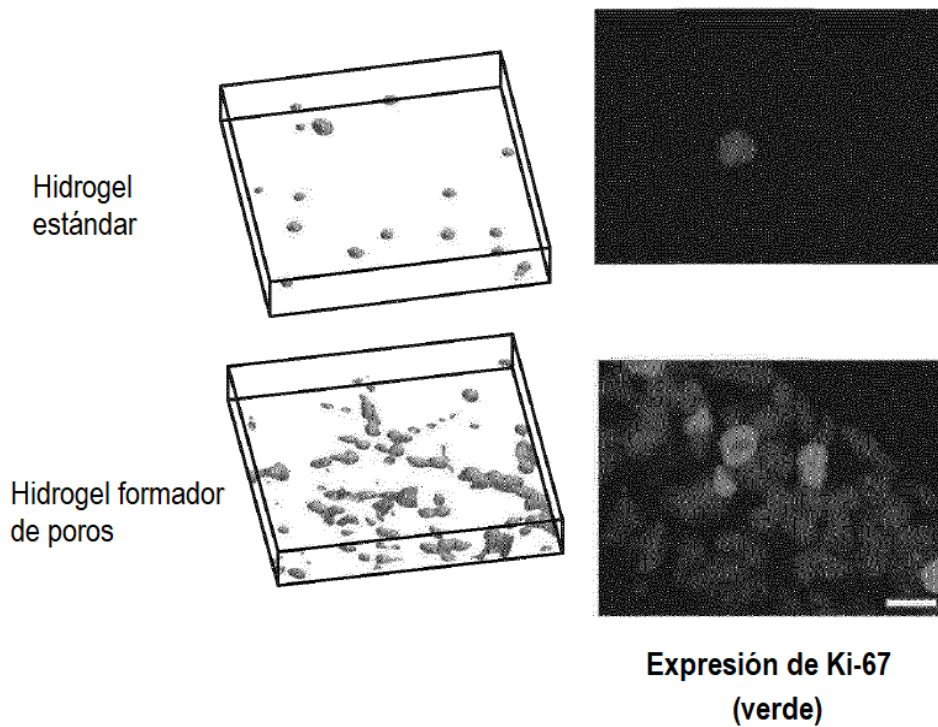


FIG. 2C

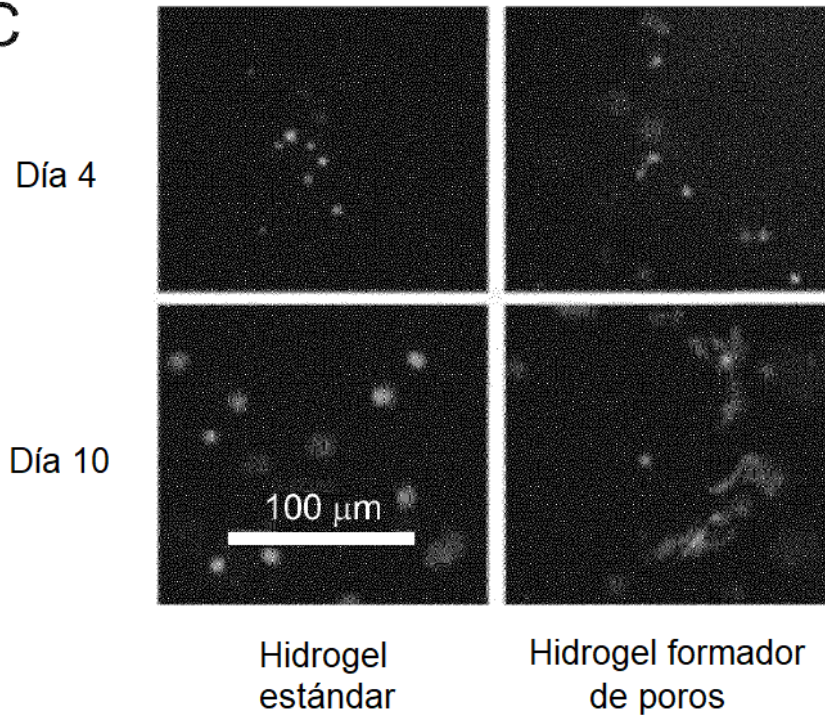


FIG. 2D

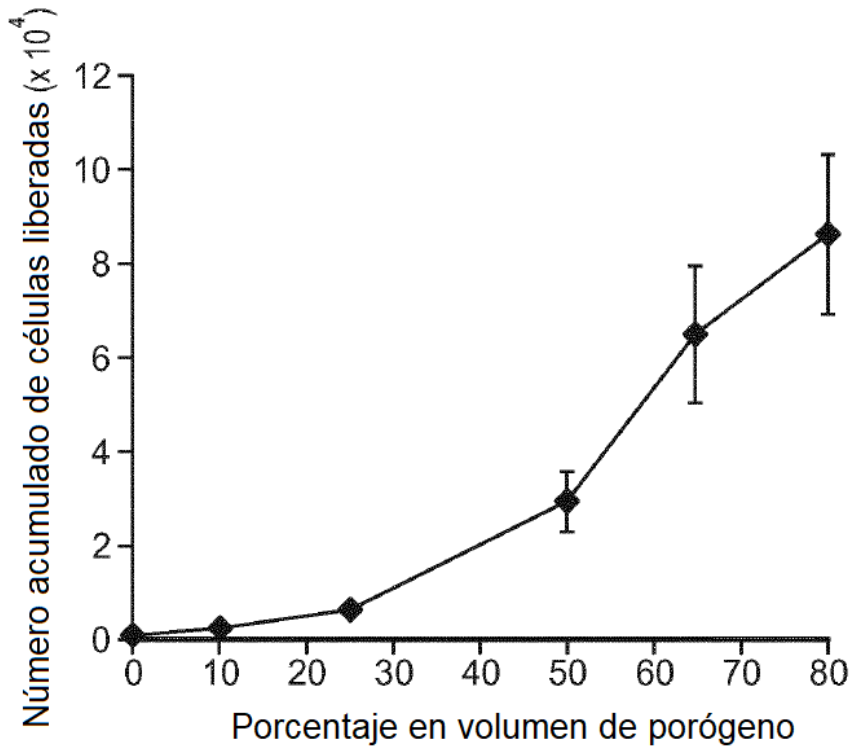


FIG. 2E

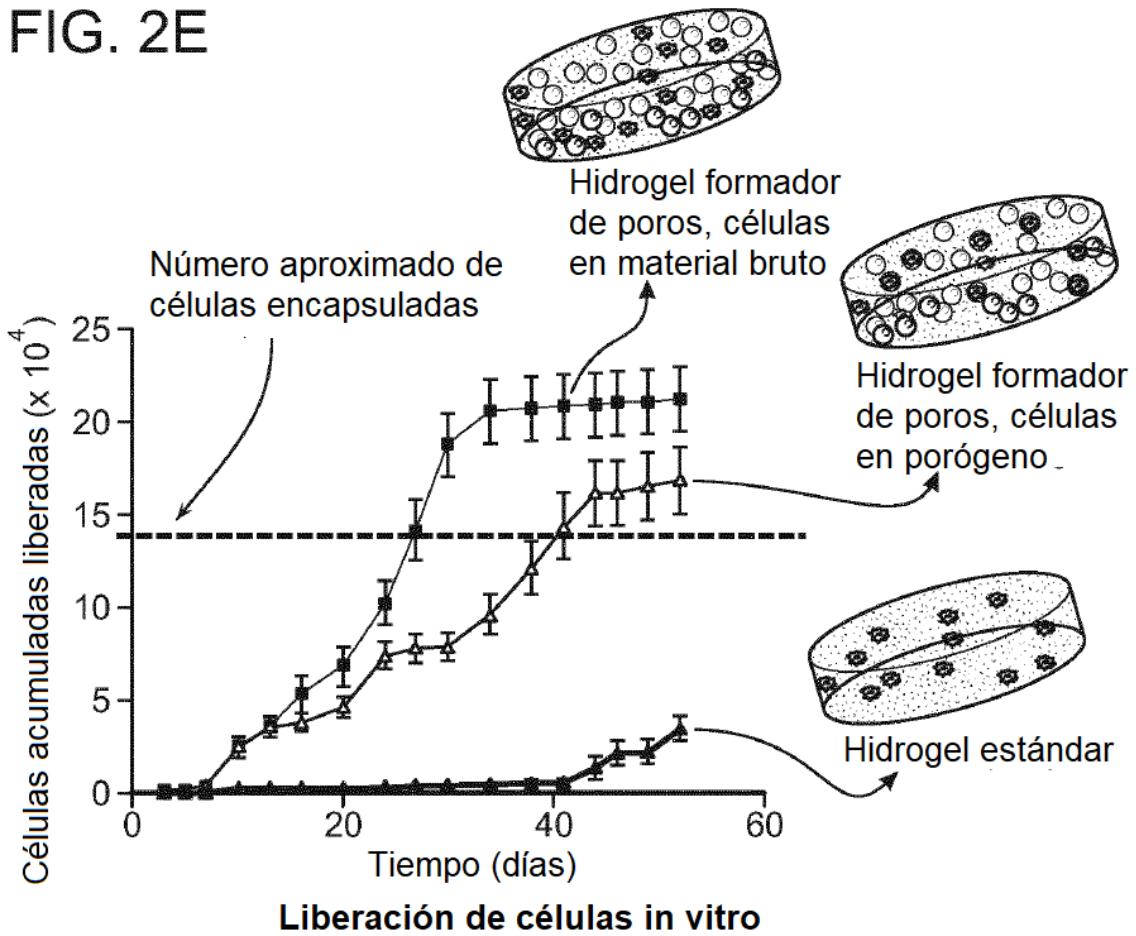


FIG. 2F

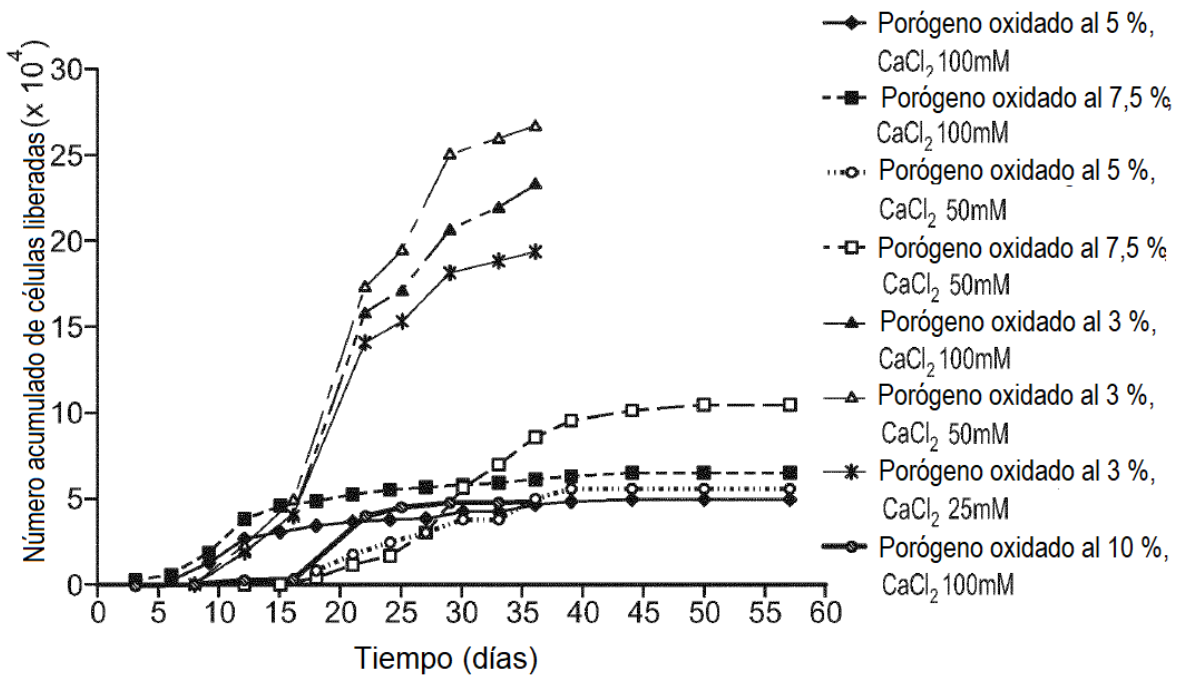


FIG. 2G

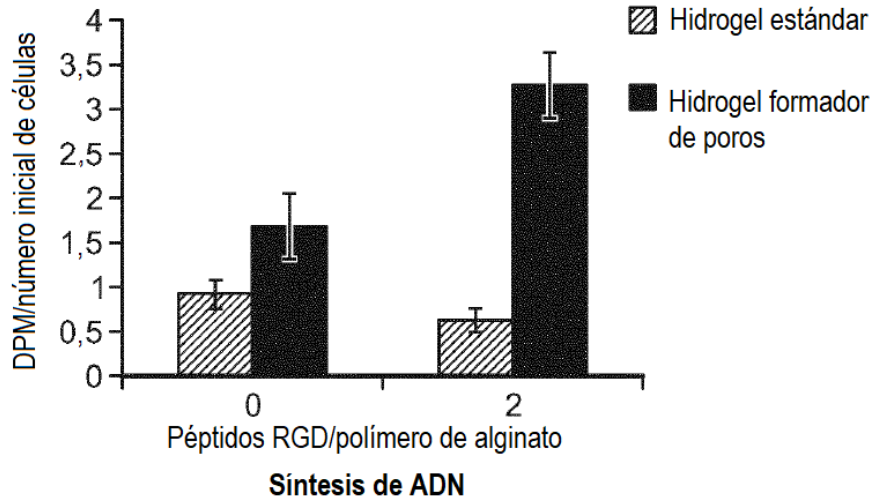


FIG. 2H

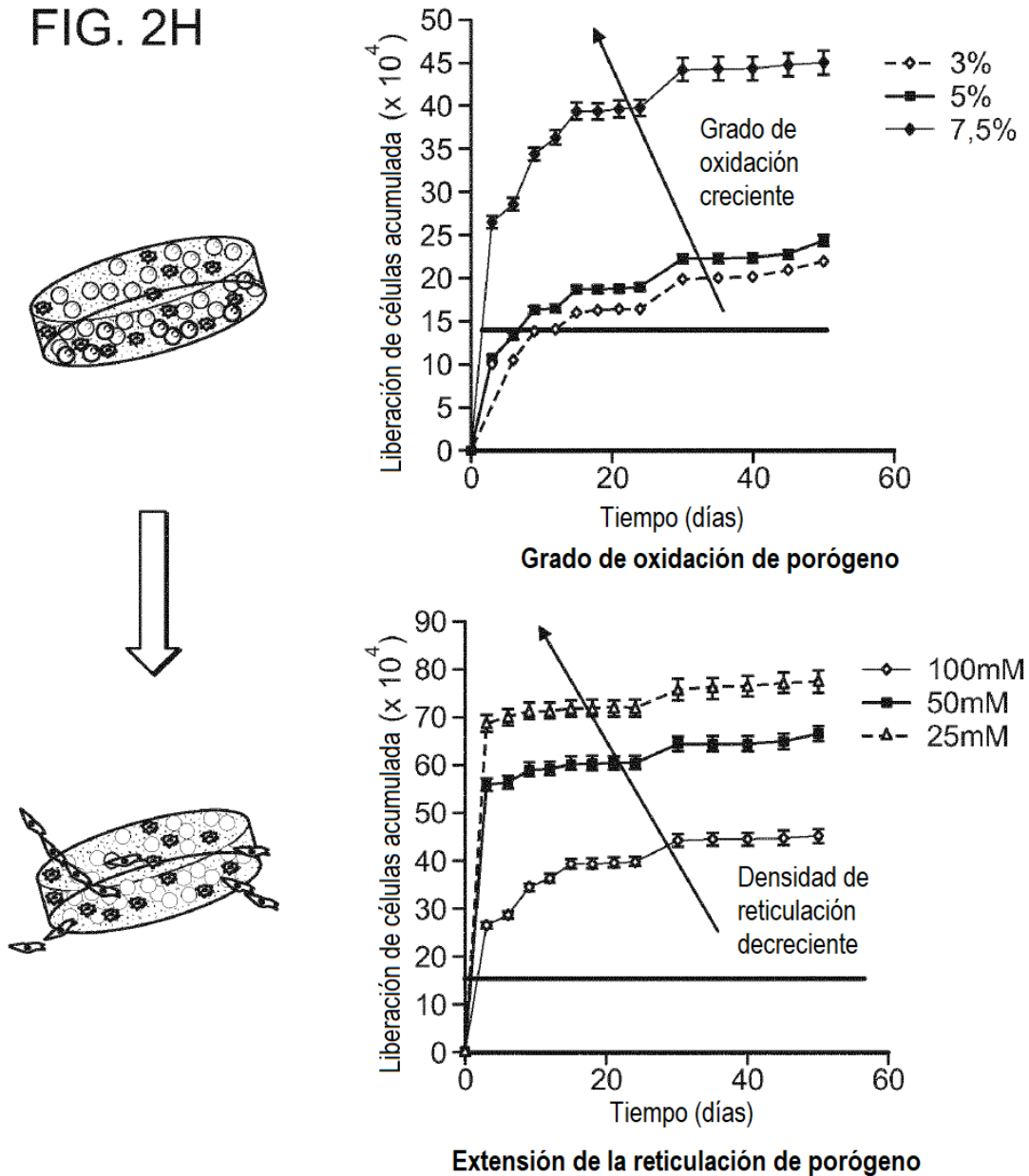


FIG. 3A

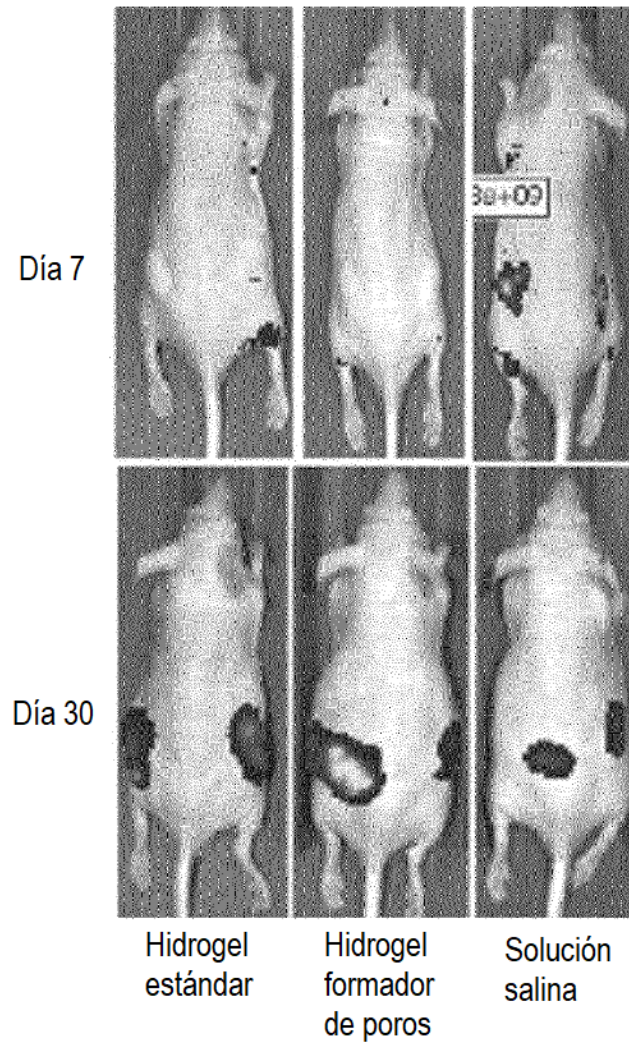


FIG. 3B

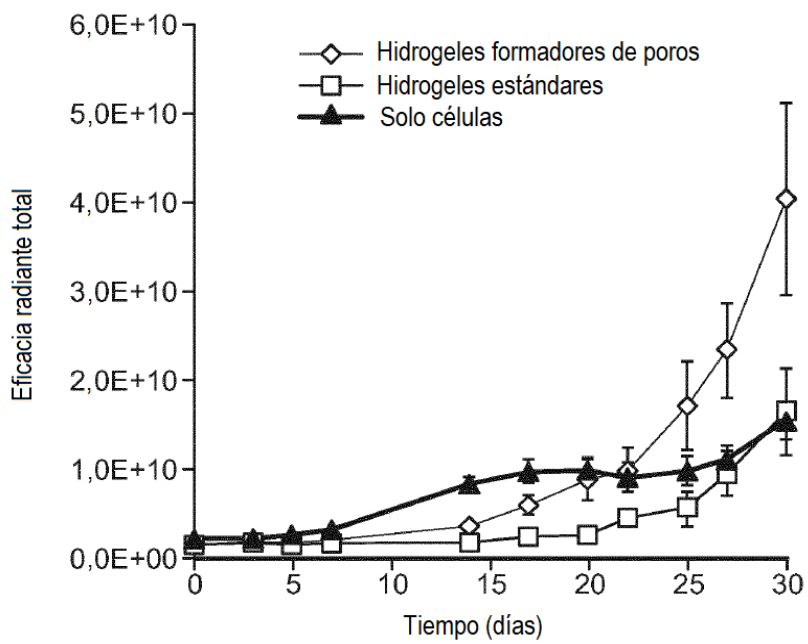


FIG. 3C

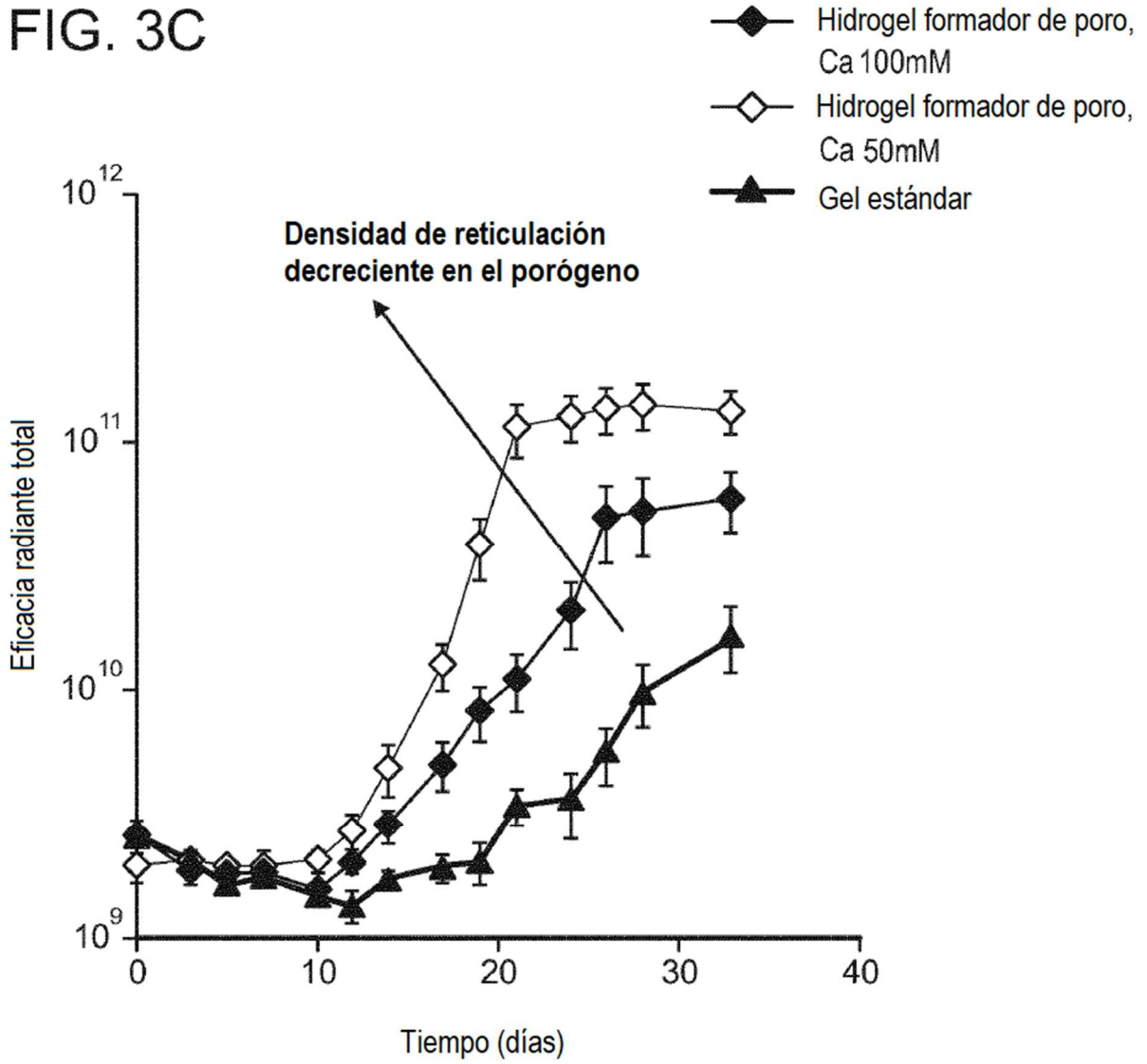
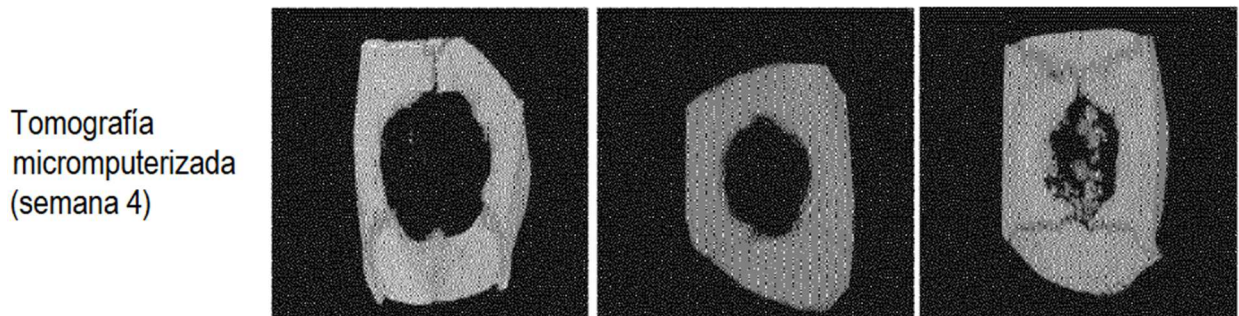


FIG. 3D



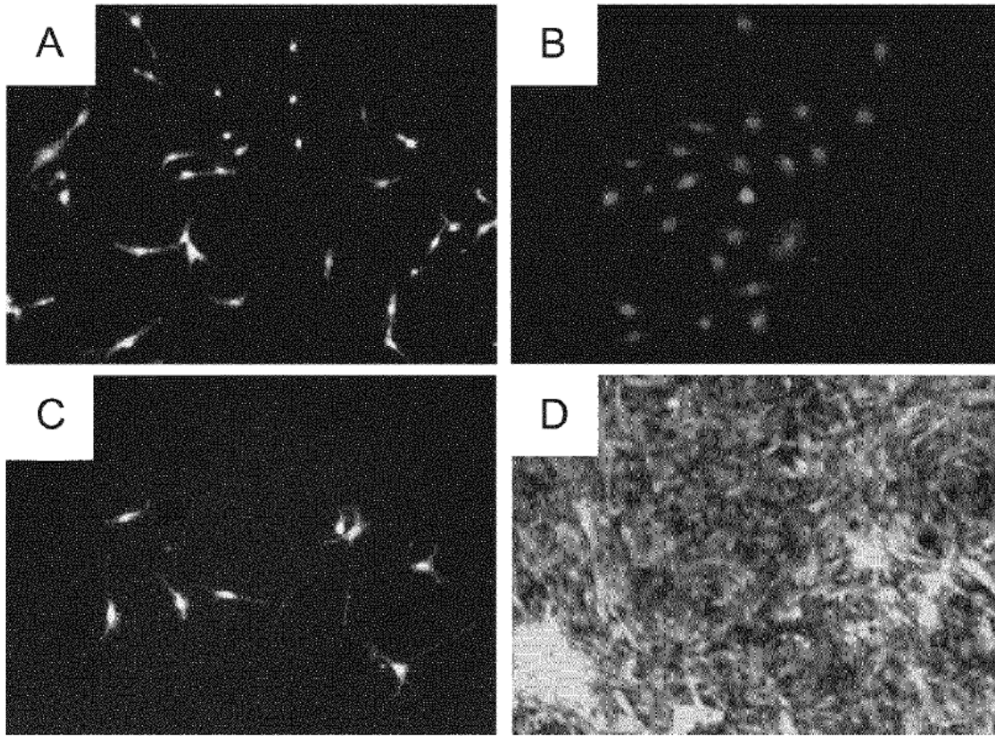


FIG. 4

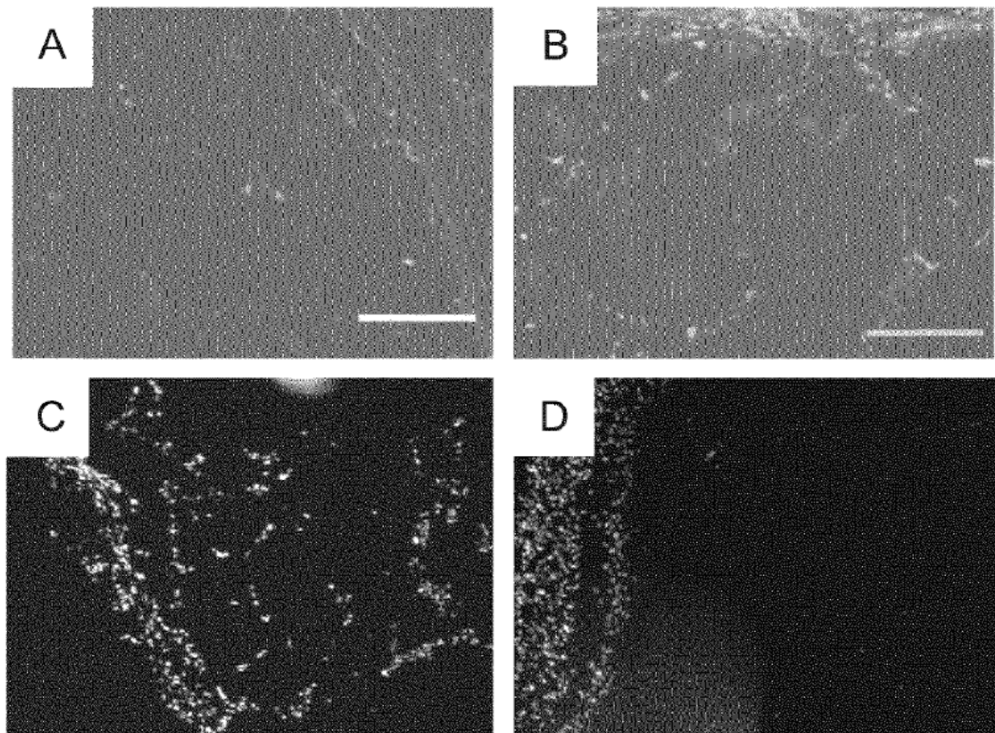


FIG. 5

FIG. 6A

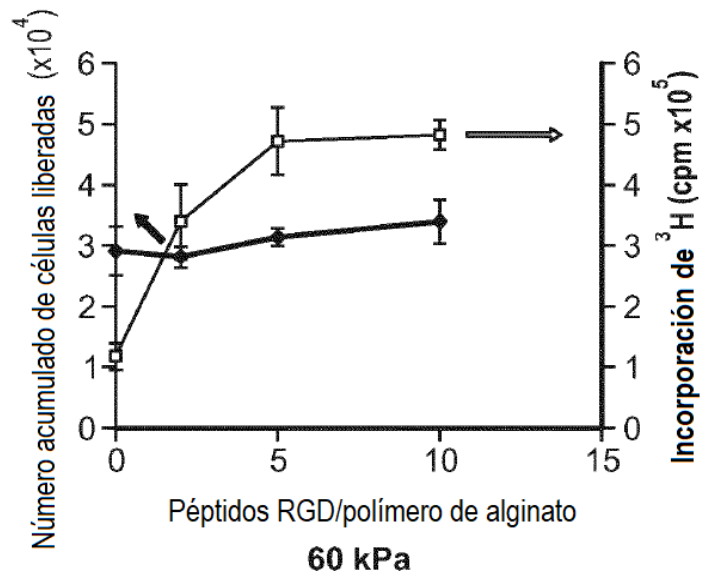


FIG. 6B

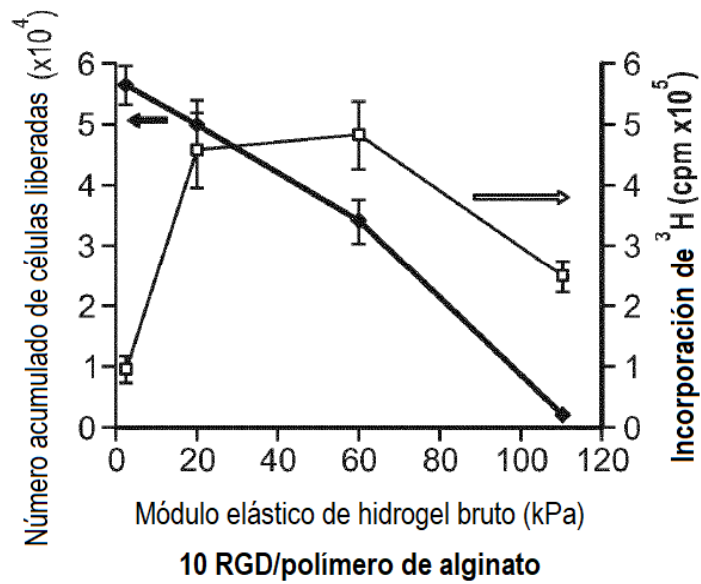


FIG. 6C

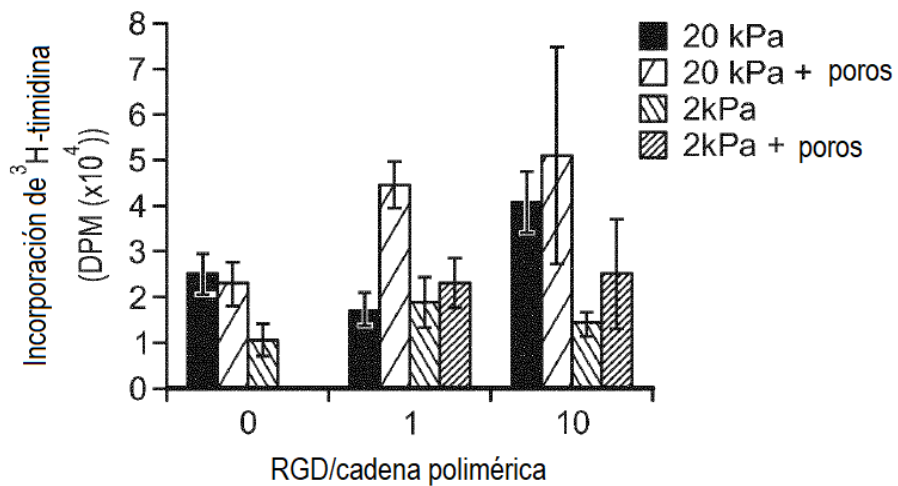
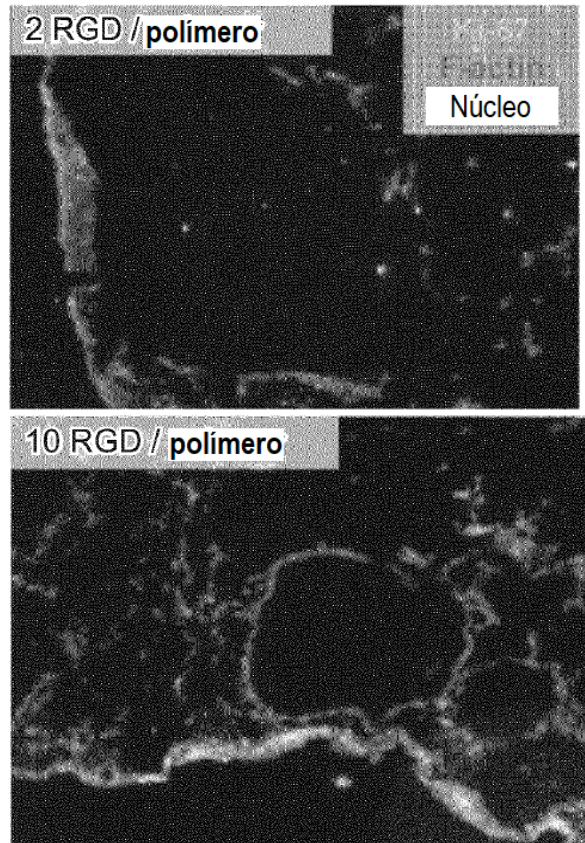
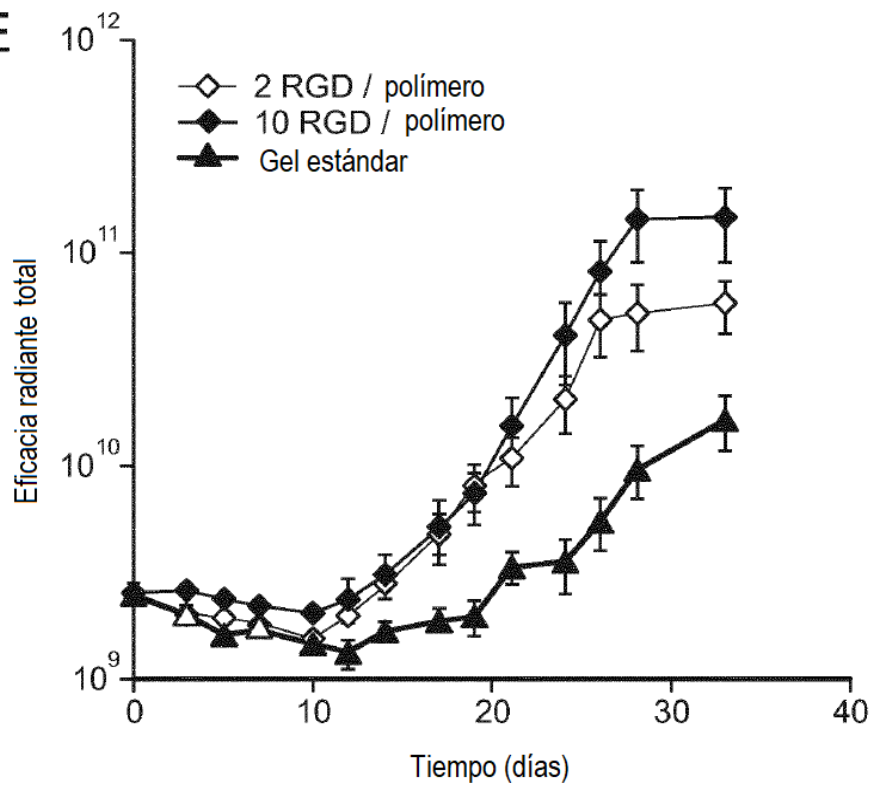


FIG. 6D



Proliferación (Ki-67; verde) Día 50

FIG. 6E



Movilización y proliferación celular *in vivo*

FIG. 6F

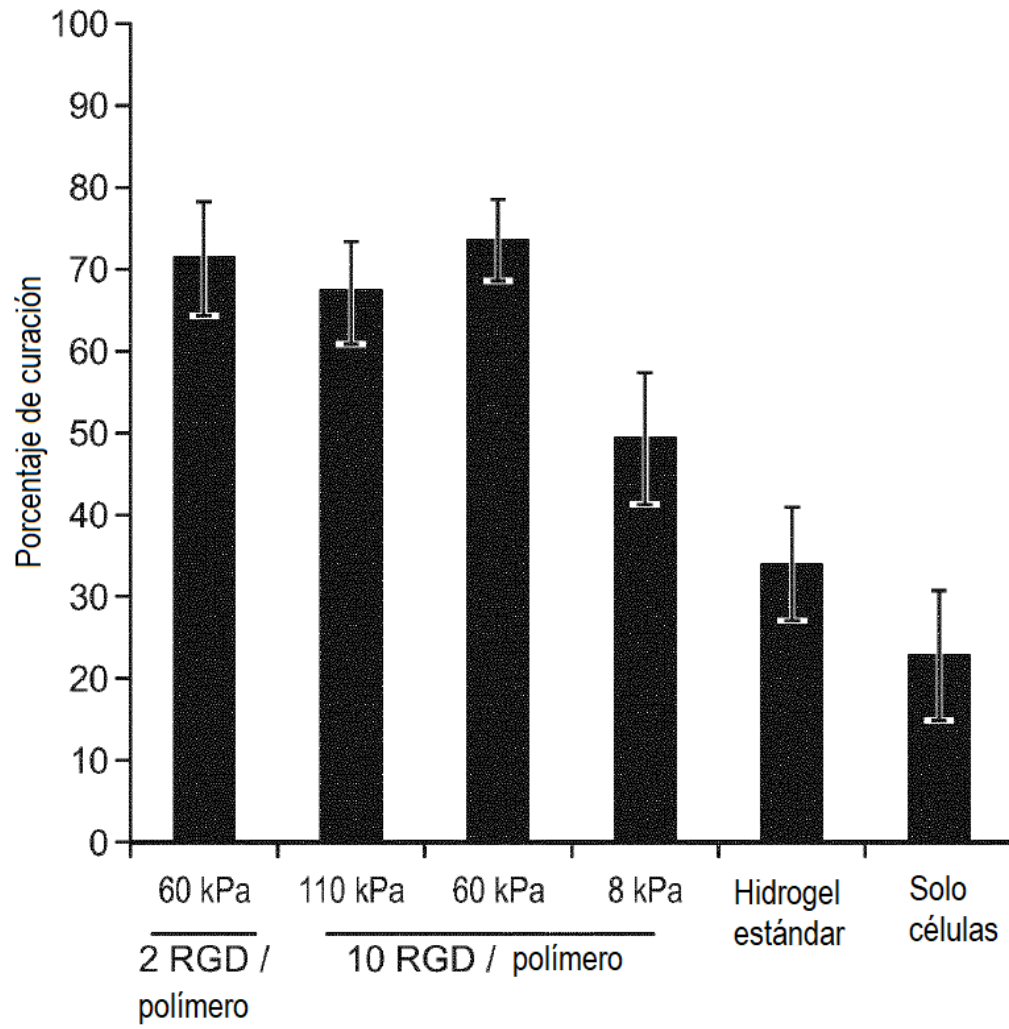


FIG. 7A

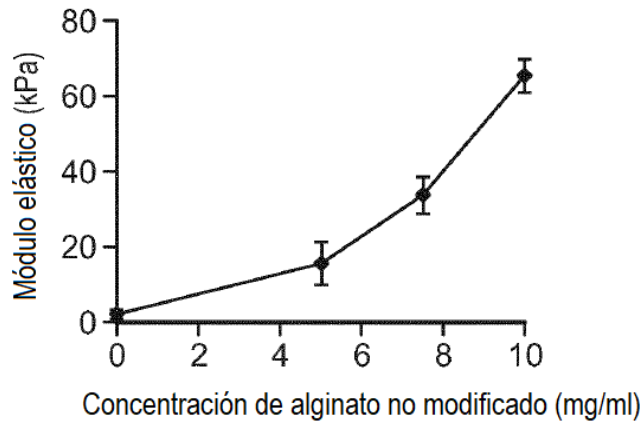


FIG. 7B

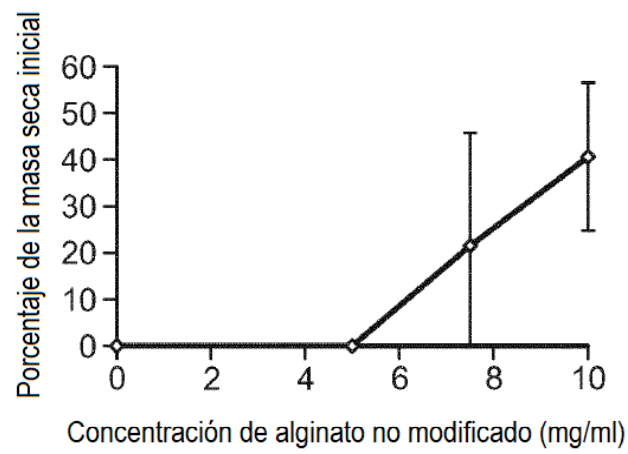


FIG. 7C

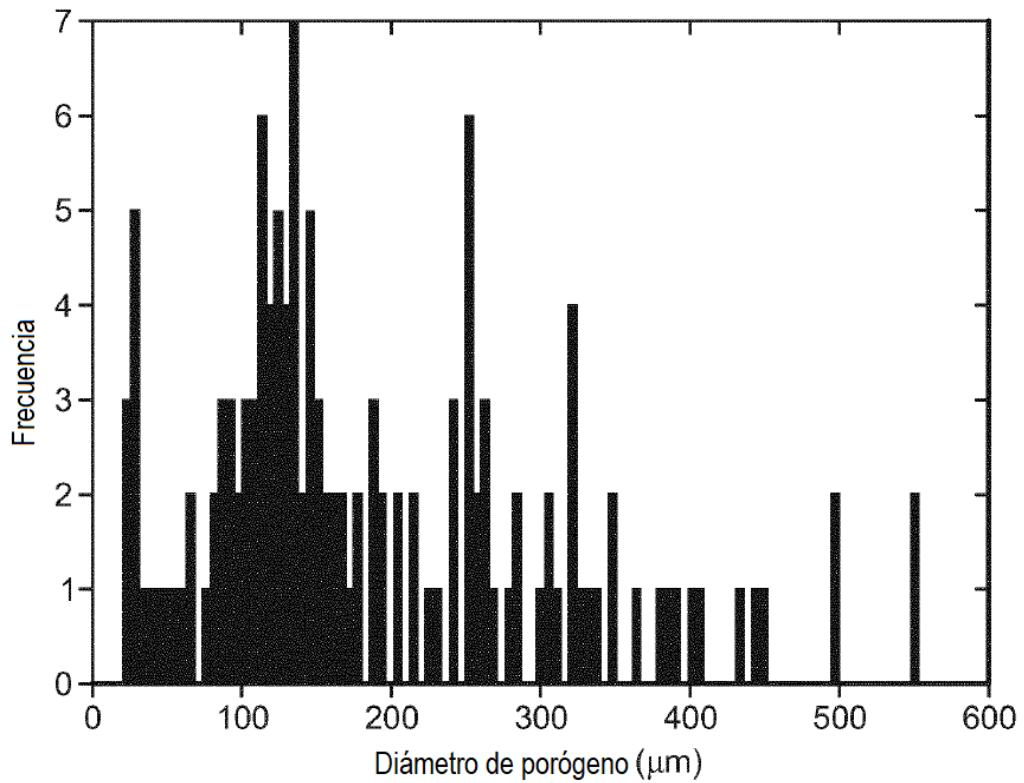


FIG. 8 Aumento del trasplante celular: materiales para propagar localmente, programar y movilizar citoblastos

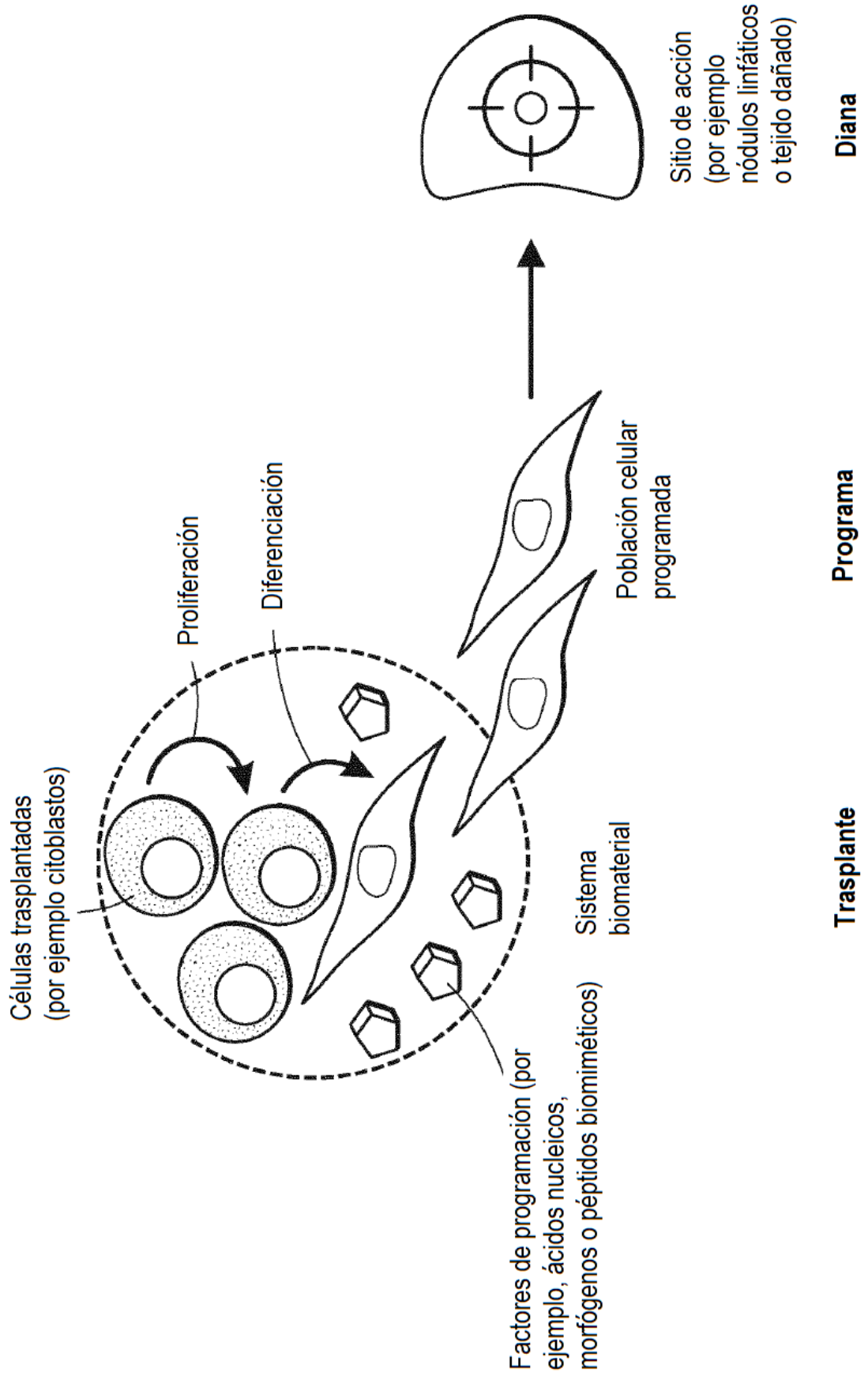


FIG. 9

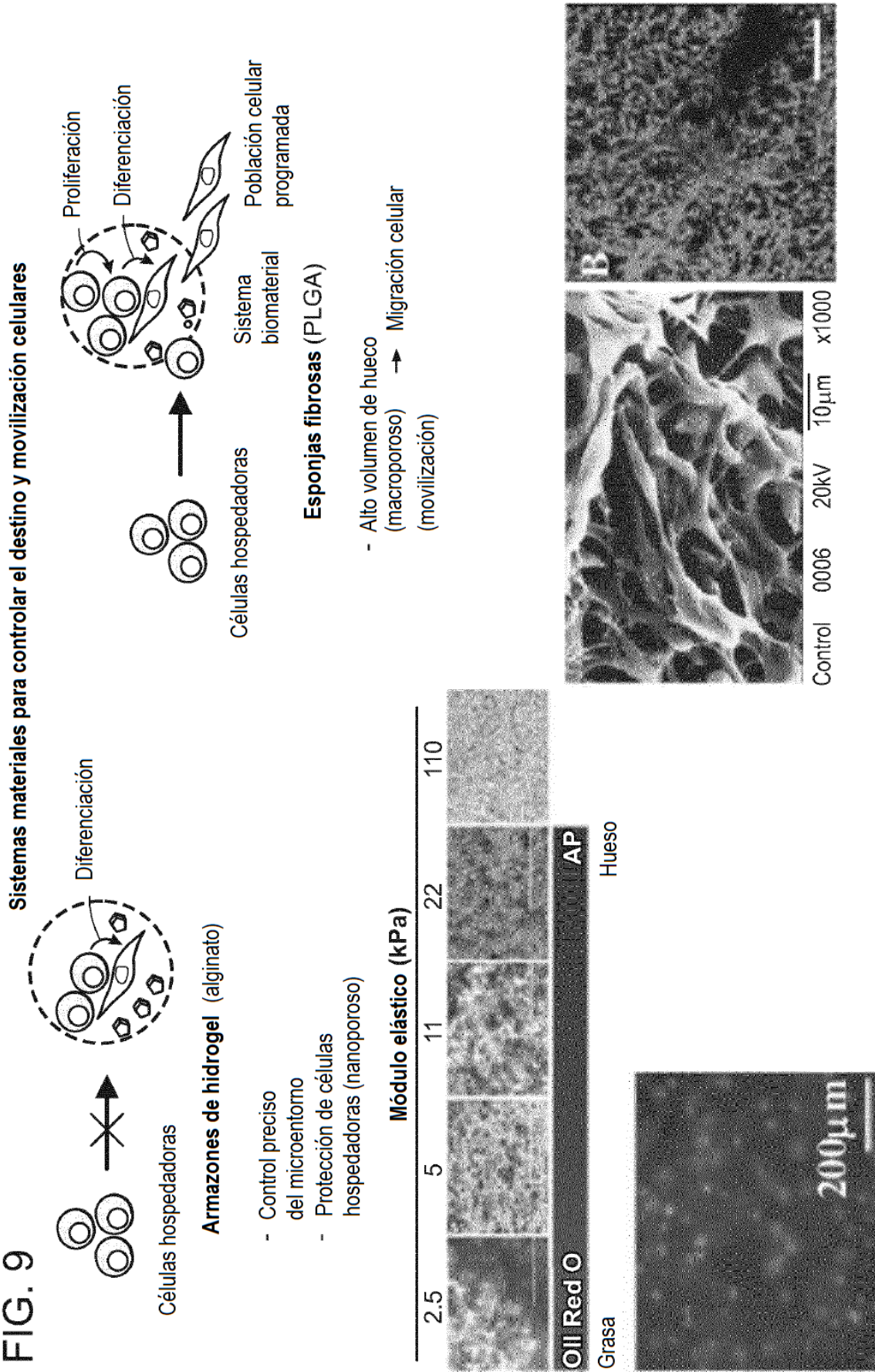


FIG. 10

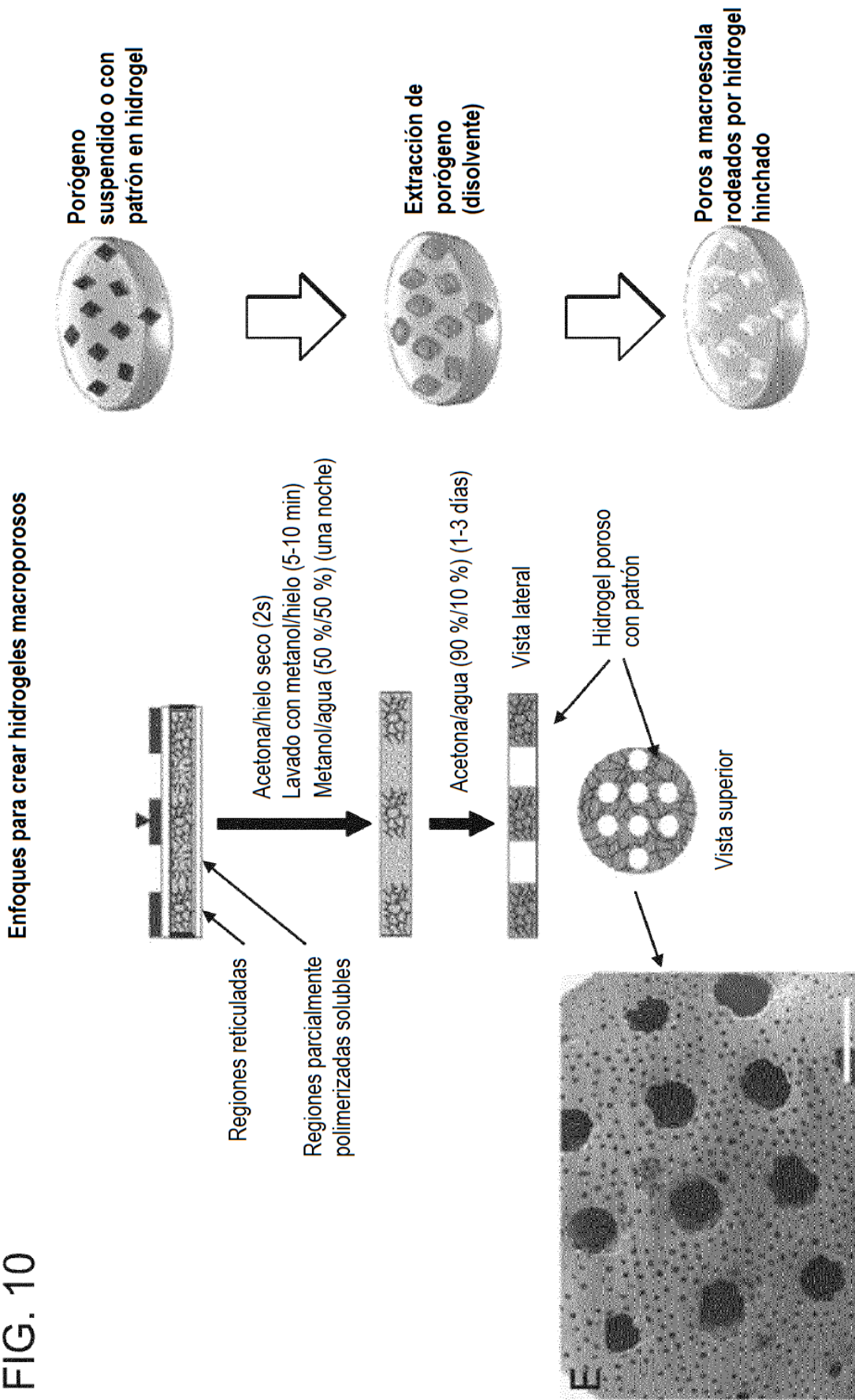


FIG. 11

Estrategia para formar hidrogeles encapsuladores de células inyectables que forman poros *in situ*

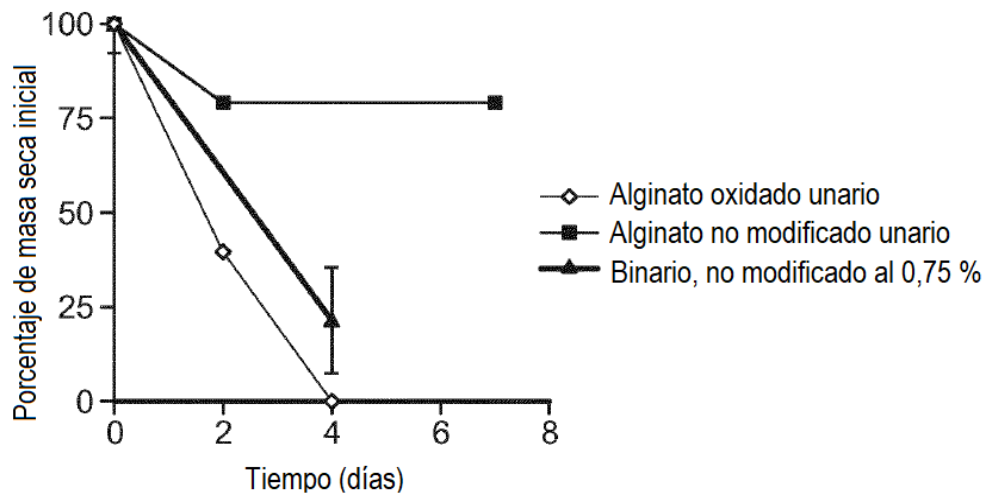
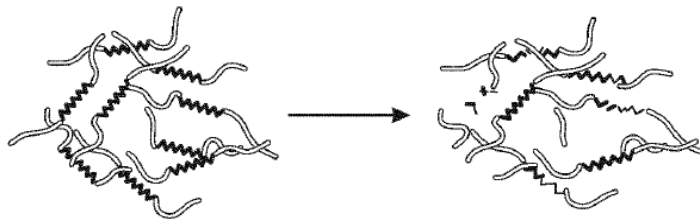
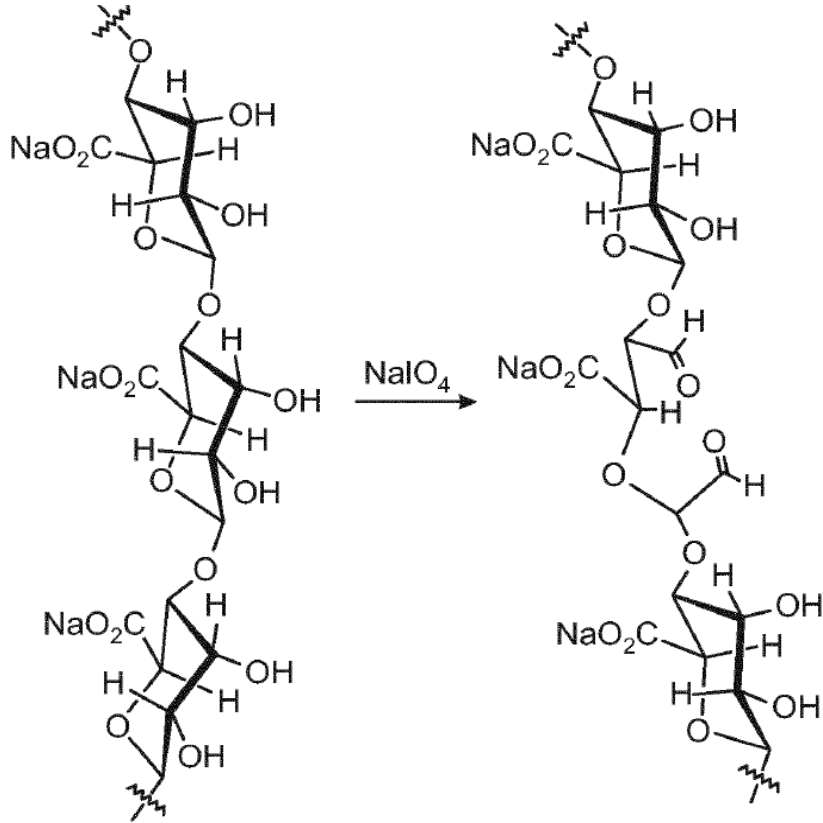


FIG. 12 Fabricación y caracterización de porógenos

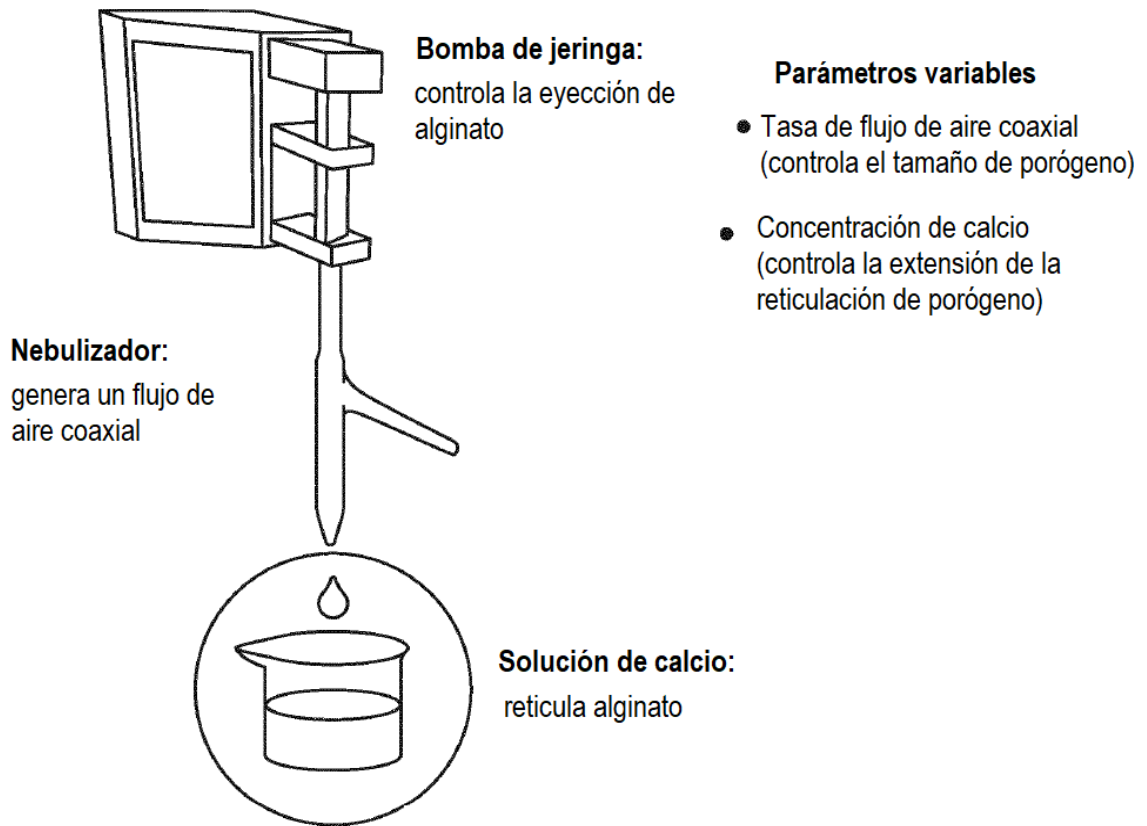
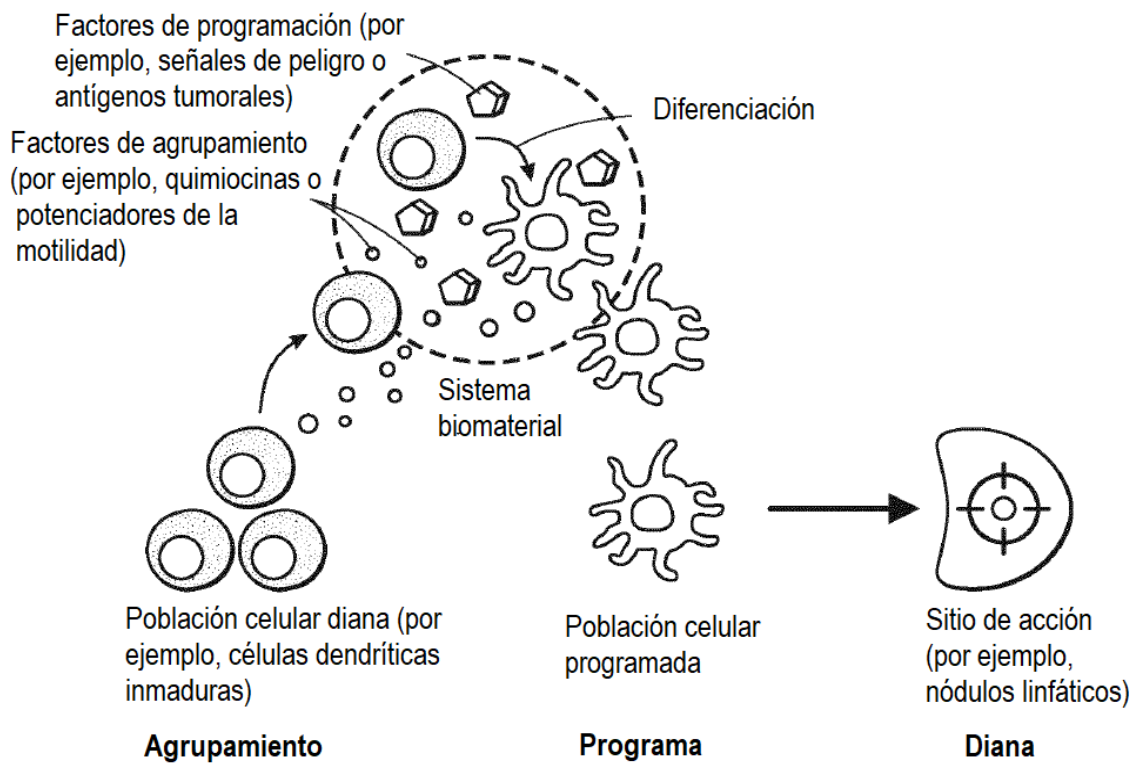
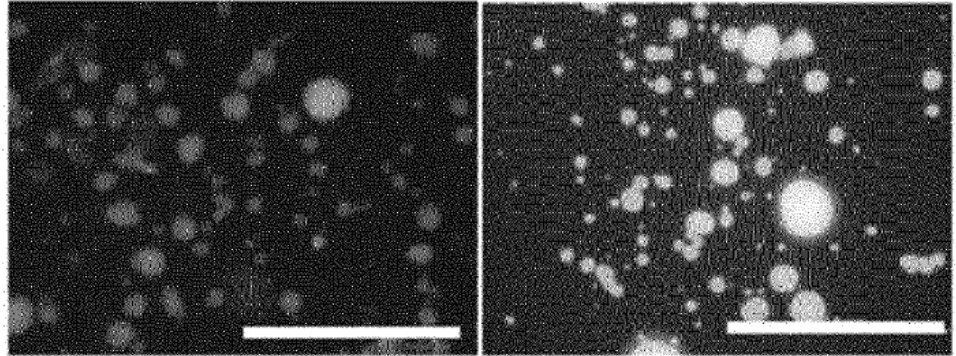


FIG. 13 Modificación de la química de porógeno para controlar el agrupamiento celular mediado por quimiocinas



Porógenos
inmediatamente
después de la
fabricación



Porógenos
después de
centrifugación y
mezclado

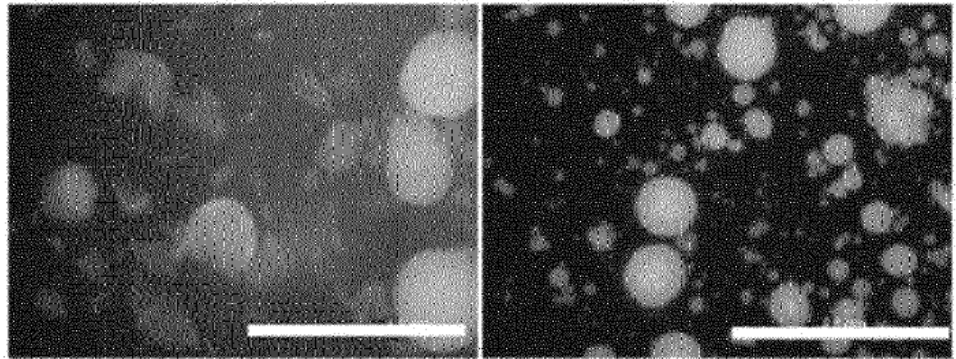


FIG. 14